



HAL
open science

Rôles des glutathion-S-transférases chez la cyanobactérie modèle *Synechocystis* PCC 6803

Xavier Kammerscheit

► **To cite this version:**

Xavier Kammerscheit. Rôles des glutathion-S-transférases chez la cyanobactérie modèle *Synechocystis* PCC 6803. Bactériologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS402 . tel-03402974

HAL Id: tel-03402974

<https://theses.hal.science/tel-03402974>

Submitted on 26 Oct 2021

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.

Rôles des glutathion-S- transférases chez la cyanobactérie modèle *Synechocystis* PCC 6803

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°577 – Structure et Dynamique des Systèmes
Vivants (SDSV)

Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 25/10/2019, par

Xavier KAMMERSCHEIT

Composition du Jury :

Stéphanie Bury-Moné Professeur des Universités, Université Paris-Sud (UMR 9198)	Président
Dimitris Petroutsos Chargé de Recherche, Université Grenoble-Alpes (UMR 5168)	Rapporteur
Xenie Johnson Chercheur CEA, Aix-Marseille Université (UMR 7275)	Rapporteur
Stéphane Lemaire Directeur de recherche, Sorbonne (FRE3354)	Examineur
Graham Noctor Professeur des Universités, Université Paris-Sud (UMR 9213)	Examineur
Franck Chauvat Chercheur CEA, Université Paris-Sud (UMR 9198)	Directeur de thèse

DEDICACE

A TOI MAMAN...

Maman ! Parti trop tôt,
Mon cœur est en sanglot.
Colérique et choqué je suis,
Depuis que tu es parti.

Maman ! Triste est mon regard,
Tant je vis un cauchemar.
Un peu beaucoup perdu,
Mais je ne reste pas abattu

Maman ! Montée vers le soleil,
Sache que tes amis sont de bons conseils.
Bien que rempli de chagrin,
Ils t'envoient un signe de la main.

...car...

Maman ! Montée aux cieux,
Sache que Papa reste amoureux.
Bien qu'en colère,
Il n'en est pas moins fier.

Maman ! Montée parmi les anges,
Sache que pour moi tout s'arrange.
Bien que rempli d'effroi,
Je te dédie ma thèse de doctorat.

Maman ! Montée vers les nuages,
Sache que frérot est devenu sage.
Bien que mécontent,
Petit Vincent est devenu grand.

Maman ! Aucun souci,
Depuis que tu es parti.
Vincent est un bon gars,
Papa est avec Vega.

Maman ! Montée vers la lumière,
Sache que ta famille est fière.
Bien qu'épris de tristesse,
Elle t'envoie toute sa tendresse.

Maman ! Aucun problème,
Ton petit dernier, te dit « je t'aime ».
Fils, Mari et normalien agrégé,
Nous serons ta fierté.

Je t'aime

TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	3
TABLE DES MATIERES.....	5
PREFACE.....	11
INTRODUCTION.....	15
CHAPITRE I - LES TERPENES : UNE FAMILLE DE MOLECULES AUX PROPRIETES INTERESSANTES	16
I. Définition, classification et structure des terpènes	16
A. <i>Définition et nomenclature usuelle</i>	<i>16</i>
B. <i>Classification structurale des terpènes</i>	<i>19</i>
C. <i>Analogie et diversification structurale des terpènes</i>	<i>23</i>
II. Voie de biosynthèse, toxicité et rôles biologiques chez les (cyano)bactéries	25
A. <i>Voie de biosynthèse des terpènes chez les cyanobactéries</i>	<i>25</i>
B. <i>Rôles biologiques de terpènes chez les (cyano)bactéries</i>	<i>27</i>
C. <i>Toxicité des terpènes chez les cyanobactéries</i>	<i>28</i>
II. Applications des terpènes.....	28
A. <i>L'usage historique des terpènes dans les industries cosmétiques et alimentaires.....</i>	<i>28</i>
B. <i>Les terpènes sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique.....</i>	<i>31</i>
C. <i>Les terpènes, des molécules d'avenir dans les industries chimiques et de l'environnement.....</i>	<i>33</i>
CHAPITRE II –LES CYANOBACTERIES.....	35
I. Les cyanobactéries : des origines de la vie aux biotechnologies.....	35
A. <i>Importance écologique des cyanobactéries sur la biosphère.....</i>	<i>35</i>
B. <i>Classification et taxonomie des cyanobactéries.....</i>	<i>40</i>
C. <i>Les cyanobactéries : des modèles d'étude aux biotechnologies</i>	<i>47</i>
II. Le métabolisme énergétique des cyanobactéries	54
A. <i>Introduction générale au métabolisme</i>	<i>54</i>
B. <i>La photosynthèse oxygénique chez les cyanobactéries.....</i>	<i>56</i>
C. <i>Les autres métabolismes : carbone et azote.....</i>	<i>86</i>
III. La gestion des stress chez les cyanobactéries	94

A.	<i>Introduction aux différents stress</i>	94
B.	<i>Les différentes sources de stress chez les cyanobactéries.....</i>	95
C.	<i>La gestion des stress chez les cyanobactéries</i>	107
CHAPITRE III - LES GLUTATHION-S-TRANSFERASE (GST) : DES ENZYMES		
CRUCIALE DANS LA DETOXIFICATION ET LA GESTION DES STRESS..... 122		
I. Définition, classification et évolution des GST..... 122		
A.	<i>Définition et dogme fonctionnelle des GST.....</i>	122
B.	<i>Historique de la découverte et de la classification des GST.....</i>	122
C.	<i>Evolution des GST.....</i>	130
II. Structure et caractéristiques des différentes classes de GST..... 135		
A.	<i>Structure et caractéristiques des GST cytosoliques</i>	135
B.	<i>Structure et localisation des GST mitochondriales</i>	143
C.	<i>Structure et localisation des GST membranaires ou MAPEG.....</i>	145
III. Activités et fonctions des GST..... 147		
A.	<i>Les différentes activités des GST.....</i>	147
B.	<i>Les différentes fonctions des GST.....</i>	154
C.	<i>Les GST chez les cyanobactéries</i>	167
<u>RESULTATS ET DISCUSSION</u> 170		
CHAPITRE I – ANALYSE DE LA TOXICITE DES TERPENES ET DE L’IMPLICATION		
DES GST DANS LA TOLERANCE AUX BIOCARBURANTS (TERPENES & ALCOOLS)		
171		
I. L’analyse systématique de la toxicité des terpènes et terpénoïdes		
révèlent leur 171		
A.	<i>Les terpènes sont des molécules toxiques pour Synechocystis</i>	171
B.	<i>La toxicité des terpènes dépend de leur structure tridimensionnelle</i>	175
C.	<i>La toxicité des terpènes dépend plus de la présence de groupements fonctionnels (aldéhyde, alcool, cétone) que de la longueur de leur chaîne carbonnée</i>	176
II. Analyse de la tolérance-sensibilité des mutants Δgst aux terpènes et		
aux alcools-solvants 179		
A.	<i>Résultats de l’analyse de la tolérance-sensibilité au limonène et au pinène.</i>	179
B.	<i>Résultats de l’analyse de la tolérance-sensibilité aux alcools-solvants.....</i>	180
C.	<i>Bilan des résultats</i>	180
CHAPITRE II – ÉTUDE DU ROLE DES GST DANS LA TOLERANCE AUX STRESS .. 182		

I – Les GST homologues Sll1545 et Slr0236 sont impliquées dans la tolérance au stress photo-oxydant	183
<i>A. Résumé du manuscrit</i>	<i>183</i>
<i>B. Format du manuscrit.....</i>	<i>184</i>
<i>C. Manuscrit n°1.....</i>	<i>184</i>
II – La GST Sll1147 de type MAPEG est requise dans la tolérance aux stress membranaires, une fonction conservée dans l'évolution des (cyano)bactéries à l'Homme.....	203
<i>A. Résumé du manuscrit</i>	<i>203</i>
<i>B. Format du manuscrit.....</i>	<i>204</i>
<i>C. Manuscrit n°2.....</i>	<i>204</i>
III – La GST Sll0067 : un nouvel acteur de la détoxification du méthylglyoxal	244
<i>A. Resumé de l'article</i>	<i>244</i>
<i>B. Format de l'article.....</i>	<i>245</i>
<i>C. Manuscrit n°3.....</i>	<i>245</i>
IV – Les GST Sll1902 et Slr0605 ont un effet sur l'assimilation du carbone	280
<i>A. Les gènes sll1902 et sll0605 ne sont pas essentiels à la croissance en photoautotrophie standard</i>	<i>280</i>
<i>B. La croissance du double mutant Δsll1902-slr0605 est ralentie en absence de carbone dissous dans le milieu.....</i>	<i>282</i>
<i>C. La composition en pigments est modifiée chez les mutants Δsll1902 et Δslr0605 et le double mutant Δslr0605-sll1902 par rapport à la souche WT</i>	<i>283</i>
<i>D. Les 2 simples mutants Δsll1902 et Δslr0605 présentent une accumulation transitoire et séquentielle de ROS, puis de glutathion réduit (GSH) et enfin de glutathion oxydé (GSSG) alors que le double mutant Δslr0605-sll1902 ne subit pas ces variations dans les conditions standard de photoautotrophie</i>	<i>285</i>
<i>E. Les mutants Δsll1902, Δslr0605 et Δslr0605-sll1902 accumulent transitoirement et de façon séquentielle des ROS et des caroténoïdes et présentent un niveau plus élevé de glutathion réduit (GSH) en réponse à une exposition à la lumière dans un milieu dépourvu de carbone dissous</i>	<i>286</i>
<u>MATERIELS ET METHODES.....</u>	<u>289</u>
CHAPITRE I – SOUCHES, MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE.....	290
I. Culture des cyanobactéries.....	290
<i>A. Souche modèle de cyanobactérie utilisée</i>	<i>290</i>

B.	<i>Milieux et conditions de culture des cyanobactéries</i>	290
II. Culture de Escherichia coli		291
A.	<i>Souches modèles d'Escherichia coli utilisées</i>	291
B.	<i>Milieux et conditions de culture des souches de Escherichia coli</i>	291
III. Conservation des souches		291
A.	<i>Congélation des souches de cyanobactéries</i>	291
B.	<i>Congélation des souches de Escherichia coli</i>	291
CHAPITRE II - CONSTRUCTION ET OBTENTION DES MUTANTS DE L'ETUDE.....		292
I. Méthodes classiques de biologie moléculaire		292
A.	<i>Méthodes d'extraction, de purification et de dosage d'ADN</i>	292
B.	<i>Méthodes de génération de fragments d'ADN par PCR et par digestion</i>	296
C.	<i>Méthodes de clonage et transformation</i>	299
II. Construction des mutants de délétion des gènes <i>gst</i>		303
A.	<i>Principe général de construction et d'obtention de mutants de délétion chez Synechocystis</i>	303
B.	<i>Construction des simples mutants de délétion</i>	304
C.	<i>Construction des doubles mutants de délétion <i>Δsll1545-slr0236</i> et <i>Δsll1902-slr0605</i></i>	309
III. Construction de mutants de complémentation fonctionnelle hétérologue chez <i>Synechocystis</i> et construction de plasmides de surexpression des GST cytosoliques de <i>Synechocystis</i>		310
A.	<i>Construction de mutants de complémentation fonctionnelle hétérologue <i>Δsll1147::pR-hmGST2/3-Sm^R/Sp^R</i></i>	310
B.	<i>Stratégie de construction du mutant <i>Δsll1147::pR-sll0067-Km^R</i></i>	312
C.	<i>Construction des plasmides de surexpression des gènes <i>gst</i> pour l'analyse biochimique et catalytique des GST de <i>Synechocystis</i></i>	313
CHAPITRE III - ANALYSE DES MUTANTS DE L'ETUDE.....		314
I. Analyse phénotypique de tolérance-sensibilité aux stress chez les mutants <i>Δgst</i>		314
A.	<i>Objectifs, stratégie générale et stress étudiés</i>	314
B.	<i>Recherche systématique de phénotypes par analyse comparative</i>	316
C.	<i>Courbe de croissance</i>	321
II. Analyse métabolique et physiologique de la réponse au stress chez les mutants <i>Δgst</i>		322

A.	<i>Analyse quantitative des marqueurs du stress oxydant et métabolique</i>	<i>322</i>
B.	<i>Analyse quantitative de l'équilibre redox du couple GSH/GSSG en réponse aux stress.....</i>	<i>336</i>
C.	<i>Analyse de la pigmentation en réponse aux stress</i>	<i>344</i>
III - Analyse biochimique et enzymatique de l'activité des GST recombinantes de Synechocystis		346
A.	<i>Production et purification des GST recombinantes de Synechocystis</i>	<i>346</i>
B.	<i>Caractérisation des activités enzymatiques des GST recombinantes de Synechocystis</i>	<i>346</i>
C.	<i>Etude de l'activité enzymatique de la GST recombinante Sll0067 de Synechocystis sur le méthylglyoxal et le glutathion.....</i>	<i>347</i>
<u>POSTFACE.....</u>		<u>352</u>
<u>REFERENCES</u>		<u>360</u>
<u>ANNEXES</u>		<u>381</u>
<u>REMERCIEMENTS</u>		<u>393</u>

PREFACE

Les données présentées dans ce manuscrit sont le fruit de 3 années d'un travail mené sous la direction du Docteur Franck CHAUVAT et du docteur Corinne CASSIER-CHAUVAT, que j'ai accompli dans leur Laboratoire de « Biologie et de Biotechnologies des Cyanobactéries (LBBC) » situé au CEA de Saclay. En toute cohérence avec l'intitulé du laboratoire, ce projet s'est construit et a été mené dans une indispensable synergie entre recherche fondamentale et recherche appliquée, puisqu'une meilleure compréhension du métabolisme des cyanobactéries est indispensable aux avancées biotechnologiques.

Sur le plan fondamental, les cyanobactéries sont perçues comme les organismes procaryotes qui sont à l'origine de la photosynthèse oxygénique qui a façonné l'atmosphère de notre atmosphère en utilisant l'énergie solaire, l'eau et le CO₂ pour produire une grande partie de la biomasse et de l'oxygène (O₂) nécessaire à notre chaîne alimentaire. Confrontées aux espèces réactives de l'oxygène souvent désignées « ROS » (Reactive Oxygen Species) inévitablement produites par leur métabolisme photo-autotrophique (par exemple sous forte lumière), les cyanobactéries ont développé une panoplie de systèmes (dit anti-oxydants) dont certains ont été conservés chez les plantes et les mammifères. Parmi ces acteurs importants, on trouve le tripeptide glutathion (γ -glutamyl-cystéinyl-glycine) qui joue un rôle dans la protection contre les stress (notamment (photo)oxydant et métabolique) comme cela sera une nouvelle fois montré et discuté (mais aussi précisé) dans cette thèse. Le glutathion existe sous deux formes, l'une réduite (monomérique, notée GSH) et l'autre, oxydée (dimérique, notée GSSG, où les deux monomères sont liés entre-eux par un pont disulfure). Le glutathion réduit sert de donneurs d'électrons à une panoplie d'enzymes (anti-oxydantes et/ou de détoxification), telles que les glutathion-S-transférases qui ont été analysées en détail au cours de cette thèse. Ce transfert d'électrons aboutit à l'oxydation du glutathion, qui peut ensuite être re-réduit par l'enzyme glutathion réductase qui utilise les électrons fournis par le NAD(P)H (il est oxydé en NAD(P)⁺).

Les glutathion-S-transférases (GST) sont perçues comme des enzymes de détoxification qui conjuguent le glutathion sur des molécules toxiques hydrophobes (le plus souvent des électrophiles) ce qui altère leurs propriétés physico-chimiques (diminution de l'hydrophobicité du toxique, étiquetage) et biologiques (neutralisation) et facilite ainsi leur élimination (dégradation et/ou excrétion) des cellules et/ou des organismes. Comme un grand nombre de ces études concernent les GST de mammifères ou de plantes, leur activité a été testée avec des xénobiotiques qui touchent la santé humaine ou animale (drogues, médicaments, polluants...) et le développement des plantes (pesticides). Ainsi de nombreux laboratoires ont étudié l'influence de xénobiotiques sur l'activité GST d'un organisme ou de ses tissus. Ils ont également l'activité de conjugaison avec le CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène), un substrat qui s'est imposé comme standard dans les tests *in vitro* d'activité GST, en dépit que certaines GST ne soient pas capables de conjuguer le GSH au CDNB.

Il est apparu que les GST constituent une superfamille de protéines dont la classification repose sur leur séquence primaire en acides-aminés; leur structure, leur réactivité immunologique et sur leurs activités. Ainsi, les GST de plantes (50 à 90, selon la plante) ont été réparties en 14 classes dont 5 spécifiques aux plantes; tandis que les 27 GST humaines sont actuellement catégorisées en 7 classes. Cependant la classification actuelle n'est pas rigoureuse car elle n'est pas issue de l'analyse systématique de la sélectivité/redondance des GST. Ceci est dû au fait que cette étude est très complexe chez

eucaryotes supérieurs en raison de (i) la multiplicité des GST (chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, on compte 55 GST et chez l'homme 27 GST ont été identifiées et (ii) de la différenciation cellulaire et tissulaire, et du développement de ces eucaryotes supérieurs.

Même chez les cyanobactéries qui possèdent un petit nombre de GSTs (par exemple 6 chez la cyanobactérie modèle *Synechocystis* PCC 6803), on connaît mal la fonction des GST. C'est pourquoi, au laboratoire nous avons décidé d'analyser en détail leur sélectivité/redondance chez un organisme simple la cyanobactérie *Synechocystis* PCC 6803 qui présente les atouts suivants. *Synechocystis*, la cyanobactérie la plus étudiée, est unicellulaire, et dotée d'un petit génome (3.95 Mb) entièrement séquencé (voir CyanoBase : <http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>) et facilement manipulable grâce aux techniques et aux outils largement développés au laboratoire (inactivation génique, surproduction de protéines régulée ou constitutive, et localisation subcellulaire de protéines). *Synechocystis* possède 6 GST désignées SII0067, SII1147, SII1545, SIIr0236, SII1902 et SIIr0605 dans CyanoBase. **L'objectif de notre travail combinant les approches *in vivo* et *in vitro* est d'identifier la fonction et l'activité de chacune des 6 GST de *Synechocystis*.** Lorsque j'ai commencé mon travail, quelques analyses *in silico* et *in vitro* (conjugaison du GSH avec quelques xénobiotiques) avaient identifié des GST rangées les classes suivantes :

- Rho pour les cyanobactéries *Synechococcus elongatus* PCC 6301, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 et *Synechocystis* (SII1545),
- Chi pour *Synechocystis* (SII0067) qui est très active envers les isothiocyanates,
- MAPEG (Membrane-Associated Protein involved in Ecosanoïd and Glutathione metabolism) pour *Synechocystis* (SII1147).

Par contre, aucune GST cyanobactérienne n'avait été analysé *in vivo*.

C'est dans ce contexte que mon projet de thèse s'est concentré sur la problématique de l'identification et de la caractérisation du ou des rôle(s) des GST chez *Synechocystis* et de leur possible redondance et sélectivité fonctionnelle.

Sur le plan appliqué, les cyanobactéries sont également perçues comme des usines cellulaires de 3^{ème} génération puisque leur métabolisme n'utilise que des composés durables et renouvelables (énergie solaire, CO₂ atmosphérique, eau y compris des eaux polluées). Elles sont donc activement utilisées pour la photoproduction de composés d'intérêt (substances pharmaceutiques : molécules antioxydantes, antitumorales, antimicrobiennes ; molécules plateformes pour la chimie ; biocarburants : alcools, terpènes...), grâce aux nombreux outils génétiques facilement utilisables chez les cyanobactéries et à leur photosynthèse qui convient aux enjeux de la transition écologique. C'est justement dans ce contexte de recherche de nouvelles sources d'énergie durables et respectueuses de l'environnement que les cyanobactéries sont modifiées et étudiées. En effet, l'énergie est primordiale pour l'industrie moderne et la vie quotidienne. En 2008, 5,7.10²⁰ Joules ont été consommés dans le monde parmi lesquels 80% ont été générés par la combustion de carburants fossiles, relâchant 6 gigatonnes de CO₂, un gaz à effet de serre. Les questions portant sur la disponibilité et la dépendance à l'énergie et sur l'impact environnemental des énergies fossiles poussent la communauté scientifique et industrielle à développer de nouvelles sources d'énergies.

Parmi elles, l'énergie solaire est une source naturelle attractive puisque disponible et inépuisable. Le flux solaire annuel reçu par la Terre, d'environ 5.10²⁴ Joules, est en excès par

rapport à la consommation mondiale en énergie. Par conséquent, il y a un intérêt croissant pour les procédés combinant la production de biocarburants (alcools, alcanes, terpènes...) à la capture du CO₂ via les cyanobactéries qui ne nécessitent donc que de l'énergie solaire, du CO₂ et de l'eau (y compris non potable). Les biocarburants à l'étude par la communauté scientifique internationale sont principalement les alcools (mélangeables à l'essence) et les alcanes (précurseurs de diesel). Très récemment, quelques laboratoires ont initié des projets visant à produire des terpènes, tels que le β-phellandrène et le limonène, car ces molécules, naturellement produites par les plantes, sont des précurseurs très énergétiques du kérosène pour l'aviation (l'addition de terpènes au diesel produit du kérosène).

Néanmoins, les faibles rendements de production sont une problématique récurrente qui nécessite une meilleure compréhension au niveau fondamental des cyanobactéries sur des divers aspects. Pour minimiser les instabilités génétiques liées à la surproduction de gènes hétérologues, une meilleure compréhension des mécanismes de réparation de l'ADN sont essentiels. L'étude de la photosynthèse, du métabolisme et des réseaux de régulation peuvent permettre de lever certains verrous métaboliques, d'améliorer les rendements de la photosynthèse et d'optimiser les enzymes du cycle de Calvin pour augmenter l'incorporation du carbone. Enfin, la plupart des molécules d'intérêts sont généralement toxiques. Dans le cas des terpènes, aucune étude n'a été amorcée pour identifier et comprendre leur toxicité. De plus, l'amélioration des rendements de production par la construction de souches plus tolérantes passe nécessairement par une meilleure compréhension des mécanismes de gestion des toxiques et des stress.

Parmi ces mécanismes, les GST sont attractives car elles pourraient participer aux mécanismes de détoxification des biocarburants, ces derniers pouvant être considérés comme des xénobiotiques puisqu'ils ne sont pas naturellement produits par les cyanobactéries. Si une GST conjuguait au GSH un terpène produit par une souche, cela ne serait pas nécessairement intéressant sur le plan biotechnologique puisque des étapes supplémentaires de purification/extraction seraient nécessaires. Cependant, rien ne présume du rôle direct des GST dans la tolérance aux biocarburants que le LBBC souhaite produire. Il est tout à fait envisageable que les GST participent indirectement à la tolérance aux terpènes en gérant le ou les stress qu'ils produisent.

Dans cet objectif, mon projet de thèse a également porté sur l'analyse de la toxicité des terpènes et sur l'implication possible des GST dans la tolérance-sensibilité aux biocarburants (terpène et alcools).

Pour répondre à ces 2 enjeux et problématiques, je présenterai tout d'abord dans la section « INTRODUCTION » : (i) l'importance fondamentale et biotechnologique des cyanobactéries en raison de la synergie entre recherche fondamentale et appliquée, (ii) le métabolisme et la physiologie des cyanobactéries et (iii) les différents stress auxquels elles sont confrontées ainsi que les stratégies et mécanismes qu'elles ont développés pour les combattre, afin de bien resituer de façon intégrée le rôle des GST que j'ai identifiés.

La partie « MATERIELS ET METHODES » développera l'ensemble des techniques et des méthodologies utilisées au cours de ce projet. Elle est présentée de façon plus technique qu'à l'accoutumée en raison de mon passé d'étudiant en Section de Technicien Supérieur et que je suis convaincu que les détails techniques que j'y présente seront utiles au laboratoire pour continuer à utiliser des techniques que j'ai grandement contribuées à développer.

Enfin, la dernière partie « RESULTATS ET DISCUSSION » s'appuiera essentiellement sur les différents manuscrits que j'ai eu la chance de rédiger en collaboration avec mes encadrants. Parmi eux, le premier qui a été accepté dans la revue *Frontiers in microbiology* montre l'implication des GST homologues Sll1545 et Slr0236 dans la gestion du stress photo-oxydant. Le second récemment soumis à la revue *Frontiers in microbiology* et traite du rôle conservé dans l'évolution des MAPEG dans la tolérance aux stress membranaires. Le rôle de la GST Sll0067 sera également présenté puisqu'il remet en cause le dogme selon lequel le méthylglyoxal, un oxoaldéhyde ubiquitaire est détoxifié par une première étape non-enzymatique. Enfin, l'analyse du rôle des GST Sll1902 et Slr0605 sera présentée de façon plus classique tout comme l'analyse de la toxicité des terpènes et de la tolérance-sensibilité de mutants dépourvus de GST.

INTRODUCTION

CHAPITRE I - LES TERPÈNES : UNE FAMILLE DE MOLECULES AUX PROPRIETES INTERESSANTES

I. Définition, classification et structure des terpènes

A. Définition et nomenclature usuelle

1) Origine du mot terpène

Le terme terpène est issu de mot anglais *turpentine* (térébenthine, *lat. Balsamum terebinthinae*). L'essence de térébenthine dit « résine de pin » est un liquide visqueux odorant qui coule après la coupe et le taillage du bois et de l'écorce de plusieurs espèces de pin (*Pinaceae*). La térébenthine contient des « acides résineux » et certains hydrocarbures appelés terpènes. Traditionnellement, tous les composés naturels construits à partir de l'unité isoprène – provenant pour la plupart des plantes – sont des terpènes.

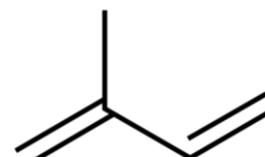


Figure 1 – Structure de l'unité isoprène

2) Définition et structure générale des terpènes

Les terpènes sont une large famille de composés organiques naturels (au moins 55 000) (Davies et al., 2015) de type hydrocarbure et de formule générale $(C_5H_8)_n$ dont la structure suit la règle de l'isoprène établie par Ruzicka et Wallach en 1953-1959 (Ruzicka, 1953).

Cette règle repose sur une unité de base, le 2-méthyl-1,3-butadiène ou isoprène (C_5H_8), un hémiterpène à 5 carbone. Cette règle est représentée dans la figure ci-après avec un alcane analogue à l'isoprène, le 2-méthylbutane (d'après (Breitmaier, 2006a)). Elle montre que les terpènes dérivent d'un point de vue structural de l'unité isoprène (2-méthylbutane). Ainsi, chacune des classes de terpènes correspond à un nombre précis d'unité isoprène (2-méthylbutane). On distingue alors les terpènes en fonction de ce nombre et/ou du nombre de carbones de la manière suivante : les *hemi-* (C_5), *mono-* (C_{10}), *sesqui-* (C_{15}), *di-* (C_{20}), *sester-* (C_{25}), *tri-* (C_{30}), *tetra-* (C_{40}) et *polyterpènes* ($>C_{40}$).

D'après cette règle, en se basant sur le modèle du 2-méthylbutane, son groupement isopropyl est défini comme étant la « tête » de la molécule alors que le groupement éthyl correspond à la « queue ». Tel que représenté dans la figure ci-après, les unités isoprène (2-méthylbutane) sont reliées entre elles par une liaison « tête-à-queue » pour les *mono-* (C_{10}), *sesqui-* (C_{15}), *di-* (C_{20}) et *sesterterpènes* (C_{25}). Pour les *tri-* (C_{30}) et *tétraterpènes* (C_{40}), une liaison « tête-à-tête » est présente au centre de la molécule, correspondant respectivement à l'assemblage de 2 sesquiterpènes ($2 \times C_{15}$) et de 2 diterpènes ($2 \times C_{20}$). L'assemblage successif des unités isoprène produits des molécules linéaires comme présentées dans la figure ci-après mais conduit également à la formation de composés cycliques (Davies et al., 2015).

Bien que des terpènes linéaires relativement simples d'un point de vue structural soient représentés dans la figure ci-dessous, la nomenclature systématique selon l'IUPAC qui y est associé se révèle assez complexe pour une dénomination courante. Néanmoins, le comité américain de nomenclature en chimie organique a posé les règles de nomenclature des monoterpènes acycliques, monocycliques et bicycliques (pour revue (Crane, 1955; Chizzola,

2013)). Elle est utilisée dans les manuels et les bases de données, mais reste trop complexe pour un usage courant au regard de l'énorme diversité des terpènes. En pratique, chaque terpène possède un nom basé et tenant compte principalement de la plante source comme par exemple le pinène issu majoritairement du pin (*Pinus*), et l'eucalyptol provenant de l'eucalyptus. Dans le reste de ce mémoire, les noms usuels seront utilisés.

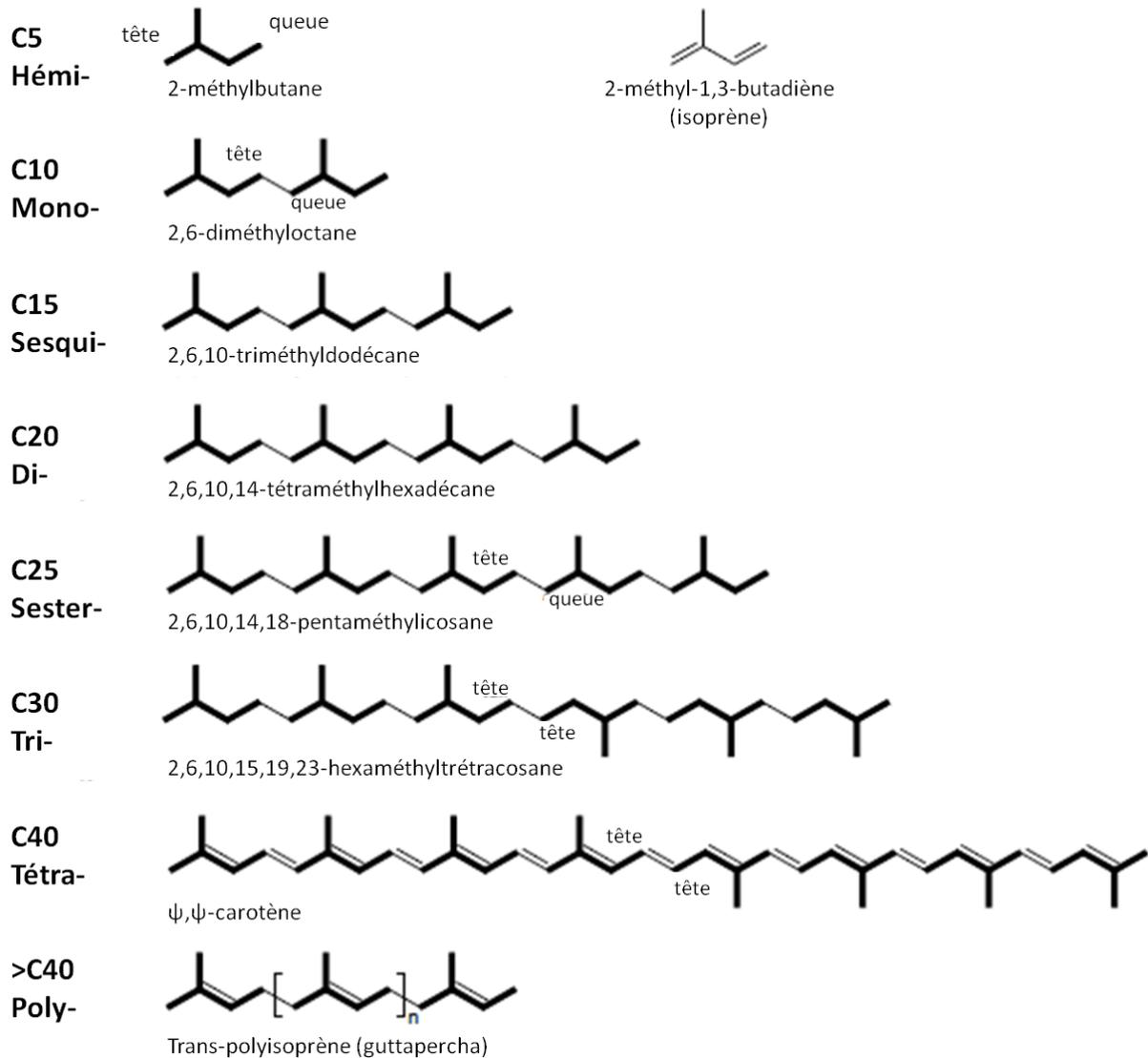
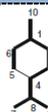
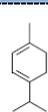
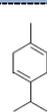
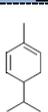
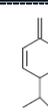
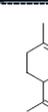
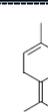
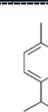
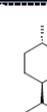
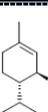
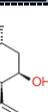
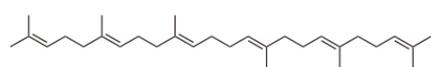
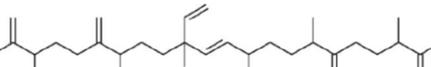
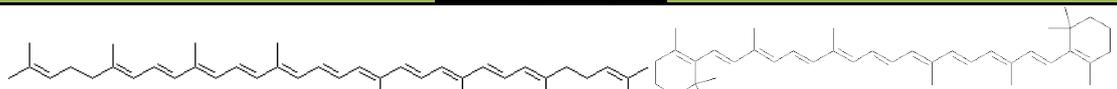
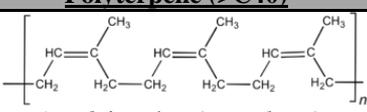


Figure 2 – Représentation schématique de la classification selon la règle de l'unité isoprène

Tableau 1 – Classification des terpènes et terpénoïdes

Hémiterpènes (C5)												
												
Monoterpènes (C10)												
<i>Monoterpènes acycliques</i>												
 myrcene	 Z-β-ocimène	 E-β-ocimène	 linalool	 geraniol	 nerol	 citronellol	 geranial (E-citral)	 neral (Z-citral)	 Z-isocitral	 citronellal		
<i>Monoterpènes monocycliques ou p-menthane terpènes</i>												
 menthane	 α-terpinène	 γ-terpinène	 α-phellandréne	 β-phellandréne	 limonène	 terpinolène	 p-cymène	 menthol	 trans-piperitol	 isopulegol	 trans-pulegol	 trans-carveol
<i>Monoterpènes bicycliques</i>												
Structure cyclique de type « carane/thujane »												
 Δ-3-carene	 thujane	 α-thujène	 sabinène									
Structure cyclique de type « pinane »												
 pinane	 α-pinène	 β-pinène	 trans-verbenol	 cis-chrysanthenol	 pinocampheol	 verbenone	 trans-pinocampnone	 trans-pinocarveol	 pinocarvone			
Structure cyclique de type « camphane/fenchane »												
 camphène	 α-fenchène	 endo-fenchol	 borneol	 fenchone	 camphor							
Sesquiterpènes (C15)												
<i>Sesquiterpènes acycliques</i>												
 Z-β-farnésène	 E-β-farnésène	 E,E-α-farnésène	 2E,6E-farnésol	 α-sinensal	 β-sinensal	 E-nerolidol						
<i>Sesquiterpènes cycliques</i>												
Diterpènes (C20)												
 Phytol (chaîne latérale de la chlorophylle)												
Triterpènes (C30)												
 Squalène			 Botryococcène				 Stérol					
Tétraterpènes (C40)												
 Lycopène β-carotène												
Polyterpène (>C40)												
 cis-polyisoprène (caoutchouc)												

B. Classification structurale des terpènes

Comme déjà évoqué précédemment, la classification des terpènes repose sur 2 principaux critères : (i) le nombre de carbones ou d'unités isoprène (C_5H_8) (la molécule d'isoprène comporte 5 atomes de carbone et représente l'unique membre des hémiterpènes (C_5)) contenus dans leur molécule et (ii) la structure du squelette carboné « mère » pour lequel, on distingue les structures (a.) acycliques ou (b.) cycliques subdivisées en fonction du (α) nombre de cycle : mono-, bi- ou polycyclique(s) et du (β) motif de cyclisation « mère » (cycle p-menthane, pinane, thujane...(pour revue(Breitmaier, 2006a, 2006b, 2006c, 2006d, 2006e, 2006f, 2006g, 2006h)), critère pour lequel il existe une énorme diversité de cycle. La classification tenant compte de l'ensemble de ces critères est présentée dans le tableau ci-avant et comme suit (d'après (Crane, 1955)(Breitmaier, 2006a, 2006b, 2006c, 2006d, 2006e, 2006f, 2006g, 2006h)(Chizzola, 2013)) :

- **les hémiterpènes (C_5)** ou isoprène

- **les monoterpènes (C_{10} , 2 unités isoprène) :**
 - o les monoterpènes acycliques, dont le myrcène, le Z- β -ocimène et le E- β -ocimène sont les plus retrouvées dans les huiles essentielles (voir tableau I)

 - o les monoterpènes cycliques, subdivisés en 3catégories selon le nombre et la nature des cycles considérés :
 - *les monoterpènes monocycliques :*
 - de type A (dérivé 1-methyl-4-isopropyl-cyclohexane ou p-menthane) qui comprend le α -terpinène, le γ -terpinène, le α -phellandrène, le β -phellandrène, le α -terpinolène et le limonène (Chizzola, 2013). Les monoterpènes de type A résultent de différents réarrangements du cation γ -terpinyl portant sur la position de doubles liaisons.
 - de type B (dérivé du 1-diméthyl-cyclohexane) dont le β -cyclogeraniolène, le α -pyronène et le cyclodihydromyrcène font partie (Crane, 1955).

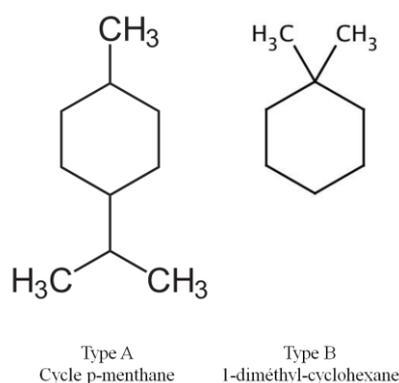


Figure 3 – Structure des dérivés de type A et B pour les monoterpènes monocycliques

- *les monoterpènes bicycliques*, sont classés en fonction du squelette cyclique sur lequel ils reposent :
 - *les composés bicycliques de type bicyclohexane* présentent une structure basée sur un cycle de type bicyclo[3.1.0]hexane qui correspond à la présence d'un cyclopropane intégré et relié au

cyclohexane au niveau des carbones C2 et C4 (Crane, 1955). Les principaux terpènes dérivant de cette structure sont le α -thujène et le sabinène et forment les *dérivés terpéniques de type « thujane/sabinane »*

- les composés bicycliques de type bicycloheptane sont de 3 catégories :
 - les *dérivés terpéniques de type « carane »* ont un cycle du type bicyclo[4.1.0]heptane (Crane, 1955). Il s'agit d'un cyclopropane relié par une liaison additionnelle entre le C5 et le C8 du cycle p-menthane. Le principal représentant est le δ -3-carène retrouvé dans l'essence de térébenthine obtenus à partir du pin (*Pinus*) et des sapins (*Abies*),
 - les *dérivés terpéniques de type « bornane »* sont tous basés sur le bicyclo[2.2.1]heptane via une liaison établie entre les carbones C1 et C8 (Crane, 1955). On retrouve majoritairement dans les huiles essentielles le camphène et le fenchène (Chizzola, 2013) qui possèdent respectivement un sous type de squelette carboné, le camphane et le fenchane,
 - les *dérivés terpéniques de type « pinane »* reposent sur le bicyclo[3.1.1]heptane par addition d'une liaison entre les carbones C6 et C8 (Crane, 1955). Les composés majeurs de type pinane sont le α - et le β -pinène retrouvés dans les huiles essentielles de pin (*Pinus*) (Chizzola, 2013)

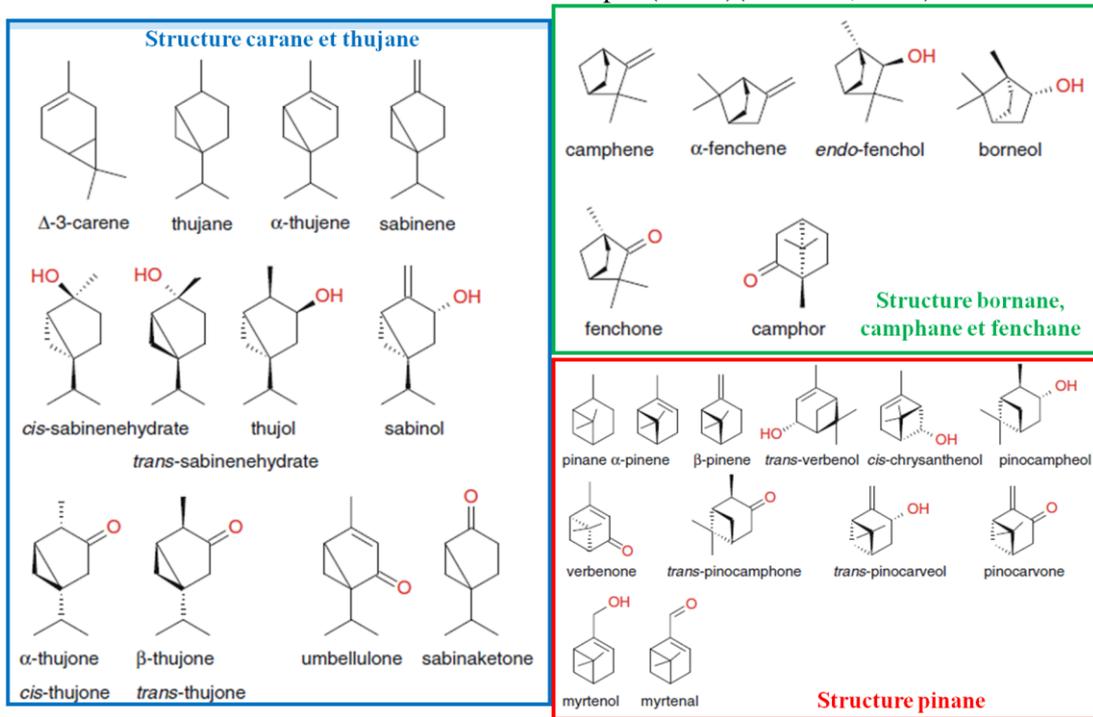


Figure 4 – Structure de quelques monoterpènes bicycliques

- les *monoterpènes tricycliques* présentent un tricyclic de type [2.2.1.0] comme le tricyclène, le principal composé de l'huile essentielle des feuilles du cotonnier créole (*Gossypium barbadense*).

- **les sesquiterpènes (C15, 3 unités isoprène) :**

- les sesquiterpènes acycliques : les différents isomères du farnésène sont des hydrocarbures ramifiés et comprennent 4 doubles liaisons. Le E,E- α -farnésène et le E- β -farnésène sont couramment retrouvés dans les huiles essentielles alors que le E,Z- α -farnésène et le Z,Z- α -farnésène ne sont pas retrouvés dans la nature.

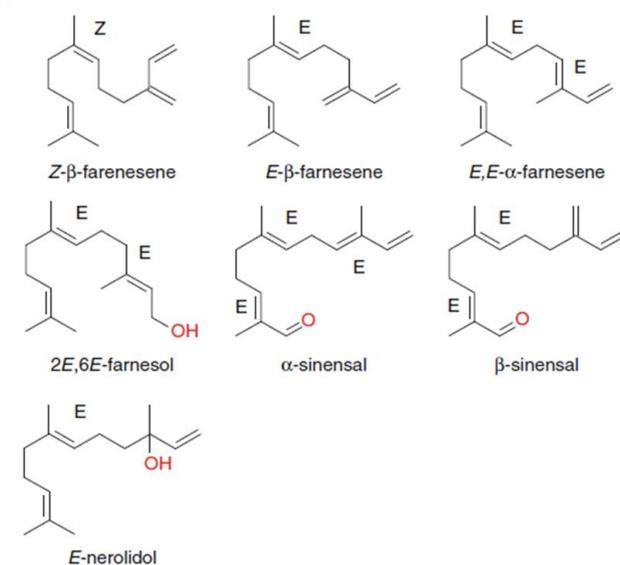
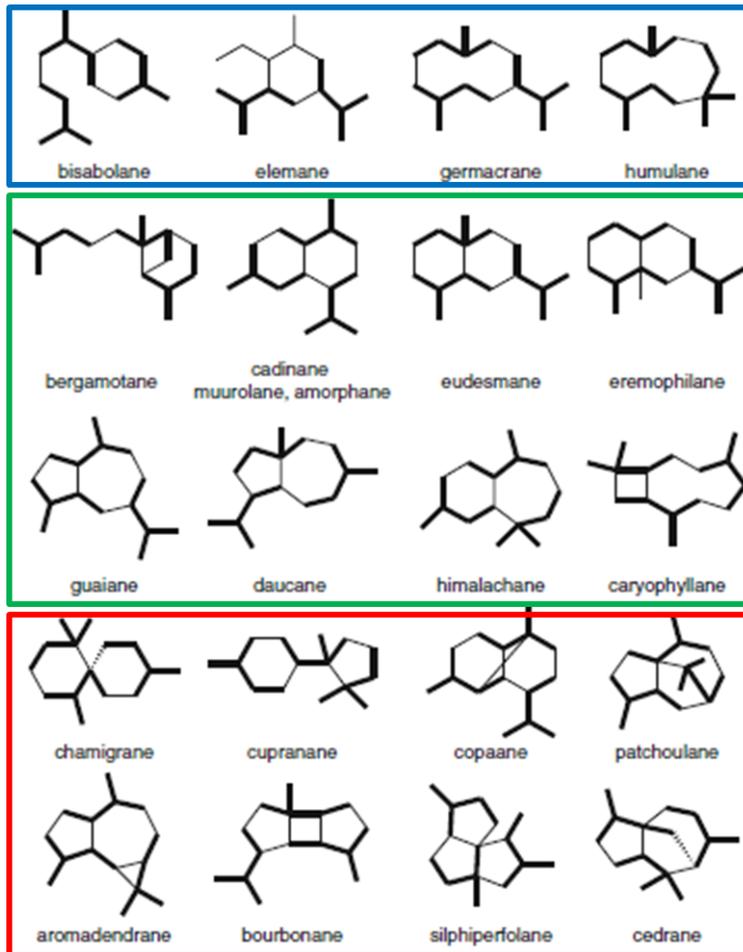


Figure 5 – Structure de quelques sesquiterpènes linéaires

- les sesquiterpènes cycliques : le repliement de la chaîne farnésyl, durant sa biosynthèse, permet d'obtenir une grande diversité de structure cyclique dont les plus importantes sont représentées dans la **figure X** et sont classés en 2 groupes :
 - *les monocycliques* comme par exemple, les isomères du bisabolène (Z- α -bisabolène, β -bisabolène, E- γ -bisabolène, Z- γ -bisabolène) qui dérive du squelette carboné cyclique à 6 carbones, le bisabolane. Les germacrènes et le α -humulène, quant à eux, présentent respectivement une structure cyclique à 10 et à 11 carbones.
 - *les bi- et tricycliques* sont fréquemment retrouvés dans les huiles essentielles et offrent une grande diversité de structure. Les bergamotènes présente un cycle de type cyclobutane. Les dérivés terpéniques du cadinane, murolane et amorphane possèdent un système à 2 cycles substitués par un groupement isopropyl et 2 groupements méthyl. Le β -caryophyllène, qui dérive du α -humulène, présente lui, un cycle à 9 carbones fusionné à un cyclobutane.



Monocyclique
Bicyclique
Tricyclique

Figure 6 – Structure des principaux cycles de base des sesquiterpènes cycliques

- **les diterpènes (C₂₀, 4 unités isoprène)** : le phytol, un constituant majeur des chlorophylles fait partie des diterpènes
- **les sesterterpènes (C₂₅, 5 unités isoprène)** :
- **les triterpènes (C₃₀, 6 unités isoprène)** : squalène, précurseur du cholestérol
- **les tétraterpènes (C₄₀, 8 unités isoprène)** : caroténoïdes
- **les polyterpènes (>C₄₀, >8 unités isoprène)** : comme le caoutchouc (ci-1,4-polyisoprène) qui est le terpène présentant la chaîne carbonée la plus longue composée de plus de 100 000 unités isoprène.

C. Analogie et diversification structurale des terpènes

1) Quelques observations d'analogie structurale

En dépit de cette classification, les terpènes présentent de fortes analogies structurales. Ceci provient du fait qu'ils dérivent tous d'une unique unité de base, l'isoprène. En considérant la voie de biosynthèse des terpènes, les terpènes sont synthétisés à partir d'une molécule matrice (le diméthylallylpyrophosphate DMAPP (C5)) sur lequel se greffe par polymérisation successive une unité de base (l'isopentenylpyrophosphate IPP (C5)).

Ainsi, les terpènes acycliques présentent une forte analogie structurale, seul leur nombre d'unité isoprène étant variable. De la même manière, les mono- et sesquiterpènes acycliques n'ont pas été représentés de manière linéaire pour rendre compte de l'analogie structurale qui existe entre eux. Ce mode de représentation souligne également l'apparenté structurale qui coexiste entre les monoterpènes acycliques et les p-menthane terpènes. D'autres exemples renforcent cette notion. C'est le cas du squelette bisabolane qui comporte un cycle à 6 carbones et présente une analogie structurale avec le cycle p-menthane. Les bergamotènes ont un cycle de type cyclobutane similaire au pinène.

Parmi les monoterpènes cycliques, une dernière classe a été décrite (Chizzola, 2013). Il s'agit des monoterpènes mono- ou bicycliques à O-hétérocycles. Ils ont une analogie avec certains monoterpènes monocycliques de type A (p-menthane), puisqu'une réaction intramoléculaire avec des groupements contenant de l'oxygène, conduit à la formation d'un second hétérocycle. Ces composés sont fréquemment retrouvés dans les huiles essentielles comme le 1,8-cinéol – un eucalyptol avec une liaison éther entre les carbones C1 et C8 (tableau I) – qui est le principal composé de l'essence d'eucalyptus (*Eucalyptus globulus* et autres espèces) (Chizzola, 2013).

2) Diversification des terpènes

a. Premier niveau de diversification : les isoméries

Alors que la classification rend compte, à elle seule, de la grande diversité des terpènes, celle-ci est encore plus importante si l'on considère :

- (i) l'isomérisation des molécules et en particulier :
 - a. l'isomérisation de position des insaturations qui existe chez certains composés. C'est le cas du pinène pour lequel on distingue le α -pinène et le β -pinène,
 - b. la stéréoisomérisation de configuration pour laquelle on distingue :
 - i. l'énantiomérisation notée R/S et/ou +/- pour les terpènes comportant un ou plusieurs carbones asymétriques. C'est notamment le cas du limonène pour lequel 2 énantiomères présentent des propriétés et des applications différentes. Le (R)-(+)-limonène est retrouvé principalement dans l'orange (*Citrus sinensis*) et le pamplemousse (*Citrus paradisi*) et présente une odeur citronnée avec des notes fraîches de citron et d'orange. Le (S)-(-)-limonène, quant à lui, présente une odeur plus proche du pin et de la térébenthine. Il est retrouvé chez l'eucalyptus et la menthe poivrée (*Mentha x piperita*) (Chizzola, 2013). L'énantiomérisation a donc un impact important sur les propriétés organoleptiques des terpènes qui sont très recherchées par les industries de la parfumerie et de la cosmétique. Un second exemple concerne un dérivé du limonène, la carvone. Les 2 énantiomères de la carvone

diffèrent par leur pouvoir rotatoire, leur dichroïsme circulaire et leur saveur. Le (S)-(+)-carvone présente une odeur caractéristique des fruits du carvi ou cumin des prés (*Carum carvi*), alors que le (R)-(+)-carvone est un arôme mentholé composant de la menthe verte (*Mentha spicata*).

- ii. la diastéréoisomérisation pour les terpènes stéréoisomères présentant un nombre pair de carbones asymétriques mais non énantiomère. C'est le cas de
- iii. la diastéréoisomérisation de configuration *Z* et *E* : pour les terpènes présentant des groupements différents à chaque extrémité d'une double liaison.

Notons ici que le ratio entre les différents isomères sont variables lorsqu'on compare différentes huiles essentielles issues de diverses plantes sources, tel que représenté par le tableau ci-dessous :

Tableau 2 – Rapport du R-(+)-citronellal sur le S-(-)-citronellal dans diverses huiles essentielles avec un arôme citron

Plant species	% ^a	(+)-citronellal (%)	(-)-citronellal (%)
<i>Melissa officinalis</i>	3–31	97–99	1–3
<i>Cymbopogon nardus</i>	1.1	85	15
<i>Eucalyptus citriodora</i>	71.2	56	44
<i>Litsea cubeba</i>	0.3–0.9	33–53	47–67
<i>Nepeta cataria</i> var. <i>citriodora</i>	0.4	0.1	99.9
<i>Backhousia citriodora</i>	0.1	17	83

^aPourcentage de citronellal dans l'huile essentielle

3) Second niveau de diversification : les isomérisations de fonction

Le second niveau de diversification correspond à (ii) l'état d'oxydation des hydrocarbures (alcools, aldéhydes, cétones, esters). Ces terpènes sont alors qualifiés de terpénoïdes. La figure ci-après donne un exemple de terpénoïdes et rend compte de la diversification des terpènes par les différences isomères qui existent.

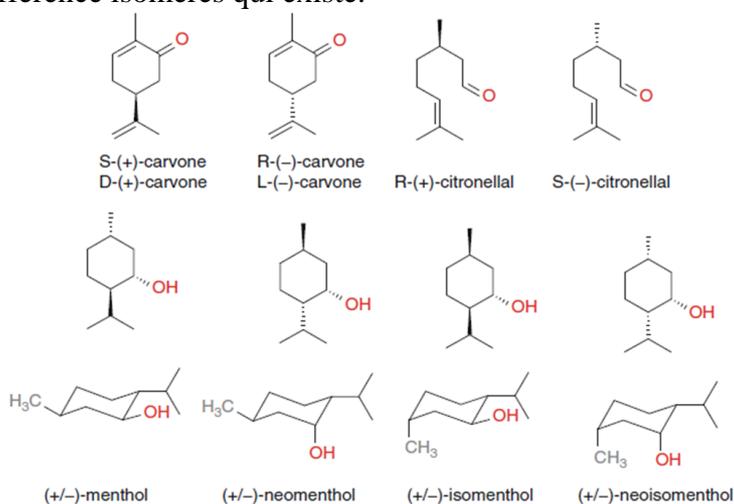


Figure 7 – Exemples de différents stéréoisomères de monoterpénoïdes

II. Voie de biosynthèse, toxicité et rôles biologiques chez les (cyano)bactéries

A. Voie de biosynthèse des terpènes chez les cyanobactéries

1) La voie du MEP

Les terpènes dérivent tous de 2 précurseurs : l'isopentenyl-pyrophosphate (IPP) et le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP), produits par la voie métabolique appelée MEP (MEP pour 2-C-méthyl-D-erythritol-4-phosphate), qui a été bien caractérisée chez *Escherichia coli* (Boronat and Rodriguez-Concepcion 2015). La voie MEP utilise 2 substrats: le pyruvate produit par la glycolyse (catabolisme des sucres comme le glucose) ; et le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) généré par la glycolyse et aussi le cycle de Calvin chez les organismes photosynthétiques (assimilation du CO₂ grâce à l'énergie fournie par la photosynthèse). La voie MEP utilise 7 étapes pour transformer le pyruvate et le GAP en IPP et DMAPP :

- (1) la première réaction, catalysée par l'enzyme DXP synthase (DXS), condense le pyruvate et le GAP en 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP),
- (2) la deuxième étape, effectuée par la DXP reductoisomérase (DXR) réarrange et réduit le DXP pour former le MEP,
- (3) à (5) les réactions 3 à 5, successivement catalysées par les enzymes (i) MEP cytidylyltransférase (MCT), (ii) 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-erythritol (CDP-ME) kinase (CMK) et (iii) 2-C-méthyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate (MEcPP) synthase (MDS), transforment le MEP en CDP-ME, puis en CDP-MEP et enfin en MEcPP,
- (6) la 4-hydroxy-3-méthyl-but-2-ényl diphosphate (HMBPP) synthase (HDS) produit le HMBPP,
- (7) enfin, sous l'action de la HMBPP réductase (HDR), il y a formation de l'IPP et du DMAPP

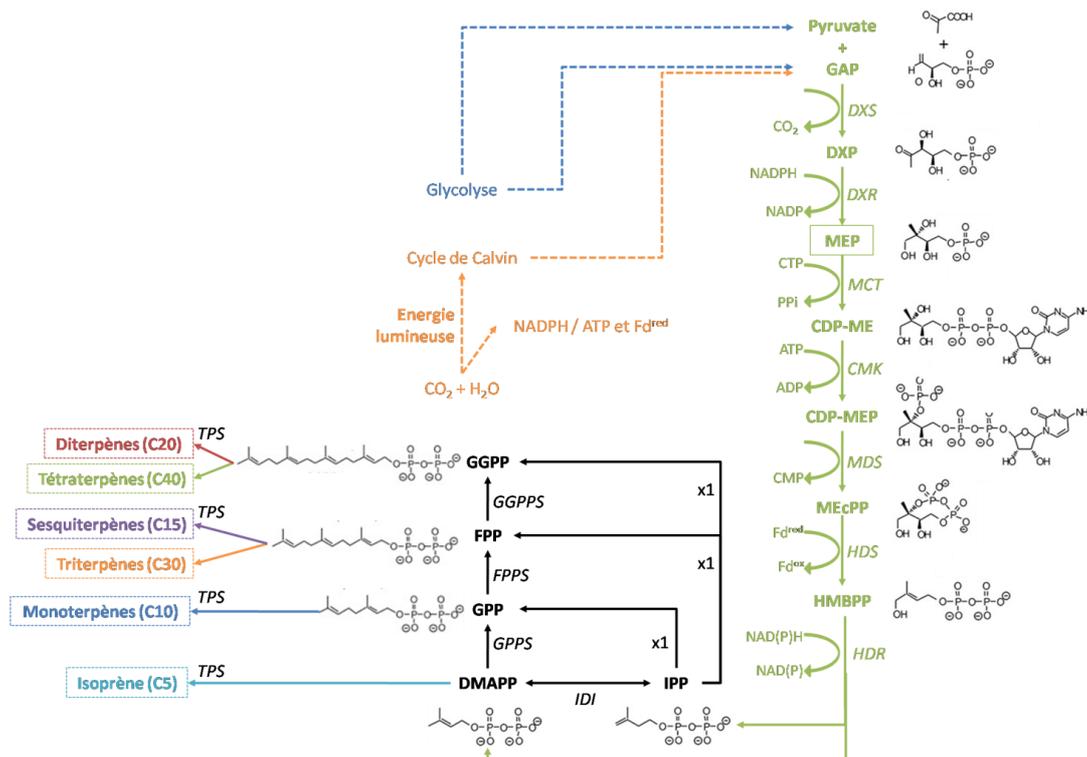


Figure 8 – Représentation schématique de la voie du MEP

Ferrédoxine réduite (**Fd^{red}**) ; glycéraldéhyde 3-phosphate (**GAP**) ; 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (**DXP**) synthase (**DXS**) ; DXP reductoisomérase (**DXR**) ; MEP cytidyltransférase (**MCT**) ; 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-erythritol (**CDP-ME**) kinase (**CMK**) ; 2-C-méthyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate (**MEcPP**) synthase (**MDS**) ; 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate (**HMBPP**) synthase (**HDS**) ; HMBPP réductase (**HDR**) ; isopentenyl pyrophosphate (**IPP**) isomérase (**IDI**) ; diméthylallyl pyrophosphate (**DMAPP**) ; géranyl pyrophosphate (**GPP**) synthase (**GPPS**) ; farnésyl pyrophosphate (**FPP**) synthase (**FPPS**) ; géranyl géranyl pyrophosphate (**GGPP**) synthase (**GGPPS**) ; terpène synthase (**TPS**)

Ensuite, un groupe d'enzymes appelées prényltransférases, catalysent l'addition répétée des unités IPP activées au DMAPP, par des réactions de condensation tête-à-queue (Davies, Jinkerson and Posewitz 2015). Ceci conduit à la formation de molécules linéaires : des prényls-pyrophosphates : GPP ; FPP ; GGPP, qui varient en longueur (par multiple de 5 atomes de carbones) et sont respectivement les précurseurs des : monoterpènes (C10) ; sesquiterpènes (C15) et triterpènes (C30 ; 2 fois C15) ; diterpènes (C20) et tétraterpènes (C40 ; 2 fois C20). La synthèse de ces terpènes nécessite des enzymes spécifiques : les terpènes synthases (TPS).

Ainsi, la synthèse du limonène requiert une limonène synthase (Davies, Work, et al. 2014), et celle du pinène et du sabinène utilise une pinène synthase (Sarria, et al. 2014) et une sabinène synthase (Zhang, et al. 2014), et ainsi de suite. En outre, l'enzyme IDI (IPP isomérase) joue un rôle important dans la proportion en DMAPP et en IPP, qui influence la nature des terpènes finalement produits. Les propriétés catalytiques des TPS influent également sur la nature des produits obtenus, car leur spécificité et leur stéréospécificité est variable. Certaines TPS synthétisent des mélanges de terpènes et d'autres les différents isomères d'un unique terpène.

2) *Synechocystis* PCC 6803 possèdent les enzymes de la voie du MEP

De manière intéressante, le génome de *Synechocystis* contient un homologue (orthologue) de chacun des gènes de la voie du MEP, décrits chez *E. coli* (Pattanaik and Lindberg 2015).

Tableau 3 – Enzymes et gènes vraisemblablement impliqués dans la voie métabolique MEP (2-C-méthyl-D-erythritol-4-phosphate) chez *Synechocystis*

Enzymes	Nom(s) du gène	Gène ID	Taille du gène (en pb)
DXS	<i>dxs</i>	<i>sll1945</i>	1923
DXR	<i>dxr</i>	<i>sll0019</i>	1185
MCT	<i>ispD</i>	<i>slr0951</i>	693
CMK	<i>ispE</i>	<i>sll0711</i>	948
MDS	<i>ispF (ygbB)</i>	<i>slr1542</i>	486
HDS	<i>ispG (gcpE)</i>	<i>slr2136</i>	1212
HDR	<i>ispH (lytB)</i>	<i>slr0348</i>	1221
IDI	<i>idi (fni)</i>	<i>sll1556</i>	1050
GPPS/FPPS/GGPPS	<i>crtE</i>	<i>slr0379</i>	909

L'annotation des enzymes et des gènes a été réalisée avec la base KEGG (http://www.genome.jp/kegg-bin/shox_organism?menu_type=pathway_maps&org=syn) et le gène ID grâce la base CyanoBase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>) ; la taille des gènes correspond à celle de phase codante ; l'abréviation des enzymes est décrite dans la figure ci-dessous ; D'après (Pattanaik and Lindberg 2015)

B. Rôles biologiques de terpènes chez les (cyano)bactéries

Bien que massivement synthétisés par les plantes, les rôles biologiques des terpènes ne seront présentés que chez les (cyano)bactéries où ils sont nécessaires à plusieurs grandes fonctions dont :

- **la traduction** : en effet, l'isopentenyl ARNt, synthétisé à partir du groupement isopentenyle de l'IPP par une ARNt isopentenyltransférase (tRNA $\Delta 2$ -IPP transferase), augmente l'efficacité de traduction. L'enzyme ARNt isopentenyltransférase est codée par le gène *miaA* chez *E. coli* (Persson et al., 1994; Boronat and Rodríguez-Concepción, 2015),
- **le métabolisme** : puisque les hèmes, les ubiquinones et ménaquinones et les pigments (chlorophylles et caroténides) nécessitent les précurseurs FPP et GGPP de la voie du MEP pour être synthétisé, tel que représenté dans la figure ci-après,
- **la structuration des enveloppes bactériennes** dont le peptidoglycane puisque le bactoprénol constitue le lipide qui transporte les précurseurs du peptidoglycane, la voie du MEP est donc essentielle puisque le peptidoglycane est essentiel à la viabilité des cellules. De plus, les lipides membranaires de type éther retrouvés chez les Archea sont synthétisés à partir du GGPP (Boronat and Rodríguez-Concepción, 2015).

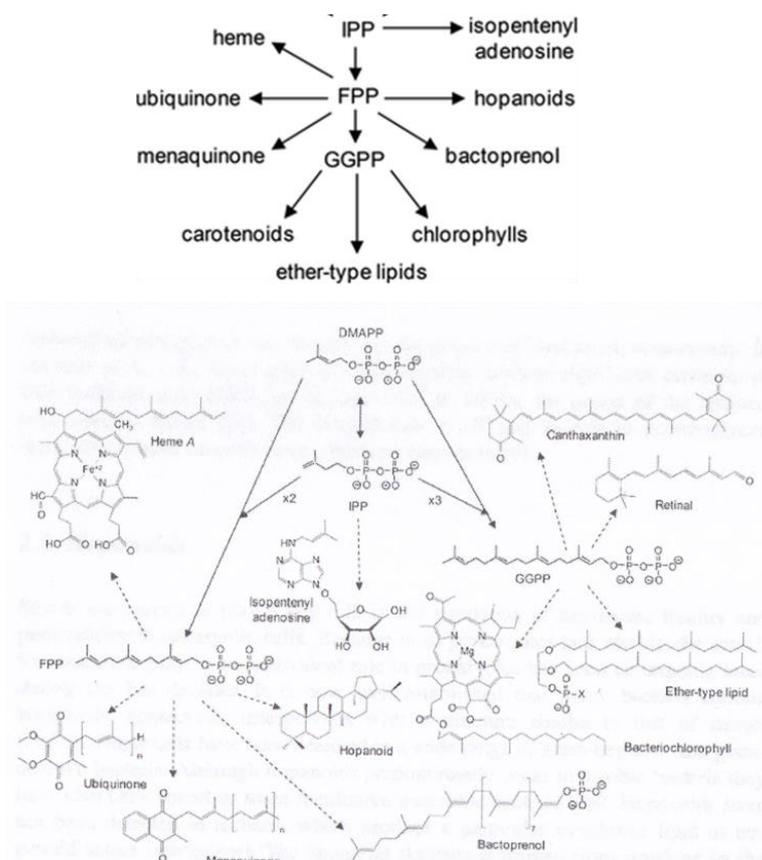


Figure 9 – Représentation schématique du rôle de la voie du MEP dans la synthèse de molécules essentielles à la physiologie (cyano)bactérienne

C. Toxicité des terpènes chez les cyanobactéries

Bien que les terpènes soient très étudiés pour leurs nombreuses applications (voir partie suivante), la toxicité de ceux-ci a été très peu étudiée chez les bactéries et encore plus chez les cyanobactéries alors que plus en plus de souches cyanobactériennes sont ingénierées pour la photoproduction de terpènes (Rosgaard et al., 2012; Sarria et al., 2014; Englund et al., 2015; Savakis and Hellingwerf, 2015; Kitchener and Grunden, 2018). A ma connaissance, la toxicité des terpènes n'a été reportée que dans 2 articles, respectivement chez *E. coli* pour le pinène et le géraniol (Sarria et al., 2014) et chez *Synechocystis* pour le géraniol, le géraniol, le linalool, le farnésène et le citronellène (Hellier et al., 2013).

C'est pourquoi l'analyse de la toxicité des terpènes chez *Synechocystis* a été l'un de mes projets au cours de mes travaux de thèse, en plus de l'étude des GST de *Synechocystis*.

II. Applications des terpènes

Les terpènes sont de plus en plus étudiés du fait de leur immense diversité qui peut être source de nouvelles molécules thérapeutiques par exemple mais aussi du fait que parmi les terpènes d'ores et déjà utilisés, ceux-ci présentent des propriétés physico-chimiques multiples et intéressantes pour divers champs industriels. Ainsi :

- **les propriétés organoleptiques** (odeur, saveur, flaveur...) sont très recherchées par les industries cosmétiques, de la parfumerie et alimentaires et en a d'ailleurs fait l'usage historique des terpènes,
- **les propriétés biologiques** (activité antimicrobienne, antiparasite...) sont prometteuses pour l'industrie pharmaceutique et expliquent la très forte consommation mondiale d'huiles essentielles,
- **les propriétés physico-chimiques** (molécule plateforme, faible viscosité aux faibles températures...) font de terpènes des molécules attractives pour les industries de la chimie, de la pétrochimie et de l'environnement.

A. L'usage historique des terpènes dans les industries cosmétiques et alimentaires

Les terpènes/terpénoïdes sont retrouvés dans de nombreux produits alimentaires non manufacturés (légumes, fruits, jus de fruits, épices...) (Chizzola, 2013). Cela s'explique simplement par le fait que ces produits sont issus de plantes qui synthétisent ces molécules. Ces dernières donnent alors le goût caractéristique que l'on connaît du jus de citron, d'orange ou de pamplemousse. L'arôme de menthe est très reconnaissable et provient principalement du terpénoïde menthol. De nombreux terpénoïdes ont une odeur caractéristique dont certaines sont présentées dans le tableau ci-après.

En plus de leur occurrence naturelle, les produits alimentaires manufacturés regorgent de terpènes dont la quantité ajoutée dépend du seuil d'odeur qui peut varier considérablement et qui dépend de la matrice d'un terpène à un autre. Ainsi, le (-)-limonène qui a l'arôme d'agrumes est un agent odorant essentiel du jus d'orange et le néral/géraniol (citrone) sont les molécules clés de l'arôme de citron. Ma propre expérience confirme cette observation, puisqu'en ouvrant un flacon de citral, l'odeur de l'arôme citron synthétique est véritable. Le terpénoïde 1-p-menthène-8-thiol présent dans le jus de pamplemousse est responsable de

l'arôme de pampleousse et avec une concentration de 0,02 ng/L, il est l'un des terpènes/terpénoïdes ayant un seuil d'odeur le plus faible. La lecture des listes des ingrédients de plusieurs produits alimentaires suffit à rendre compte de leur utilisation. Par exemple, la carvone (un dérivé du limonène) est utilisée comme additif alimentaire dans l'industrie du chewing-gum (*Brevet US5158790, 1992, Wm. Wrigley, Jr. Company*). Les additifs dénommés E140, E160 et E161 regroupent des molécules dérivant des terpènes qui sont respectivement les chlorophylles, les carotènes/caroténoïdes/lycopènes et les xanthophylles.

Les terpènes sont également très utilisés dans l'industrie de la cosmétique et les produits d'hygiène. Un simple détour au rayon produit d'hygiène nous permet de rendre compte de l'utilisation des terpènes dans l'industrie de la cosmétique, comme le démontre la figure ci-dessous donnant la composition de certains produits.

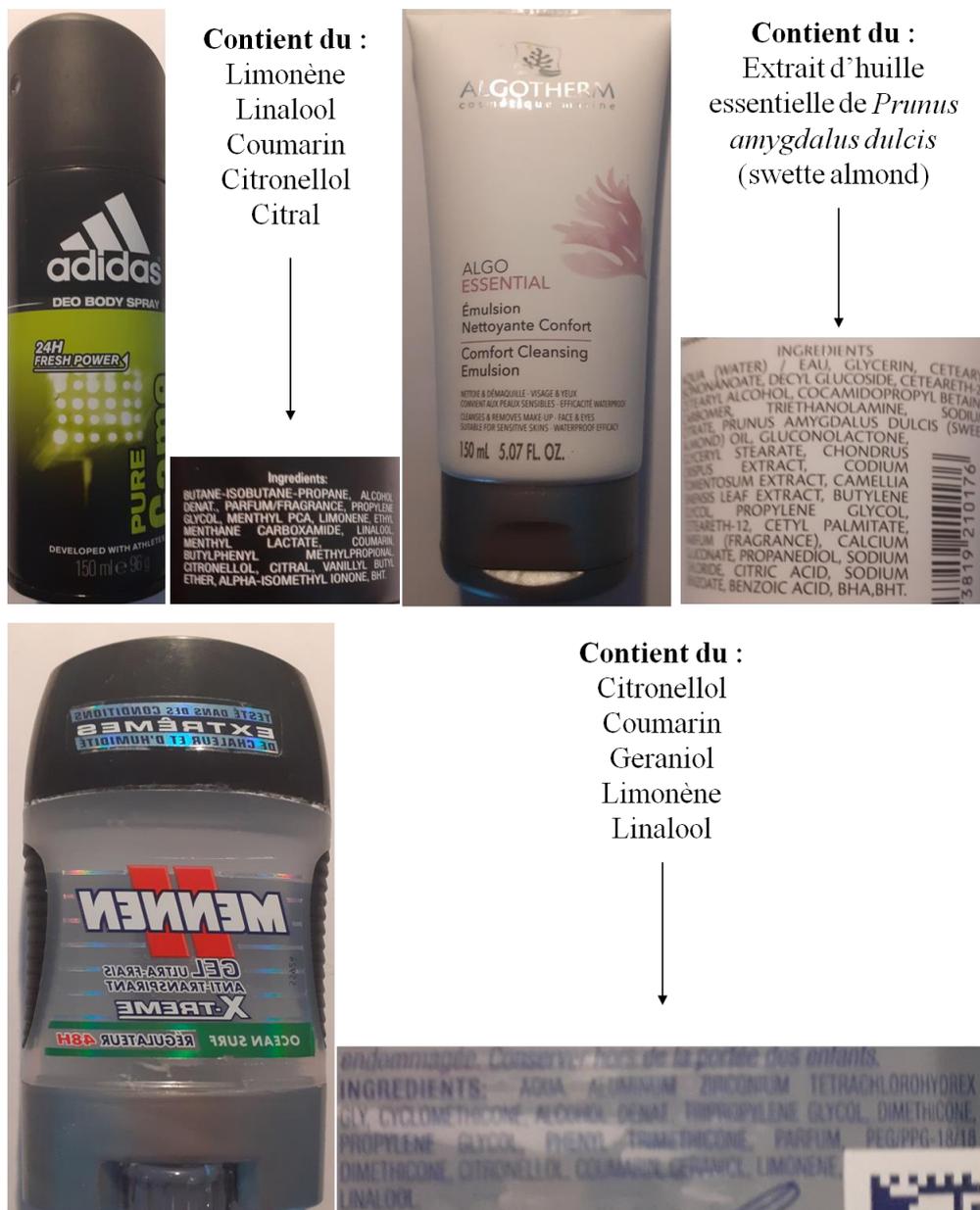


Figure 10 – Exemples de quelques produits cosmétiques comportant des terpènes dans leur composition

Tableau 4 – Odeur/Arôme (ou flaveur) des différents monoterpènes

Compound	Odor	Compound	Odor
Borneol	Woody-camphoraceous, dry-minty	<i>trans</i> - α -Bergamotene	Weak woody, warm, tea-leaf-like
Isoborneol	Camphoraceous, weak peppery and woody	Bicyclogermacrene	Green, spicy, mushroom-notes, dry-woody
Camphene	Camphoraceous, mild-oily	β -Bisabolene	Sweet, warm, balsamic, woody, spicy
Camphor	Camphoraceous, fresh, warm-minty, ethereal	α -Bisabolol	Sweet, mild floral
δ -3-Carene	Resinous, sweet, refined-limonene-like, spicy	β -Bisabolol	Mild, sweet, weak herbal
Carvedol	Fresh, caraway- and spearmint-like	Bulnesol	Weak woody, weak spicy
S-(+)-Carvone	Spicy, caraway-like	Cadina-1,4-dien-3-ol	Weak fruity, weak woody, spicy
R-(-)-Carvone	Spearmint-like	Cadina-1,4-diene	Fruity, mango-like, spicy, woody
Citronellal	Minty, citrus-like	δ -Cadinene	Dry-woody, weak medicinal
Citronellol	Floral, rose-like	α -Cadinol	Weak woody, medicinal, dry
Cumin aldehyde	Sharp, acid, pungent, woody, oily	Calamanene	Weak floral, weak spicy
Cumyl alcohol	Floral, oily-spicy, dillseed- and caraway-like	β -Caryophyllene	Woody, spicy, terpene notes
Cymen-8-ol	Weak citrus-like	Caryophyllene oxide	Weak woody, warm, mild, weak spicy
<i>p</i> -Cymene	Fresh, weak citrus-like, lemon and bergamot notes	α -Copaene	Vegetable-like, hops-like, woody
Geraniol	Lemon, sweet	α -Cubebene	Spicy, herbal
Geraniol	Floral, lemonlike, minty	β -Cubebene	Herbal, woody
Limonene	Fresh, citrus-like, mild lemon and orange notes	Cubenol	Spicy, herbal, green-tea notes
Linalool	Fresh, floral, clean, sweet, lemon notes	β -Elemene	Fresh, warm, weak woody
Myrcene	Mild, sweet, balsamic, plastic note	γ -Elemene	Mild, woody
Neral	Sweet, lemon	δ -Elemene	Lime-oil-like, woody
Nerol	Rose, sweet	β -Eudesmol	Woody
<i>cis</i> - β -Ocimene	Herbal, warm-herbaceous, sweet-floral, neroli-oil-like	<i>trans</i> - β -Farnesene	Warm, mild, sweet
<i>trans</i> - β -Ocimene	Herbal, weak floral	<i>trans,trans</i> - α -Farnesene	Mild, warm, sweet
α -Phellandrene	Spicy, herbaceous, minty, peppery-woody, fresh, citrus	<i>cis,trans</i> - α -Farnesol	Mild, sweet, oily, floral, fresh green
β -Phellandrene	Peppery, minty, refreshing, citrus-like	<i>trans,trans</i> - α -Farnesol	Weak fresh, fresh green, weak floral
α -Pinene	Pine-like, sharp, woody, turpentine-like	Germacrene B	Earthy, mushroomlike
β -Pinene	Dry-woody, pine-like, resinous-terpene-like, spicy	Germacrene D	Weak spicy, weak fruity, apple-like, weak dry-woody
Piperitone	Fresh, minty, camphoraceous	α -Guaiene	Sweet-woody, balsamic, peppery
Sabinene	Warm, oily-peppery, woody-herbaceous, spicy	β -Guaiene	Balsamic, woody, spicy
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	Mild, pleasant, warm, woody-balsamic	Guaiol	Woody-balsamic, mild, sweet, weak floral
<i>trans</i> -Sabinene hydrate	Warm, balsamic-woody, mild	α -Gurjunene	Balsamic, woody
Terpinen-4-ol	Nutmeg-like, spicy, woody-earthy, liliac-like	α -Humulene	Weak woody, weak spicy, herbal
α -Terpinene	Refreshing, lemon-citrus-like	γ -Muurolene	Weak spicy, weak herbal, woody
γ -Terpinene	Fresh-herbaceous, citrus-like	T-Muurolol	Weak woody, weak spicy, mild
α -Terpineol	Floral, liliac-like	<i>trans</i> -Nerolidol	Woody-floral, weak green
Terpinolene	Sweet-piney, oily, petroleum-like	Spathulenol	Weak fruity, weak herbal
α -Thujene	Green, herbal, woody	α -Zingiberene	Spicy, fresh, sharp

Tiré de (Chizzola, 2013)

B. Les terpènes sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique

Bien que les huiles essentielles ne soient pas utilisées uniquement par l'industrie pharmaceutique, le tableau ci-dessous rend compte de leur importance quantitative.

Tableau 5 – Estimation de la consommation mondiale des principales huiles essentielles

Oil type	Botanical species	Tons/year	Main terpenoids
Orange	<i>Citrus sinensis</i>	50,000	Limonene (92–97%)
Com mint	<i>Mentha arvensis</i>	25,000	Menthol (70%)
Peppermint	<i>Mentha piperita</i>	4,500	(–)-Menthol (30–55%), menthone (14–32%)
Eucalyptus	<i>Eucalyptus globulus</i>	4,000	1,8-Cineol (>70%)
Lemon	<i>Citrus limon</i>	3,500	Limonene (60–80%), geraniol (0.5–2%), neral (0.2–1.2%)
Citronella	<i>Cymbopogon winterianus</i>	3,000	Citronellal (30–45%), geraniol (20–25%), citronellol (9–15%)
Citronella	<i>Cymbopogon nardus</i>		Geraniol (15–23%), citronellol (3–9%), geraniol (3–6%)
Eucalyptus	<i>Eucalyptus citriodora</i>	2,100	Citronellal (70–87%), citronellol (5–10%)
Spearmint	<i>Mentha spicata</i>	2,000	(–)-Carvone (50–80%)
Cedarwood (Virginia)	<i>Juniperus virginiana</i>	1,500	α -Cedrene (22–53%), thujopsene (10–25%), cedrol (5–30%)
Lime	<i>Citrus aurantifolia</i>	1,500	Limonene
Lavandin	<i>Lavandula angustifolia</i> <i>x L. latifolia</i>	1,000	Linalool (24–35%), lavandulyl acetate (28–38%)
Litsea	<i>Litsea cubeba</i>	1,000	Geraniol (38–45%), neral (25–33%)
Cedarwood (China)	<i>Cupressus funebris</i>	800	α -Cedrene (13–29%), thujopsene (18–31%), cedrol (10–16%)
Coriander	<i>Coriandrum sativum</i>	700	(+)-Linalool (65–78%)
Grapefruit	<i>Citrus paradisi</i>	700	Limonene
Patchouli	<i>Pogostemon cablin</i>	600	Patchoulol (27–35%)
Basil (Reunion type)	<i>Ocimum basilicum</i>	500	Estragol (75–87%), linalool (0.5–3%)
Basil (European type)	<i>Ocimum basilicum</i>		Linalool (45–62%), estragol (0–30%), eugenol (2–15%)
Mandarine	<i>Citrus reticulata</i>	500	Limonene (65–75%), γ -terpinene (16–22%)

Tiré de (Chizzola, 2013)

Ces huiles essentielles sont utilisées en phytothérapie qui repose sur les substances actives des plantes. Les huiles essentielles classiques issues des plantes médicinales oléagineuses sont la camomille allemande (*Matricaria recutita*), le thym (*Thymus vulgaris*), la menthe poivrée (*Mentha x piperita*), le carvi (*Carum carvi*) et le fenouil (*Foeniculum vulgare*). Ces huiles essentielles ne sont pas seulement utilisées pour soigner des pathologies humaines mais présentent aussi un intérêt croissant dans la phytothérapie vétérinaire.

Pour les pathologies, le recours aux huiles essentielles l'est principalement pour soulager la douleur chronique, la dépression, les troubles cognitifs, l'anxiété, l'insomnie et les troubles liés au stress. Par exemple, les essences contenant du linalool sont traditionnellement utilisées comme sédatifs, analgésiques et anxiolytiques. Dans ce contexte, l'influence des huiles essentielles sur le système nerveux est étudiée.

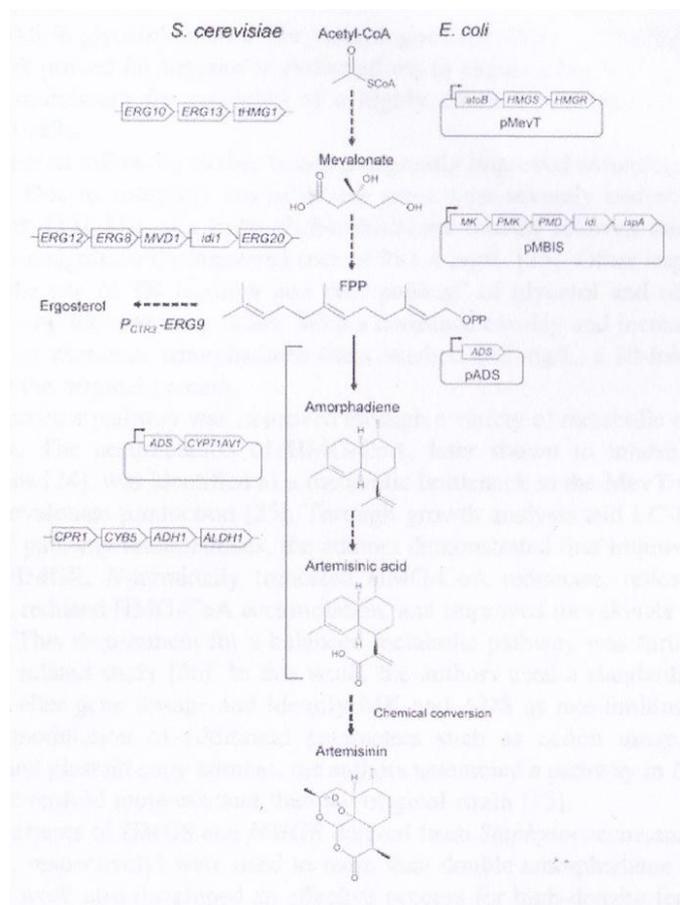
L'utilisation des huiles essentielles dans certains thérapeutiques provient de leurs diverses propriétés que sont leurs :

- **activité antimicrobienne** : les terpènes sont toxiques et plusieurs modes d'action ont été proposés comme la dégradation de la paroi, les dommages causés sur la membrane plasmique et les protéines membranaires causant des fuites cellulaires et la dissipation de la force proton-motrice. Cela provient du caractère hydrophobe des terpènes. Néanmoins, c'est la combinaison de leur hydrophobicité avec la présence de groupements fonctionnels qui est essentiel pour leur activité antimicrobienne. Ainsi, la toxicité des terpènes/terpénoïdes va décroissante selon le groupement fonctionnel considéré comme suit : aldéhyde > cétone > alcools > esters > hydrocarbure.

Les terpènes/terpénoïdes présentant un large spectre d'action sont le thymol suivi dans l'ordre par les molécules suivantes : carvacrol, α -terpineol, terpinen-4-ol, eugenol, linalool, (-)-thujone, Δ -3-carene, geranyl acetate, (*cis* + *trans*) citral, nerol, geraniol, menthone, β -pinene, (-)-limonene, α -pinene, α -terpinene, borneol, (+)-sabinene, γ -terpinene, citronellal, terpinolene, 1,8-cineole, bornyl acetate, carvacrol methyl ether, myrcene, β -caryophyllène, α -bisabolol, α -phellandrene, α -humulène, β -ocimène, aromadendrene, et p-cymène. Les terpènes ont des effets antibactérien, antifongique et antiviral.

A titre d'exemple, le linalool et le citral inhibent très efficacement la croissance de *Candida albicans*. Des huiles essentielles de thym et de citron inhibent la production d'aflatoxine et la croissance d'*Aspergillus parasiticus* alors que l'essence de carvi n'a pas d'effet. Néanmoins, l'exemple le plus documenté reste à ce jour l'artémisine, un sesquiterpène lactone, utilisé dans le traitement de la malaria causé par *Plasmodium* (George et al., 2015). La figure ci-dessous montre la synthèse de l'artémisine. Les essences extraites de *Melaleuca alternifolia* et de *Santolina insularis* ont une activité antivirale contre le virus *Herpes simplex* de type 1 et 2. Le terpène ascaridol a une propriété antiparasite (pour revue voir (Chizzola, 2013)).

Figure 11 – Voie de synthèse de l'artémisine obtenue par ingénierie des souches de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Escherichia coli*



- **activité anticancéreuse** : puisque des études ont montré qu'un régime riche en isoprénoïdes éviterait l'apparition de cancers. Le terpène α -bisabolol a montré des effets cytotoxiques sur des cellules gliales et le β -caryophyllène a des effets de potentialisation des activités anticancéreuses de l' α -humulène, de l'isocaryophyllène

Tableau 6 – Propriétés des carburants et « terpènes-carburants »

Fuel Name	Density (range) (kg/m ³)	Flash point (°C) (min)	Freezing point (°C) (max)	Net heat of combustion (MJ/kg) (min)	Cetane number (min 40)	References
<i>Amorphane</i>						
Jet-A (ASTM)	775-840	38	-40	42.8	N.D.	[9]
Jet-A	811	43	-47	43.42	N.D.	
20 % Amorphane ^a /JetA	818	49	-48	43.1	N.D.	
50 % Amorphane ^a /JetA	846	60	-53	42.97	N.D.	
100 % Amorphane ^a	880	113	<-52	42.79	N.D.	
<i>Farnesene</i>						
#2 Diesel	864.6	73	N.D.	42.4	41.6	[7]
5 % AMD-200/#2 Diesel	859.5	75	N.D.	N.D.	41.7	
20 % AMD-200/#2 Diesel	845.4	78	N.D.	42.8	45.2	
50 % AMD-200/#2 Diesel	820.4	86	N.D.	43.2	50.7	
100 % AMD-200 (Farnesane)	773.7	109	N.D.	44.2	58.6	
<i>Monoterpene dimers</i>						
Alpha-Pinene_Dimer	935	N.D.		42.047	N.D.	[136]
Beta-Pinene_Dimer	938	N.D.		42.118	N.D.	
Limonene_Dimer	914	N.D.		41.906	N.D.	
JP-5	820	N.D.	<-46.15	42.4	N.D.	
JP-10	940	N.D.	<-79.15	42.1	N.D.	
RJ-5	1,080	N.D.	>-18.15	41.6	N.D.	
Gasoline	740	N.D.	<-100.15	43.6	N.D.	
Diesel no. 2	850	N.D.	-12.15 to -6.15	42.4	N.D.	
Biodiesel	880	N.D.	>-10.15	37.4	N.D.	
β-Pinene	860	N.D.	-61.15	42.9	N.D.	
(continued)						
Fuel Name	Density (range) (kg/m ³)	Flash point (°C) (min)	Freezing point (°C) (max)	Net heat of combustion (MJ/kg) (min)	Cetane number (min 40)	References
<i>Bicyclic monoterpenes</i>						
α-Pinene	860	N.D.	-64.15	42.9	N.D.	
<i>Bicyclic monoterpenes</i>						
Jet-A ASTM	775-840	38	-40	42.8	N.D.	[8]
Jet-A	811	43	-47	43.4192	N.D.	
20 % AMJ-400 ^b /Jet-A	820.4	43	-51	43.0534	N.D.	
50 % AMJ-400 ^b /Jet-A	834.9	44	-56.5	42.9881	N.D.	
100 % AMJ-400 ^b (pinane)	860.3	43	<-70	42.8011	N.D.	
<i>Hydrogenated limonene and myrcene</i>						
Diesel		58.3	N.D.	N.D.	45.6	[10]
Hydrogenated limonene (limonane)						
10 % in diesel	N.D.	58.9	N.D.	N.D.	42.8	
Hydrogenated myrcene						
2 % in diesel	N.D.	63.9	N.D.	N.D.	44.9	
5 % in diesel	N.D.	61.7	N.D.	N.D.	44.3	
10 % in diesel	N.D.	60	N.D.	N.D.	44.7	
<i>Bisabolane</i>						
D2 diesel	850	60-80	N.D.	N.D.	40-55	[6]
Biodiesel	880	100-170	N.D.	N.D.	48-65	
Bisabolane	820	111	N.D.	N.D.	41.9	

^a Partially mixed with nonhydrogenated amorphadiene
N.D. Not determined
^b 98.7 % of pinane

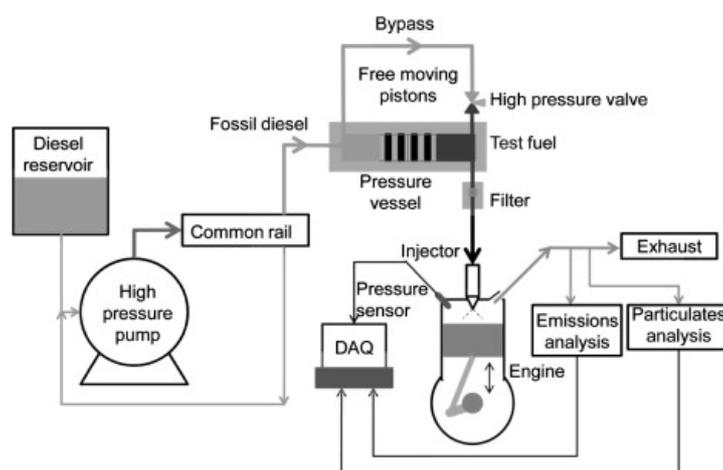


Figure 13 – Représentation schématique du système d'étude des propriétés de combustion et d'émission des terpènes en vue de leur utilisation comme carburants
Tiré de (Hellier et al., 2013)

Les terpènes sont donc une famille de molécules très diversifiée présentant de multiples applications. Puisqu'ils sont synthétisés par la voie du MEP de façon commune à celle des dérivés terpéniques essentielles à la croissance des cyanobactéries (bactoprénol, caroténoïdes...), la synthèse de terpènes (par l'introduction d'un gène codant pour une terpène synthase) peut provoquer des stress en perturbant cette voie métabolique ou en modifiant la physiologie des cyanobactéries. En conséquence, je présenterai dans la partie suivante les cyanobactéries, leur métabolisme et les stress auxquelles elles sont confrontées.

I. Les cyanobactéries : des origines de la vie aux biotechnologies

Les cyanobactéries sont les seuls organismes procaryotes capables d'effectuer la photosynthèse oxygénique. Elles utilisent l'énergie solaire pour hydrolyser des molécules d'eau, produisant ainsi de l'oxygène indispensable à la respiration des organismes dits « aérobiques », de l'énergie sous forme d'ATP et du pouvoir réducteur sous forme de NAD(P)H, leur permettant d'assimiler des minéraux (NO_3 , PO_4 , SO_4 , *etc.*) et du carbone à partir du CO_2 atmosphérique nécessaires à leur croissance. Cette partie a pour but de montrer que les cyanobactéries, du fait de leur capacité métabolique à réaliser la photosynthèse oxygénique et de leur incroyable diversité morphologique et physiologique, ont eu et ont, encore aujourd'hui, un impact écologique globale sur la biosphère ; qu'elles ont joué un rôle important dans l'élucidation des mécanismes biochimiques relatifs à la photosynthèse et qu'elles sont des outils et des modèles prisés par les biotechnologies modernes.

A. Importance écologique des cyanobactéries sur la biosphère

1) Les cyanobactéries sont à l'origine de l'atmosphère oxygénique

a. Les cyanobactéries sont à l'origine de l'atmosphère oxygénique

Les cyanobactéries sont apparues il y a environ 3 milliards d'années (Awramik, 1992). Du fait de leur capacité à réaliser la photosynthèse oxygénique, elles ont eu un impact considérable sur la biosphère dont les principaux effets ont été :

- un enrichissement de l'atmosphère terrestre en oxygène tout au long du précambrien (à partir de – 3,3 milliards d'années) (Des Marais, 1991),
- une diminution du taux de CO_2 atmosphérique, provoquant une nouvelle chute de la température terrestre moyenne dont les effets ont fortement impacté la biosphère existante
- et une augmentation massive de la biomasse planétaire issue de la capacité des cyanobactéries à fixer le CO_2 pour synthétiser des molécules organiques disponibles pour le reste du vivant.

La photosynthèse est un processus biochimique vraisemblablement apparu chez les bactéries après la divergence entre les 2 domaines procaryotes du vivant décrits par Woese (Woese and Fox, 1977), puisqu'aucune archée photosynthétique n'a été aujourd'hui identifiée (Xiong et al., 2000). Ainsi, les bactéries pourpres qui réalisent la photosynthèse anoxygénique sont aujourd'hui décrites comme ancêtre commun des lignées photosynthétiques actuelles et la photosynthèse anoxygénique aurait alors précédé la photosynthèse oxygénique (Battistuzzi et al., 2004)(Johnson et al., 2013), pour laquelle seule les cyanobactéries en sont doués et possèdent à ce titre un appareil photosynthétique unique (Xiong et al., 2000). Dans un tel scénario évolutif, des duplications de gènes ont contribué à l'émergence d'un second photosystème (Drews, 2011) et à l'apparition de la réaction d'oxydation de 2 molécules d'eau en dioxygène (Cardona et al., 2015), par évolution des composants auxiliaires du photosystème II (antennes photosynthétiques et cluster manganèse (Johnson et al., 2013)).

b. Impact sur les cycles biogéochimiques globaux d'hier à aujourd'hui

Les premières cyanobactéries n'ont pas été datées précisément mais les nombreux fossiles montrent leur expansion sur la surface de la Terre. Grâce à leur photosynthèse, les cyanobactéries ont assimilé le CO₂ atmosphérique en le mobilisant sous forme de carbonate de calcium (CaCO₃) (Jansson and Northen, 2010). Leur métabolisme photosynthétique a donc grandement influencé le cycle biogéochimique du carbone comme le témoigne les stromatolithes composés de roches calcaires comme étant les plus anciennes traces de vies identifiées (Nutman et al., 2016).

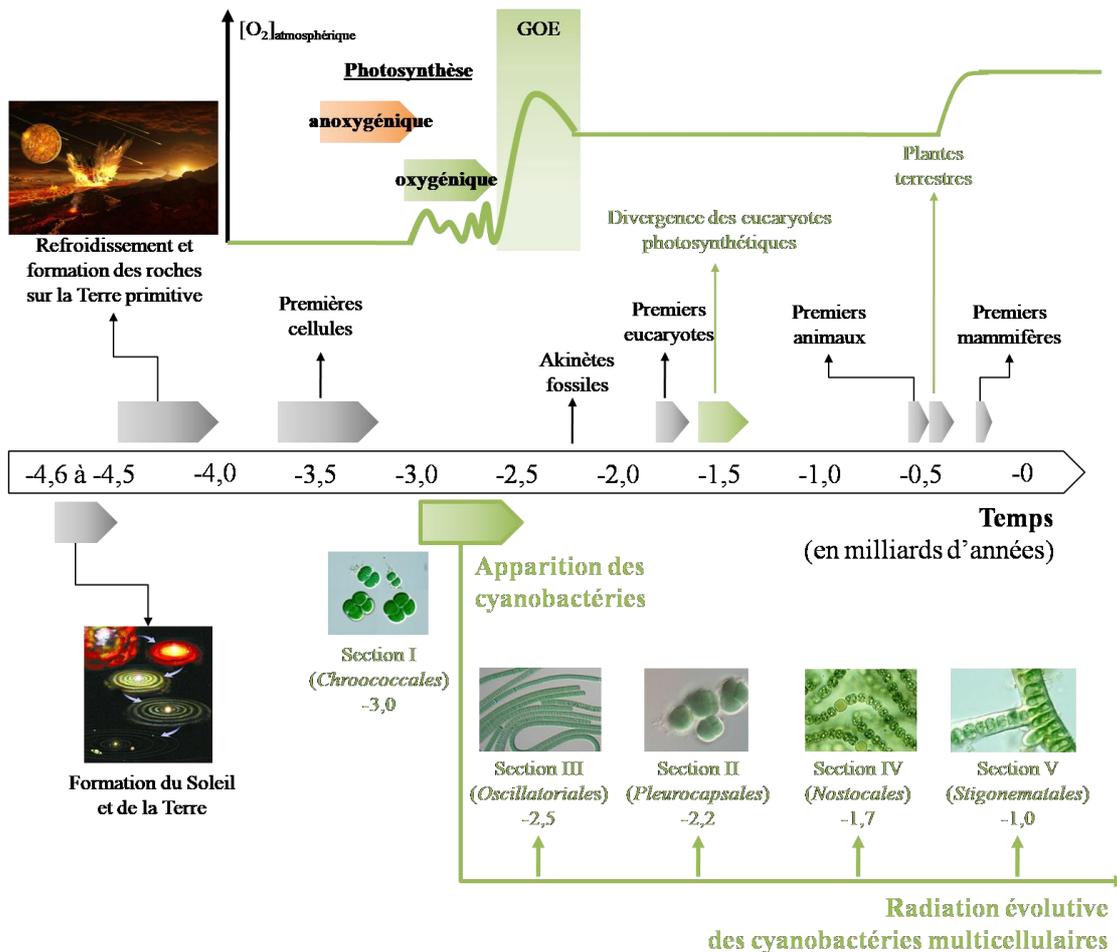


Figure 14 – Frise chronologique de l'apparition des cyanobactéries et leurs impacts sur l'évolution du vivant

En parallèle d'une forte consommation de CO₂, la production de dioxygène O₂ a également fortement augmenté modifiant ainsi certains paramètres géochimiques (précipitation de métaux). Ces divers marqueurs coïncident avec les analyses phylogénétiques (De Marais, 2000) datant l'émergence des cyanobactéries entre -3 et -2,5 milliards d'années. La forte production de dioxygène a modifié globalement les sphères biologiques et géologiques en passant de milieux riches en espèces réduites à des biotopes fortement oxydants : c'est la grande oxydation (Great Oxygenation Event : GOE). En conséquence, cela a considérablement modifié la vie sur Terre, en cantonnant les organismes anaérobies à des niches écologiques dépourvus d'oxygène et en entraînant une radiation évolutive importante. Parmi ces évolutions, on note l'apparition de la compartimentation cellulaire : avec genèse du noyau (environ - 1,8 milliards d'années ; apparition des eucaryotes) et spécialisation

d'organites intracellulaires par endosymbiose. En ce qui concerne les cyanobactéries, ces radiations évolutives ont eu pour effet l'émergence de formes pluricellulaires différenciées qui définissent aujourd'hui les 5 sections des cyanobactéries.

De nos jours, elles assurent environ 30 à 40 % de la production d'O₂, de l'assimilation du CO₂ et du N₂ par les océans (Partensky et al., 1999)(Hoehler et al., 2001)(Grizeau et al., 2016). Les cyanobactéries convertissent l'énergie lumineuse en biomasse hautement énergétique avec un rendement et une efficacité supérieure aux plantes (3-9 % pour les cyanobactéries contre 0,25 à 3 % pour les plantes) (Ducat et al., 2011). Elles produisent ainsi une grande partie de la biomasse du phytoplancton et constituent le premier maillon de la chaîne alimentaire et l'une des premières barrières d'entrée des toxiques dans cette chaîne.

2) *Le chloroplaste dérive des cyanobactéries*

Les cyanobactéries présentent un appareil photosynthétique très semblable à celui des chloroplastes des plantes (l'organite où s'effectue la photosynthèse). Une cyanobactérie serait d'ailleurs à l'origine de ces chloroplastes, après endosymbiose (coopération mutuellement bénéfique entre 2 organismes vivants, où l'un est contenu par l'autre) avec un hôte eucaryote (Gray, 1993).

L'optimisation de cette symbiose a provoqué la perte du matériel génétique inutile ou redondant avec l'hôte (Martin et al., 1998). Le génome du chloroplaste ne code actuellement que pour 50 à 200 protéines, contre plusieurs milliers pour les cyanobactéries. Comme 18% du génome nucléaire de la plante *Arabidopsis* provient de cyanobactéries (Leister and Schneider, 2003), il semble qu'au moins une partie du matériel génétique perdu ait été transféré dans le génome nucléaire de la plante. Les protéines correspondantes ont d'ailleurs souvent acquis un domaine supplémentaire en particulier une séquence d'adressage chloroplastique (Weisbeek et al., 1989).

3) *La diversité des cyanobactéries explique leur présence ubiquitaire*

a. *Diversité morphologique et ultrastructures des cyanobactéries*

i. *Diversité morphologique*

La diversité des cyanobactéries s'observe aisément sur le plan morphologique tel que symbolisé par la Figure 15. La taille des cellules cyanobactériennes varie d'environ 0,5µm jusqu'à 40 µm de diamètre comme chez *Oscillatoria princeps*. Elles peuvent exister sous différentes formes (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014a): unicellulaires sphériques (*Synechocystis* sp. PCC6803) ou cylindriques (*Synechococcus* sp. PCC7942), se divisant par scission binaire ou par scission multiples (*Dermocarpa*, *Xenococcus*, de l'ordre des *Pleurocapsales*).

D'autres cyanobactéries sont pluricellulaires organisées en filaments linéaires pouvant présenter des cellules différenciées et spécialisées telles les hormogonies, les akinètes (résistances aux stress et dissémination de ces cyanobactéries), ou encore les hétérocystes (fixation de l'azote atmosphérique, notamment chez les *Nostocales* (*Anabaena* sp., *Nostoc* PCC7120)). On observe également des formes pluricellulaires en filament linéaire dépourvues de cellules spécialisées (*Spirulina* sp.) et des formes en filament ramifié (*Fischerella* sp.)(Rippka et al., 1979). Ces critères morphologiques sont d'ailleurs à la base de la taxonomie et de la classification.

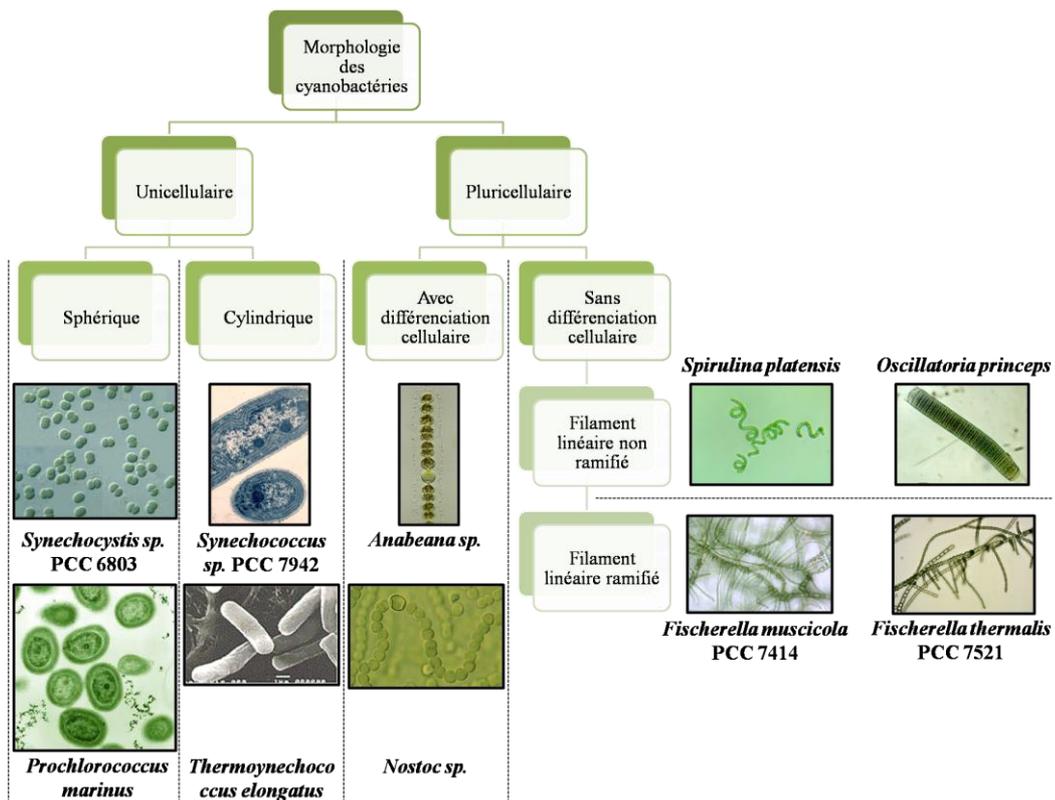


Figure 15 – Diversité morphologique des cyanobactéries

Photographies en microscopie photonique ou électronique de différentes cyanobactéries

ii. Ultrastructure des cyanobactéries

Les cyanobactéries présentent une ultrastructure proche des autres bactéries mais possèdent quelques particularités morphologiques et biochimiques, expliquant leur capacité à coloniser divers milieux dont des milieux extrêmes.

L'enveloppe de type GRAM négatif est souvent plus épaisse que chez d'autres bactéries (de 1 à 10 nm) avec une couche de peptidoglycane particulièrement importante. Elle est parfois protégée par une gaine mucilagineuse constituée de microfibrilles. Celles-ci sont souvent associées à des pilis qui peuvent atteindre 1 µm de long et assurent une migration des cellules par glissement en réponse à une variation de l'environnement. Les cyanobactéries ont un phototropisme (Bhaya, 2004) et certaines sont douées de tactisme hydrique (F. Garcia-Pichel and Pringault, 2001).

Le cytoplasme est semblable aux autres bactéries. Le matériel génétique est contenu dans une région appelée nucléoïde au centre la cellule. A l'exception de *Gloeobacter violaceus*, dont l'appareil photosynthétique se situe dans la membrane plasmique, les cyanobactéries possèdent des membranes photosynthétiques spécialisées intracellulaires appelées thylakoïdes. Le plus souvent en disposition pariétale concentrique chez les cyanobactéries de formes cylindriques ou sphériques, ils s'organisent plus rarement en disposition radiale. Les thylakoïdes sont constitués de 2 membranes de 7 nm d'épaisseur renfermant l'espace intrathylakoïdien. Le cytoplasme renferme de nombreuses inclusions servant de réserves de nutriments et d'énergie. On retrouve des grains de polyglucoside situés près des thylakoïdes (réserve de carbone), d'un polypeptide composé de L-Arg et L-Asp fabriqués sans ribosome, la cyanophycine (réserve d'azote), de vultine (réserve de phosphate) et des globules lipidiques. Un dernier type d'inclusion et pas des moindres, le carboxysome, est observé chez

les cyanobactéries et n'a pas de rôle de réserve mais un rôle métabolique. Le carboxysome est nécessaire à la fixation du carbone.

Certaines espèces planctoniques possèdent des vésicules à gaz, de petits cylindres protéiques contenant de l'air. Elles leur permettent de se positionner de manière optimale dans la colonne d'eau qu'elles occupent. Enfin, certaines cyanobactéries présentent des cellules différenciées et spécialisées. L'exemple principal est les hétérocystes, des cellules à paroi épaisse où siège la fixation de l'azote atmosphérique. Toutes les bactéries ne sont pas douées de différenciation cellulaire. C'est le cas de *Synechocystis* sp. PCC 6803, qui fait l'objet de ce travail, qui ne peut assimiler que l'azote combiné (nitrate, ammonium ou urée) comme source d'azote. Ce dernier point met en perspective le fait que la diversité des ultrastructures et des morphologies des cyanobactéries est étroitement liée à leur capacité métabolique et donc à la colonisation de nombreux milieux.

b. Diversité métabolique et physiologique

Les cyanobactéries présentent une diversité métabolique, qui est en partie responsable de leur présence ubiquitaire sur la planète. Elles peuvent assimiler le carbone et/ou l'azote à partir de diverses sources (C : dioxyde de carbone, glucose, acétate, glycérol ; N : diazote, ammonium, nitrate, urée, arginine, glutamine)(Bryant, 2006). Les cyanobactéries présentent une faculté d'adaptation remarquable. Elles ont ainsi pu coloniser de nombreux biotopes sur terre comme le symbolise la figure ci-dessous. Elles montrent également de très grandes capacités d'adaptation à leur environnement (lumière, salinité, température, radiations...) (F. Garcia-Pichel and Pringault, 2001)(Rippka et al., 1979). Certaines espèces peuvent notamment croître dans des environnements pollués par des métaux lourds.



Figure 16 – Les cyanobactéries colonisent la plupart des eaux et des sols de notre planète
Photographie de quelques habitats naturels des cyanobactéries

En plus de leur grande capacité d'adaptation, leur diversité métabolique explique en partie la variété des biotopes colonisés par les cyanobactéries, dont certains sont présentés dans la Figure 16. Elles colonisent la quasi-totalité des eaux douces, marines et saumâtres et la plupart des sols (même désertiques) où règnent des températures allant de 0°C (glaciers) à 70°C (source chaudes). Elles supportent même des milieux alcalins comme certains lacs jusqu'à pH 11(Summerfield and Sherman, 2008)(Ferran Garcia-Pichel and Pringault, 2001)(Badger et al., 2006).

Les cyanobactéries sont également intéressantes pour leur capacité, ou pas, à faire des symbioses avec d'autres microorganismes (champignons, bryophytes, gymnospermes, angiospermes). La plus simple d'entre elle correspond aux biofilms bactériens qui témoignent de la coopération inter-espèces entre bactéries anaérobies et cyanobactéries. Les symbioses avec les plantes supérieures (angiospermes et gymnospermes) sont plus complexes. Certains travaux ont d'ailleurs montré que les cyanobactéries constituaient les principaux épiphytes (organismes vivant sur des plantes) fixateurs d'azote dans les forêts tropicales et les mangroves du Costa Rica. Elles constitueraient ainsi la principale source d'azote moléculaire dans l'écosystème tropical, soulignant à nouveau leur importance écologique.

Sur le plan génétique, il y a, là encore, une grande diversité. Les cyanobactéries peuvent posséder des chromosomes circulaires ou linéaires de diverses taille (1.7 Mb à 12 Mb) et divers plasmides (de 2 Kb à 100 Kb) (Naraimsamy et al., 2013).

B. Classification et taxonomie des cyanobactéries

1) Historique de la taxonomie des cyanobactéries

Les cyanobactéries sont donc très diverses et la colonisation de nombreux milieux par les cyanobactéries, en font le groupe le plus vaste et le plus diversifié des bactéries (Shi and Falkowski, 2008). Plusieurs classifications ont été mises au point. Parmi ces systèmes, le système Geitler, qui date de 1932, était basé sur la morphologie de spécimens de collection. Il compte 3 ordres : les *Chroococcales*, les *Chemosiphonales* et les *Hormogonales* qui contenait 1300 espèces réparties en 145 genres ("Encyclopedia of Microbiology - Moselio Schaechter - Third Edition - Volume 1," n.d.). Une seconde taxonomie fut proposée dans la Revue Annuelle de Microbiologie (Annual Review of Microbiology) par Stanier et Cohen-Bazire en 1977. Ils proposaient alors une classification en 6 sections principales :

- (i) section I : les *Chroococcales*, formes unicellulaires (coque ou bacille),
- (ii) section II : les *Pleurocapsales*, formes unicellulaires ou en agrégats non filamenteux maintenus pas des parois externes partagées ou une matrice gélatineuse,
- (iii) section III : les *Oscillatoriales*, formes filamenteuses ne formant pas d'hétérocystes,
- (iv) section IV : les *Nostocales*, formes filamenteuses de largeur égale à hétérocystes,
- (v) section V : les *Rivulariales*, formes filamenteuses de largeur variable à hétérocystes,
- (vi) et la section VI : les *Stigonematales*, formes filamenteuses branchés à hétérocystes.

Drouet, en 1981 (Drouet, 1981), utilisa des spécimens issus d'herbier et compara leur morphologie. Il simplifia la classification en précédente en incluant seulement 62 espèces réparties en 24 genres. Plusieurs noms de souches bactériennes proviennent d'ailleurs de ce système (*Escherichia coli* notamment). Néanmoins, d'après les taxonomistes, cette classification n'était pas appropriée. Bourelly fit une réévaluation du système de Geitler, en 1985, dans son ouvrage *Les algues d'eau douce III* (2ème édition), basée sur la morphologie et le mode de reproduction (Caspers, 1974).

De nos jours, la classification qui fait office de référence est celle de Rippka et de ses collaborateurs (sous la direction de Stanier) de 1979, dans laquelle les cyanobactéries sont

classées en 5 sections (et non plus 6, d'après les premiers travaux de Stanier) : les *Chroococcales* – qui comprend les 2 cyanobactéries les mieux connues, *Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC7942, notamment étudiées au laboratoire – les *Pleurocapsales*, les *Oscillatoriales* – qui contient la spiruline, une cyanobactérie très utilisées dans les biotechnologies – les *Nostocales* et les *Stigonematales*. Cette classification repose sur la morphologie générale, l'ultrastructure, le mode de reproduction, la physiologie et quelques données génétiques à partir de spécimens de collection et de culture (pour revue voir (Rippka et al., 1979)).

2) Classification des cyanobactéries selon le Bergey's Manual

La classification des cyanobactéries dans la Manuel de Bergey (Holt, 1994) – présenté dans le tableau suivant – repose sur la même stratégie d'analyse de la morphologie, de l'ultrastructure et du mode de reproduction. Les cyanobactéries y constituent un phylum d'une seule classe, dans lequel les taxons classiques sont remplacés par des sous-sections et des sous-groupes et les genres sont remplacés par des formes, dont la détermination repose sur des clés taxonomiques. Les 56 formes actuellement reconnues se répartissent en cinq sous-sections, qui regroupent 56 formes reconnues :

- Section I : anciennement les *Chroococcales*, c'est un taxon hétérogène sur le plan phylogénétique puisqu'il ne forme pas de clade défini. Les *Chroococcales* sont dispersées parmi d'autres sous-sections et leur classification phylogénétique est actuellement impossible à réaliser. Ce sont des formes unicellulaires qui se reproduisent par division binaire ou bourgeonnement. Les divisions se font suivant 1, 2 ou 3 plans, à angle droit ou non, donnant naissance à des cellules isolées ou des amas de taille variable. Les cellules sont sphériques, ellipsoïdales ou en bâtonnet et ont des dimensions variant de 0,5 à 30 µm. Les formes planctoniques contiennent généralement des vacuoles à gaz. La plupart des genres synthétisent des phycobiliprotéines mais les formes *Prochloron* et *Prochlorococcus* n'en n'ont mais synthétisent de la chlorophylle *a* et *b*.
- Section II : anciennement les *Pleurocapsales*, dans laquelle les cyanobactéries se reproduisent exclusivement ou à certains stades par la formation de petites cellules sphériques (baeocytes). La cellule parentale grossit, sa membrane externe s'épaissit et finit par libérer de 4 à plus de 1000 baeocytes. La division multiple est la caractéristique phénotypique qui distingue cette section des autres cyanobactéries.
- Section III : anciennement les *Oscillatoriales*, elle inclut les cyanobactéries se divisant dans un seul plan, à angle droit, suivant un seul axe et formant un filament unisériel de cellules végétatives (formes filamenteuse homocystées). L'ensemble des cellules est appelé trichome.
- Section IV : anciennement les *Nostocales*, elle regroupe les formes filamenteuses hétérocystées ne présentant pas de ramifications vraies.
- Section V : anciennement les *Stigonematales*, elle classe les cyanobactéries filamenteuses qui croissent par division cellulaire interalaire et qui se divisent dans plusieurs plans. La reproduction s'effectue par rupture au hasard des trichomes, par formation d'hormogonies et par germination des akinètes. Les cyanobactéries de cette section forment des hétérocystes en absence d'azote combiné.

3) La classification des cyanobactéries en question

La classification d'Anagnostidis et Komarek, fondée sur la morphologie générale, l'ultrastructure et le mode de reproduction, fut présentée dans une série d'articles datant de 1985 jusqu'à 1990 dans la revue *Algology Studies* et une seconde série dans la revue *Archives of Hydrobiology* de 1985 à 1990. Cette étude comprenait alors 4 ordres: les *Chroococcales*, les *Oscillatoriales*, les *Nostocales*, et les *Stigonematales*. Les *Pleurocapsales* étaient fusionnés aux *Chroococcales*. De plus, les analyses moléculaires fondées sur l'ARNr 16S par Giovannoni et ses collègues en 1988 (Giovannoni et al., 1988) et par Turner et ses collègues datant de 1989 (Turner et al., 1989) comprend 9 ordres (et 10 si on inclut les *Prochlorales*) répartis en 6 super-groupes dont les ancêtres seraient :

- un ancêtre *Gleobacter* (pour une première partie des *Chroococcales*),
- un ancêtre *Pseudanabena* (pour une deuxième partie des *Chroococcales*),
- un premier ancêtre pour un 1^{er} groupe des *Oscillatoriales*,
- un ancêtre du type prochlorophytes pour les *Prochlorales*,
- un ancêtre *Synechococcus* (pour une troisième et une quatrième partie de *Chroococcales* et pour les *Pleurocapsales*).
- un ancêtre, regroupant dans ce 6^{ème} super-groupe, une seconde partie des *Oscillatoriales*, des *Nostocales* et des *Stigonematales*.

Ces études qui tiennent compte de données génétiques font alors apparaître le caractère polyphylétique des *Chroococcales* et des *Oscillatoriales*, ce qui semble remettre en cause la classification de Rippka de 1979, qui reste pourtant aujourd'hui une référence. Néanmoins, il est à noter que la classification et la taxonomie des cyanobactéries est en perpétuelle évolution. Elle est d'ailleurs actuellement en cours de révision suite à la découverte et à l'apparition de 2 nouvelles classes (*Melainabacteria* et *Sericytochromatia*), qui, fait intéressant, ne possède pas d'appareil photosynthétique, et regroupe au moins une partie des cyanobactéries provisoirement qualifiées d'*incertae sedis* (dont la position est incertaine) (Soo et al., 2017).

Le tableau ci-après rend compte de la classification encore aujourd'hui admise.

Tableau 7 – Classification des cyanobactéries d'après le manuel de Bergey

Section	Clé taxonomique			Formes	
	Clé taxonomique de 1 ^{er} rang	Clé taxonomique de 2 ^{ème} rang	Clé taxonomique de 3 ^{ème} rang		
Section I (anciennement les <i>Chroococcales</i>)	I. Phycobilisomes absents, phycobiliprotéines absentes ou sous forme de traces	A. Forme libre, marine, cellules de 0,5-0,8 µm de Ø		<i>Prochlorococcus</i>	
		B. Symbiotique des didemnides, cellules de 8-14 µm de Ø		<i>Prochloron</i>	
	II. Phycobiliprotéines et phycobilisomes dans la membrane cytoplasmique et absence de thylakoïdes			<i>Gloeobacter</i>	
	III. Phycobiliprotéines et phycobilisomes présents dans des thylakoïdes	A. Reproduction par fission binaire dissymétrique (bourgeonnement) au pôle apical de cellules ovoïdes, piriformes ou en forme de massue		<i>Chamaesiphon</i>	
		B. Reproduction par division binaire transverse symétrique dans un seul plan et absence de gaine structurée	1. Sphères ou bâtonnets de 1,7-2,3 µm de Ø		<i>Cyanobacterium</i>
			2. Sphères ou bâtonnets de 0,8-1,4 µm de Ø		<i>Cyanobium</i>
			3. Sphères ou bâtonnets > à 3 µm de Ø		<i>Cyanothece</i>
			4. Sphères ou bâtonnets de 0,6-2,1 µm de Ø		<i>Synechococcus</i>
			5. Cellules fusiformes de 4-8 µm par 35-80 µm		<i>Dactylococcopsis</i>
		C. Reproduction par division binaire transverse symétrique dans un seul plan et présence d'une gaine structurée			<i>Gloethece</i>
		D. Reproduction par division binaire transverse symétrique dans 2 ou 3 plans et absence de gaine structurée	1. Cellules sphériques de 3-4 µm et présence de vacuoles de gaz		<i>Microcystis</i>
	2. Cellules sphériques de 2-6 µm et absence de vacuoles de gaz		<i>Synechocystis</i>		
E. Reproduction par division binaire transverse symétrique dans 2 plans et présence d'une gaine structurée	1. Cellules 22-32 µm formant des agrégats souvent de 4 cellules		<i>Chroococcus</i>		
	2. Cellules sphériques 3-10 µm formant des agrégats		<i>Gloeocapsa</i>		
Section II (anciennement les <i>Pleurocapsales</i>)	I. Reproduction seulement par division multiple (sous-groupe 1)	A. Cellule végétative avec une polarité base apex (piriforme ou ovoïde)	1. Baeocytes immobiles avec paroi fibreuse à la libération	<i>Cyanocystis</i>	
			2. Baeocytes sans paroi fibreuse à la libération, parfois mobiles		<i>Dermocarpella</i>
		B. Cellule végétative sans polarité (sphérique) jusqu'à 1 000 baeocytes	1. Baeocytes sans paroi fibreuse à la libération, mobiles ou non		<i>Staniera</i>
	2. Baeocytes avec paroi fibreuse à la libération, immobiles		<i>Xenococcus</i>		
	II. Reproduction par nombreuses divisions binaires suivies de divisions multiples (sous-groupe 2)	A. Les cellules végétatives se reproduisent par divisions binaires dans trois plans formant des amas cubiques ou irréguliers. Elles forment ensuite des baeocytes par divisions multiples	1. Baeocytes immobiles avec paroi fibreuse à la libération		<i>Chroococciopsis</i>
			2. Baeocytes sans paroi fibreuse à la libération, mobiles ou non		<i>Myxosarcina</i>
		B. Divisions binaires dans plusieurs plans produisant des agrégats irréguliers avec ou sans pseudofilaments résultant de divisions intermittentes dans un seul plan. Seulement quelques cellules forment des baeocytes qui sont souvent mobiles			<i>Pleurocapsa</i>

Section	Clé taxonomique					Formes		
	1 ^{er} rang	2 ^{ème} rang	3 ^{ème} rang	4 ^{ème} rang	5 ^{ème} rang			
Section III (anciennement les <i>Oscillatoriales</i>)	I. Trichomes non cylindriques (aplatis ou avec section à 3 branches)	A. Trichomes aplatis (section ellipsoïdale)				<i>Crinalium</i>		
		B. Trichomes avec section à 3 branches				<i>Starria</i>		
	II. Trichomes cylindriques	A. Trichomes en hélice ouverte ou fermée, mobiles par rotation	1. Trichomes en hélice presque fermée, paroi cellulaire difficilement visible, cellules de 2-4 µm de large et mobilité permanente par rotation			<i>Spirulina</i>		
			2. Trichomes en hélice ouverte, paroi cellulaire visible, cellule de 6-12 µm de large et vacuoles à gaz souvent visibles			<i>Arthrospira</i>		
		B. Trichomes droits ou légèrement sinueux sur seulement une partie	1. Trichomes engainés, si mobiles, pas de rotation. Certains produisent des hormogonies	a. Gaine persistante et épaisse (> 8 mm), un seul trichome par gaine et seules les hormogonies sont mobiles		<i>Lyngbia</i>		
				b. Gaine persistante et mince (< 0,2 mm) et Ø du trichomes < 6 µm	i. Plusieurs trichomes par gaine, pas d'hormogonies		<i>Microcoleus</i>	
					ii. Un seul trichome (< 6 mm) par gaine, hormogonies mobiles		<i>Symploca</i>	
					iii. Autres formes (trichomes < 3 mm), peu mobiles		<i>Leptolyngbia</i>	
				a. Cellules plus longues que larges, peu mobiles avec de petites constriction intercellulaires, 1- 3 µm et vacuoles à gaz		i. Des phycobilines		<i>Limnothrix</i>
					ii. Pas de phycobilines		<i>Prochlorothrix</i>	
					iii. Peu mobile, constriction nettes et vacuoles à gaz polaires		<i>Pseudanabaena</i>	
					iv. Trichomes très mobiles (1-4 µm)		<i>Geitlerinema</i>	
			2. Trichomes continuellement mobiles, pas de gaine persistante	b. Cellules plus courtes que larges ou isométriques (4 à > 80 µm)		i. Trichomes courts de 2 à 16 cellules, constriction et peu mobiles		<i>Borzia</i>
						ii. Trichomes non constriction (4-100 µm) très mobiles		<i>Oscillatoria</i>
						iii. Trichomes non constriction (3,5-6 µm) vacuoles de gaz		<i>Planktothrix</i>
iv. Non constriction, cellules isométriques (6-22 µm) marines		<i>Trichodesmium</i>						
v. Non constriction, réseau cytoplasmique à thylakoïdes		<i>Tychonema</i>						

Section	Clé taxonomique					Formes
	1 ^{er} rang	2 ^{ème} rang	3 ^{ème} rang	4 ^{ème} rang	5 ^{ème} rang	
Section IV (anciennement les <i>Nostocales</i>)	I. Trichomes sans polarité base-apex	A. Le cycle ne comporte pas la formation d'hormogonies structurellement distinctes	1. Trichomes plus ou moins en spirale lâche	a. Trichomes à ½-1 spire immobile, hétérocystes matures terminaux, en formation par paire au centre, akinètes distants souvent isolés et présence de vacuoles de gaz pendant le cycle	<i>Anabeanopsis</i>	
				b. Trichomes comprenant plusieurs spires, immobiles, hétérocystes intercalaires ; akinètes en chaînes et distants et présence de vacuoles de gaz pendant le cycle	<i>Cyanospira</i>	
				a. Trichomes formés de cellules cylindriques, mobiles ou non, constriction intercellulaires peu marquées, extrémités légèrement atténuées, hétérocystes intercalaires, akinètes rarement adjacents et vacuoles de gaz présentes pendant le cycle	<i>Aphanizomenon</i>	
			2. Trichomes droits		b. Trichomes formés de cellules discoïdes souvent avec une gaine mince, mobiles ou non, hétérocystes intercalaires et terminaux, akinètes en chaîne et vacuole à gaz parfois présentes	<i>Nodularia</i>
					c. Trichomes formés de cellules cylindriques, mobiles ou non, cellule terminale conique, hétérocystes uniquement terminaux, akinète adjacent et pas de vacuoles de gaz	<i>Cylindrospermum</i>
					d. Trichomes formés de cellules cylindriques, non mobiles, cellule terminale conique, hétérocystes uniquement terminaux, akinètes adjacents ou distants et vacuoles de gaz toujours présentes	<i>Cylindrospermopsis</i>
					e. Trichomes formés de cellules en forme de baril ou cylindriques, mobiles ou non, cellule terminale conique (mobiles) ou indifférenciée (planctoniques), hétérocystes intercalaires et terminaux, akinètes adjacents ou non et vacuoles de gaz parfois présentes	<i>Anabaena</i>
					B. Le cycle comporte la formation d'hormogonies structurellement distinctes	
					2. Pas de cycle clair par manque de mobilité et de différenciation	<i>Nostoc cluster 3-5</i>
			II. Trichomes avec une polarité base-apex Le cycle comporte la formation d'hormogonies structurellement distinctes	A. Hormogonies mobiles, avec gaine mince ou non, de taille uniforme, 1 seul hétérocyste terminal. <i>Trichome mature avec gaine épaisse et atténuation apicale très marquée, fausses ramifications fréquentes, akinètes (si produits) isolés ou en chaînes courtes adjacentes</i>	1. Pas d'akinète, pas de besoin en fortes concentrations de Na, Mg et Ca	
	2. Pas d'akinète et besoin de fortes concentrations en NaCl				<i>Rivularia</i>	
	3. Grands akinètes généralement dulçaquicoles				<i>Gloeotrichia</i>	
	B. Propriétés identiques à II, A, 1 mais atténuation apicale peu ou pas marquée	1. Région apicale du trichome de largeur constante, formation transitoire de vacuoles de gaz (hormogonies), pas d'akinète		<i>Tolypothrix</i>		
		2. La région apicale du trichome présente des cellules terminales élargies, akinètes en chaînes, adjacents ou non aux hétérocystes qui peuvent être intercalaires et terminaux		<i>Microchaete</i>		

Section	Clé taxonomique					Formes
	1 ^{er} rang	2 ^{ème} rang	3 ^{ème} rang	4 ^{ème} rang	5 ^{ème} rang	
Section V (anciennement les <i>Stigonematales</i>)	I. Ramifications vraies dichotomiques ou sub-dichotomiques	A. Dépôt calcaire sur les filaments et pas de fouets terminaux	1. Hétérocystes présents			<i>Loriella*</i>
			2. Hétérocystes absents			<i>Geitleria</i>
		B. Pas de dépôt calcaire sur les filaments, fouets terminaux			<i>Iyengariella</i>	
	II. Ramifications vraies latérales, irrégulières ou aspect filamenteux peu visible	A. Hétérocystes sous forme de cellules latérales, terminaux, rarement intercalaires ou sur une branche courte	1. Ramifications en Y présentes			<i>Mastigocladopsis*</i>
			2. Ramifications en Y absentes	a. Marin, endolithe dans des carbonates		<i>Mastigocoleus*</i>
		b. Dulçaquicole ou terrestre, non endolithe		<i>Nostochopsis</i>		
		B. Hétérocystes intercalaires quelquefois terminaux	1. Produit des hormocystes et des hormogonies, unisérié			<i>Westiella*</i>
			2. Produit parfois des hormogonies mais pas d'hormocystes, trichomes plurisériés ou semi-amorphes	a. Trichomes matures fragmentés en agrégats irréguliers		<i>Chlorogloeopsis</i>
				b. Trichomes pluri-sériés au moins en partie		<i>Stigonema</i>
				c. Trichomes uni et pluri-sériés, pas d'hétérocystes		<i>Doliocatella*</i>
d. Trichomes uni et pluri-sériés, hétérocystes présents				<i>Fischerella**</i>		

En raison de l'énorme diversité métabolique et du polymorphisme des cyanobactéries. La classification du Bergey's Manual (Holt, 1994), largement inspirée des travaux de Rippka (Rippka et al., 1979), est fondée sur des caractères morphologiques stables et observables en culture comme :

- la forme et le mode de croissance :
 - o sous forme unicellulaire,
 - o sous forme de colonies, pour lequel on distingue l'aspect et la forme de la colonie,
 - o sous forme de filaments, pour lequel on distingue diverses formes en fonction de :
 - la polarité des filaments,
 - la présence ou non de ramifications pour lesquelles on précise la nature :
 - ramifications vraies,
 - ramifications fausses : simples en Y ou géminées,
 - la présence ou non d'une gaine pour laquelle on précise l'épaisseur,
- la forme et la taille des cellules végétatives,
- la présence ou non de vacuoles à gaz,
- la présence ou non (forme homocystée) de cellules différenciées et spécialisées telles que les hétérocystes, les akinètes ou les hormogonies. Pour chacune d'entre elles, on distingue leur taille, leur forme et leur mobilité (hormogonies).

C. Les cyanobactéries : des modèles d'étude aux biotechnologies

1) Les 2 cyanobactéries modèles

a. *Synechococcus* sp. PCC 7942

Synechococcus sp. PCC 7942, aussi nommé *Synechococcus elongatus*, de part sa forme en bâtonnet, est une cyanobactérie à GRAM négatif (comme toutes les cyanobactéries), unicellulaire et vivant dans les eaux salines. Son organisation cellulaire est similaire à celle de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (voir ci-après) mais sa forme est différente, puisque la cellule est allongée ressemblant à un cylindre d'environ 1 μm de diamètre pour 3 à 4 μm de long. *Synechococcus* possède un plasmide d'environ 46 000 pb et un chromosome circulaire de 2,7 Mb entièrement séquencé (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>). Et, *Synechococcus* est le premier modèle cyanobactérien pour lequel il a été démontré une transformation efficace par de l'ADN exogène (Shestakov and Khyen, 1970). Elle est beaucoup étudiée dans le cadre de l'assimilation du carbone inorganique, du transport et de la régulation de composés azotés et de la réponse à une carence en fer.

b. *Synechocystis* sp. PCC 6803

i. Caractéristiques morphologiques et physiologiques

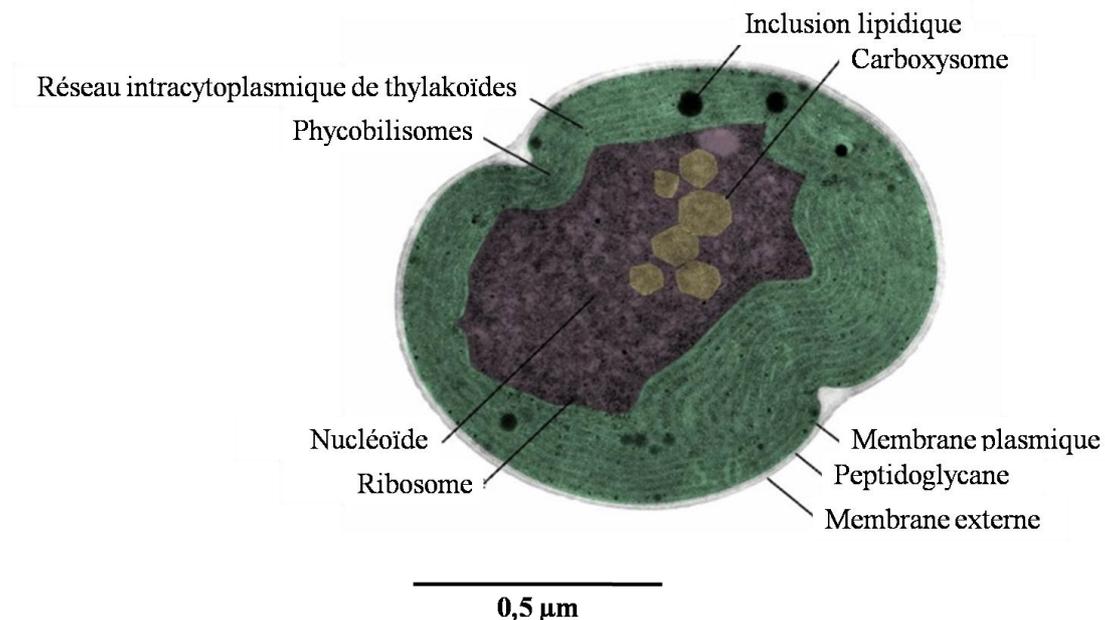


Figure 17 – Photographie d'une coupe d'une cellule de *Synechocystis* SP.PCC 6803 observée en microscopie électronique et colorisée artificiellement

Les thylakoïdes sont les membranes photosynthétiques (les phycobilisomes constituent les antennes collectrices de lumière). Les carboxysomes protègent l'activité carboxylase (fixation du CO_2 en carbohydrates) de l'enzyme RUBISCO (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase).

Synechocystis sp. PCC6803 (abrégié *Synechocystis* dans le reste de mon mémoire) est une bactérie à GRAM négatif, isolée d'un lac californien en 1968. Elle est unicellulaire, sphérique (Rippka et al., 1979), vivant aussi bien dans les eaux douces que les eaux saumâtres (euryhaline) (Richardson et al., 1983) et qui peut supporter un pH très alcalin. Elle possède

une double membrane (externe et cytoplasmique) et un périplasme. Elle présente des thylakoïdes intracytoplasmiques, qui sont le siège de la photosynthèse.

ii. *Synechocystis PCC 6803 : un modèle d'étude historique de la photosynthèse*

Historiquement, les cyanobactéries et plus particulièrement *Synechocystis*, ont servi de modèles pour la compréhension de la photosynthèse oxygénique. Cela s'explique par la forte similarité entre l'appareil photosynthétique des cyanobactéries avec celui du chloroplaste des algues et des plantes supérieures. De plus, la culture de *Synechocystis* est plus aisée que celle de la plante modèle *Arabidopsis* et son génome est plus facilement manipulable que celui du chloroplaste. C'est pourquoi, elle a permis de comprendre les bases biochimiques de la photosynthèse oxygénique (Rochaix, 1992). Enfin, la caractéristique métabolique de *Synechocystis* qui a grandement facilité l'étude de la photosynthèse, est son caractère hétérotrophe facultatif (Rippka et al., 1979), soit sa capacité à croître au dépend du glucose en absence de lumière. Cela a notamment permis l'obtention de mutant affecté dans la photosynthèse, impossible ou difficile à réaliser chez des organismes exclusivement phototrophes. *Synechocystis* est encore aujourd'hui très utilisée au laboratoire. Le développement de sa génétique fait d'elle, un bon système modèle pour étudier la physiologie (Battchikova et al., 2010) (Hagemann, 2011) (Kirilovsky, 2010) (Singh et al., 2009), la morphologie (Vermaas, et al. 2008), la division cellulaire (Marbouty et al., 2009) (Miyagishima et al., 2005) et la tolérance aux stress (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014b).

iii. *Génétique et génome de Synechocystis sp. PCC 6803*

Le génome de *Synechocystis* a été le 1^{er} génome cyanobactérien séquencé (Kaneko et al., 1996) et est disponible sur le site CyanoBase : (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>).

Synechocystis possède 7 plasmides de 2,3 kb à 119 kb et un chromosome circulaire de 3,57 Mb qui est polyploïde. On compte une dizaine de copies du chromosome par cellule en phase exponentielle et qui semble toutes s'exprimer. Chez *Synechocystis*, 2 modes majeurs de transfert de matériel génétique ont été identifiés : la transformation naturelle (Chauvat et al., 1983) car *Synechocystis* est naturellement compétente et la conjugaison (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994).

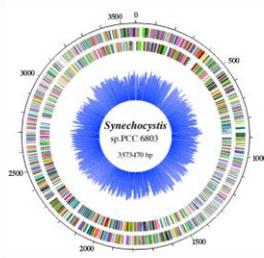
Représentation	Nom	Taille (en pb)	Nombre de gènes
	Chromosome circulaire (~ 10 copies)	3 573 470	3 317
	pSYSM	119 895	132
	pSYSX	106 004	110
	pSYSA	103 307	106
	pSYSG	44 343	49
	pCA2.4	2 378	2
	pCB2.4	2 345	3

Figure 18 – Représentation schématique du génome de *Synechocystis* PCC 6803
La taille du chromosome circulaire et des plasmides ne sont pas à l'échelle.

Lors de la transformation, les recombinaisons génétiques entre les régions d'homologie d'un ADN donneur et le génome de la cellule (chromosome ou plasmide) permettent l'intégration dirigée de cet ADN donneur en lieu et place du site correspondant dans le génome. Ceci conduit, selon le cas à l'élimination d'un ou plusieurs gènes (ou promoteur(s)) contigus) ou à leur remplacement par un (leur) version modifiée (Grigorieva and Shestakov, 1982)(Williams, 1988)(Labarre et al., 1989). La conjugaison permet d'introduire des plasmides dérivés (voir ci-après) du plasmide naturel, RSF1010, qui se réplique de façon autonome chez *Synechocystis* et *Synechococcus* PCC 7942 (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994). Des vecteurs d'expression constitutive (Marraccini et al., 1993) ou conditionnelle (thermorégulée) (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994) ont été développés à partir du plasmide RSF1010. Ces vecteurs permettent d'étudier *in vivo* la fonction et l'expression de l'ensemble des gènes de *Synechocystis* (et aussi de *Synechococcus*), même les gènes essentiels, et de localiser les protéines correspondantes (Marraccini et al., 1993) (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994) (Poncelet et al., 1998) (Mazouni et al., 2003) (Mazouni et al., 2004).

2) Différences morphologiques et physiologiques entre *Synechococcus* et *Synechocystis*

Bien que présentant un temps de génération similaire de 10 à 12 heures dans les conditions standards et optimales de culture, ces 2 modèles ont des différences morphologiques et physiologiques importantes. La première est liée à la morphologie des cellules (respectivement un bacille et un coque pour *Synechococcus* et *Synechocystis*).

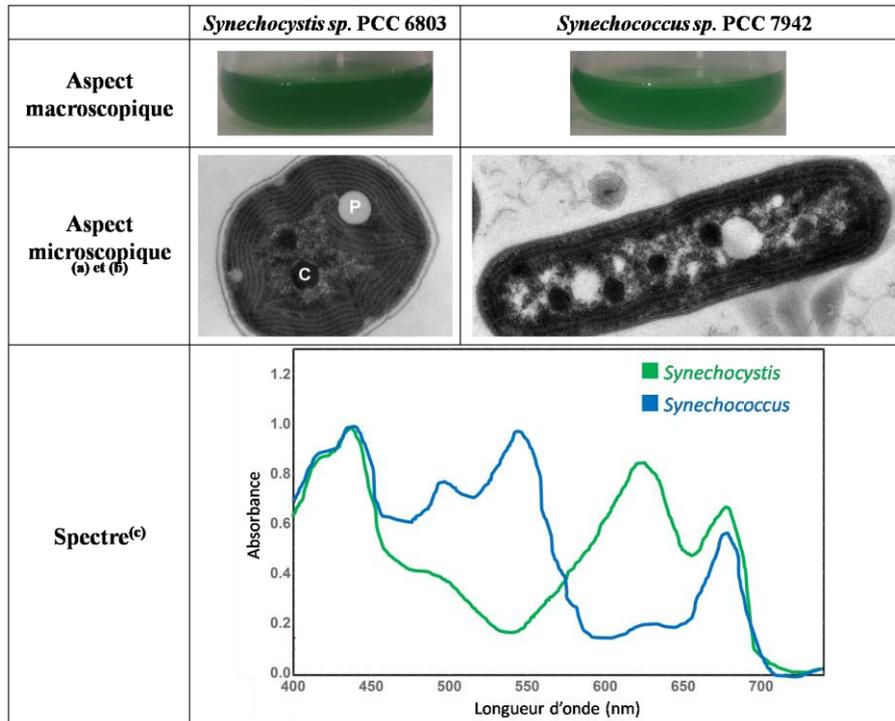


Figure 19 – Différences entre *Synechocystis* et *Synechococcus*

(a) Tiré de « α -Tocopherol Plays a Role in Photosynthesis and Macronutrient Homeostasis of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 That Is Independent of Its Antioxidant Function », Sakuragi Y., et al, 2006, *Plant Physiology* ; C = Carboxysome ; P = poly- β -hydroxybutyrate ; (b) Tiré de « Electron micrograph of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 cell showing the carboxysomes as polyhedral dark structures », Gonzalez R., et Kerfeld C., 2015 ; ; (c) Adapté de « Analysis of fluorescence spectra in cyanobacteria from pico seconds to minutes » ; ACADEMISCH PROEFSCHRIFT ; VRIJE UNIVERSITEIT

La culture sur milieu solide rend compte de cette différence. Les colonies de *Synechocystis* sont généralement plus grosses et plus denses que celles de *Synechococcus*. De plus, la motilité de *Synechocystis* est plus flagrante en milieu solide et peut fortement augmenter dans certaines conditions de culture ou en fonction du fond génétique de la souche. La seconde différence concerne la capacité à former un biofilm et s'observe particulièrement en milieu liquide. Chez *Synechocystis*, lorsque l'on homogénéise une culture restée en phase stationnaire prolongée sans agitation, on observe la présence d'un biofilm caractérisée par une augmentation de la viscosité du milieu. Enfin, la dernière différence repose sur la composition et la proportion en pigments photosynthétiques qui peut déjà s'apprécier en milieu liquide puisque *Synechocystis* présente une couleur verte dense et foncée tandis que *Synechococcus* a une couleur verte-jaune plus brillante.

3) Les cyanobactéries : des modèles d'intérêt industriel

a. Les cyanobactéries : des modèles dans les biotechnologies modernes

Les cyanobactéries sont également regardées comme des usines cellulaires pour la production durable (photoproduction) de produits pour les industries alimentaires, pharmaceutiques, de l'énergie et de l'environnement (Cassier-Chauvat and Chauvat 2002). Ainsi les cyanobactéries produisent de nombreuses molécules d'intérêt (vitamines, antioxydants, toxines, biocarburants) (Dittmann, et al. 2015) (Narainsamy, Farci, et al. 2016). Les cyanobactéries synthétisent aussi des métabolites secondaires comme des antibactériens, des antifongiques, des antiviraux, des anticancéreux et des algicides (Savakis and Hellingwerf 2015) (Dittmann, et al. 2015) (Narainsamy, Farci, et al. 2016). La figure ci-dessous illustre parfaitement la diversité des composés qu'il est possible de produire à partir des voies métaboliques existantes (représentées en noir) chez les cyanobactéries.

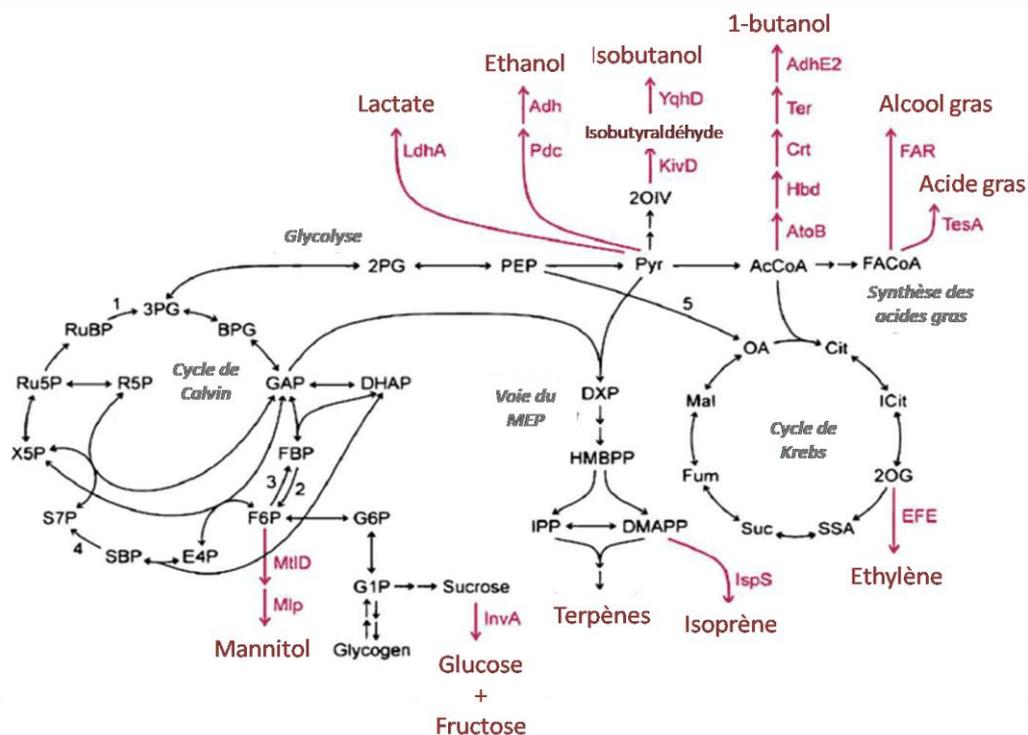


Figure 20 – Exemples de métabolites d'intérêt dérivés du métabolisme central des cyanobactéries

Tiré de « Rosgaard, L., de Porcellinis, A. J., Jacobsen, J. H., Frigaard, N.-U., & Sakuragi, Y. (2012). Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants. *Journal of Biotechnology*, 162(1), 134–47. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.05.006 »

Certaines cyanobactéries, comme *Arthrospira platensis* connue sous le nom de spiruline, font l'objet de cultures intensives aux Etats-Unis (Hawaï, Californie) et en Asie pour leurs qualités nutritionnelles exceptionnelles. Elles sont notamment utilisées dans la production de compléments alimentaires (<http://www.spirulina.com/> et <http://www.cyanotech.com>) incluant des vitamines, des thérapeutiques. Elles produisent aussi des bioplastiques (polyhydroxyalkanoates (PHA)) (Dittmann, et al. 2015), ayant des propriétés similaires aux polyéthylènes et aux polypropylènes. Les cyanobactéries au sein de consortiums formés avec des bactéries chimiotrophes peuvent être utilisées pour la dépollution des eaux usées et de sites (aquatiques ou terrestres) pollués par du pétrole ou des métaux lourds (De Philippis, Colica and Micheletti 2011).

b. Les cyanobactéries : des modèles pour la photoproduction de biocarburants

En 2008, 80% de l'énergie consommée dans le monde entier ($5,7 \times 10^{20}$ J) a été générée à partir de la combustion issue de combustibles fossiles (pétrole, gaz et charbon), libérant ainsi environ 6 gigatonnes de CO_2 (gaz à effet de serre) dans l'atmosphère (Zhou and Li 2010). Les préoccupations liées à la disponibilité en énergie qui diminue grandement, à l'indépendance énergétique qui devient critique et à la pollution croissante, explique le développement de nouvelles sources d'énergie plus durables et respectueuses de l'environnement. Le flux solaire annuel reçu par la Terre ($\approx 5 \times 10^{24}$ J) est très supérieur à la consommation d'énergie mondiale ($5,7 \times 10^{20}$ J) ; d'où l'intérêt croissant pour les micro-organismes photosynthétiques, tels que les cyanobactéries, qui pourraient produire des biocarburants à partir de cette énergie lumineuse et de ressources abondantes et peu coûteuses : CO_2 et eau – même des eaux industrielles polluées (NaCl, ammonium, nitrate, urée, phosphate *etc.*).

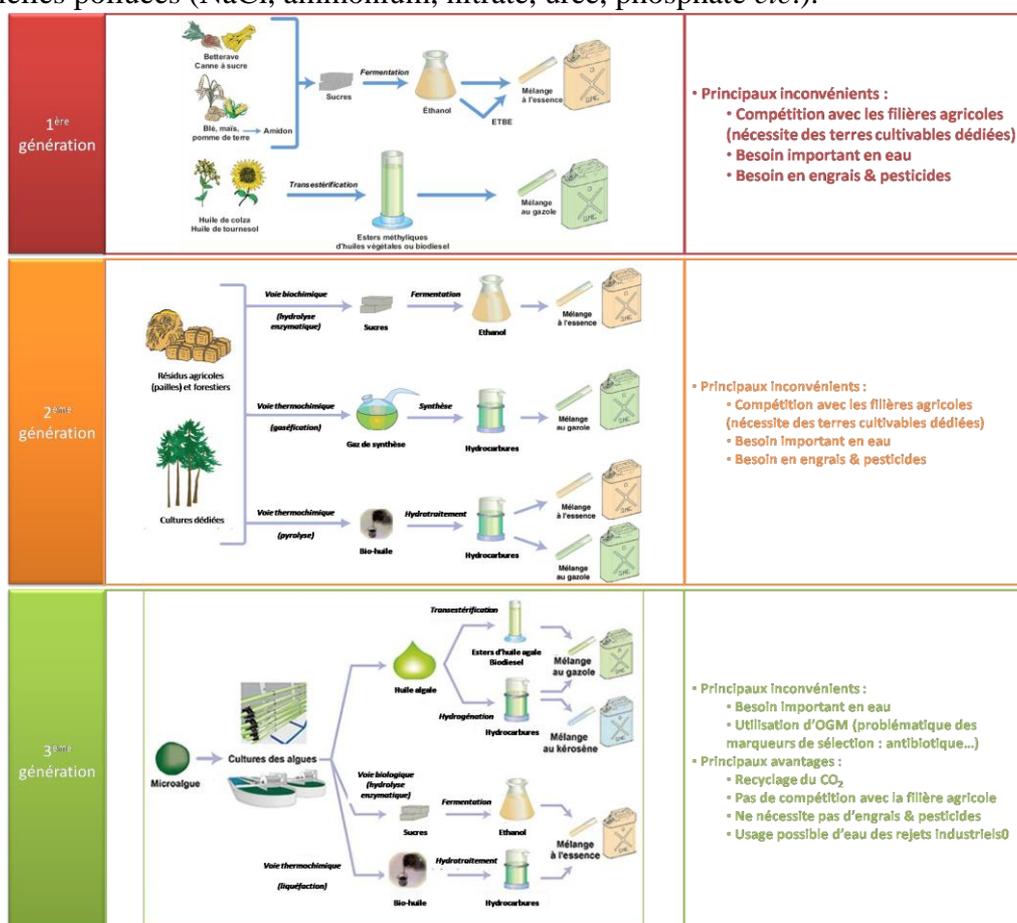


Figure 21 – Schéma de la production des biocarburants de 1ère, 2ème et 3ème génération et leurs avantages et inconvénients

L'exploitation des cyanobactéries répond parfaitement aux critères et aux exigences environnementales relatives à la production de biocarburants de 3^{ème} génération. En effet, leur croissance ne nécessite pas de terres cultivables, de fertilisants, d'engrais, d'insecticides et de pesticides (Angermayr, Gorchs Rovira and Hellingwerf 2015) comme cela l'était auparavant pour les biocarburants de 1^{ère} et de 2^{ème} génération qui reposaient respectivement sur l'utilisation de cultures vivrières (betterave, canne à sucre) et de déchets verts (résidus cellulosiques) de l'industrie du bois et de l'agriculture.

De plus, les cyanobactéries captent l'énergie solaire à des rendements plus élevés (3 à 9 %) que les plantes (0,25 à 3%) ; et tolèrent une concentration en CO₂ plus élevée (Zhou and Li 2010) (Ducat, Way and Silver 2011). On estime qu'elles fixent chaque année 25 gigatonnes de carbone issu du CO₂ atmosphérique (Jansson and Northen 2010). L'utilisation de cyanobactéries dans les sites industriels consommant beaucoup de pétrole (métallurgie, cimenteries), pour produire des biocarburants à partir du CO₂ produit par ces industries, permettrait de réduire leur bilan carbone, en réduisant leur consommation de pétrole tout en évitant d'avoir à transporter les biocarburants de leur site de production vers les sites industriels d'utilisation.

Les cyanobactéries sont actuellement très étudiées pour la production des biocarburants suivants : les alcools (éthanol, butanol) mélangeables à l'essence, les biodiesels (Dismukes, et al. 2008), les alcanes qui sont des précurseurs de diesel (Savakis and Hellingwerf 2015) et du dihydrogène comme biogaz (Ghirardi, et al. 2009). De récents travaux au laboratoire effectués avec *Synechocystis* ont permis d'augmenter significativement (20 fois) le faible niveau naturel de production d'H₂ (Ortega-Ramos, et al. 2014). Très récemment, les études se sont orientées vers la production de terpènes (composés riches en énergie capables de transformer du diesel en kérosène pour l'aviation : pour revue voir (Pattanaik and Lindberg 2015) et (Lai and Lan 2015)). Quelques laboratoires ont obtenu une production faible (et peut-être transitoire car décrite seulement sur une petite durée n'excédant pas 1-3 mois) de β -phellandrène (Formighieri and Melis 2014) et de limonène (Kiyota, et al. 2014)(Davies, Work, et al. 2014). Enfin, bien que *Synechocystis* et *Synechococcus* soient très largement utilisées comme châssis de production, il est important de noter que l'immense diversité des cyanobactéries doit nous permettre d'identifier des souches alternatives plus productives et plus performantes.

II. Le métabolisme énergétique des cyanobactéries

A. Introduction générale au métabolisme

1) Définitions

Le métabolisme est un ensemble de processus complexes et incessants de transformation de matière et d'énergie par la cellule ou par l'organisme. On distingue le métabolisme des molécules informationnelles (réplication, transcription, traduction...) du métabolisme énergétique, qui lui, correspond à l'ensemble des réactions chimiques par lesquelles les êtres vivants acquièrent et utilisent de l'énergie libre et synthétisent et dégradent les biomolécules qui les constituent. Le métabolisme énergétique met en jeu des échanges de matière et d'énergie entre la cellule et son milieu extérieur. Il correspond à l'ensemble des réactions d'oxydation de molécules permettant la libération d'énergie puis son utilisation pour assurer la synthèse de constituants cellulaires. On distingue alors 2 volets :

- le catabolisme, qui libère de l'énergie (le plus souvent sous forme de composés à haut potentiel énergétique : ATP, phosphoenolpyruvate, thioesters...) et du pouvoir réducteur (sous forme de transporteurs d'électrons : NADH, NADPH, flavoprotéines...) en décomposant des biomolécules organiques complexes (glucides, lipides, protéines) jusqu'à l'oxydation complète en molécules simples (dioxyde de carbone (CO₂), eau (H₂O)...),
- l'anabolisme, qui utilise cette énergie et ce pouvoir réducteur pour fabriquer des molécules complexes (cholestérol, réserves glucidiques...) à partir de précurseurs simples (acétylCoA).

Il existe un lien étroit entre le catabolisme et l'anabolisme tel que représenté dans la Figure 22. De plus, l'une des caractéristiques aisément observable pour le catabolisme et l'anabolisme est respectivement leur caractère convergent et divergent. Ainsi, à partir d'une infinité de molécules, le catabolisme permet leur dégradation en molécules « carrefour » comme le pyruvate. A l'inverse, l'anabolisme est clairement divergent puisqu'il assure la synthèse d'un nombre important de molécule à partir d'une molécule carrefour.

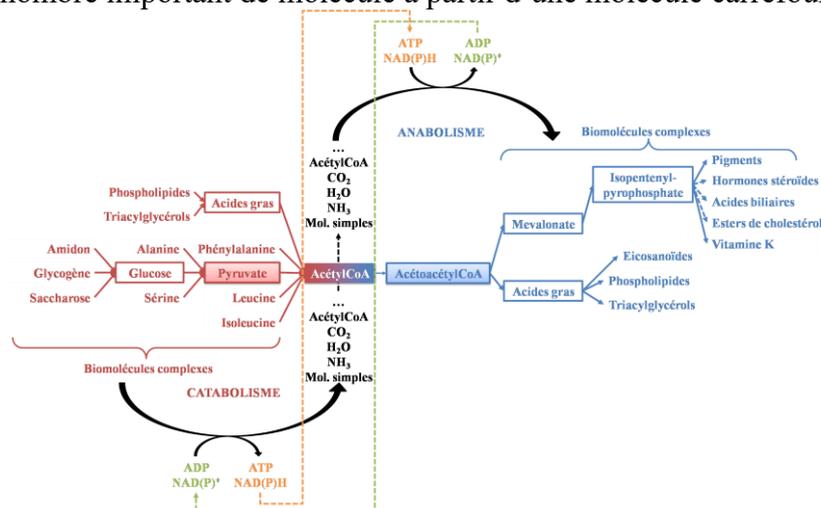


Figure 22 – Représentation schématique du lien entre catabolisme convergent et anabolisme divergent

2) Différents types trophiques

Pour vivre les organismes doivent donc extraire de l'énergie à partir de l'environnement et la convertir en une énergie compatible avec leurs capacités métaboliques (= source d'énergie). Ils doivent également trouver dans leur environnement des composés donneurs d'électrons (= source d'électron) et prélever des précurseurs nécessaires pour élaborer leur propre matière (= source de carbone). En fonction de la nature de ces 3 sources, on distingue différents types trophiques tel que représenté dans le Tableau 8. D'après ce tableau, les cyanobactéries sont des organismes photolithoautotrophes et ont donc pour :

- source d'énergie : la lumière, captée durant la phase photochimique de la photosynthèse,
- source d'électron, l'eau, oxydée en O₂ durant cette même phase de la photosynthèse,
- source de carbone, le CO₂, assimilé lors de la phase non photochimique de la photosynthèse.

Tableau 8 – Les différents types trophiques

(1) Source d'énergie	(2) Source d'électrons	(3) Source de carbone	Type trophique	Exemple
Lumière <i>Photo-</i>	Organique <i>-organo-</i>	Organique <i>-hétérotrophe-</i>	<i>Photoorgano</i> hétérotrophe	Bactéries photosynthétiques non sulfureuses (pourpres et vertes) souvent autotrophes facultatives & héliobactéries
		Minérale (CO ₂) <i>-autotrophe</i>	<i>Photoorgano</i> autotrophe	
	Inorganique <i>-litho-</i>	Organique <i>-hétérotrophe-</i>	<i>Photolitho</i> hétérotrophe	
		Minérale (CO ₂) <i>-autotrophe</i>	<i>Photolitho</i> autotrophe	Algues, bactéries photosynthétiques sulfureuses (pourpres et vertes) & cyanobactéries
Composé chimique <i>Chimio-</i>	Organique <i>-organo-</i>	Organique <i>-hétérotrophe-</i>	<i>Chimioorgano</i> hétérotrophe	Protozoaires, mycètes, bactéries pathogènes
		Minérale (CO ₂) <i>-autotrophe</i>	<i>Chimioorgano</i> autotrophe	
	Inorganique <i>-litho-</i>	Organique <i>-hétérotrophe-</i>	<i>Chimiolitho</i> hétérotrophe	
		Minérale (CO ₂) <i>-autotrophe</i>	<i>Chimiolitho</i> autotrophe	Bactéries nitrifiantes, bactéries thiotrophes oxydant le soufre, bactéries oxydant le fer

Par conséquent, la photosynthèse sera donc largement présentée dans la partie B suivante.

B. La photosynthèse oxygénique chez les cyanobactéries

1) Vue d'ensemble de la photosynthèse oxygénique

a. Généralités sur la photosynthèse

Les cyanobactéries constituent l'unique phylum chez les bactéries à réaliser la photosynthèse oxygénique. L'ubiquité de son donneur d'électrons, l'eau, leur permet de coloniser davantage de biotopes que les bactéries effectuant la photosynthèse anoxygénique.

Les cyanobactéries sont considérées comme l'ancêtre du chloroplaste des eucaryotes photosynthétiques d'après la théorie endosymbiotique. A ce titre, les cyanobactéries possèdent un appareil photosynthétique très similaire à celui des plantes expliquant ainsi la très forte conservation structurale et fonctionnelle des complexes photosynthétiques (Sadekar et al., 2006). Tout comme les plantes, les cyanobactéries sont donc capables d'utiliser l'énergie solaire pour produire, à partir d'eau (H₂O) et de dioxyde de carbone (CO₂), du dioxygène (O₂) et des composés organiques de formule générale (CH₂O)_n tel que présenté dans l'équation (1) présentée ci-dessous :



b. Les 2 phases de la photosynthèse oxygénique

La photosynthèse oxygénique se décompose en 2 phases.

- (1) La première repose sur la capacité des organismes photosynthétiques à absorber l'énergie lumineuse et à produire de l'énergie (sous forme d'ATP) et du pouvoir réducteur (sous forme de NADPH) *via* des réactions dépendantes de la lumière. C'est la phase dite « lumineuse » de la photosynthèse.
- (2) L'énergie chimique et le pouvoir réducteur alimentent alors des réactions d'assimilation du carbone indépendantes de la lumière produisant des sucres et d'autres composés organiques à partir de CO₂ et d'eau (H₂O). Cette seconde étape correspond à la phase dite « obscure ».

i. La phase « lumineuse » ou photochimique

Cette phase a lieu au niveau de replis membranaires et de vésicules lipidiques intracellulaires spécialisées : les thylakoïdes. Chez les algues et les plantes, ces thylakoïdes sont eux-mêmes empilés en grana dans le stroma (équivalent au cytoplasme des cyanobactéries) des chloroplastes. La phase « lumineuse » ou photophosphorylation est l'une des 2 stratégies de production d'énergie sous forme d'ATP et de génération d'un pouvoir réducteur, dont les représentations schématisées sont présentées ci-après :

- la première stratégie est la **phosphorylation de l'ADP liée à la réoxydation des coenzymes réduits** (ou phosphorylation oxydative mitochondriale ou respiration mitochondriale), au cours des voies anaboliques par transfert des électrons jusqu'à un accepteur final, l'eau H₂O :
-

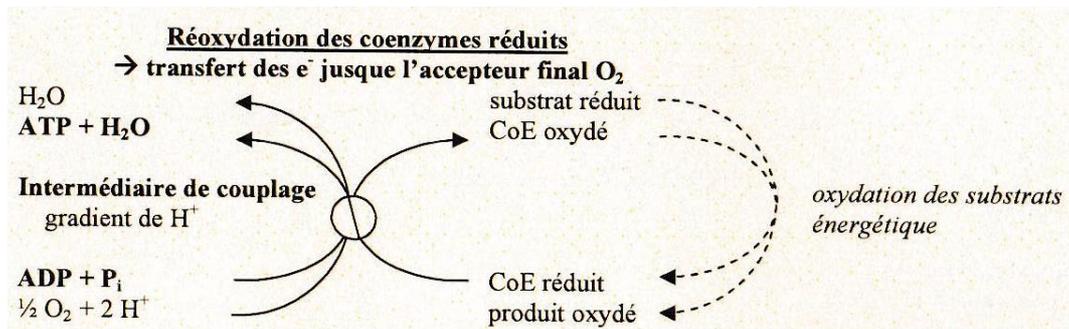


Figure 23 – Représentation schématique de la phosphorylation de l'ADP liée à la réoxydation des coenzymes réduits

Il y a un couplage chimio-chimique via un intermédiaire de couplage (gradient de H⁺) entre :

- des étapes d'oxydoréduction très exergoniques dans le transfert des électrons depuis les coenzymes (CoE) réduits jusqu'à l'eau,
- et la régénération de la liaison phosphoanhydride de l'ATP.

- la seconde repose sur la **phosphorylation de l'ADP liée à la photosynthèse** (ou photophosphorylation) par transfert des électrons libérés par l'excitation des photons jusqu'à un accepteur final, le NADP⁺ :

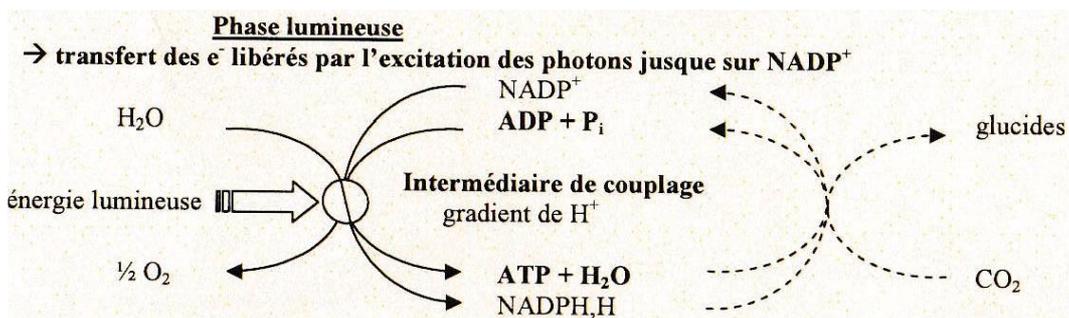


Figure 24 – Représentation schématique de la phosphorylation de l'ADP liée à la photosynthèse

Il y a un couplage chimio-chimique via un intermédiaire de couplage (gradient de H⁺) entre :

- des étapes d'oxydoréduction très exergoniques dans le transfert des électrons libérés par la photolyse de l'eau,
- et la régénération de la liaison phosphoanhydride de l'ATP.

En comparant la phosphorylation oxydative mitochondriale à la photophosphorylation, on remarque que ces 2 processus partagent un mécanisme commun dont les étapes principales sont :

- (i) le transfert des électrons dans une série de porteurs membranaires incluant des cytochromes, des quinones et des protéines Fe-S, depuis un donneur d'électron (un CoE réduit (NAD(P)H le plus souvent) pour la phosphorylation oxydative ou l'eau H₂O pour la photophosphorylation) vers un accepteur final d'électron (l'eau H₂O pour la phosphorylation oxydative ou le NADPH pour la photophosphorylation),
- (ii) la translocation concomitante de protons H⁺ de l'autre côté d'une membrane créant ainsi un gradient électrochimique,
- (iii) et le couplage chimio-osmotique entre la force protomotrice générée par ce gradient et la synthèse d'ATP, catalysée à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi) par une ATP synthase très proche de l'ATP synthase de la phosphorylation oxydative. Néanmoins, contrairement au NADH dans la phosphorylation oxydative, l'eau est un très mauvais donneur d'électrons (E° = 0,82 V contre - 0,32 V). C'est pourquoi, la photophosphorylation diffère de la phosphorylation oxydative car elle requiert l'apport d'énergie sous forme de lumière pour créer un bon donneur d'électrons.

Pour la photosynthèse, à cela s'ajoute une première étape qui consiste en l'absorption de la lumière.

D'un point de vue énergétique, pour 2 photons absorbés, un électron est transféré de H₂O au NADP⁺. La formation de l'O₂ requiert donc 4 électrons, soit 8 photons (4 par photosystème). On obtient ainsi l'équation (2) suivante :



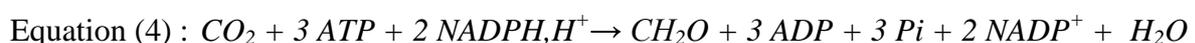
Environ 12 H⁺ sont transloqués pour 4 électrons transférés de H₂O jusqu'au NADP⁺. Ils ont 2 origines : (i) 4 protons H⁺ apparaissent dans le cytoplasme lors de la réduction de 2 H₂O et (ii) 8 autres protons H⁺ sont transloqués lors du passage des 4 électrons par le cycle des quinones.

Les mesures expérimentales donnent 3 ATP synthétisés pour un O₂ produit, soit :



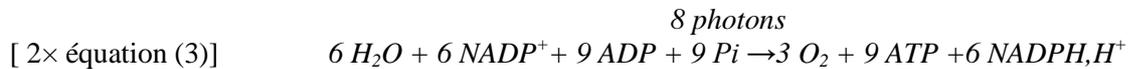
ii. La phase « obscure » ou non photochimique

La seconde phase dite « obscure » ne dépend pas directement de la lumière. Elle consomme l'énergie sous forme d'ATP et le NADPH produit précédemment pour le transport, l'assimilation et la fixation du carbone inorganique sous forme de CO₂ et pour produire des composés organiques (CH₂O) comme le glucose (C₆H₁₂O₆). Au cours du cycle de Calvin, pour une molécule de CO₂ assimilé, on a une consommation de 3 ATP et de 2 NADPH, H⁺ soit l'équation suivante :



iii. Bilan global de la photosynthèse

Le bilan global des 2 phases de la photosynthèse oxygénique peut donc s'écrire à partir des équations (3) et (4). Pour la synthèse d'un triose ($3 \text{ CH}_2\text{O}$), il faut donc 3 molécules de CO_2 fixées, une consommation de 9 ATP et de 6 NADPH, H^+ , comme le montre l'équation (5) ci-dessous :



Dans cet exemple : $n=3$, on retrouve l'équation (1) : $n \text{ CO}_2 + 2n \text{ H}_2\text{O} + \rightarrow n \text{ CH}_2\text{O} + n \text{ O}_2 + n \text{ H}_2\text{O}$.

2) Mécanisme de la phase photochimique : source d'électrons et source d'énergie

a. Vue d'ensemble

La phase photochimique de la photosynthèse correspond au catabolisme central chez les cyanobactéries puisqu'elle génère l'ATP et du pouvoir réducteur sous forme de NADPH pour alimenter la phase non photochimique. La phase « lumineuse » repose sur le fonctionnement en série de 4 complexes qui interviennent dans les 4 étapes suivantes

- (i) l'absorption de la lumière *via* :
 - o le phycobilisome : dont le rôle est de tirer profit de l'énergie des photons ($h\nu$) qu'il capte pour oxyder la molécule d'eau (H_2O) en dioxygène (O_2) en lui arrachant ses électrons, c'est la photolyse de l'eau réalisé par le photosystème II qui intervient dans :
- (ii) le transfert des électrons dans l'appareil photosynthétique *via* :
 - o le photosystème II (PSII), qui initie le transfert des électrons vers :
 - o le cytochrome b6/f, qui sert de carrefour des flux d'électrons et poursuit leur transfert vers :
 - o le photosystème I (PSI), dans lequel le flux d'électrons converge vers un accepteur final d'électron, la ferrédoxine, véritable transporteur central d'électron.
- (iii) la translocation concomitante de protons H^+ au cours du transfert des électrons au sein de l'appareil photosynthétique a lieu au niveau du PSII et du cytochrome b6/f, générant un gradient électrochimique servant de force motrice à pour :
- (iv) la synthèse d'ATP couplé à la dissipation du gradient de protons H^+ par :
 - o l'ATP synthase qui catalyse ainsi la synthèse d'ATP par couplage énergétique chimio-osmotique.

Les schémas suivants proposent 2 modes de représentation de la photosynthèse.

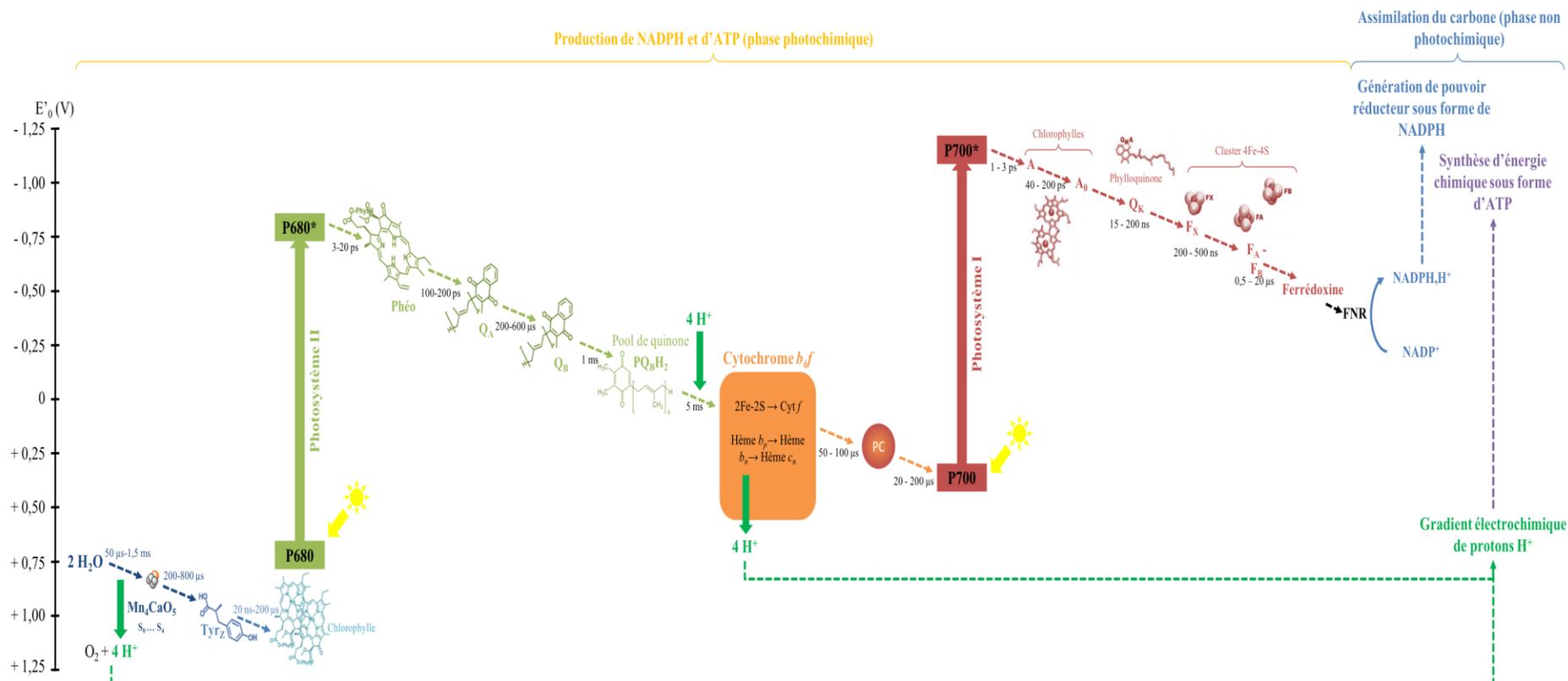


Figure 25 – Schéma en Z de la photosynthèse chez les cyanobactéries
 Pour le détail, se référer au texte.

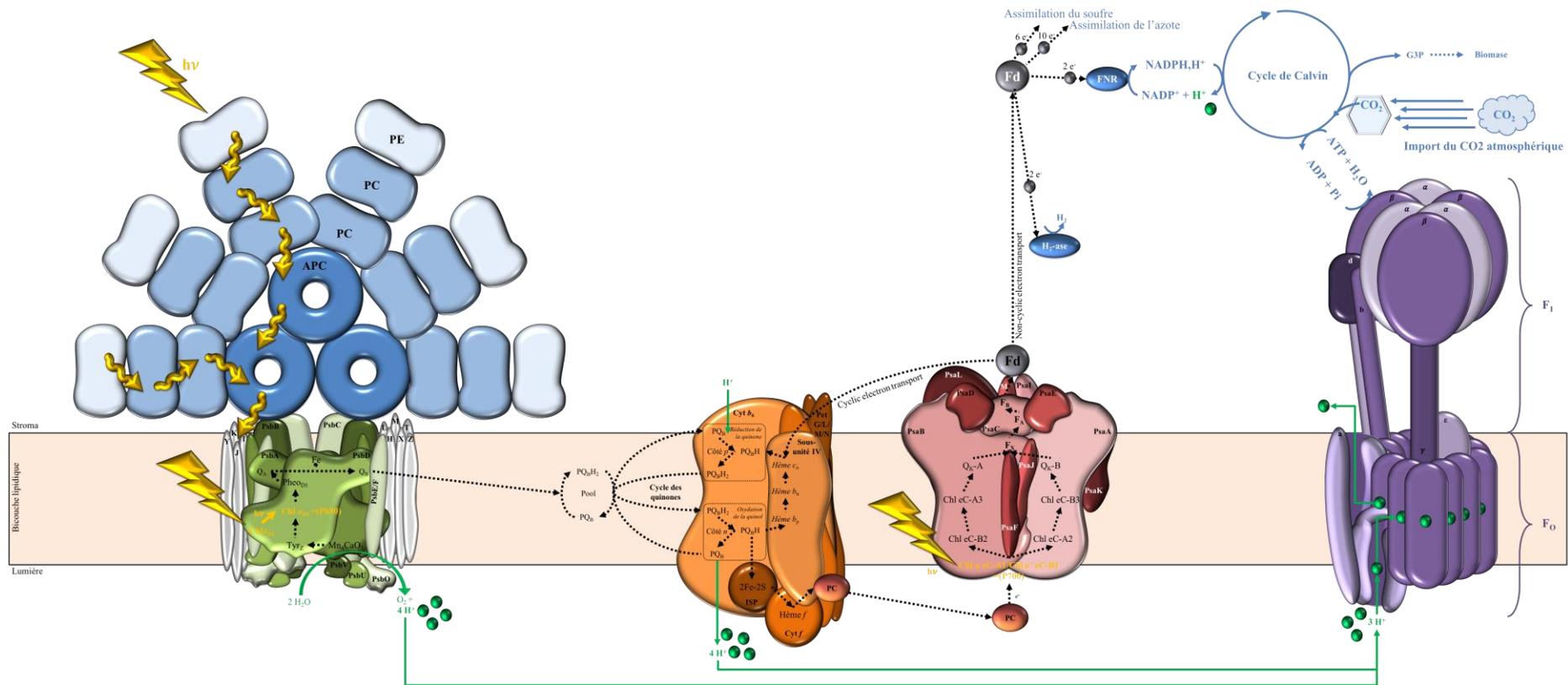


Figure 26 – Représentation schématique de la photosynthèse oxygénée chez les cyanobactéries
Pour le détail, se référer au texte.

b. L'absorption de la lumière par le phycobilisome

Chez les cyanobactéries, la captation de l'énergie lumineuse *via* ce mécanisme et le transfert de proche en proche des excitons jusqu'au centre réactionnel (photosystème I et II, abrégé PSI et PSII) est réalisé par un complexe antennaire d'absorption de la lumière (ou light-harvesting complex ; LHC) ou antennes photosynthétiques (rappelant leur structure en forme d'antenne) ou encore phycobilisome, nom tiré des protéines qui le constitue, les phycobiliprotéines.

Organisation, composition et structure du phycobilisome :

Le phycobilisome est un complexe de 3 à 7 MDa qui s'associe à la surface des thylakoïdes (Grossman et al., 1993) et peut fournir son énergie d'excitation (excitons) au photosystème I et II (centre réactionnel), tel que le montre la figure ci-dessous. Le phycobilisome est construit à partir d'un complexe multimérique de phycobiliprotéines liant des chromophores (phycobilines) que sont la phycocyanine (PC), la phycoérythrine (PE) et l'allophycocyanine (APC). Les chromophores phycobilines sont des chaînes ouvertes de cycles tétrapyrroles lié de manière covalente par une liaison thioéther à un résidu cystéine des phycobiliprotéines. Ces chromophores assure à la cyanobactérie d'absorber la lumière pour un intervalle de longueur d'onde allant de 500 à 680 nm (Glazer, 1989).

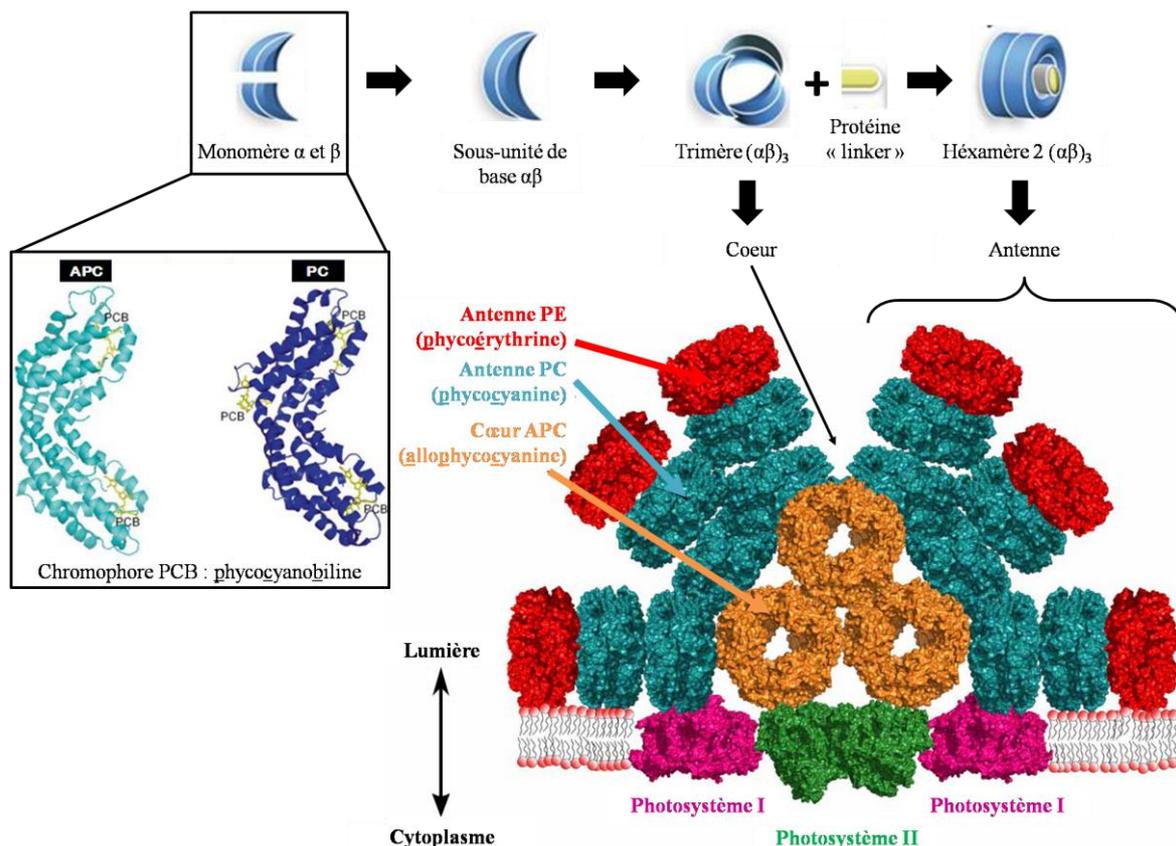


Figure 27 – Modèle structural et d'assemblage du megacomplexe phycobilisome-PSI/II
Adapté de (Saer and Blankenship, 2017) et de Marx et al. (2014)

L'assemblage d'un tel complexe débute par la formation d'une première sous-unité $\alpha\beta$ (soit un hétérodimère) constitué d'un monomère α et d'un monomère β de chacune des phycobiliprotéines (PC, APC ou PE) et qui fixent plusieurs chromophores. Dans la Figure 27, c'est la phycocyanobiline (PCB) qui est représenté pour le monomère α^{APC} ($\lambda_{max} = 652$ nm) et

le monomère β^{PC} ($\lambda_{max} = 620$ nm). Ensuite, 3 sous-unités $\alpha\beta$ s'assemblent et forment une structure cylindrique sous forme d'un trimère de dimère $(\alpha\beta)_3$. Le cœur du phycobilisome (noté cœur APC dans la Figure 27) est constitué de 2 à 5 de ces trimères de dimère cylindriques. Avec l'intervention d'une protéine « linker », un trimère $(\alpha\beta)_3$ peut s'associer avec un second trimère $(\alpha\beta)_3$ et forme alors un double disque hexamérique annoté $2(\alpha\beta)_3$. Les hexamères s'entassent les uns sur les autres et forment les antennes majoritairement grâce à des interactions entre les sous-unités β (Saer and Blankenship, 2017).

Les phycobiliprotéines APC constituent le cœur du phycobilisome et sont ancrées à la membrane du thylakoïde par une protéine « linker » codée par le gène *apcE* (Adir et al., 2006). Chaque sous-unité $(\alpha\beta)^{APC}$ lie 2 molécules de phycocyanobiline conférant une absorption de la lumière à $\lambda_{max} = 652$ nm. L'architecture globale du cœur APC révèle un assemblage de 2 à 3 (voir même 5) cylindres chacun composé de d'un hexamère $2(\alpha\beta)_3$. Pour les cœur bi-cylindriques, les 2 disques sont positionnées l'un à côté de l'autre ; pour les tri-cylindriques, le troisième est placé au-dessous des 2 autres (Figure 27) et pour les pentacylindres la structure obtenue ressemble à un trapèze à l'envers (Saer and Blankenship, 2017).

Les antennes sont généralement composées de PC mais peuvent parfois aussi contenir de la PE. La phycobiliprotéine PC est structuralement proche de APC mais présente, au niveau d'une boucle en C-terminal de son monomère β , un domaine supplémentaire de liaison à la PCB (Figure 27). Tout comme PAC, les hexamères $2(\alpha\beta)_3$ de PC forment des structures cylindriques qui s'étendent depuis le cœur vers l'extérieur comme en éventail. Sous forme d'antenne, la PC admet un maximum d'absorption à 620 nm. Les antennes peuvent également contenir de la PE qui peut se lier à une variété de phycobilines : la phycoerythrobiline, la phycovibiline et la la phycourobiline (Glazer, 1989). Elle lie d'ailleurs jusqu'à 5 bilines contre 2 et 3 respectivement pour APC et PC.

Conséquence de la composition en phycobiliprotéines sur l'aspect des cyanobactéries :

La composition du cœur et des antennes varie en fonction de la cyanobactérie considérée et chaque phycobiliprotéine possède ses propres propriétés spectrales qui varient selon l'association apoprotéine/groupement prosthétique (pigment). Ainsi, chez *Synechocystis*, le phycobilisome est constitué de 6 antennes de PC composées de 3 hexamères de PC ; la PE est substituée par un hexamère de PC puisque la PE est absente chez *Synechocystis*. Les cyanobactéries ne possèdent donc pas toutes les phycobiliprotéines connues. En conséquence, elles sont actives à différentes longueurs d'onde ce qui conditionne leur répartition dans l'environnement (Couradeau et al., 2011). La différence de composition des antennes photosynthétiques et leur forte abondance dans la cellule (jusqu'à 50 % des protéines solubles) explique aussi la diversité des couleurs que les cyanobactéries peuvent arborer, comme le représente la Figure 28 ci-après.

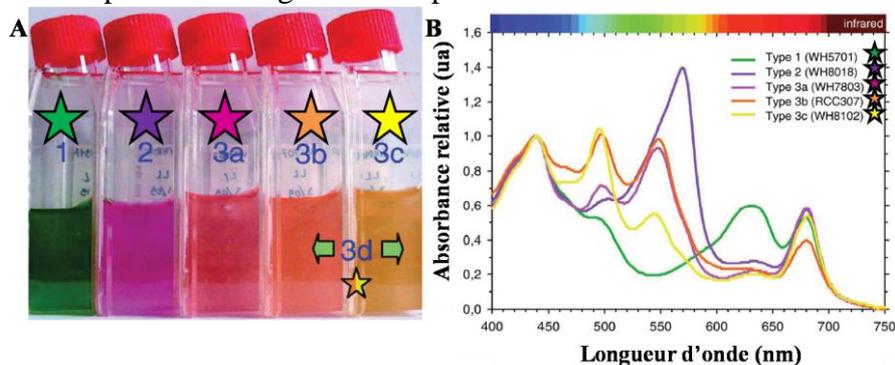


Figure 28 – Culture (A) et spectre d'absorption (B) de différentes espèces de *Synechococcus* en condition standard

(D'après Six et al., 2007, Genome Biology)

Mécanisme de transfert de l'énergie lumineuse dans phycobilisome :

L'absorption de la lumière se fait selon le principe suivant : quand une molécule absorbe un photon, un électron de cette molécule est déplacé à un niveau d'énergie plus élevée. Il s'agit d'un événement de type « tout-ou-rien » car l'énergie du photon doit être exactement égale à l'énergie nécessaire à la transition électronique. La molécule est alors dans un état excité instable et va rapidement retourner à son état basal (l'électron retrouve son orbitale de faible énergie). Ce retour se fait en libérant l'énergie absorbée sous forme de chaleur, de lumière (fluorescence) ou, ce qui nous intéresse ici, sous forme d'exciton (= énergie d'excitation est directement transmise à une autre molécule voisine).

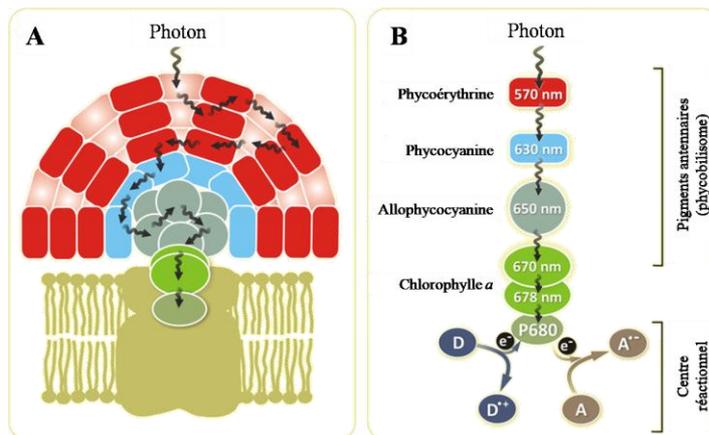


Figure 29 – Représentation schématique du mécanisme de transfert de l'énergie lumineuse dans le phycobilisome jusqu'au centre réactionnel du photosystème II

(D'après Govindjee et Dmitriy Shevela, *Frontiers in Plant Science*, 2011)

Les longueurs d'onde indiquées dans les cercles représentent la longueur d'onde maximale d'absorption du pigment considéré.

Chez les cyanobactéries, l'énergie des photons absorbés passe de manière successive au travers des molécules des antennes photosynthétiques [phycoérythrine (absente chez la plupart des cyanobactéries) → phycocyanine → allophycocyanine], tels que représenté dans la figure ci-dessous. Le transfert de l'excitation des systèmes antennaires à la chlorophylle *a* du centre réactionnel (P680) du photosystème II (PSII) se ferait grâce aux chlorophylles périphériques du PSII ($\lambda_{\max} = 670 \text{ nm}$ et 678 nm), initiant ainsi le transfert des électrons dans le PSII. En passant à l'état excité (P680*), la chlorophylle *a* perd un électron qu'elle cède à un accepteur noté A et elle revient à son état basal en captant un électron (issu de la photolyse de l'eau) provenant d'un donneur noté D.

*c. Le transfert des électrons par le PSII, le cytochrome *b6f* et le PSI*

i. Le photosystème II (PSII) : initiation du transfert des électrons

Organisation, composition et structure du photosystème II :

Le photosystème II (PSII) de la cyanobactérie thermophile *Thermosynechococcus elongatus* est un complexe multimérique composés d'au moins 17 sous-unités dont 14 occupent la membrane photosynthétique et pour lesquelles la figure 30 et le tableau donnent un aperçu ci-après. Les sous-unités transmembranaires comprennent les protéines du centre réactionnel : D1 (PsbA) et D2 (PsbD), les sous-unités antennaires internes contenant de la chlorophylle *a* (Chl *a*) CP43 (PsbC) et CP47 (PsbB) et les sous-unités α et β du cytochrome *b*₅₅₉ (PsbE et PsbF). Le photosystème II est un dimère symétrique dont chaque protomère contient 36 hélices transmembranaires dont 22 appartiennent à D1, D2, CP43 et CP47. La protéine D1 interagit avec D2 selon un axe de symétrie de pseudo-ordre 2 parallèle à l'axe du dimère et qui passe par le Fe non hème. CP43 et CP47 sont également en relation selon cette pseudo-symétrie et contiennent chacune 6 hélices transmembranaires constituant un trimère de dimères et fixant respectivement 16 et 13 Chl *a* antennaires. D'après (Whitmarsh and Govindjee, 2002) et (Gao et al., 2018).

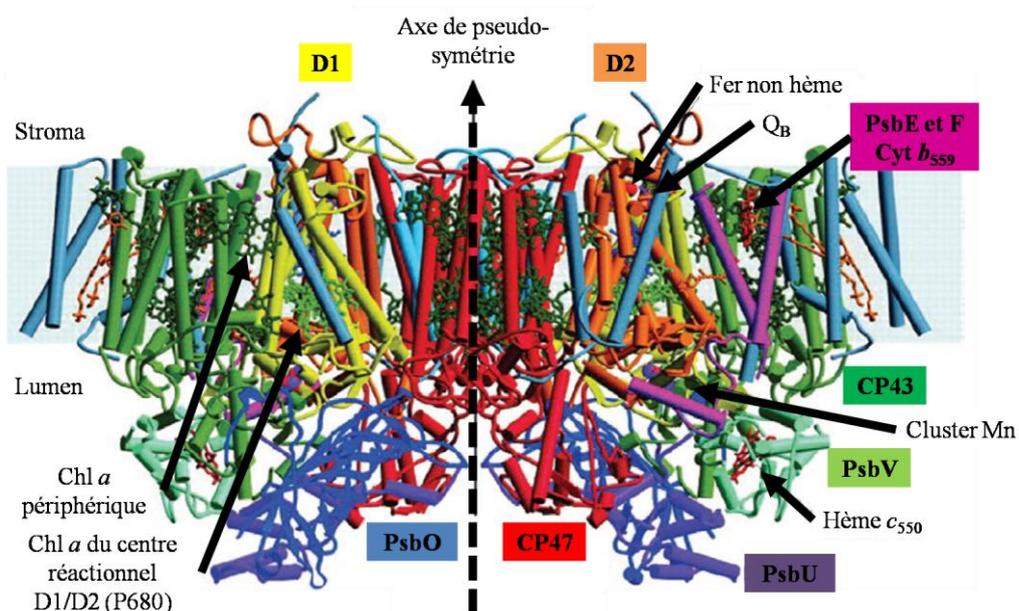


Figure 30 – Structure du photosystème II de *Thermosynechococcus elongatus* obtenue par cristallographie aux rayons X vue dans le plan de la membrane

Les sous-unités transmembranaires sont D1 (jaune), D2 (orange), CP47 (rouge), CP43 (vert) et le cytochrome b559 (rose). Les autres sous-unités transmembranaires sont colorées en bleu et gris-bleu. Les sous-unités extrinsèques sont PsbO (bleu foncé), PsbU (violet) et PsbV (vert clair). Les différents cofacteurs sont représentés sous forme de bâtonnets (stick form) avec les Chl *a* du centre réactionnel D1/D2 en vert clair et les Chl *a* périphériques en vert foncé. Les phéophytines, hèmes, caroténoïdes sont respectivement en bâtonnets bleu foncé, rouge et orange. Le fer non hème est représenté par une sphère rouge. [D'après la référence PDB 1S5L - James Barber and So Iwata, Imperial College London, U.K.]

Tableau 9 – Liste des gènes et des protéines composant le PSII

Gène	Protéine	Masse (kDa)	Localisation (htm)	Chl	Rôle
<i>psbA</i>	D1	39	I (5)	4	D1 (et D2) forment le centre réactionnel impliqué dans le transfert des électrons au sein du PSII
<i>psbB</i>	CP47	56	I (6)	16	Liaison à l'antenne chl <i>a</i>
<i>psbC</i>	CP43	47	I (6)	13	Liaison à l'antenne chl <i>a</i>
<i>psbD</i>	D2	39	I (5)	5	D2 (et D1) forment le centre réactionnel impliqué dans le transfert des électrons au sein du PSII
<i>psbE</i>	Cyt <i>b</i> ₅₅₉ (α)	9,3	I (1)		Liaison à l'hème <i>b</i> ; rôle dans la photoprotection
<i>psbF</i>	Cyt <i>b</i> ₅₅₉ (β)	4,5	I (1)		Liaison à l'hème <i>b</i> ; rôle dans la photoprotection
<i>psbH</i>	PsbH	7,8	I (1)		Fonction inconnue
<i>psbI</i>	PsbI	4,2	I (1)		Fonction inconnue
<i>psbJ</i>	PsbJ	4,2	I (0)		Fonction inconnue
<i>psbK</i>	PsbK	4,3	I (1)		Fonction inconnue
<i>psbL</i>	PsbL	4,5	I (0)		Fonction inconnue
<i>psbM</i>	PsbM	4	I		Fonction inconnue
<i>psbO</i>	PsbO (MSP)	27	P (0)		Rôle dans l'évolution de l'oxygène et la stabilisation du cluster Mn
<i>psbP</i>	PsbP	20	P (0)		Rôle dans l'évolution de l'oxygène
<i>psbT</i>	PsbT	3,8	P (1)		Fonction inconnue
<i>psbU</i>	PsbU	10	P		Fonction inconnue
<i>psbV</i>	Cyt <i>c</i> ₅₅₀	12	P (0)		Liaison à l'hème <i>c</i>
<i>psbX</i>	PsbX	4	I (1)		Fonction inconnue
<i>psbZ</i>	psbZ	11	I		Fonction inconnue

D'après (Whitmarsh and Govindjee, 2002) et (Gao et al., 2018); I : Intégrale ; P : Périphérique ; (htm : hélice transmembranaire) Cyt : cytochrome ; PS : photosystème ; MSP : Manganese-stabilizing protein

Mécanisme du photosystème II :

Transfert des électrons dans le PSII

Le transfert des électrons est initié lorsque P680 est excité en P680* *via* les chlorophylles *a* périphériques ($\lambda_{\max} = 670 \text{ nm}$ et 678 nm ; voir Figure 29) qui lui transfèrent l'énergie lumineuse (photon) captée par les systèmes antennaires. Dans sa forme photo-oxydé P680⁺ est l'espèce biologique avec le potentiel rédox le plus élevé jamais décrite (1,3V) et donc la plus oxydante. L'électron célibataire dans P680⁺ photo-oxydé est transféré à une molécule de Phéo *a*, qui le transfère à son tour à un accepteur primaire : la plastoquinone PQ_A fixée irréversiblement à un polypeptide du PSII. Comme dans le cas de l'ubiquinone des mitochondries, PQ_A est réduite par 2 transferts mono-électroniques successifs (transfert de 2 électrons 1 par 1 ; voir Figure 31) : PQ_A cède un premier électron puis un second à un accepteur secondaire PQ_B, une plastoquinone attachée de façon réversible au PSII. Une plastoquinone PQ issue du pool membranaire est réduite en plastoquinol PQH₂ qui transférera ses électrons vers le cytochrome *b_{6f}* et régénère ainsi les quinones Q_A et Q_B du PSII.

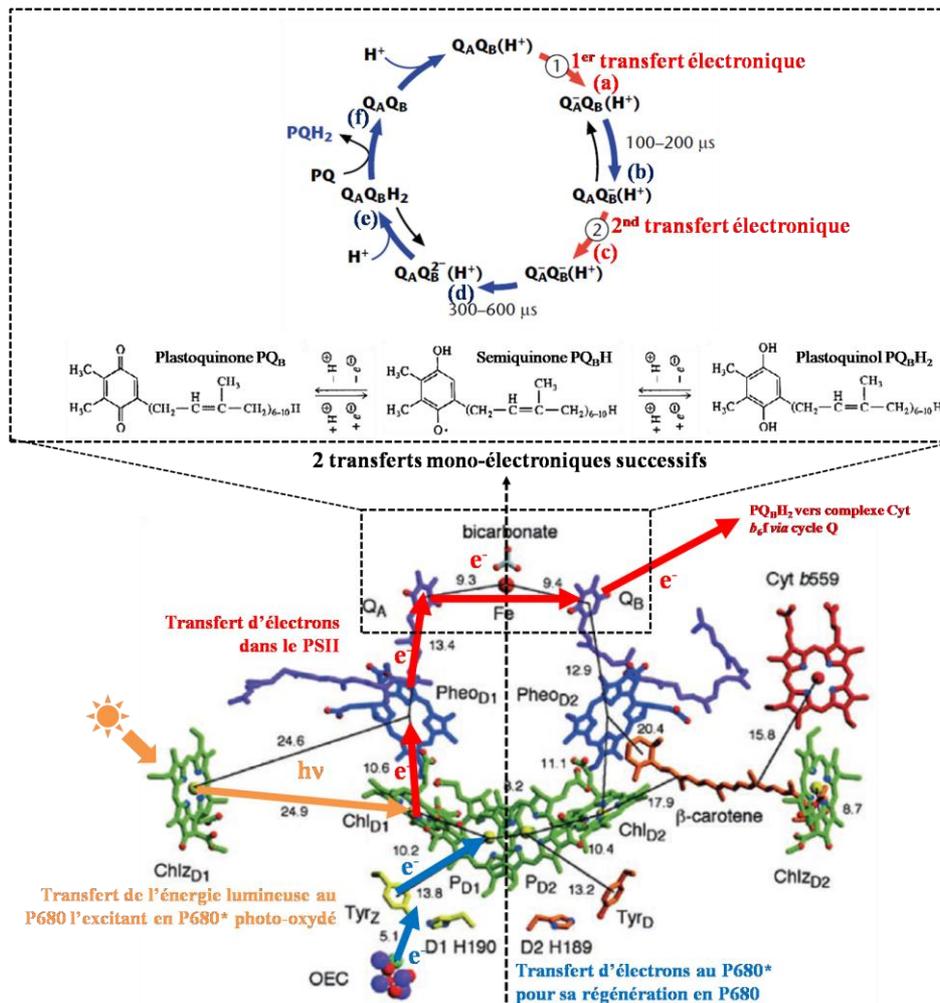


Figure 31 – Disposition des cofacteurs dans l’espace dans les sous-unités D1 et D2 du centre réactionnel du PSII et mécanisme de transfert des électrons dans le PSII

Le complexe est vu dans le plan de la membrane (voir Figure 30) avec la lumière du thylakoïde vers le bas. La flèche noire en pointillé représente l’axe de pseudo-symétrie d’ordre 2 du centre réactionnel. Les fines lignes indiquent les distances centre à centre de chaque cofacteur en Å. Chaque protomère fixe donc de multiples **Chl a (vert)** : les 2 anneaux de Chl a (Chl_{D1} et Chl_{D2}) sont positionnés dans l’espace de façon parallèle et forme une paire constituant le donneur primaire d’électron du PSII, le P680 (d’après la longueur d’onde de son absorption maximale). Les Chl a périphériques (Chl_{ZD1} et Chl_{ZD2}) sont vraisemblablement impliquées dans le transfert de l’énergie lumineuse à P680. Les protomères fixent également : 2 molécules de **phéophytine a (bleu)** (Pheo a : Pheo_{D1} et Pheo_{D2}), 2 **plastoquinones (en violet)** (Q_A et Q_B), un **noyau hème Cyt b₅₅₉ (rouge)**, un **β-carotène (orange)** et un Fe non hème. Chacun de ses composants participe au transfert des électrons. Le PSII présente également un complexe protéique contenant un groupe de 4 ions Mn (cluster Mn ou OEC pour Oxygen Evolving Complex) et un résidu tyrosine (Tyr_Z) qui jouent un rôle dans la régénération de P680 via la réaction de photolyse de l’eau qui produit de l’O₂. Le cycle des quinones Q_A et Q_B est décrit comme suit : il y a un (1) 1^{er} transfert électronique avec (a) un 1^{er} électron capté par Q_A; (b) Q_A⁻ transfère son électron à Q_B produisant l’état Q_A⁻/Q_B⁻ ; puis un (2) 2nd transfert électronique a lieu : (c) Q_A⁻/Q_B⁻ forme un nouvel état Q_A⁻/Q_B²⁻, puis (d) converti en Q_A⁻/Q_B²⁻ qui (e) capte rapidement des protons H⁺ produisant ainsi l’état Q_AQ_BH₂ qui (f) revient à l’état initial grâce à une plastoquinone PQ issue du pool membranaire de quinone qui est réduite en plastoquinol PQH₂.

D’après (Whitmarsh and Govindjee, 2002) et (Gao et al., 2018).

Finalement, la séparation de charge (P680⁺-Phéo⁻) est essentielle puisqu'elle déclenche : (i) la réduction d'une plastoquinone PQ_B en plastoquinol PQ_BH₂ pour poursuivre le transfert des électrons jusqu'au complexe cytochrome *b₆f* et (ii) l'oxydation de l'eau au niveau du cluster Mn pour régénérer P680, dont nous allons préciser le mécanisme ci-après.

Production d'O₂ par oxydation (ou photolyse) de l'eau via le cluster Mn

La production de dioxygène par le PSI s'opère du côté lumière thylakoïde des protéines D1 et D2 et implique différentes protéines extrinsèques (MSP ou PsbO, PsbP et PsbQ), des ions calcium (Ca²⁺) et chlorure (Cl⁻) et le cluster Mn dont la structure est présentée dans la figure ci-dessous.

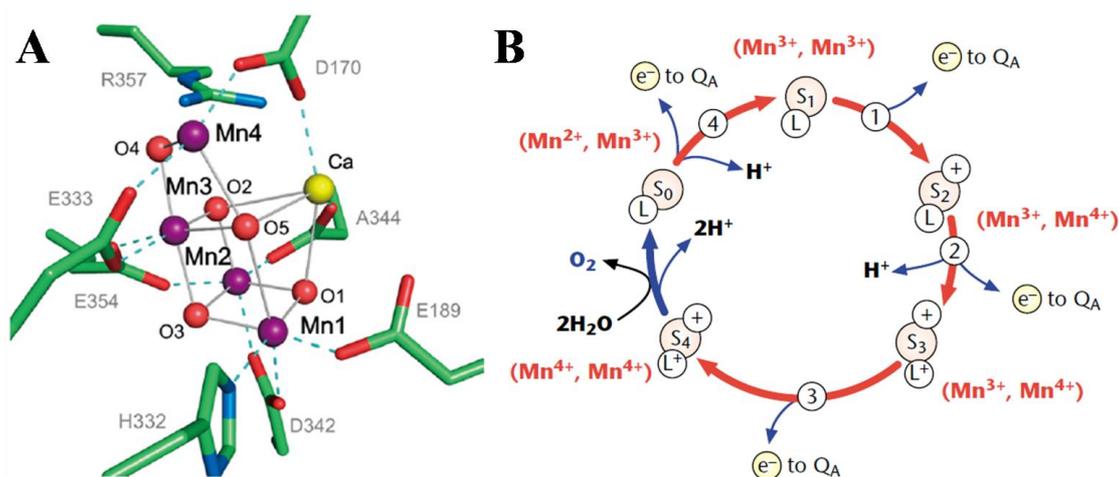


Figure 32 – Structure du cluster MN et modèle du cycle des étapes S de production du dioxygène
 (A) - L'analyse de la structure cristalline du cluster Mn (PDB : 4UB6 ; (Nagashima et al., 2018)) révèle qu'il a pour formule chimique Mn₄CaO₅ et qu'une dizaine d'acides aminés au moins ont été identifiés comme impliqués dans la liaison et la stabilisation du cluster Mn. La structure du cluster Mn est décrite comme une « chaise déformée » composé de 3 ions Mn (annoté Mn1-Mn3) et d'un ion calcium connectés avec 4 atomes d'oxygène. Le quatrième ion manganèse Mn (Mn4) et le cinquième atome d'oxygène (O4) forme le « dossier » de la « chaise déformée » ; (B) - Parmi les états S formés au cours du cycle de transfert de 4 électrons assurant la production de dioxygène (O₂), S₀ est l'état le plus réduit et S₄ le plus oxydé. Lors de l'oxydation de l'état S₄, le cluster Mn est spontanément réduit à l'état S₀ en oxydant l'eau (H₂O) pour former du dioxygène O₂ et des protons H⁺ (Joliot, P., and B. Kok. 1975. Oxygen evolution in photosynthesis. *In* Bioenergetics of Photosynthesis. Govindjee, editor. Academic Press, New York. pp.388–413.). Les protons sont produits durant les transitions S₀-S₁ ; S₂-S₃ et S₃-(S₄)-S₀ (Fowler, 1977)

ii. *Le cytochrome b₆f : transfert non cyclique et cyclique des électrons*

Le cytochrome *b₆f* est impliqué dans le transfert des électrons depuis la plastoquinol PQ_BH₂ jusqu'à la plastocyanine (PC) ET dans la translocation de protons H⁺ depuis le stroma vers la lumière des thylakoïdes. Ce mécanisme se fait au moyen de quinones lipophiles présentes dans la bicouche lipidique et qui se déplacent entre un site d'oxydation et de relargage de protons H⁺ dans le site « p » du complexe *b₆f* situé au niveau de côté électropositif (p) de la membrane et un site de réduction et de capture de protons H⁺ dans le site « n » du complexe *b₆f* situé au niveau de côté électronégatif (n) de la membrane.

Organisation, composition et structure du complexe cytochrome b_6f :

La structure cristallisée du complexe cytochrome b_6f a été obtenue chez *Chlamydomonas reinhardtii* (une microalgue) et chez 2 cyanobactéries : *Nostoc sp.* PCC 7120 et la cyanobactérie thermophile *Mastigocladus laminosus* dont le cristal contient 4 grosses sous-unités (de 17 à 32 kDa) :

- (i) le cytochrome f avec un cytochrome de type c pour une masse de 32 kDa,
- (ii) le cytochrome b_6 avec un groupe héminique à haut potentiel et bas potentiel pour une masse de 25 kDa,
- (iii) la protéine de Rieske contenant un centre fer-soufre [2Fe-2S] (ou ISP pour Rieske iron-sulfur protein) pour une masse de 19 kDa,
- (iv) la sous-unité IV d'une masse de 17 kDa.

Ce complexe est également composé 4 petites sous-unités hydrophobes de 3 à 4 kDa chacune (PetG, PetL, PetM et PetN). Le complexe est sous forme d'un dimère d'une masse totale de 217 kDa et dont chaque monomère contient 7 groupes prosthétiques (voir Figure 33).

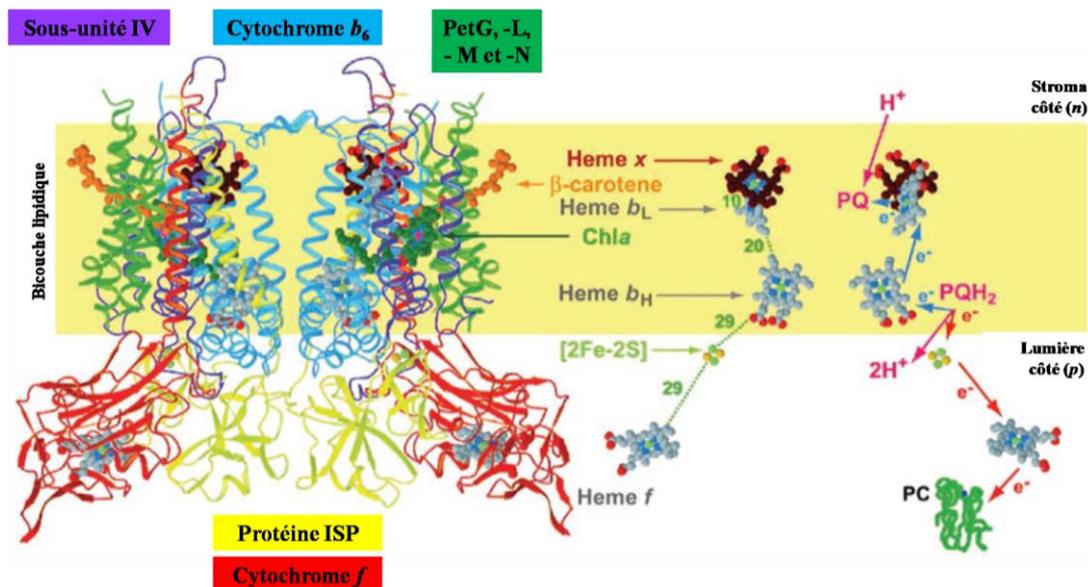
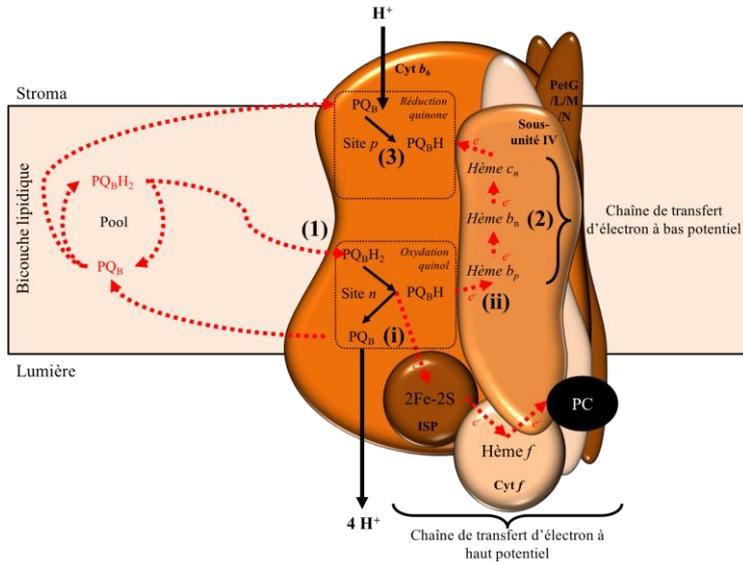


Figure 33 – Modèle structural du complexe cytochrome b_6f dimérique

La structure présentée ci-dessus a été obtenue par cristallographie aux rayons X en présence d'un inhibiteur analogue de quinone (le tridécylstigmatelline ou TDS) et de lipides synthétiques (le dioleoylphosphatidyl-choline ou DOPC). La structure révèle néanmoins que chaque monomère est composé : - de 4 hèmes : (i) l'hème c du cytochrome f (hème f), (ii) l'hème b_p (hème b_H) à haut potentiel situé dans le site p , (iii) l'hème b_n (hème b_L) à faible potentiel positionné dans le site n et (iv) l'hème c_n (Hème x) ; - d'un centre fer-soufre ([2Fe-2S]), - d'une molécule de chlorophylle a , - d'une molécule de β -carotène et - d'une plastoquinone. Chaque monomère contient 13 hélices transmembranaires : 4 dans le cytochrome b_6 (en bleu), 3 dans la sous-unité IV (en violet), 1 dans le cytochrome f (en rouge), dans la protéine ISP (en jaune) et dans chacune des petites sous-unités (PetG, -L, -M et -N ; en vert) ; (Kurisu et al., 2003)

Mécanisme de transfert non-cyclique des électrons du complexe cytochrome *b₆f*:

Les électrons pris en charge par PQ_BH_2 vont être transférés au complexe du cytochrome *b₆f* par l'intermédiaire du cycle Q. Comme dans les mitochondries, le cycle Q lors de la photosynthèse oxyde les quinones réduites (ici PQ_BH_2). Cette oxydation est due au complexe des cytochromes *b₆f* qui contient des cytochromes à fer et des centres [Fe-S] de type Rieske. Le complexe des cytochromes *b₆f* n'accepte que les électrons, les protons H^+ seront donc transloqués dans la lumière du thylakoïde. C'est donc l'équivalent du complexe II (coenzyme Q – cytochrome c oxydoréductase) de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le cycle Q se réalise en 2 parties schématisées ci-après :



1^{ère} partie du cycle :

(1) La plastoquinol PQ_BH_2 issu du pool membranaire de quinones se lie au niveau du site *p* du complexe cytochrome *b₆f*. PQ_BH_2 est oxydée en semi-quinone PQ_BH puis en plastoquinone PQ_B grâce à 2 transferts mono-électroniques successifs :

- (i) l'un jusqu'au centre FeS de la protéine ISP au sein de la chaîne de transfert d'électron à haut potentiel ($2Fe-2S \rightarrow Cyt f \rightarrow PC$),
- (ii) l'autre jusqu'à l'hème *b_p*.

L'oxydation de PQ_BH_2 en PQ_B lors de cette étape est concomitante à la translocation de 2 protons H^+ vers la lumière du thylakoïde.

- (2) L'électron capté par l'hème *b_p* est transféré au sein de la chaîne de transfert d'électron à bas potentiel (Hème *b_p* → Hème *b_n* → Hème *c_n*) jusqu'à la plastoquinone PQ_B générée à l'étape précédente qui a diffusée librement jusqu'au site « n ».
- (3) La plastoquinone PQ_B est ensuite réduite en semi-quinone PQ_BH et entraîne la consommation d'un proton H^+ issu du stroma.

2^{ème} partie du cycle :

(1) et (2) Une deuxième plastoquinol PQ_BH_2 issu du pool membranaire de quinones se lie de nouveau au site « p » du complexe cytochrome *b₆f* et les étapes (1) et (2) se déroule comme dans la première partie du cycle jusqu'à l'hème *c_n*.

(3) L'hème *c_n* transfère un électron à la semi-quinone obtenue au cycle précédent ce qui régénère la plastoquinol PQ_BH_2 et le cycle peut recommencer.

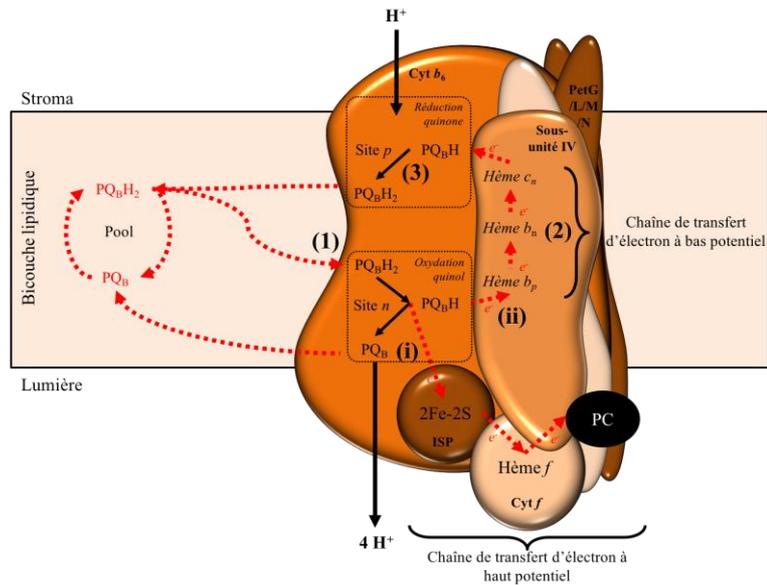


Figure 34 – Mécanisme de transfert des électrons dans le complexe cytochrome *b₆f*

En conclusion, au moyen du cycle des quinones qui s'établit entre le PSII et le complexe cytochrome *b₆f*, on obtient un transfert non-cyclique ou linéaire des électrons depuis la plastoquinol PQ_BH₂ jusqu'à la plastocyanine (PC) qui diffuse vers le PSI.

iii. *Le photosystème I : transfert des électrons jusqu'à l'accepteur final*

La plastocyanine (PC) transfère les électrons jusqu'au photosystème I qui assure leur transmission jusqu'à l'accepteur final, la ferrédoxine (Fd).

Organisation, composition et structure du photosystème I :

(Pour revue : (Fromme et al., 2001; Grotjohann and Fromme, 2005; Jordan et al., 2001; Xu et al., 2001))

Le photosystème I des cyanobactéries contient 11 à 12 sous-unités (Tableau 10) qui forment un trimère d'hétérodimère PsaA/PsaB (Figure 35). Ce méga-complexe comporte de nombreux cofacteurs et groupements prosthétiques (96 chlorophylles *a*, 22 β-carotènes, 2 phylloquinones, 4 lipides et 3 centres fer-soufre [4Fe-4S]). Il est composé de 3 grands-types de sous-unités (en fonction de leur taille/localisation) :

- (i) les 2 grandes sous-unités membranaires PsaA et PsaB contiennent chacune 11 hélices transmembranaires et forment l'hétérodimère qui présente un axe local de pseudo-symétrie C₂. Le dimère PsaA/PsaB se décompose en plusieurs domaines structurels et fonctionnels :

- (a) *le domaine membranaire* des 5 hélices α transmembranaires situées en C-terminal séparent structurellement la chaîne de transfert d'électron qu'il constitue des pigments antennaires du photosystème I. Ce domaine correspond donc au centre réactionnel puisqu'il présente de nombreuses liaisons de coordination avec la plupart des cofacteurs impliqués dans la chaîne de transfert d'électron. De plus, il présente des homologies structurales avec le centre réactionnel des sous-unités D1 et D2 du PSII. Ce domaine lie également 25 chlorophylles (respectivement 12 et 13 pour PsaA et PsaB) et donne un axe local de pseudo-symétrie C₂,

- (b) *le domaine stromal* des 6 hélices en N-terminal assure l'arrangement en un trimère d'hétérodimère PsaA/PsaB. Ce domaine comporte une région riche en boucle située côté lumière du thylakoïde qui intervient dans la liaison du donneur d'électron (plastocyanine et cytochrome *c₆*),

- (c) *le domaine luminal* est également une région riche en boucle qui introduit une asymétrie permettant l'attachement et l'interaction du cœur PsaA/PsaB avec les sous-unités extrinsèques stromales PsaC, PsaD et PsaE et les petites sous-unités membranaires. Elles forment le site de liaison de l'accepteur d'électron, la ferrédoxine,

- (ii) les sous-unités stromales PsaC, PsaD et PsaE situées à la surface de l'hétérodimère PsaA/PsaB côté stroma du thylakoïde, participent à avec PsaA/PsaB à la liaison de la ferrédoxine,

- (iii) les petites sous-unités membranaires toutes situées en périphérie de l'hétérodimère PsaA/PsaB, qui participent à la cohésion du PSI avec les systèmes antennaires (phycobilisomes) et à la stabilisation de la structure quaternaire en renforçant les interactions qui s'établissent à l'interface entre chaque monomère du trimère, sont classées en 2 groupes :

- (a) les sous-unités PsaL, PsaI et PsaM, situées au cœur du trimère,

- (b) et les sous-unités PsaF, PsaJ, PsaK et PsaX situées en périphérie et de manière distale au PSI sont orientées du côté lumière du thylakoïde.

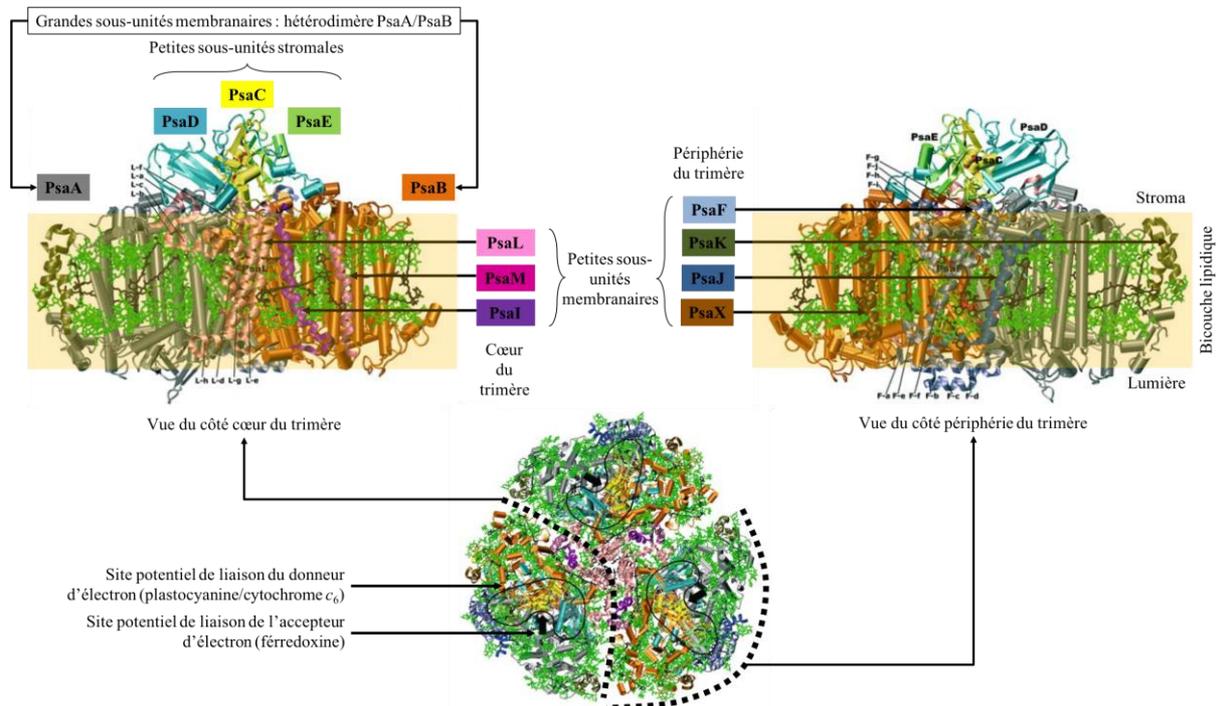


Figure 35 – Structure du monomère vue côté cœur et périphérie et du trimère du photosystème I cyanobactérien à une résolution de 2,5 Angstrom

Tableau 10 - Liste des gènes et des protéines composant le PSI

Nom du gène chez <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Protéine	Masse (kDa)	Localisation (htm)	Chl	Rôle
<i>slr1834</i>	PsaA	83,0	I (11)		
<i>slr1835</i>	PsaB	82,4	I (11)		
<i>ssl0563</i>	PsaC	8,9	P ; s		
<i>slr0737</i>	PsaD	15,6	P ; s		
<i>ssr2831</i>	PsaE	8,0	P ; s		
<i>sll0819</i>	PsaF	15,7	I ; d ; l		
<i>smr0004</i>	PsaI	4,3	I ; c		
<i>sml0008</i>	PsaJ	4,4	I ; d ; l		
<i>ssr039/sll0629</i>	PsaK/K2	8,5/13,7	I ; d ; l		
<i>slr1655</i>	PsaL	16,6	I ; c		
	PsaM	3,4	I ; c		
Not detected (Cyanobactérie thermophile)	PsaU	3	I		
	PsaX	/	I ; d ; l		

I : Intégrale ; P : Périphérique ou extrinsèque ; s : côté stroma du thylakoïde ; l : côté lumière du thylakoïde ; c : central (au cœur du trimère) ; d : distal ; htm : hélice transmembranaire

Mécanisme du photosystème I :

Le mécanisme de transfert des électrons au sein du PSI est illustré dans la figure ci-dessous.

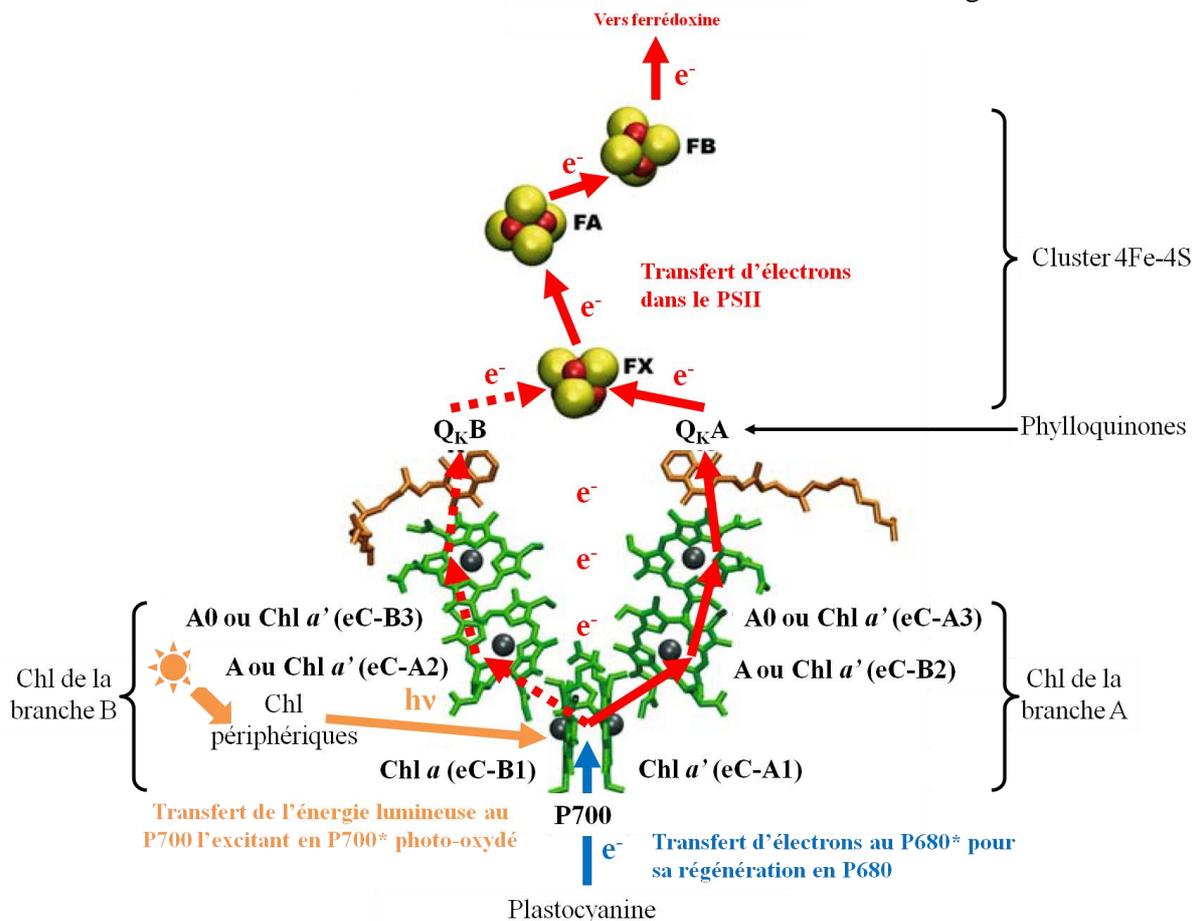


Figure 36 - Disposition des cofacteurs dans l'espace dans les sous-unités PsaA et PsaB du centre réactionnel du PSI et mécanisme de transfert des électrons dans le PSI

La structure est vue parallèlement au plan de la membrane avec le stroma au dessus. Les molécules de Chl a et de phylloquinone sont disposés en 2 branches en relation via l'axe de pseudosymétrie d'ordre 2 (non représenté).

d. Le système Fd-FNR : synthèse du NADPH comme accepteur final d'électrons

i. Mécanisme de transfert cyclique des électrons

En plus de son rôle dans le transfert non cyclique des électrons depuis P_{QBH2} jusqu'à la PC, le complexe cytochrome *b₆f* joue un rôle central dans une autre réaction. Lorsqu'il n'y a pas de NADP⁺ disponible pour recevoir les électrons de la ferredoxine réduite (Fd), le complexe assure le transfert, cette fois-ci, cyclique d'électrons pour maintenir le ratio de production ATP/NADPH adéquat pour la fixation du carbone lors de la phase non photochimique de la photosynthèse. Ce mécanisme est schématisé dans la figure ci-dessous.

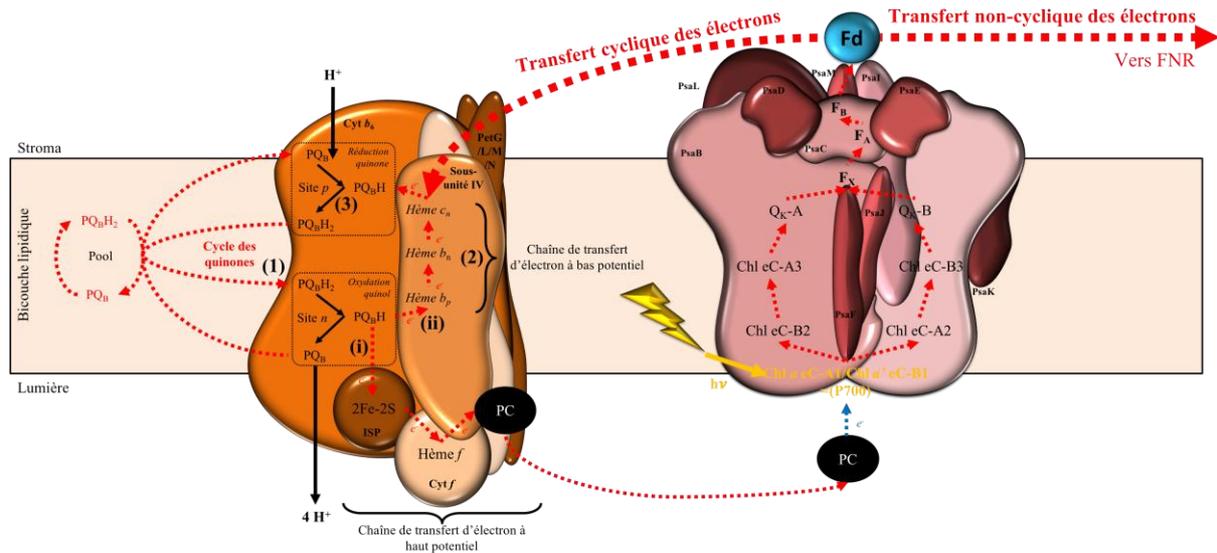


Figure 37 – Modèle du transfert non-cyclique et cyclique des électrons par le cycle des quinones et le complexe cytochrome b6f

ii. Mécanisme de transfert cyclique des électrons vers l'accepteur final : le NADPH

La plupart des électrons suivent une voie cyclique en étant transférés sur une ferrédoxine (Fd), une protéine située dans le stroma et possédant un centre [2Fe-2S]. Le Fd (sous forme réduite) réduit le NADP^+ au cours d'une réaction catalysée par la ferrédoxine- NADP^+ réductase (FNR, enzyme à FAD) qui produit l'accepteur final d'électron, le NADPH.

Ainsi, à l'issue du transfert des électrons au sein de la chaîne photosynthétique, un pouvoir réducteur est généré sous forme de NADPH. Le gradient de protons H^+ qui s'est établi de façon concomitante est alors dissipé par l'ATP synthase pour générer de l'énergie chimique sous forme d'ATP comme présenté ci-après.

e. La synthèse d'ATP par couplage chimio-osmotique via l'ATP synthase

i. Théorie chimio-osmotique par Peter Mitchell en 1961

La synthèse d'ATP est basé sur la théorie d'un couplage chimio-osmotique durant lequel l'énergie libre du transfert des électrons est conservée par le pompage de protons depuis le stroma vers la lumière du thylakoïde. La dissipation du gradient électrochimique ainsi crée fournit alors l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP. Les principales observations expérimentales en accord avec cette théorie sont que : (i) la phosphorylation oxydative requiert a minima une 2 compartiments séparés par une membrane intacte et imperméable aux ions (H^+ , HO^- , K^+ , Cl^- ...) (sinon, il y a perte du gradient), (ii) l'existence d'un gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane (observé expérimentalement par mesure du pH de part et d'autre de la membrane) et (iii) la présence de molécules perméabilisantes empêche la synthèse d'ATP mais pas le transfert d'électrons.

Ce couplage est réalisé par l'ATP synthase.

ii. *Structure de l'ATP synthase*

Nous présenterons, ici, l'ATP synthase mitochondriale qui a une structure similaire aux ATP synthases des bactéries et des chloroplastes. L'ATP synthase est une ATPase de type F_0 - F_1 . Lorsque l'on observe la membrane interne mitochondriale en microscopie électronique, on remarque que la surface matricielle est recouverte de petits champignons. La résolution de ces structures par cryo-électromicroscopie (Cryo-EM) confirme une structure en forme de petite sphère rattachée à la membrane par un petit pied. L'ATP synthase possède 2 composants distincts : (i) le composant membranaire F_0 (le "O" vaut pour sensible à l'oligomycine) et (ii) le composant soluble F_1 (le "1" vient du fait qu'il a été le premier facteur essentiel à la phosphorylation oxydative purifiée).

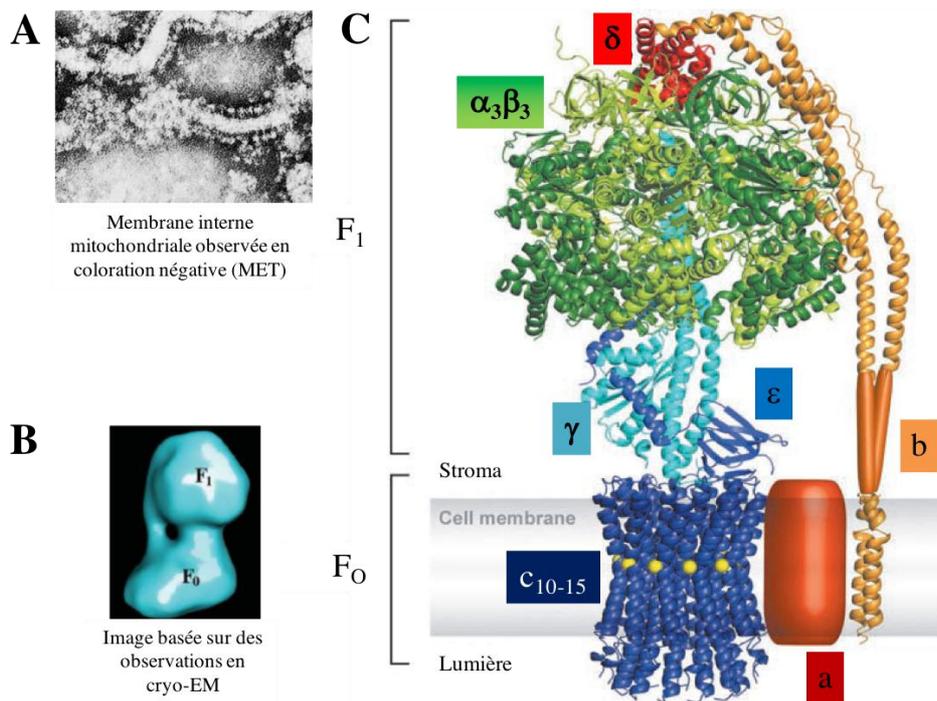


Figure 38 – Modèle structural composite de l'ATP synthase

Ce modèle est basé sur la structure cristallographique de l'assemblage c_{11} de l'ATPase- F_1F_0 translocon à Na^+ de *Ilyobacter tartaricus* (PDB : 1YCE), du composant F_1 de *Escherichia coli* (PDB : 1JNV), de la structure RMN des sous-unités δ et du segment transmembranaire de la sous-unité b de *Escherichia coli* (PDB : 2A7U et 1B9U). Les structures de la sous-unité a et de la région charnière de la sous-unité b ne sont pas connus.

Le composant F_0 est composé de 3 sous-unités transmembranaires a, b, c (271, 161 et 89 résidus respectivement) qui forme un complexe de stœchiométrie $a_2b_2c_{12}$ chez *Escherichia coli*. Chez les eucaryotes, le composant F_0 mitochondrial est composé d'autres sous-unités (d, F6, OSCP, e, f, g et A6L) mais dont la fonction est peu connue. Comme représenté dans la Figure 38, la sous-unité a est une protéine intégrale qui interagit avec le domaine transmembranaire des 2 sous-unités b qui s'associent en *coiled-coiled* et s'étendent jusque dans le stroma pour y interagir avec le composant F_1 . Les sous-unités c sont des petites protéines très hydrophobes constituées de 2 hélices α quasiment perpendiculaire au plan de la membrane et dont l'arrangement spatial forme 2 cercles concentriques.

Le composant F1 est un nonamère de stœchiométrie $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ dans lequel la sous-unité β contient le site catalytique pour la synthèse d'ATP et la sous-unité δ permet l'interaction entre le composant F_0 et F_1 . La structure cristallographique du composant F_1 issue de mitochondries du tissu cardiaque bovin révèle que cette protéine de 400 kDa présente une hauteur et une largeur de 100 Angströms. Les sous-unités α et β (553 et 528 résidus respectivement) présente un pourcentage d'identité de séquence de 20% et des repliements proches qui s'apparient dans 'espace comme les quartiers d'une orange. La sous-unité γ (298 résidus) interagit avec les sous-unités α et β grâce à son domaine C-terminal qui s'insère dans la partie centrale de l'hexamère $\alpha_3\beta_3$. Son domaine N-terminal, quant à lui, forme une tige centrale reliant les composants F_0 et F_1 .

iii. Mécanisme catalytique de l'ATP synthase

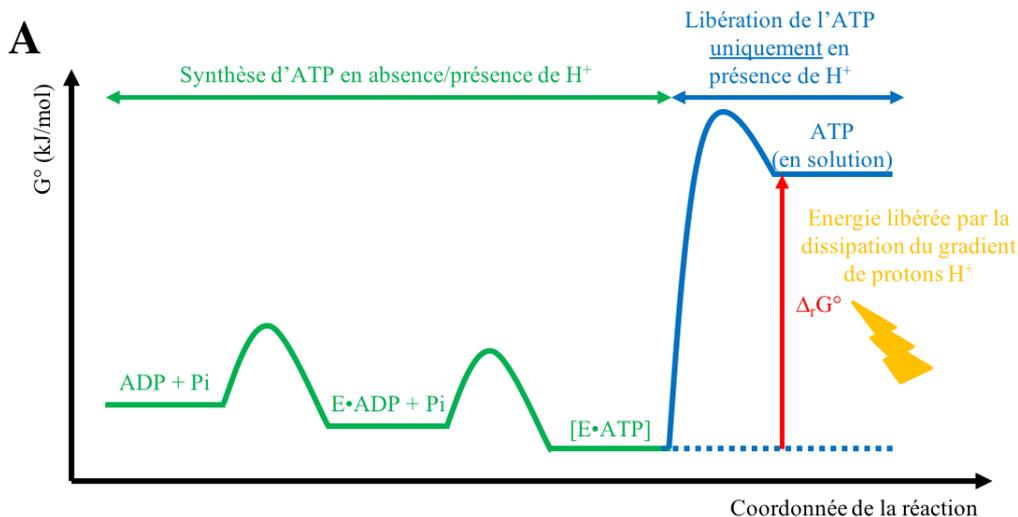
L'ATP synthase catalyse la formation d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique P_i de manière concomitante au passage de protons H^+ à travers la membrane selon leur gradient électrochimique. Cette capacité catalytique provient des 2 domaines fonctionnels suivants : (i) le domaine F_0 qui assure la dissipation du gradient de protons H^+ au moyen du « rotor » formé par les sous-unités c et γ ; (ii) et le domaine F_1 qui correspond à l'ATPase et réalise la synthèse d'ATP *via* le « stator » formé principalement par les sous-unités $\alpha_3\beta_3$.

-Aspect énergétique : dissipation du gradient de H^+ par rotation du rotor $c-\gamma$

La mesure *in vitro* du $\Delta_r G^\circ$ de la synthèse de l'ATP par F_1 est presque nulle, au lieu de 30 kJ/mol. En fait, l'équilibre est déplacé par la très forte association de l'ATP à l'enzyme, comparée à celle de l'ADP. La différence de K_d correspond à en effet à une différence de 40 kJ/mol d'énergie de liaison. Donc en absence de gradient de proton, l'enzyme synthétise de l'ATP mais il ne peut pas quitter la surface de l'enzyme. L'énergie libérée par la dissipation du gradient sert à libérer l'ATP. Cette observation suppose que pour que la synthèse d'ATP soit continue, l'enzyme doit cycliser entre une forme qui lie très fortement l'ATP et une forme qui la libère. Des études chimiques et cristallographiques ont effectivement révélé la base structurale de ce changement de conformation.

-Aspect structural : changement de conformation du dimère α/β

F_1 est un composé de 5 sous-unités différentes assemblées selon la stœchiométrie $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. α et β lient l'ADP et l'ATP, mais seules les sous-unités β catalysent l'hydrolyse ou la synthèse de l'ATP. Les sous-unités α et β , de structure tridimensionnelle proche, alternent pour former une structure ressemblant à une orange, autour de la partie C-terminale de la sous-unité γ . La protéine semble donc posséder une pseudo-symétrie d'ordre 6 voire d'ordre 3 (si on considère comme unité de base le dimère $\alpha\beta$). Cependant elle est asymétrique : un domaine de la sous-unité γ interagit uniquement avec une des sous-unités β -empty (car exempt d'ADP + P_i et d'ATP). De plus, les 3 paires de sous-unités $\alpha\beta$ n'ont pas la même conformation. En effet, lors de la cristallisation de F_1 en présence d'ADP et d'un analogue non hydrolysable de l'ATP, on note toujours qu'une paire est vide (α -empty/ β -empty), une autre lie l'ADP (α -ADP/ β -ADP) et la troisième lie l'ATP (α -ATP/ β -ATP).



B Schéma d'une partie de F_1 Structure cristallographique correspondante obtenue en présence d'ADP et d'un analogue non hydrolysable de l'ATP

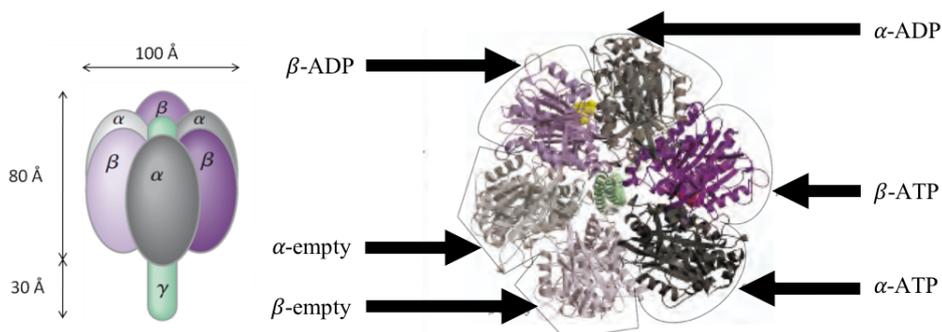


Figure 39 – Aspect énergétique et structural de la synthèse d'ATP par l'ATP synthase

- Aspect mécanistique : synthèse d'ATP par changement de conformation du dimère α/β couplé à la rotation du rotor c - γ induite par dissipation du gradient de H^+

Aspect conformationnel

Les couples α/β peuvent être dans 3 conformations différentes : (i) une conformation dite « α/β -empty » : faible affinité pour ADP, Pi et ATP, (ii) une conformation dite « α/β -ADP » : forte affinité pour ADP + Pi et (iii) une conformation dite « α/β -ATP » : synthèse ATP et forte affinité pour ATP. A chaque rotation de 120° du rotor c - γ , la sous-unité γ se retrouve au contact d'une unique sous-unité β , forçant cette dernière à adopter la conformation β -empty. De plus, les sous-unités β interagissent d'une telle manière que lorsque l'une d'entre elles adopte la conformation β -empty, ses voisines adoptent une conformation différente : l'une sous forme β -ADP et l'autre sous forme β -ATP. **On dit qu'il y a une coopérativité des changements de conformation.** Enfin, ces derniers étant permis par la rotation de γ , elle-même permise par le passage des protons à travers F_0 , **on dit finalement de cette coopérativité des changements de conformation qu'elle est endergonique.** Au final, une rotation de 360° de γ fait effectuer à chaque sous-unité β un cycle complet de changements de conformation et 3 ATP sont synthétisés et libérés, comme représenté dans la Figure 40.

Aspect rotationnel

La synthèse d'ATP est permise par le passage des protons à travers F_0 . Les protons H^+ extérieurs rentrent dans un canal hydrophile entre la sous-unité a et l'anneau de sous-unités c. A ce niveau, les protons H^+ lient une sous-unité c, ce qui induit une rotation de l'anneau. A chaque fixation d'un proton H^+ sur une sous-unité c, l'anneau tourne légèrement et ainsi de suite. La rotation serait probablement dû à la protonation du résidu Asp61 qui altère la conformation des sous-unités c, empêche son interaction électrostatique avec un résidu Arg de la sous-unité a et favorise ainsi la rotation. Lorsque l'anneau réalise presque un tour complet, la première sous-unité c ayant fixé un proton H^+ atteint un second canal hydrophile positionné entre les sous-unités a et c, qui s'ouvre vers l'intérieur : le proton H^+ est alors relargué. Et ainsi de suite pour les 10 sous-unités de l'anneau. C'est pourquoi, **on parle de catalyse rotationnelle**.

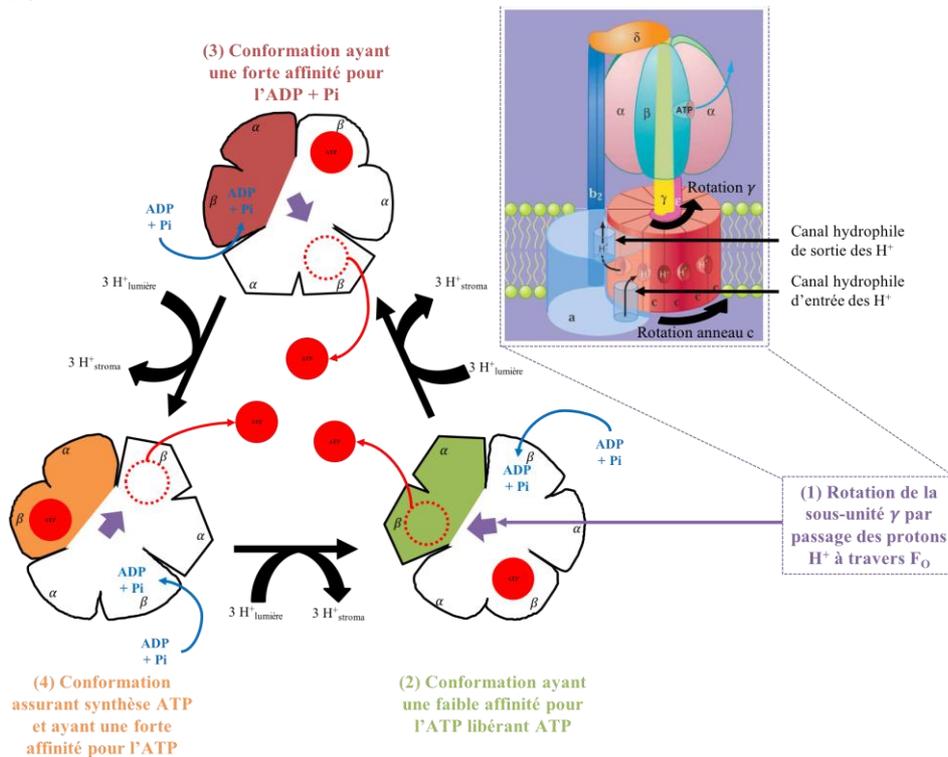


Figure 40 – Représentation schématique du mécanisme catalytique de l'ATP synthase

(1) Lorsque la sous-unité γ réalise une rotation de 120° , (2) elle interagit avec une unique sous-unité β dont la conformation passe de la forme β -ATP (site de fixation tendu) vers la forme β -empty (site de fixation ouvert). L'affinité de β pour l'ATP chute, ce qui entraîne sa libération. (3) Après une 2^{ème} rotation de γ , la sous-unité β prend la conformation β -ADP (site de fixation relâché) : elle lie ADP et Pi. (4) Après une troisième rotation de γ , elle change de nouveau de conformation, devient β -ATP (site de fixation tendu) et synthétise l'ATP et le lie fortement. Et, le cycle catalytique recommence.

La rotation de l'anneau de sous-unités c entraîne la rotation la sous-unité γ puisque l'ATP synthase présente fonctionnellement un « rotor » formé par les sous-unités c- γ , qui influence le « stator » composé des sous-unités δ , a et b et en particulier agit sur la conformation des dimères α/β .

3) Mécanisme de la phase non photochimique

L'énergie chimique (ATP) et le pouvoir réducteur (NADPH) formés au cours de la phase photochimique de la photosynthèse sont ensuite utilisés pour la synthèse de glucides et d'autres composés à partir du CO_2 grâce au cycle de Calvin.

a. Vue d'ensemble du cycle de Calvin

Le métabolisme central carboné est essentiel aux organismes vivants. Chez les organismes photosynthétiques, l'assimilation du carbone se fait via le cycle de Calvin-Benson-Bassham (pour simplification : cycle de Calvin) en utilisant l'énergie (sous forme d'ATP) et le pouvoir réducteur (sous forme de NADPH) produit lors de la phase photochimique de la photosynthèse. De façon simplifiée, le cycle de Calvin se décompose en 3 phases :

- la **phase 1** assure la régénération du ribulose pour continuer le cycle vers,
- la **phase 2** qui permet l'assimilation du carbone suivi par,
- la **phase 3** de réduction en G3P, précurseur des sucres régénérant le ribulose.

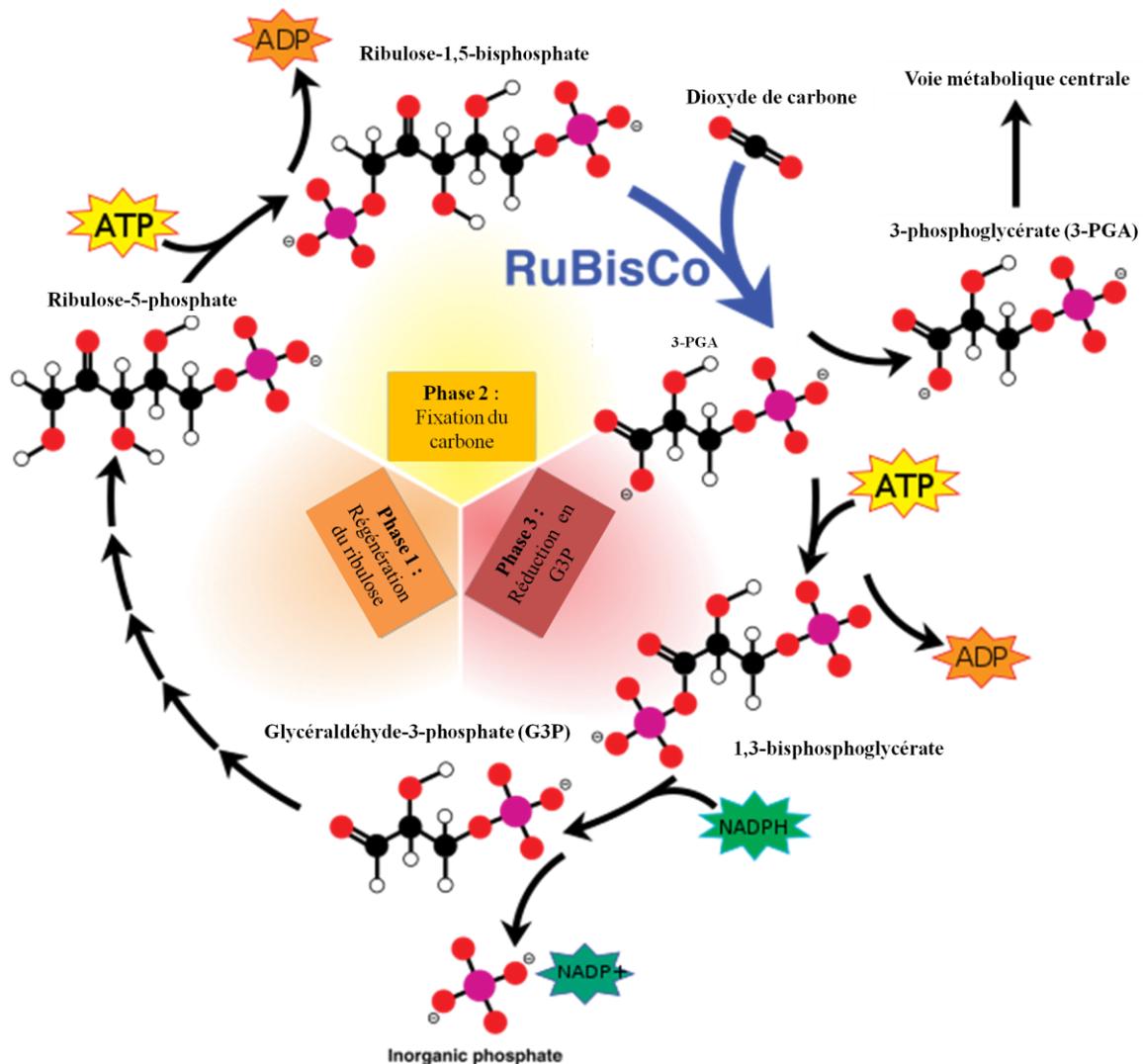


Figure 41 – Vue simplifiée du cycle de Calvin

Ce cycle correspond à la principale voie d'assimilation du CO_2 chez les organismes autotrophes et constitue le premier maillon de l'entrée du carbone inorganique faisant des cyanobactéries des modèles d'avenir pour les biocarburants de 3^{ème} génération notamment. Le

cycle de Calvin requiert des sucres de différentes tailles (trioses, tétroses, pentoses, hexoses et heptoses) et peut se décomposer en 4 étapes :

- (1) la production de ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) par la phosphoribulokinase (PRK, Prk) à partir du ribulose-5-phosphate (Ru5P),
- (2) l'assimilation du carbone issu du CO₂ par carboxylation du ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) par la RuBisCO en 3-phosphoglycérate (3-PGA),
- (3) la conversion du 3-PGA en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH, Gap2),
- (4) la régénération du (Ru5P).

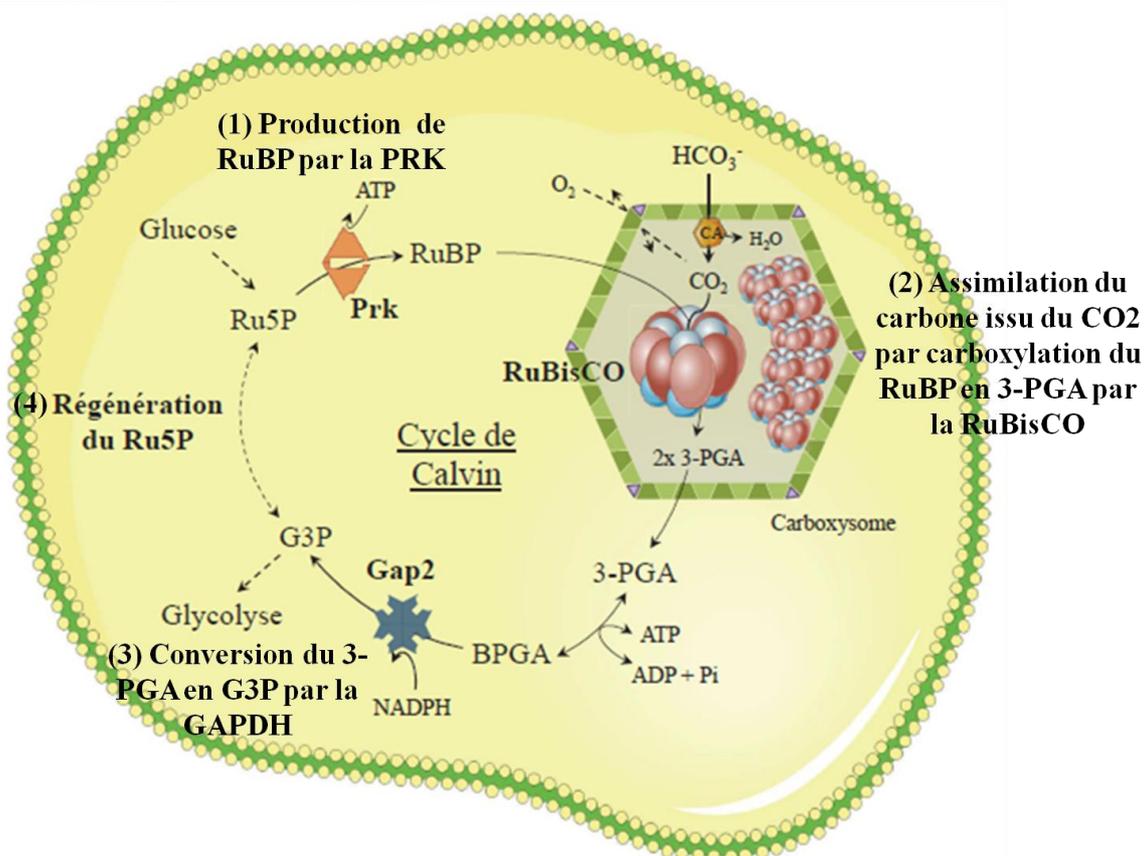


Figure 42 – Le cycle de CALVIN-BENSON-BASSHAM

Les trapèzes verts représentent la coque protéique du carboxysome et dont les sommets (représentés par des triangles violets) correspondent à une protéine spécifique. Ce compartiment contient des anhydrases carboniques (CA, hexagone en orange) et de très nombreuses RuBisCO (structure en L₈S₈, grandes sous-unités L en rouge et petites sous-unités S en bleu) ; BPGA : Bisphosphoglycérate

Adapté de « Vers la reprogrammation métabolique de la cyanobactérie modèle Synechocystis pour la production durable de biocarburants : structuration des flux du carbone par CP12 et implications sur l'équilibre bioénergétique, l'hydrogénase et l'intégrité génomique » ; Théo Veaudor)

On peut considérer que le cycle de Calvin implique 2 phases :

- une phase de production (ligne du haut de la figure 44 où : 3 molécules de Ru5P réagissent avec 3 molécules de CO₂ pour former 6 molécules de G3P avec le recours à 6 molécules d'ATP et de NADPH (étape 2, figure 44),

La nature cyclique de la voie rend ce processus équivalent à la synthèse d'un G3P à partir de 3 molécules de CO₂. A ce stade, un G3P peut alors « sortir » du cycle et être utilisé dans des voies de biosynthèse.

- une phase de récupération (lignes du bas de la figure 44), où les atomes de carbone des 5 G3P restants sont « réarrangés » dans une série de réactions pour régénérer les 3 Ru5P avec lesquels le cycle a démarré. Cette phase peut être décomposée en 4 séries de réactions :
 - étape 6 : $C_3 + C_3 \rightarrow C_6$
 - étape 8 : $C_3 + C_6 \rightarrow C_4 + C_5$
 - étape 9 : $C_3 + C_4 \rightarrow C_7$
 - étape 11 : $C_3 + C_7 \rightarrow C_5 + C_5$

La stœchiométrie globale de ce processus est $5 C_3 \rightarrow 3 C_5$ et il est important de souligner que cette phase ne nécessite ni apport d'énergie (ATP), ni pouvoir réducteur (NADPH).

Le schéma ci-après illustre les différents sucres par une représentation schématique du nombre de carbones (C₃ à C₇) et de la position de la fonction C=O, tandis que la figure suivante propose une représentation des sucres en projection de Fischer (structure linéaire par souci de clarté) impliqués dans le cycle de Calvin.

b. Transport et concentration du CO₂

Le transport du CO₂ est la première étape assurant l'assimilation du CO₂ par le cycle de Calvin. Pour cela, de nombreuses cyanobactéries ont développé des systèmes d'import et de transport du CO₂ tels que des transporteurs de bicarbonates et de transporteurs de CO₂ spécifiquement associés à des NADPH-déshydrogénases du complexe I (NDH-I) de la chaîne respiratoire. Une fois dans la cellule, le CO₂ est concentré et stocké. A titre d'exemple, de nombreuses cyanobactéries possèdent un système CCM (CO₂ Concentration mechanism) leur assurant la survie dans un milieu dont la teneur en CO₂ est faible. Le carbone est stocké sous forme d'ion hydrogénocarbonate HCO₃⁻ et constitue le substrat de l'enzyme de fixation du carbone, la RuBisCO (Ribulose Bisphosphate Carboxylase Oxygénase).

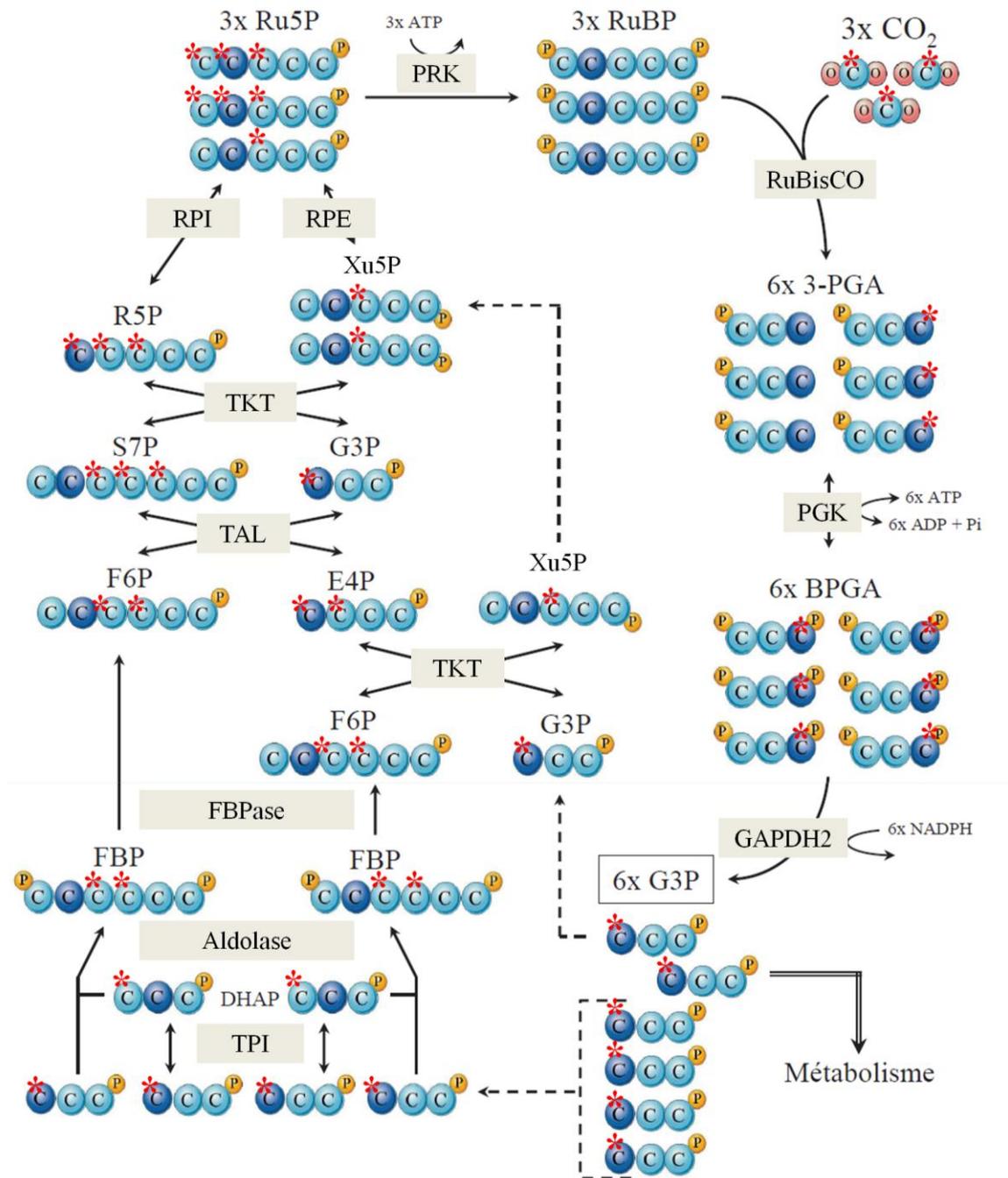


Figure 43 - Le cycle de Calvin en vue simplifiée rendant compte de la diversité des sucres impliqués dans la régénération du Ru5P

Les sphères bleues foncées indiquent la position du groupe C=O dans chaque sucre. Les sphères jaunes illustrent la position du groupement phosphate et les astérisques rouges représentent les carbones marqués ^{14}C après un tour de cycle et exposition au $^{14}\text{CO}_2$ sont en rouge ; Ru5P : Ribulose-5-phosphate; RuBP : Ribulose-1,5-bisphosphate; 3-PGA : 3-phosphoglycérate; BPGA : Bisphosphoglycérate; G3P : Glycéraldéhyde-3-phosphate; DHAP : Dihydroxyacétone phosphate; FBP : Fructose-1,6-bisphosphate; F6P : Fructose-6-phosphate; Xu5P : Xylulose-5-phosphate; E4P : Erythrose-4-phosphate; S7P : Sedoheptulose-7-phosphate; R5P : Ribose-5-phosphate; PGK : Phosphoglycérate kinase; TPI = Triose phosphate isomérase; FBPase = Fructose-1,6-bisphosphatase; TKT = Transcétolase; TAL = Transaldolase; RPI : Ribose-5-phosphate isomérase; RPE : Ribulose-5-phosphate épimérase

Adapté de « Vers la reprogrammation métabolique de la cyanobactérie modèle ynechocystis pour la production durable de biocarburants : structuration des flux du carbone par CP12 et implications sur l'équilibre bioénergétique, l'hydrogénase et l'intégrité génomique » ; Théo Veaudor)

Phase 1 de production

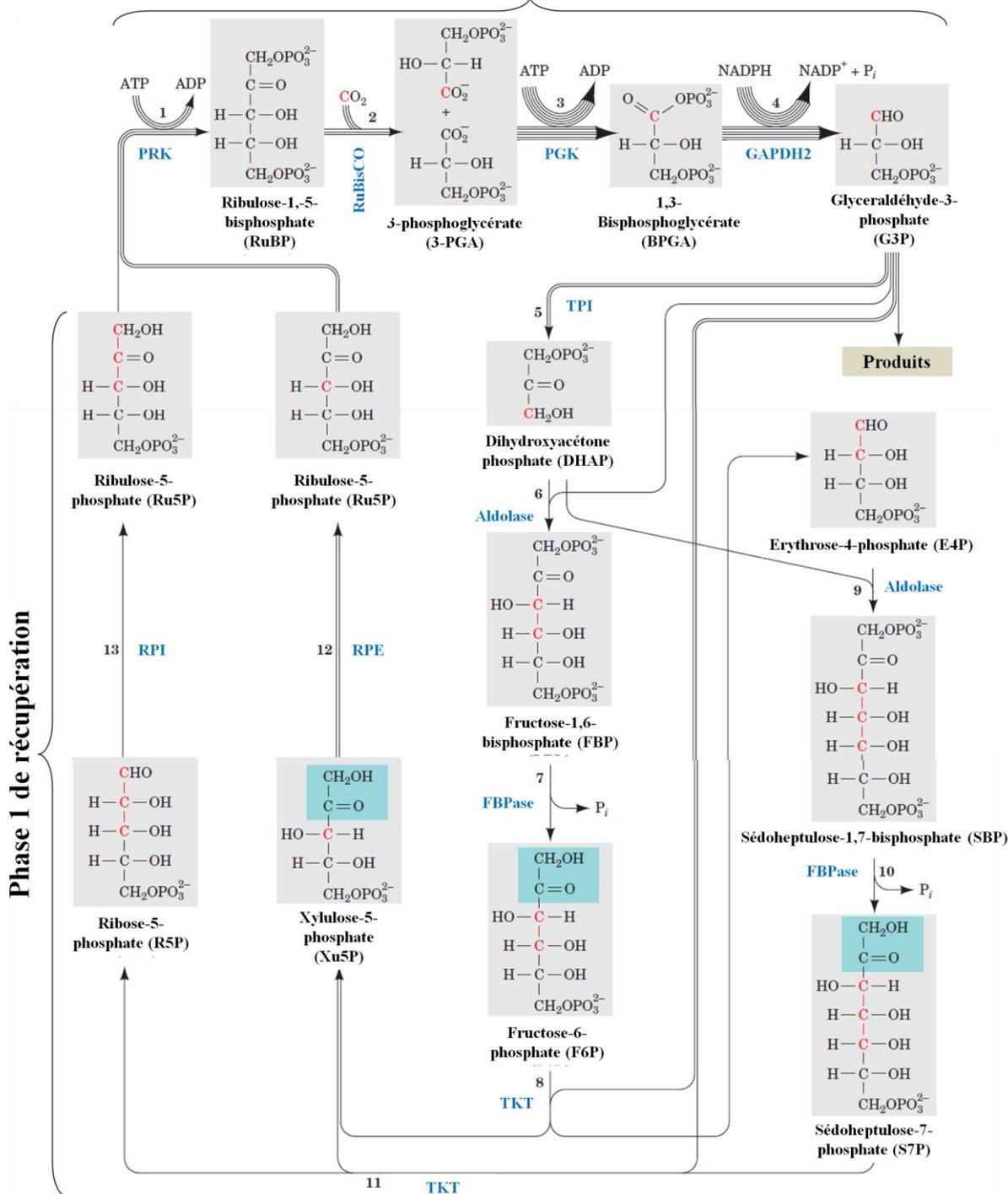


Figure 44 – Le cycle de Calvin

Le nombre de lignes d'une flèche indique le nombre de molécules qui réagissent pour un seul tour de cycle qui transforme 3 molécules de CO_2 en 1 molécule de G3P. Les carbones marqués ^{14}C après un tour de cycle et exposition au $^{14}\text{CO}_2$ sont en rouge.

Adapté de Biochimie – VOET – 2^{ème} édition

c. *Les enzymes du cycle de Calvin : assimilation du carbone par la phase de production et régénération du Ru5P par la phase de récupération*

i. *La phosphoribulokinase (PRK)*

(Phase 1 - étape 1, figure 44)

Chez *Synechocystis*, la PRK est une protéine soluble de 38 kDa codée par le gène *sll1525* et localisée à proximité des thylakoïdes (Agarwal et al., 2009). Elle consomme l'ATP pour phosphoryler le Ru5P en RuBP. Elles possèdent 2 cystéines (Cys19 et Cys41) correspondant aux cystéines régulatrices de la PRK de l'épinard (Porter and Hartman, 1988). La distance relative entre ces 2 cystéines chez *Synechocystis* suggère que la régulation par ces cystéines est absente in vivo (Tamoi et al., 1998; Kobayashi et al., 2003). Néanmoins aucune structure tridimensionnelle n'a encore été publiée (Michelet et al., 2013).

ii. *La ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygénase (RuBisCO)*

(Phase 1 - étape 2, figure 44)

La Rubisco est une enzyme multimérique composée de 2 x 8 grandes et petites sous-unités. La grande sous-unité (RbcL, L pour *Large* - 52,4 kDa) est codée par le gène *slr0009* et la petite (RbcS, S pour *Small* - 13 kDa) par le gène *slr0012*. Ces 2 gènes sont regroupés dans l'opéron *rbc* comprenant également les gènes codant les chaperones et les protéines accessoires requises à l'assemblage de la Rubisco (pour revue (Hauser et al., 2015)). La Rubisco catalyse la carboxylation du RuBP et produit 2 molécules de 3-phosphoglycérate (3-PGA) (étape 2). Néanmoins, l'assimilation du CO₂ est limitée par 2 propriétés de la Rubisco : (i) sa constante catalytique est l'une des plus faible connue ($k_{cat} \approx 3 \text{ s}^{-1}$) et (ii) sa faible spécificité entre CO₂ et O₂. Or, l'activité oxygénase produit une molécule de 3-PGA et une de 2-phosphoglycolate (2-PG), une molécule toxique qui inhibe certaines enzymes du métabolisme du carbone (triose phosphate isomérase (TPI), phosphofructokinase (PRK))(Anderson, 1971; Kelly and Latzko, 1976). Le 2-PG est néanmoins éliminé par la photorespiration (Peterhansel et al., 2010), processus essentielle à la viabilité cellulaire en photoautotrophie (Eisenhut et al., 2008). Pour compenser la faible efficacité catalytique et éviter la production du toxique 2-PG par la Rubisco, les cyanobactéries (tout comme les plantes) produisent une grande quantité de Rubisco immobilisées dans un état paracristallin (Shively et al., 1973)(on considère d'ailleurs qu'il s'agit de la protéine la plus abondante sur Terre (Dhingra et al., 2004)) et les cyanobactéries (uniquement) ont développé les carboxysomes, un système protéique d'encapsulation de la Rubisco rendant ce compartiment partiellement imperméable au O₂ et CO₂(Figure 42). La structure protéique comporte néanmoins des transporteurs et des anhydrases carboniques qui, respectivement, importent du HCO₃⁻ et le convertissent en CO₂ qui se retrouve concentré dans les carboxysomes.

iii. *La phosphoglycérate kinase*

(Phase 1 - étape 3, figure 44)

La PGK est une phosphotransférase qui catalyse la réaction ATP-dépendante de conversion du 3-PGA en 1,3-bisphosphoglycérate (BPGA). Cette enzyme intervient également dans la néoglucogénèse dans le sens de formation du BPGA et dans la 7^{ème} étape de la glycolyse de manière inverse.

iv. *La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH)*

(Phase 1 - étape 4, figure 44)

La GAPDH du cycle de Calvin (GAPDH2) est codée par le gène *sll1342* et est une isoforme de celle de la glycolyse (GAPDH1, codée par le gène *slr0884*) chez *Synechocystis*. Cette enzyme est homotétramérique (4 x 36,5 kDa) et bidirectionnelle puisqu'elle convertit *in*

in vitro le bisphosphoglycérate (BPGA) en G3P et inversement. Cependant, *in vivo* la réaction anabolique est favorisée par l'association de l'enzyme à un petit inhibiteur de faible poids moléculaire (Koksharova et al., 1998).

v. *Les enzymes de régénération du Ru5P*
(Phase 2 - étape 5 à 13, figure 44)

La régénération du Ru5P est cruciale. Lorsque 3 molécules de RuBP sont carboxylées par la Rubisco, le cycle produit 6 molécules de G3P dont une assure le gain net de carbone (encart « produits ») et les 5 autres assurent la régénération du Ru5P (aux étapes 5, 6, 8 et 11). Cette régénération requiert des réarrangements de sucres les uns avec les autres via des enzymes fonctionnant en série dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau ci-après.

Tableau 11 – Caractéristiques des enzymes impliquées dans la régénération du Ru5P

Enzyme	Gène	Masse (kDa)	Oligomérisation	Substrat(s)	Produit(s)
TPI	<i>slr0783</i>	26,2	ND	G3P/DHAP	DHAP/G3P
Aldolase (classe I)	<i>slr0943</i>	33,0	Dimérique	DHAP+G3P	FBP
Aldolase (classe II)	<i>sll0018</i>	39,0	Octamérique	DHAP+G3P	FBP
FBPase (classe I)	<i>slr2094</i>	38,3	Tétramérique	FBP/SBP	F6P/S7P
FBPase (classe II)	<i>slr0952</i>	29,0	ND	FBP/SBP	F6P/S7P
TAL	<i>slr1793</i>	43,1	ND	E4P + F6P	S7P + G3P
TKT	<i>sll1070</i>	71,7	ND	F6P + G3P	E4P + Xu5P
				S7P + G3P	R5P + Xu5P
RPI	<i>slr0194</i>	24,8	Dimérique	R5P	Ru5P
RPE	<i>slr0807</i>	25,0	Hexamérique	Xu5P	Ru5P

TPI : Triose phosphate isomérase ; TAL : Transaldolase ; TKT : Transcétolase ; RPI : Ribose-5-phosphate isomérase ; RPE : Ribulose-5-phosphate épimérase ; G3P : Glycéraldéhyde-3-phosphate ; DHAP : Dihydroxyacétonephosphate ; FBP : Fructose-1,6-bisphosphate ; SBP : Sédoheptulose-1,7-bisphosphate ; F6P : Fructose-6-phosphate ; S7P : Sédoheptulose-7-phosphate ; E4P ; Erythrose-4-phosphate ; Xu5P ; Xylulose-5-phosphate ; R5P : Ribose-5-phosphate ; Ru5P : Ribulose-5-phosphate (Köhler et al., 1996; Tamoi et al., 1999; Nakahara et al., 2003; Wise et al., 2004; Shen et al., 2005; L. Feng et al., 2014)

C. Les autres métabolismes : carbone et azote

1) Rôle central de la ferrédoxine dans le métabolisme et la physiologie cellulaire

Tel que représenté dans la figure 45, chez *Synechocystis*, la ferrédoxine réduite (FedRd) constitue un véritable carrefour métabolique puisque cette protéine alimente en électrons de nombreuses voies métaboliques et processus biochimiques que nous pouvons décomposer en 3 catégories :

- **le métabolisme du carbone et de l'azote**, puisque l'équilibre entre carbone et azote organique (balance C/N) est essentiel à tout organisme vivant et particulièrement chez les organismes photosynthétiques. Pour ces raisons, le métabolisme du carbone et de l'azote fera l'objet dans d'un développement dans cette partie. Dans ce cadre :
 - la FedRd est oxydée en grande partie par la ferrédoxine-NADP⁺ réductase (FNR) pour produire du pouvoir réducteur sous forme de NADPH (un transporteur d'électron et un cofacteur de nombreuses réactions) (métabolisme du carbone) :
 - il est utilisé par les mécanismes d'import du CO₂ atmosphérique,
 - puis il alimente principalement le cycle de Calvin – au cours duquel le CO₂ est incorporé dans des squelettes carbonés – qui correspond à la phase non photochimique de la photosynthèse dont le détail sera décrit dans la partie suivante,
 - enfin il peut servir à la biosynthèse de réserves de carbone organique sous forme de PHB (poly-β-hydroxybutyrate) et à la détoxification des ROS (Reactive Oxygen Species ou Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)) par l'hydrogénase,
 - la Fed RD donne également une partie de ses électrons pour l'assimilation de l'azote – la réduction du nitrate (NO₃⁻) en ammonium (NH₄⁺) faisant intervenir la nitrate réductase (NarB) et la nitrite réductase (NirA), qui consomment respectivement 2 et 6 électrons, et pour la production de glutamate par la glutamate synthase à partir de l'ion ammonium et qui nécessite 2 électrons (métabolisme de l'azote),
- **le métabolisme du soufre et des thiols**, car le fonctionnement de la chaîne photosynthétique repose sur de nombreuses protéines à centre fer-soufre, que la régulation du métabolisme (photosynthèse compris) repose majoritairement sur l'équilibre rédox des thiols (qui sera détaillé ultérieurement dans le cadre de la description des stress et des moyens de les gérer notamment par les GST). Néanmoins, la FedRd fournit des électrons pour :
 - (i) l'assimilation du soufre, pour laquelle la réduction du sulfite (SO₃²⁻) en soufre assimilable (S²⁻) est réalisée par la sulfite réductase qui nécessite 6 électrons,
 - (ii) l'alimentation du système des thiorédoxines impliquées dans l'homéostasie des thiols et des disulfides grâce à la ferrédoxine-thiorédoxine réductase (FTR).
- **le métabolisme de l'hydrogène, des lipides et des pigments**, en effet, les lipides sont essentiels de part leur rôle dans les membranes ou dans la synthèse du peptidoglycane (composé vital aux bactéries) et les pigments, le sont tout autant puisque ces lipides complexes sont essentiels à la photosynthèse. La synthèse des pigments se fait grâce à la voie du MEP (2-C-méthylérythritol-4-phosphate), qui ne sera pas présentée ici sous

cet aspect, mais plutôt comme la voie de synthèse dont le laboratoire tire profit pour la synthèse de terpènes (ce qui fera l'objet d'une partie lors de la définition et de la description de l'intérêt biotechnologiques des terpènes). Quoiqu'il en soit, le FedRD donne ses électrons à :

- l'acyl-lipide désaturase, enzyme impliquée dans le métabolisme des lipides,
- à l'hème oxygénase PcyA dédiée à la synthèse des pigments,
- et à l'hydrogénase.

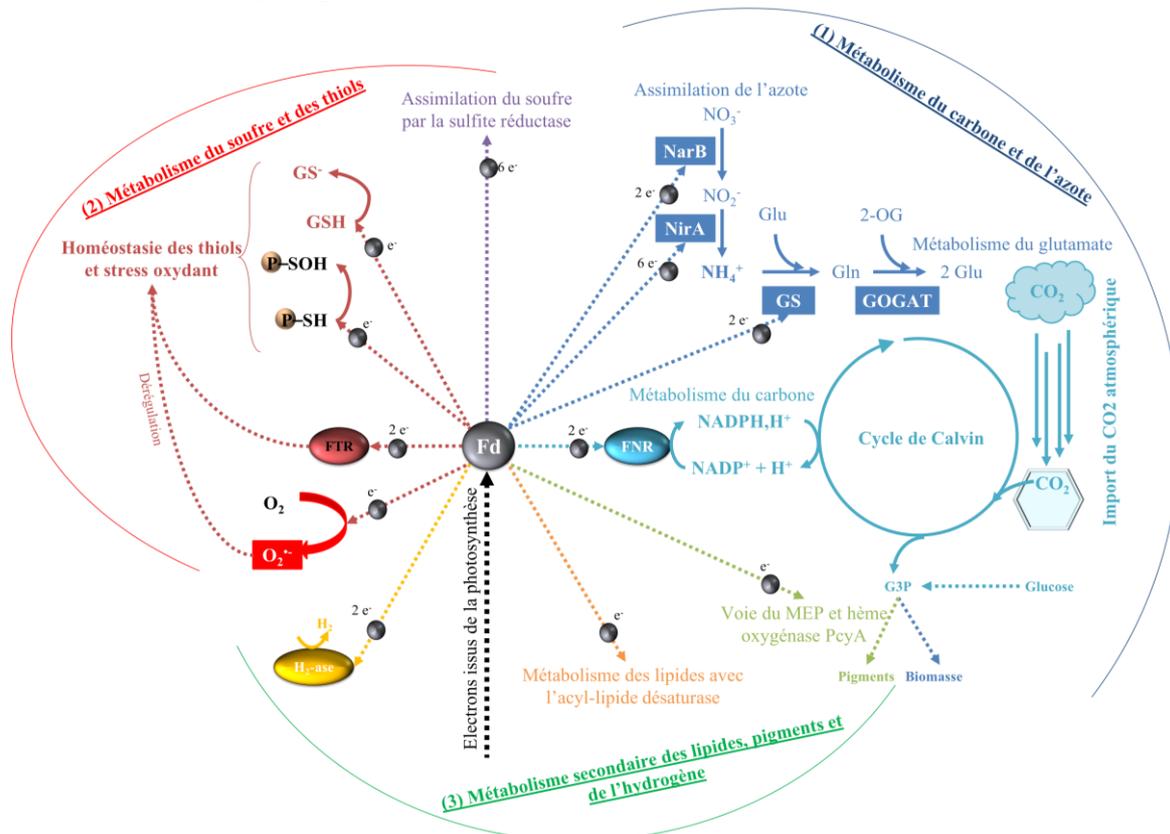


Figure 45 – Rôle central de la ferrédoxine dans le métabolisme

2) Le métabolisme du carbone

a. L'anabolisme du carbone

i. Assimilation du CO₂ par le cycle de Calvin pour la synthèse de G3P vers l'acétyl-CoA

L'anabolisme du carbone chez les cyanobactéries correspond principalement au cycle de Calvin décrit précédemment et dont la stœchiométrie globale est :



Le cycle de Calvin conduit donc à la production de G3P une molécule précurseur à d'autres produits et voies de biosynthèse qui utilisent l'ATP et le pouvoir réducteur (NADPH) produit par la photosynthèse. Par exemple, le G3P peut donner des sucres caractéristiques des plantes et être utilisé pour la synthèse des réserves sous forme de glycogène chez les cyanobactéries. Le G3P peut également être redirigé vers la synthèse de pyruvate lui-même convertit en l'acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH). L'acétyl-CoA est une molécule elle-même précurseur de la synthèse des lipides et de réserves carbonées.

ii. La production de réserves carbonées

En photoautotrophie, une partie du carbone organique est stockée sous forme de polymères de carbohydrates agrégés en granules intracellulaires insolubles, le PHB et le glycogène (Beck et al., 2012). Le PHB ou poly- β -hydroxybutyrate) est synthétisé en 3 étapes à partir de 2 molécules d'acétyl-CoA (Hein et al., 1998; Taroncher-Oldenburg et al., 2000). Ces 2 molécules sont condensées pour former de l'acétoacétyl-CoA par la β -cétotliase (PhaA), qui est par la suite réduit en hydroxybutyryl-CoA par l'acétoacétyl-CoA réductase (PhaB). La polymérisation de l'hydroxybutyryl-CoA est assurée par la PHB synthase (PhaEC). Les cyanobactéries produisent également des réserves de glucose, sous forme de glycogène, à partir du G1P lorsque celui-ci entre dans la néoglucogénèse. Le G1P est ADP-ribosylé puis polymérisé respectivement par l'ADP-glucose phosphorylase et la glycogène synthase.

b. Les voies cataboliques du carbone

i. Vue d'ensemble

En absence de lumière, l'ATP et le NADPH ne sont plus produits par la phase photochimique de la photosynthèse. Les cyanobactéries ont la capacité de reprogrammer leur métabolisme central pour réaliser la respiration pendant les phases nocturnes pour produire de l'énergie (toujours sous forme d'ATP), du pouvoir réducteur (toujours sous forme de NADPH) et des molécules carrefours (G3P, pyruvate, acétyl-CoA) précurseurs de molécules plus complexes. Lors de la respiration, le glucose provient des réserves endogènes de PHB (poly- β -hydroxybutyrate) ou du glycogène. Il peut également être apporté par le milieu extérieur et être métabolisé chez les cyanobactéries hétérotrophes facultatives comme *Synechocystis*. La dégradation du glucose, du glycogène ou des PHB se fait grâce aux voies métaboliques suivantes (Figure 46) :

- la glycolyse et les voies d'Entner-Doudoroff et des pentoses phosphates, qui mènent toutes de manière directe ou indirecte (*via* le cycle de Calvin) à la synthèse d'une molécule carrefour :
 - o l'acétylCoA, qui alimente un second cycle métabolique :
 - le cycle de Krebs, qui produit du pouvoir réducteur sous forme d'un transporteur d'électrons :
 - le NADPH, qui donne ces électrons aux cytochromes de la chaîne respiratoire située dans les thylakoïdes.

La chaîne respiratoire prend alors en charge les électrons issus du NADPH provenant de la glycolyse et du cycle de Krebs, et les transfèrent par des cascades d'oxydoréduction jusqu'à l'O₂ établissant de manière concomitante un gradient électrochimique de protons H⁺ servant de force motrice pour alimenter l'ATP synthase qui synthétise alors de l'ATP *via* ce couplage chimio-osmotique.

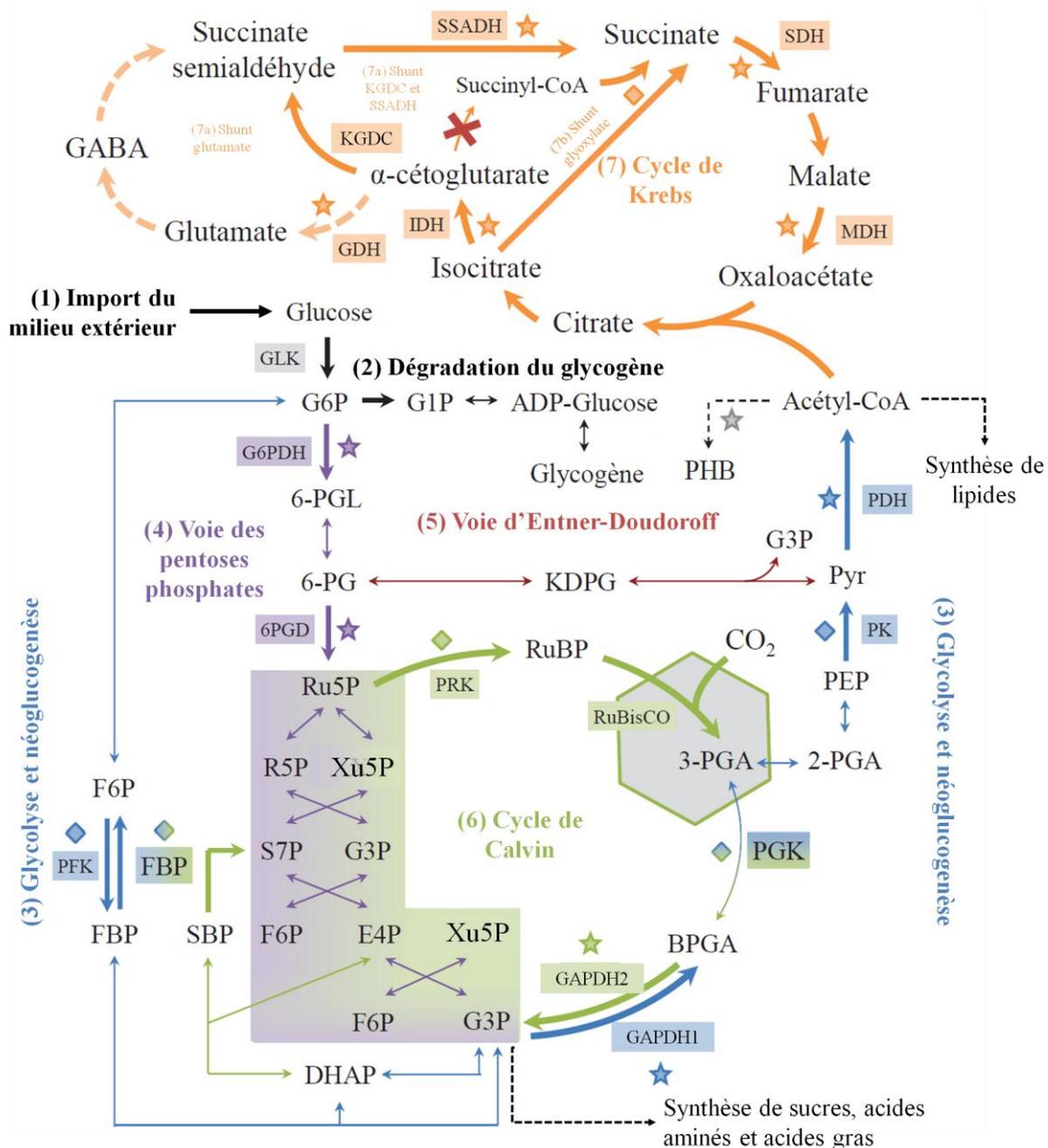


Figure 46 – Le métabolisme du carbone chez *Synechocystis*

Les losanges et les étoiles indiquent les réactions enzymatiques utilisant respectivement l'ATP ou les cofacteurs réduits (NADPH et NADH) comme cofacteurs.

G6P : Glucose-6-phosphate ; G1P : Glucose-1-phosphate ; 6-PGL : 6-phosphogluconolactone ; 6-PG : 6-phosphogluconate ; Ru5P : Ribulose-5-phosphate ; RuBP : Ribulose-1,5-bisphosphate ; 3-PGA : 3-phosphoglycérate ; DHAP : Dihydroxyacétone phosphate ; FBP : Fructose-1,6-bisphosphate ; F6P : Fructose-6-phosphate ; Xu5P : Xylulose-5-phosphate ; E4P : Erythrose-4-phosphate ; S7P : Sedoheptulose-7-phosphate ; SBP : Sedoheptulose-1,7-bisphosphate ; R5P : Ribose-5-phosphate ; 2-PGA : 2-phosphoglycérate ; PEP : Phosphoénolpyruvate ; Pyr : Pyruvate ; GABA : γ -aminobutyrate ; GLK : Glucokinase ; G6PDH : Glucose-6-phosphate déshydrogénase ; 6PGD : 6-phosphogluconate déshydrogénase ; PFK : Phosphofructokinase ; FBP : Fructose-1,6-bisphosphatase ; PGK : Phosphoglycérate kinase ; PK : Pyruvate kinase ; PDH : Pyruvate déshydrogénase ; IDH : Isocitrate déshydrogénase ; GDH := Glutamate déshydrogénase ; KGDC : α -cétoglutarate décarboxylase ; SSADH : Succinate semialdéhyde déshydrogénase ; SDH : Succinate déshydrogénase ; MDH : Malate déshydrogénase

Adapté de « Vers la reprogrammation métabolique de la cyanobactérie modèle *synechocystis* pour la production durable de biocarburants : structuration des flux du carbone par CP12 et implications sur l'équilibre bioénergétique, l'hydrogénase et l'intégrité génomique » ; Théo Veaudor)

ii. *Glycolyse, voies d'enter-doudoroff et des pentoses phosphates*

Pour chacun des étapes citées ci-après, se référer à la figure 46.

Chez *Synechocystis*, le glucose est importé du milieu extérieur ou provient de la dégradation du glycogène (étape 1 et 2). Il est converti en G6P (glucose-6-phosphate) puis dégradé en pyruvate avec des enzymes homologues à celles des organismes hétérotrophes via la glycolyse (étape 3). Cette voie n'est pas privilégiée puisque la voie des pentoses phosphates (étape 4) convertit le G6P en divers intermédiaires jusqu'au Ru5P (ribulose-5-phosphate) qui peut satisfaire la demande en substrat de la PRK (phosphoribulokinase) assurant la régénération du RuBP (ribulose-1,5-bis-phosphate) nécessaire à l'assimilation du CO₂. De plus, le Ru5P est pris en charge dans la voie des pentoses phosphates par les mêmes enzymes que celles du cycle de Calvin, celles-ci étant bidirectionnelles et leur orientation est principalement conditionnée par les équilibres chimiques entre substrats et produits. Enfin, la voie d'Entner-Doudoroff assure la synthèse de précurseurs carbonés (G3P et pyruvate) indépendamment du cycle de Calvin (étape 5.).

Le cycle de Calvin est donc interconnecté avec 2 voies cataboliques du carbone : la voie des pentoses phosphates et la glycolyse respectivement au niveau : (i) de la régénération de 3 molécules de Ru5P (Ribulose-5-phosphate) à partir des atomes de 5 molécules de G3P (glycéraldéhyde-3-phosphate) grâce aux enzymes bidirectionnelles et (ii) de la réaction de conversion du BPGA (bisphosphoglycérate) en G3P dont la réaction inverse catalysée par l'isoforme glycolytique GAPDH1 de GAPDH2 (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase 1 et 2) lors de la glycolyse conduit à la formation de pyruvate. Ce dernier est converti en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH) qui peut être utilisé par le cycle de Krebs.

iii. *Cycle de Krebs et respiration*

Chez les cyanobactéries, le cycle de Krebs a été considéré comme incomplet du fait de l'absence de l' α -cétoglutarate déshydrogénase. Néanmoins, elles possèdent un shunt/switch (une dérive) métabolique qui peut être de 3 types (étape 7):

- le premier, majoritaire, correspond à la conversion de l' α -cétoglutarate en succinate au moyen de 2 enzymes : l' α -cétoglutarate décarboxylase (KGDC) et la succinate semialdéhyde déshydrogénase (SSADH) (Zhang and Bryant, 2011) (7a, shunt KGDC et SSADH),
- la deuxième, minoritaire (retrouvée chez certaines espèces), repose sur un shunt glyoxylate dans lequel l'isocitrate est directement converti en succinate et en glyoxylate par l'isocitrate lyase (Zhang and Bryant, 2015) (7b, shunt glyoxylate),
- et la troisième, récemment décrite chez *Synechocystis*, passe par la synthèse de glutamate et assurerait une interconnexion entre le métabolisme de l'azote (par el glutamate) et le cycle de Krebs et sa charge énergétique qu'il génère par la respiration (Zhang et al., 2016) (7c, shunt glutamate).

Le succinate formé lors du cycle de Krebs alimente la respiration *via* la complexe II (succinate déshydrogénase). De plus, la chaîne respiratoire prend en charge les électrons issus du NADPH issus de la glycolyse et du cycle de Krebs. Chez les cyanobactéries, la respiration est une voie métabolique constitutive qui assure la synthèse d'ATP par couplage chimio-osmotique. Son fonctionnement est similaire à celui des organismes non photosynthétiques.

3) Le métabolisme de l'azote

a. Vue d'ensemble

Bien que l'eau, la lumière et le CO₂ soient des composés facilement disponibles dans leurs habitats naturels et fournissent ainsi les squelettes carbonés *via* la photosynthèse, les sources d'azote sont limitées et peu disponibles alors même que l'azote est essentiel à la croissance notamment pour la synthèse des bases azotées (constituant indispensable des acides nucléaires : ADN et ARN) et des acides aminés (briques élémentaires des protéines). De plus, sur le plan biotechnologique, la capacité des cyanobactéries à utiliser diverses sources d'azote (dont des sources polluantes : urée, nitrate...) justifie encore l'intérêt de présenter ici le métabolisme de l'azote. Parmi les sources d'azote utilisées par les cyanobactéries, on distingue les sources minérales (ion ammonium NH₄⁺, ion nitrate NO₃⁻, ion nitrite NO₂⁻), les sources organiques (urée, acides aminés : comme l'arginine et la glutamine) et inorganiques, certaines cyanobactéries étant capable de fixer l'azote atmosphérique (N₂). Les différents systèmes d'assimilation de l'azote reposent sur 3 étapes :

- le transport des sources d'azote et leurs conversions en ion ammonium NH₄⁺,
- l'incorporation des ions ammonium NH₄⁺ et cycle de l'urée.

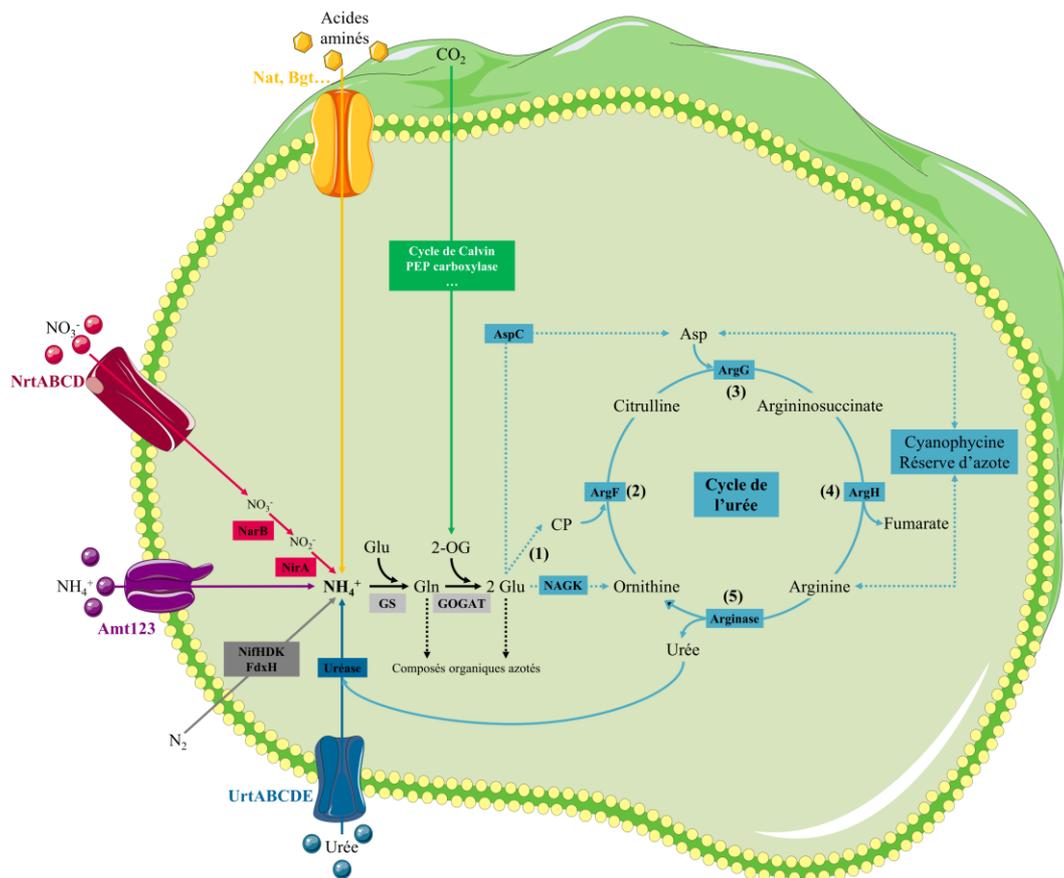


Figure 47 – Le métabolisme de l'azote et le cycle de l'urée
Le détail de ces voies est présenté ci-après.

b. Transport et assimilation de l'azote à partir de différentes sources

Le NH_4^+ est la forme réduite de l'azote que les cyanobactéries incorporent dans les molécules carbonées telles que les acides aminés et l' α -cétoglutarate. Quelque soit la source d'azote utilisée, son assimilation conduit systématiquement à la production d'ion NH_4^+ .

i. Transport de l'ion ammonium NH_4^+

L'ion ammonium NH_4^+ pénètre directement dans la cellule grâce au transporteur Amt123.

ii. Réduction assimilatrice du nitrate

Bien que les ions nitrate (NO_3^-) correspondent à la forme oxydée de l'azote minéral utilisable par la plupart des cyanobactéries, chez *Synechocystis*, les ions NO_3^- sont importés par le complexe NrtABCDE, un transporteur de type ABC. Les ions nitrate (NO_3^-) sont ensuite séquentiellement transformés :

- en ions nitrite (NO_2^-) par la nitrate réductase NarB au moyen 2 électrons fournis par la ferrédoxine et captés par son centre [4Fe-4S],
- puis en NH_4^+ par la nitrite réductase NirA, une oxydoréductase à molybdène (Mo) avec un centre [4Fe-4S], qui consomme 6 électrons fourni par la ferrédoxine.

iii. Dégradation des acides aminés

Synechocystis est capable d'assimiler la plupart des acides aminés fourni par le milieu extérieur au moyen de 3 transporteurs présentant une large spécificité. Ainsi, l'arginine, la glutamine et l'asparagine comme seule source d'azote assure la croissance de *Synechocystis*. Dans le cas de l'arginine, elle est majoritairement dégradée par l'arginase et l'arginine décarboxylase (Quintero et al., 2000; Wegener et al., 2010) qui produisent de l'urée qui peut être recyclé en ion NH_4^+ .

iv. Hydrolyse de l'urée

Chez de nombreux organismes procaryotes et eucaryotes, l'urée est un déchet du métabolisme. *Synechocystis* est capable de l'utiliser comme source d'azote puisqu'elle possède un transporteur spécifique de type ABC (UrtABCDE) (Valladares et al., 2002) et une uréase qui catalyse la dissociation de l'urée ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) en ion ammonium (NH_4^+) et en dioxyde de carbone (CO_2).

c. Incorporation du NH_4^+ et cycle de l'urée

Les ions ammoniums NH_4^+ qui pénètrent directement dans la cellule ou produits lors des réactions de conversion des différentes sources d'azote sont incorporés grâce au système GS-GOGAT qui produit du glutamate qui est ensuite pris en charge par le cycle de l'urée.

i. Synthèse de précurseurs azotés par le système GS-GOGAT

La principale voie d'incorporation du NH_4^+ est la production de glutamate à partir de glutamine, d' α -cétoglutarate, et d'ion ammonium. Cette voie se fait en 2 étapes successivement catalysée par la glutamine synthase (GS) et la glutamine-oxoglutarate-aminotransférase (GOGAT) selon les équations suivantes :

Glutamate + NH₄⁺ + ATP → Glutamine + ADP + Pi catalysée par GS

Glutamine + α-cétoglutarate + Fd_{réduite} → 2 Glutamate + Fd_{oxydée} catalysée par GOGAT

La forte dépendance de cette voie vis-à-vis de l'α-cétoglutarate constitue une passerelle entre le métabolisme de l'azote et celui du carbone (Muro-Pastor et al., 2005). Ces réactions participent donc l'homéostasie C/N.

Le glutamate peut également être synthétisé (de façon minoritaire) à partir d'ion ammonium et d'α-cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase NADPH-dépendante du shunt GABA (Florencio et al., 1987) reliant, une fois de plus métabolisme de l'azote et métabolisme du carbone. Certains dérivés du glutamate (ornithine et aspartate) sont convertis au cours du cycle de l'urée, une voie qui assure la distribution, le recyclage de l'azote et sa mise en réserve sous forme de cyanophycine.

ii. Cycle de l'urée

Le glutamate synthétisé par le système GS-GOGAT (assurant ainsi l'assimilation de l'ion NH₄⁺) est ensuite pris en charge par le cycle de l'urée (Figure 47). Celui-ci contient 5 enzymes : (1) la carbamyl phosphate synthétase (non identifié expérimentalement) qui convertit le glutamate en carbamyl phosphate (CP), (2) l'ornithine transcarbamylase (ArgF) condense le CP avec l'ornithine pour produire la citrulline qui est ensuite combinée par (3) l'arginosuccinate synthétase (ArgG) en arginosuccinate. L'enzyme (4) arginosuccinase dégrade l'arginosuccinate en arginine et en fumarate. Enfin, (5) l'arginase hydrolyse l'arginine en ornithine et en urée. La présence de cette voie et de l'uréase chez *Synechocystis* est une propriété intéressante pour la dépollution d'eau enrichie en urée puisqu'elle peut croître au dépend de cette source d'azote.

III. La gestion des stress chez les cyanobactéries

A. Introduction aux différents stress

Dans les conditions naturelles, les cyanobactéries sont soumises à des conditions environnementales variables (variation d'ensoleillement et de température au cours du jour et du cycle jour/nuit, variation des concentrations en sel, minéraux et métaux, absence ou présence de polluants...). Cela nous renseigne donc sur les stress auxquels les cyanobactéries sont naturellement soumises. Parmi ces stress, on distingue :

- les stress biotique : compétition avec d'autres organismes (qui ne sera pas abordé ici),
- les stress abiotiques que l'on peut subdiviser en :
 - o stress physique (stress lumineux, stress thermique...),
 - o stress chimique (stress oxydant, métallique...).

Les principaux stress qui seront présentés ici et auxquels les cyanobactéries sont naturellement et fréquemment confrontés sont les suivants.

- (i) Ainsi, puisque les cyanobactéries réalisent la photosynthèse et libèrent, de ce fait, du dioxygène qui peut recombinaison avec des électrons excédentaires (en cas de surplus de lumière) et former des espèces réactives de l'oxygène (ERO ou *ROS pour Reactive Oxygen Species*), elles sont constamment confrontés au stress lumineux et oxydant ou **stress photo-oxydant**.

- (ii) La croissance des cyanobactéries nécessite de l'eau, de la lumière, du CO₂ et des minéraux. Dans les conditions de laboratoire, les minéraux sont apportés, le plus souvent, par un milieu de culture minéral, dans lequel les concentrations en chacun des minéraux sont donc connues et contrôlées. Parmi ces minéraux, des métaux à rôle biologique sont présents en très faible concentration et sont nécessaires à la croissance. Néanmoins, dans leurs habitats naturels, les cyanobactéries peuvent subir des variations importantes de la concentration en métaux. A plus forte concentration, ces derniers peuvent devenir toxiques. Ils altèrent les fonctions cellulaires et génèrent souvent un stress oxydant que je nomme pour la suite de mon manuscrit **stress métallique**.

- (iii) Les cyanobactéries subissent également d'importantes variations de température dans leur habitat naturel et sont ainsi confrontées au **stress thermique**.

- (iv) Certaines cyanobactéries comme *Synechocystis* sont hétérotrophes facultatives, c'est-à-dire qu'elles ont la faculté de croître au dépend du glucose comme source d'énergie et de carbone aussi bien en absence qu'en présence de lumière. Dans ce dernier cas, la mixotrophie (glucose + lumière) induit un stress oxydant (Narainsamy et al., 2013). L'excès énergétique provoquée par le fonctionnement de 2 voies métaboliques : photosynthèse et catabolisme du glucose, génère la synthèse de méthylglyoxal. Il s'agit d'un métabolite endogène toxique impliqué dans la carbonylation des protéines, qui provoque le plus souvent un stress oxydatif. Il a été identifié comme étant impliqué dans des pathologies humaines cardiovasculaires (diabète, athérosclérose...), dont la synthèse est causée de façon analogue à *Synechocystis*, par un apport excessif d'énergie dû à un régime alimentaire riche en sucres et en lipides. Le méthylglyoxal joue également un rôle dans les maladies neurodégénératives (Alzheimer). Chez les cyanobactéries, la croissance en présence de

glucose, de glycérol ou de méthylglyoxal génère donc un stress que je qualifie de **stress métabolique** pour la suite de mon manuscrit.

- (v) Les cyanobactéries peuvent être exposées dans leur habitat naturel à des polluants. Les terpènes produits par des cyanobactéries génétiquement modifiées (exemple, lorsque le gène hétérologue codant pour une terpène synthase est cloné chez la cyanobactérie) peuvent être considérés comme des xénobiotiques, ces molécules étant étrangères à la physiologie « initiale » de la cyanobactérie. Je parle donc ici de **stress xénobiotique**.

B. Les différentes sources de stress chez les cyanobactéries

1) Le stress photo-oxydant

a. Les différentes espèces réactives de l'oxygène (ERO)

En raison de leur métabolisme, les cyanobactéries sont continuellement en contact avec les espèces réactives de l'oxygène (ERO)(ou ROS pour Reactive Oxygen Species dans le reste du mémoire) présents dans notre atmosphère (ozone, O₃) ou généré par la photosynthèse, la respiration et le métabolisme. Les ROS correspondent à différents états d'oxydation de l'oxygène. Il s'agit par ordre de réduction de :

- **L'anion superoxyde (O₂•⁻)** : est un radical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron. La dismutation de cet O₂•⁻ entraîne la formation d'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).
- **Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)** : n'est pas un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production. Selon la réaction de Fenton, l'H₂O₂ se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe²⁺), en un ion OH⁻ et en radical hydroxyle (OH•) [H₂O₂ + Fe²⁺ → OH• + OH⁻ + Fe³⁺]. Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde (O₂•⁻) qui régénère Fe³⁺ en Fe²⁺ selon la réaction d'Haber-Weiss [O₂•⁻ + Fe³⁺ → O₂ + Fe²⁺]. Ainsi, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), d'anion superoxyde (O₂•⁻) et de fer permet la production de radical hydroxyle (OH•).
- **Le radical hydroxyle (OH•)** : avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La diffusion limitée de ce radical lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN...) entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. L'OH• est un oxydant monovalent puissant qui apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des ROS.

On inclut également :

- **L'oxygène singulet (¹O₂)** : est moins réactif que le radical hydroxyle (OH•) mais plus agressif que l'anion superoxyde (O₂•⁻) et que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), ce qui s'explique par un temps de demi-vie relativement long par rapport aux autres ROS (3 μs).

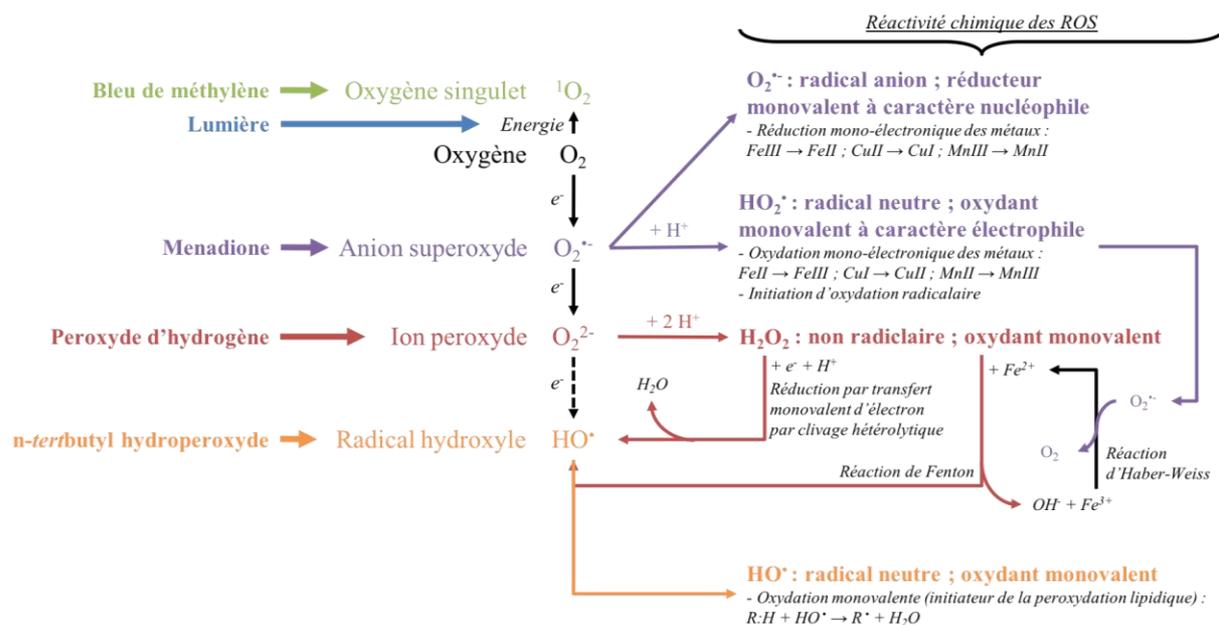


Figure 48 – Les différents ROS et leurs réactivités
 Réaction d'Haber-Weiss : $O_2^{\bullet -} + Fe^{3+} \rightleftharpoons O_2 + Fe^{2+}$
 Réaction de Fenton : $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightleftharpoons HO^- + HO^{\bullet} + Fe^{3+}$

b. Les différentes sources des ROS

i. Les ROS exogènes

D'un point de vue physique, les ROS peuvent être produit par une excitation exogène générée par des radiations (rayons α , β , γ et rayonnement lumineux UV). D'un point de vue chimique, les ROS sont également induits par des agents chimiques oxydants dont les plus couramment utilisée au laboratoire et durant mon projet sont décrit dans la figure 48. D'autres composés chimiques (alcools, aromatiques, pesticides...) sont une source de ROS mais ne seront pas abordées dans mes travaux. De plus, certains oxydes de métaux (sélénium) induisent du stress oxydant. Enfin, d'un point de vue biologique, le phytoplancton est perçu comme une source importante de ROS (Diaz and Plummer, 2018).

ii. Les ROS endogènes générés par photosynthèse

En présence de fortes intensités lumineuses, la production de ROS est inévitablement associée avec le transfert d'énergie et le transport des électrons dans le PSII. Ainsi, le complexe antennaire du PSII est source d'oxygène singulet (1O_2). Le PSII produit également de l'ion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et la radical hydroxyl (HO^{\bullet}) selon la représentation schématique ci-dessous. Au niveau de l'accepteur d'électron du PSII, la formation de peroxydes liés et du radical HO^{\bullet} a également été caractérisé (pour revue voir (Pospíšil, 2009, 2016)). L'anion superoxyde est également produit au niveau de l'étape d'oxydation de la quinol dans le cytochrome b6f (travaux de William Cramer). L'oxygène singulet peut également provenir des intermédiaires de la biosynthèse de la chlorophylle (Tripathy and Oelmüller, 2012). Les ROS sont aussi générés par d'autres stress.

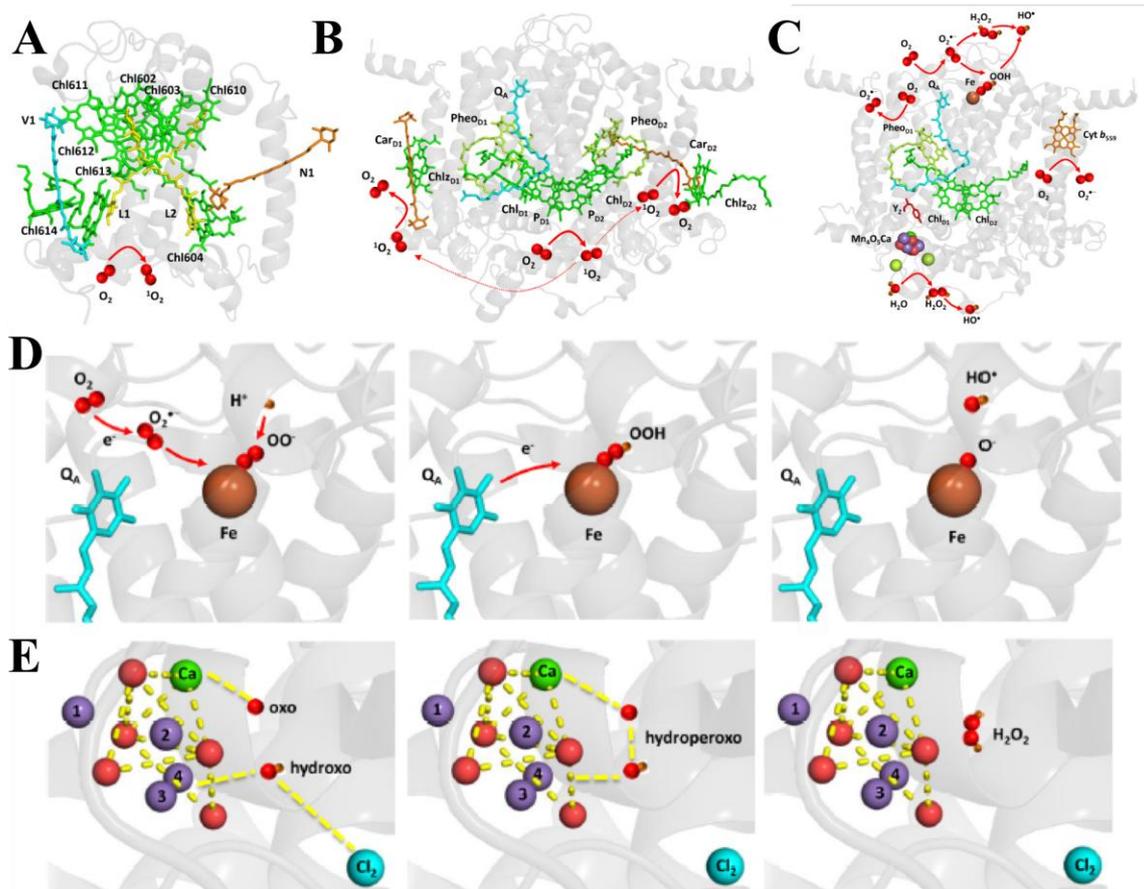


Figure 49 – Formation induite par la forte lumière de l’oxygène singlet $^1\text{O}_2$ dans le complexe antennaire (A) and dans le centre réactionnel (B), de l’anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, du peroxyde d’hydrogène H_2O_2 et du radical hydroxyl HO^\bullet (C) et de peroxydes liées et du radical HO^\bullet sur le site de l’accepteur d’électron (D) ou celui du donneur (E)

D’après la figure réalisée sur Pymol (DeLano, 2002) de la structure du PSII de *Spinacia oleracea* (PDB ID = 3JCU ; Wei et al., 2016) adapté de la revue (Pospíšil, 2009, 2016)

c. Les principales conséquences moléculaires et cellulaires des ROS

La toxicité des ROS provient généralement de leur excès qui n'est plus pris en charge par les systèmes de défenses antioxydants. Lorsque ceux-ci sont dépassés, les ROS réagissent directement avec les constituants des cellules que sont l'ADN (dont les glucides qui le compose), les lipides et les protéines et provoquant des altérations structurales et fonctionnelles conduisant jusqu'à la mort de la cellule. La figure ci-dessous rend compte de façon non exhaustive de la diversité des cibles molécules des ROS.

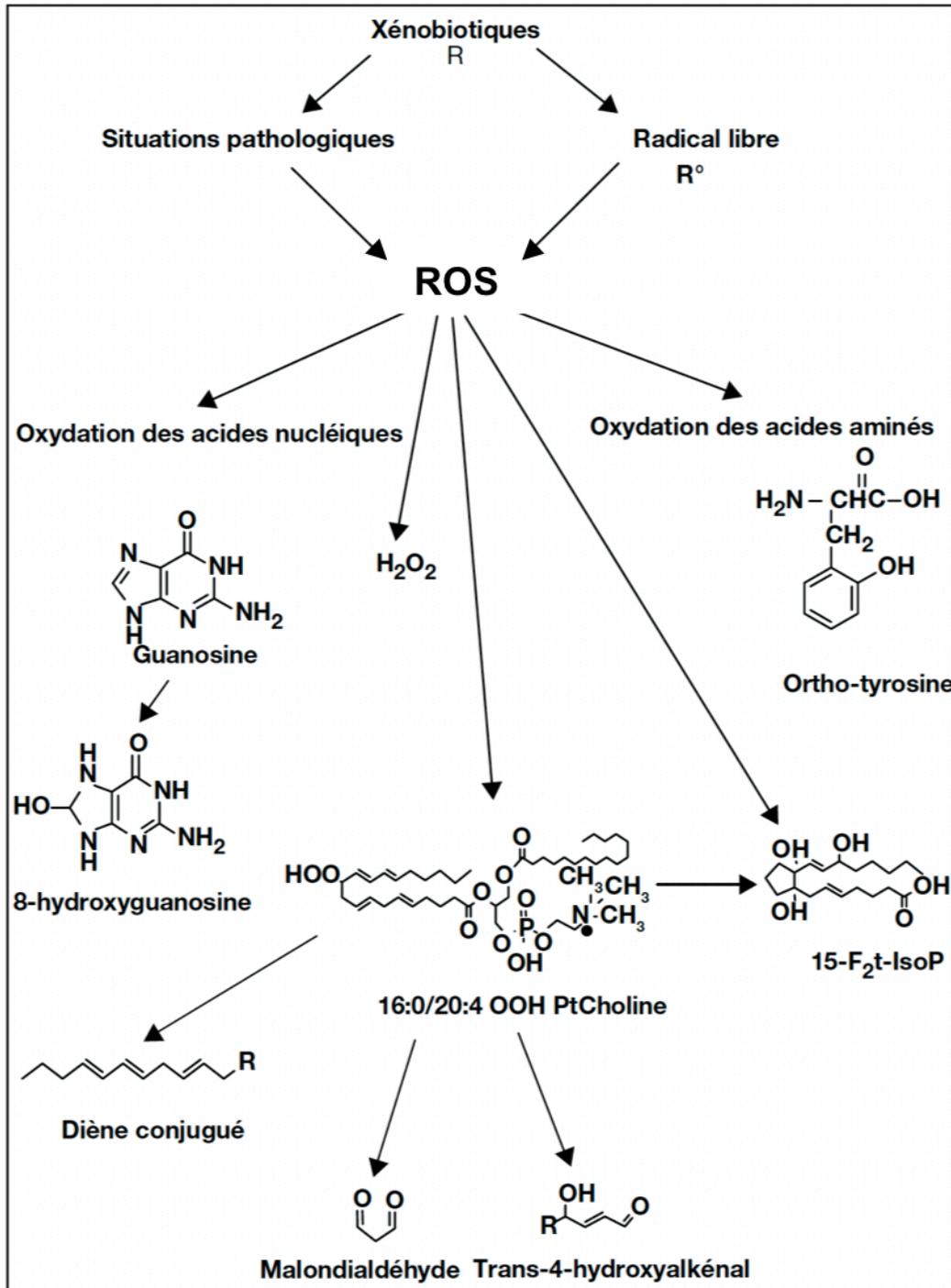


Figure 50 – Les principales cibles moléculaires de ROS

i. Principaux effets des ROS sur l'ADN

A l'échelle moléculaire, chez les organismes procaryotes (dépourvus de noyau), la molécule d'ADN est contenue dans le cytoplasme. Elle est, de ce fait, directement exposée aux différents métabolites de la cellule dont les ROS. Ces derniers sont l'une des causes majeures d'altérations de l'ADN. En dépit des mécanismes de réparation de l'ADN, les ROS provoquent une augmentation de la fréquence de mutation jusqu'à un seuil pour lequel les réparations cellulaires sont inefficaces. Parmi les différentes modifications de l'ADN causées par les ROS, on dénombre 3 grands types de dommages qui causent principalement 2 effets :

- un effet cytotoxique provoqué par 2 dommages à l'ADN :
 - o les cassures simple et double brin,
 - o et les pontages ADN-protéine,
- et un effet mutagène causé par les modifications chimiques des bases dont les principales sont :
 - o les bases hydroxylées : 5-hydroxy-dU et 5-hydroxy-dC...
 - o les bases « glycol » : thymine glycol et uracil glycol...
 - o les bases « oxo » : 8-oxo-guanine, 8-oxo-adénine...

A l'échelle cellulaire, les bases modifiées de l'ADN (8-oxo-guanine, thymine glycol...), les modifications des sucres, qui entraînent des cassures simples et doubles brin, des pontages ADN-protéines provoquent une haute cytotoxicité, une mutagénèse et une altération de l'expression des gènes. A titre d'exemple, l'impact des ROS sur l'ADN provoque chez les eucaryotes une perturbation du cycle cellulaire et provoque l'apoptose.

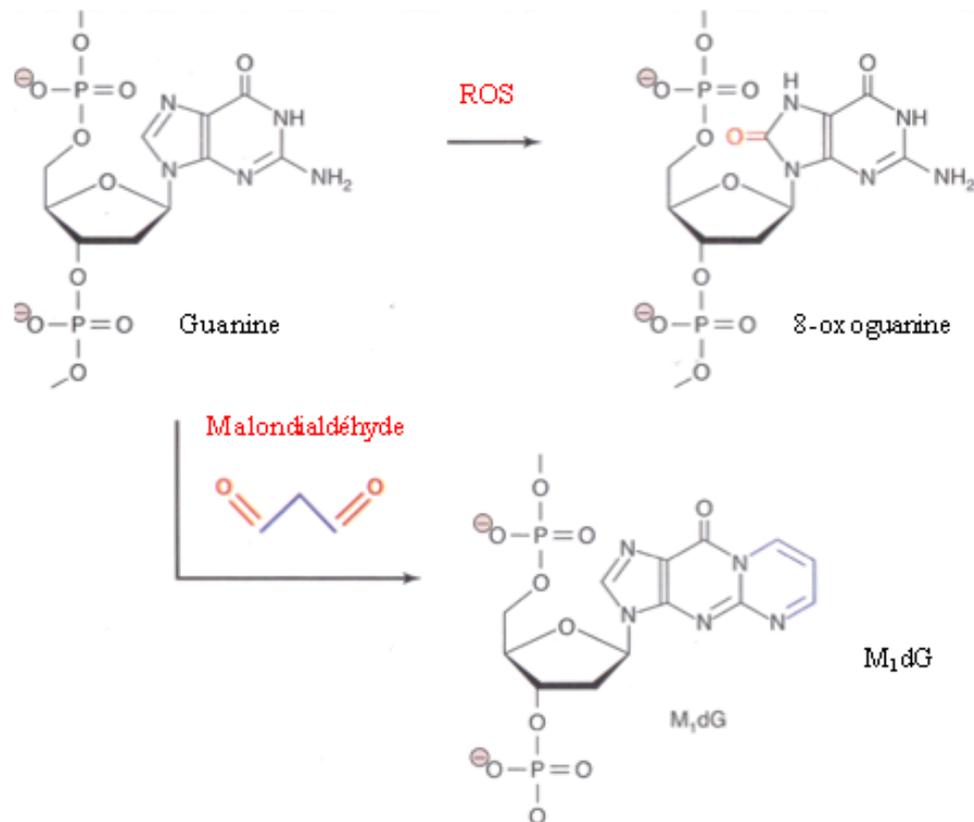


Figure 51 – Exemple de modification de la guanine par les ROS

Le nom complet de M₁dG est 3-(2-désoxy-D-érythro-pentofuranosyl)pyrimido(1,2- α)purin-10(3H)-one.

ii. Principaux effets des ROS sur les protéines

Cas général

Les altérations moléculaires sur les protéines causées par les ROS sont multiples puisqu'ils peuvent atteindre les différents acides aminés qui les composent. Le tableau ci-dessous donne justement une liste non exhaustive des modifications possibles sur les différents acides aminés.

Tableau 12 – Principales modifications oxydatives des acides aminés

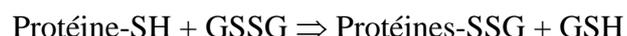
Nature des modifications		Acides aminés concernés
Oxydation du groupement thiol		Cys : Oxydation du groupement thiol : -SH → -SOH → -SO ₂ H → -SO ₃ H ; Formation de ponts disulfure intra- & intermoléculaire ; Glutathionylation Met : Met-sulfoxyde
Modification chimique des acides aminés	Hydroxylation	Trp/Phe/Pro : Hydroxy-Trp/Phe/Pro Val/Leu : Formes hydro(pero)xydes
	Carbonylation & Adduits de glyco-oxydation	Cys/His/Lys : HNE-Cys/His/Lys Lys : MDA-Lys, acroléine-Lys, carboxyméthyl-Lys
	Nitrosylation	Tyr/Trp : Nitro-Tyr/Trp
	Chlorination/Amination/Déamination	Tyr : Chloro-Tyr Arg/Lys : Chloroamines
Conversion et interconversion entre acides aminés		His : → Asn/Asp Pro : → Glu-semialdéhyde/OH-Pro ; Arg : → Glu-semialdéhyde Glu : → Oxalate/pyruvate Thr : → Acide 2-amino-3-cetobutyrique
Pontage et agrégation		Tyr : Di-Tyr
<p>The diagram illustrates the oxidative modification of amino acids by ROS. On the left, the structures of Cysteine, Histidine, Proline, Methionine, and Tyrosine are shown. An arrow labeled 'ROS' points to the right, where the modified structures are shown: Cysteine is oxidized to cysteine sulfenic acid; Histidine and Proline are converted to a pyridone ring with the release of CO₂ and H₂O; Methionine is oxidized to methionine sulfone; Tyrosine is oxidized to nitrotyrosine. The text 'Clivage de la liaison peptidique' is also present.</p>		

De manière générale, ces modifications sont d'autant plus critiques lorsque les acides aminés altérés présentent un rôle clé et essentiel à la fonction catalytique des protéines (site actif : site de liaison du(es) substrat(s) & site actif, site de liaison à un cofacteur, site d'interaction avec des partenaires, site de régulation...). Ces modifications peuvent également altérées la structure tridimensionnelle provoquant une perte de fonction, une agrégation ou une fragmentation. Parmi ces acides aminés, les histidines, les méthionines les cystéines sont décrites comme particulièrement sensibles à l'oxydation par les ROS. Je développerai ci-après l'exemple des protéines à cystéines active puisque beaucoup d'entre elles sont des enzymes glutathion-dépendantes (dont certaines GST) sur lesquels je serai

Cas des protéines à cystéine(s) active(s) :

Succinctement, les protéines à cystéine(s) active(s) sont des protéines contenant une ou plusieurs cystéine(s) *les protéines à cystéine(s) « active(s) »*, qui sont sensibles à l'état rédox de la cellule et ont donc des propriétés rédox importante dans la catalyse, la structure et/ou la fonction de la protéine. Parmi ces protéines, on distingue :

- **les protéines comportant un pont disulfure indirectement essentiel à la fonction par participation à la structure tridimensionnelle :** pour lesquelles, les cystéines sont généralement éloignés dans la structure primaire mais dont le pont disulfure est nécessaire à la structure tridimensionnelle et conditionne l'activité (sans être localisée dans le site actif). A titre d'exemple, l'insuline est une protéine composée de 2 chaînes polypeptidiques reliées par des ponts disulfures, indispensables à l'obtention d'une insuline structurellement stabilisée et fonctionnelle,
- **les protéines comportant un pont disulfure directement essentiel à l'activité enzymatique :** pour lesquelles, les cystéines sont relativement proches dans la séquence primaire et dont le pont disulfure correspondant ne modifiera pas de manière drastique la structure tridimensionnelle de la protéine. On différencie également :
 - o les ponts disulfures intramoléculaires, qui peuvent se former entre 2 cystéines du site actif d'une enzyme : dans ce cas, son activité rédox qui forme le pont disulfure par perte d'un électron donne une enzyme oxydée inactive dont l'activité peut être restaurée par la réduction du pont disulfure,
 - o les ponts disulfures intermoléculaires, qui se forment et participent à l'activité enzymatique entre 2 protéines,
- **les protéines glutathionylables :** qui possèdent au moins un résidu de cystéine qui peut réagir avec une molécule de glutathion oxydée (GSSG) *via* son groupement thiol (-SH) selon le mécanisme suivant :



Les principales réactions entre les groupements thiols (-SH) de ces cystéines actives et les ROS sont présentées dans la figure X. En présence de ROS, les protéines comportant une ou plusieurs cystéine(s) (P-SH) sont soumises à 3 grands types de modifications dont la réversibilité sera discutée dans la partie portant sur les mécanismes impliqués dans l'homéostasie des thiols.

Parmi ces altérations, on distingue :

- la formation de ponts disulfures réversibles en P-SH :
 - intramoléculaire (P₁-S-S-P₁),
 - intermoléculaire (P₁-S-S-P₂),
- la glutathionylation spontanée, transitoire et réversible, qui intervient par l'addition d'une molécule de glutathion oxydée GSSG (dont l'abondance est favorisée en présence de ROS) sur un résidu cystéine (P-SH + GSSG = P-SSG + GSH),
- l'oxydation des groupements thiols à différents degrés est possible sur les cystéines initialement « activées » par les ROS grâce à :
 - l'oxydation réversible en :
 - une forme radicalaire thyl (PS•⁻),
 - une forme acide sulfénique (P-SOH) réversible en P-SH,
 - une forme acide sulfinique (P-SO₂H) réversible en P-SOH et en P-SH,
 - l'oxydation irréversible forme acide sulfonique (P-SO₃H).

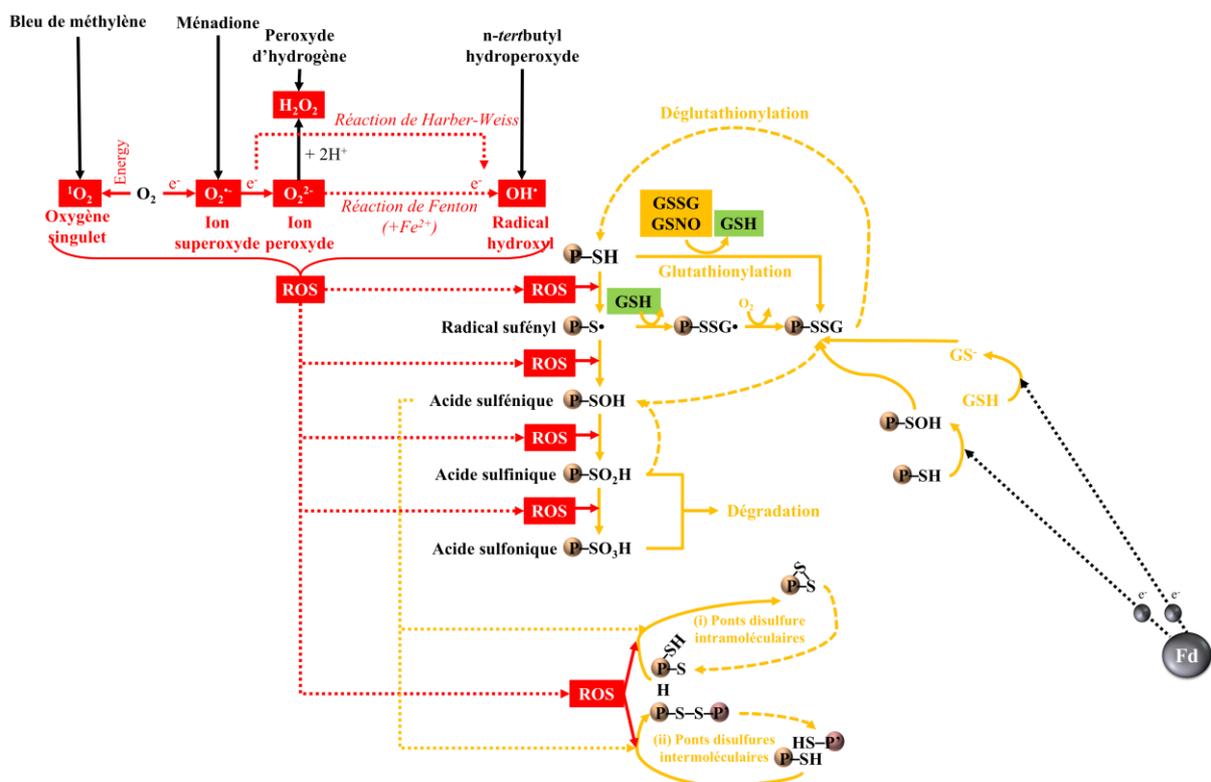


Figure 52 – Représentation schématique de l'effet des ROS sur l'homéostasie des thiols

Il découle de ces altérations une perte de fonction inévitable. Ces modifications perturbent aussi l'homéostasie globale des thiols, c'est-à-dire la potentiel rédox des cystéines (forme réduite *versus* forme oxydée) à l'échelle de la cellule. Notons, néanmoins, que dans le cas de la glutathionylation, celle-ci étant induite par les ROS mais étant aussi un phénomène transitoire et réversible, elle peut être vue sous 2 angles, à savoir comme :

- une modification nocive pour l'activité de la protéine,
- une modification protectrice et transitoire pour l'activité de la protéine en la protégeant des autres oxydations réversibles ou non réversibles dues aux ROS.

En réponse à ces modifications induites par le stress oxydant, les cyanobactéries possèdent de nombreuses protéines du type « rédoxines » – qui possèdent justement des cystéines actives formant des ponts disulfures intramoléculaires – qui assurent l'homéostasie des thiols et dont les mécanismes seront présentés ultérieurement.

iii. Principaux effets des ROS sur les lipides

Les ROS agissent sur les acides gras et les lipides polyinsaturés qui possèdent des doubles liaisons carbone-carbone (C=C) très réactives vis-à-vis du radical hydroxyle (HO•). Ce dernier entraîne la peroxydation de nombreux lipides dans un mécanisme auto-entretenu schématisé dans la Figure 53. En plus de et de la dégradation des membranes, la peroxydation lipidique génère des hydroperoxydes lipidiques (ROOH) qui peuvent à leur tour réagir avec les protéines et l'ADN. Les conséquences cellulaires sont nombreuses et sont principalement causées par une augmentation de la fluidité et de la perméabilité membranaire qui provoquent une dissipation des gradients électrochimiques associées à la production d'énergie chimique, perturbent le transport des métaux et des ions. Enfin, dans sa phase de décomposition, la peroxydation lipidique forme des produits de dégradation électrophiles très réactifs (le plus souvent des aldéhydes) ou Reactive Electrophilic Species (RES) (4-HNE, acroléine, MDA) qui provoque la carbonylation des protéines.

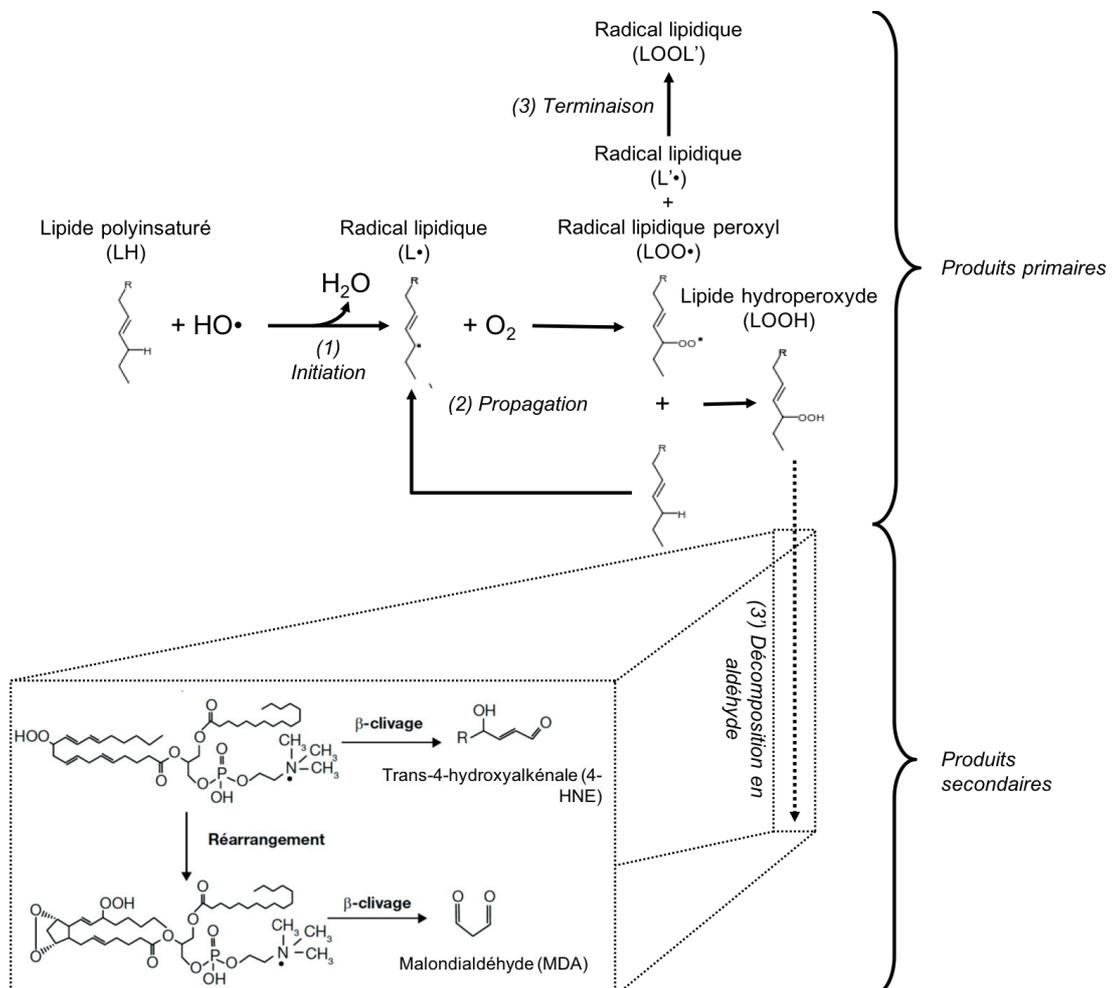


Figure 53 – Représentation schématique du mécanisme réactionnel de la peroxydation lipidique en une phase d'initiation, de propagation et de terminaison

2) *Le stress métallique*

a. *Définition des métaux lourds*

La notion de « métal lourd » est un concept avant tout empirique qui n'a pas de réelle définition précise. Il est néanmoins et communément admis que l'expression « métaux lourds » regroupe 2 catégories de composés :

- des métaux toxiques à faible dose réellement « lourd » (par rapport à leur densité) comme le plomb (Pb), le cadmium (Cd), le chrome (Cr) et le mercure (Hg) (et l'antimoine (Sb), qui est un métalloïde) qui ne sont pas nécessaires à la vie et qui, au contraire, sont très toxiques à court et à long terme,
- des métaux peu toxiques essentiels à la vie à faible dose mais qui peuvent se révéler très nocifs en quantité trop importante. Ils sont abusivement appelés « métaux lourds », puisque :
 - o leur densité est relativement faible comme c'est le cas du fer (Fe), du cuivre (Cu), du zinc (Zn), du nickel (Ni), du cobalt (Co), du vanadium (V), du sélénium (Se), du molybdène (Mo), du manganèse (Mn), du chrome (Cr), du titane (Ti),
 - o certains ne sont pas des métaux mais des métalloïdes comme l'arsenic (As).

On préfère alors le terme d'élément-trace métallique (ETM) car il englobe ces 2 catégories.

b. *Homéostasie des ETM : entre rôle physiologique et toxicité*

Sur le plan physiologique, il est possible de classer les métaux en 2 familles :

- les métaux biologiques : qui sont naturellement présents et participent aux fonctions cellulaires (fer (Fe), zinc (Zn), cuivre (Cu), manganèse (Mn), sélénium (Se),...) notamment en tant que cofacteur des métalloprotéines. Ces métaux participent aux mécanismes enzymatiques, aux réactions d'oxydoréduction, à la structuration des protéines et plus largement au maintien de l'homéostasie des métaux. De plus, à une échelle écologique, les microorganismes ont un rôle central dans les cycles biogéochimiques des métaux sur la planète.
- les métaux abiotiques : qui ne sont pas naturellement présents et qui sont généralement connus pour leurs effets toxiques (uranium (U), arsenic (As), cadmium (Cd),...).

La toxicité des ETM (en particulier celles des métaux réellement « lourds » et/ou abiotiques) est facilement mise en évidence au niveau physiologique. Leur toxicité est observée dans leur forme oxydée soluble et l'est moins (voire nullement) sous forme réduite insoluble, du fait d'une biodisponibilité réduite. Au niveau moléculaire, les mécanismes de toxicité sont relativement peu connus. En effet, il convient de distinguer la toxicité propre à chaque ETM de la toxicité induite par sa charge électronique (commune à tous les ETM) et de sa toxicité radiative pour certains d'entre eux. Je ne traiterai pas ici de la radio-toxicité des métaux.

Néanmoins, il est admis que c'est généralement au-dessus d'une concentration seuil que les métaux essentiels et non-essentiels deviennent toxiques pour la cellule. Cette toxicité se caractérise par le déplacement des métaux biologiques hors des métalloprotéines et par leur fixation parasite sur des ligands. L'excès de métaux modifie également l'équilibre rédox de la cellule et provoque des modifications de structure des acides nucléiques. C'est pourquoi, les organismes ont développé des systèmes, permettant d'assurer l'homéostasie des métaux, qui repose sur : (i) un équilibre entre les flux entrants et sortants, le stockage et l'utilisation des

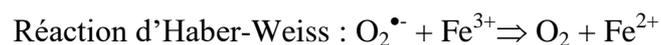
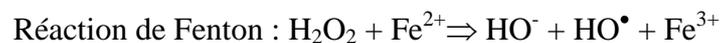
métaux, afin d'en limiter la concentration intracellulaire, (ii) et sur une modification de leur métabolisme (détoxification, réparation, dégradation...).

c. Toxicité chez les cyanobactéries et relation avec le stress oxydant

En raison de leur photosynthèse oxygénique, les cyanobactéries sont confrontés aux variations de la disponibilité des métaux induit par l'oxygène : diminution en fer (Fe), cobalt (Co), nickel (Ni) et manganèse (Mn), augmentation en zinc (Zn) et en cuivre (Cu) (Barnett et al., 2012). De plus, de nombreuses métalloprotéines ou sites de fixation des métaux existent chez les cyanobactéries et sont le siège d'interactions délétères pour la viabilité cellulaire (Shcolnick and Keren, 2006) comme les interactions Chl et Mg qui forment de l'oxygène singulet, la formation de H₂O₂ par des clusters Mn endommagés dans le PSII, la production du radical HO• ou de ROS par les Fe non hème ou par les clusters Fe-S dans le PSII.

Les cyanobactéries sont également fréquemment en contact avec des métaux lourds comme l'aluminium (Al), l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le césium (Cs), le chromate (Cr), le mercure (Hg), le plomb (Pb) et l'uranium (U). La toxicité de ces métaux est basé sur leurs propriétés physico-chimiques qui induit la production de ROS, l'inactivation d'enzyme par réaction avec les groupements thiols (-SH) ou par déplacement des cofacteurs métalliques (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014b; Cassier-Chauvat and Chauvat, 2016).

La relation entre homéostasie des métaux et stress oxydant est également supporté par la capacité de l'anion superoxyde (O₂•⁻) à provoquer des réductions mono-électronique de certains métaux (FeIII ⇒ FeII ; CuII ⇒ CuI ; MnIII ⇒ MnII). A l'inverse, le radical neutre HO₂• entraîne l'oxydation mono-électronique de ces mêmes métaux. La deuxième observation qui peut être faite est que l'intervention du fer dont la régénération en ion Fe²⁺ permet la conversion du H₂O₂ en radical hydroxyle HO• au travers des 2 réactions suivantes :



Ainsi, ces exemples démontrent clairement l'influence de certains métaux biologiques (en particulier les métaux de transition Cu et Fe) dans la production de ROS chez les cyanobactéries.

3) Le stress thermique

Comme les autres organismes photosynthétiques, les cyanobactéries sont fréquemment exposées aux variations de températures causées par l'alternance des saisons, le cycle jour-nuit et le passage des nuages qui filtrant les rayons de soleil.

Les principales conséquences des variations de température sont des modifications de la fluidité membranaire (Inoue et al., 2001; Pittera et al., 2018) et la production de ROS qui sont à l'origine de phénomène de peroxydation lipidique. La représentation ci-dessous montre d'ailleurs l'induction des ROS par la chaleur dans le PSII (Pospíšil, 2016).

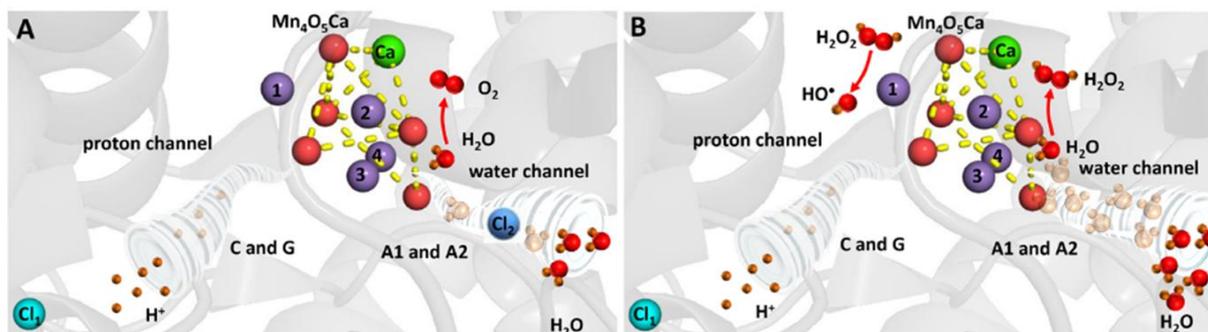


Figure 54 – Formation induite par la chaleur de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et de radical hydroxyl $HO\bullet$ par le site donneur d'électron du PSII
Tiré de (Pospíšil, 2016)

4) Le stress métabolique

Dans cette partie, je définis le stress métabolique comme toute perturbation de la physiologie dont la cause et l'origine d'un ou plusieurs métabolites endogènes. Les 2 principaux métabolites, qui seront abordés ici, sont le méthylglyoxal et le glucose.

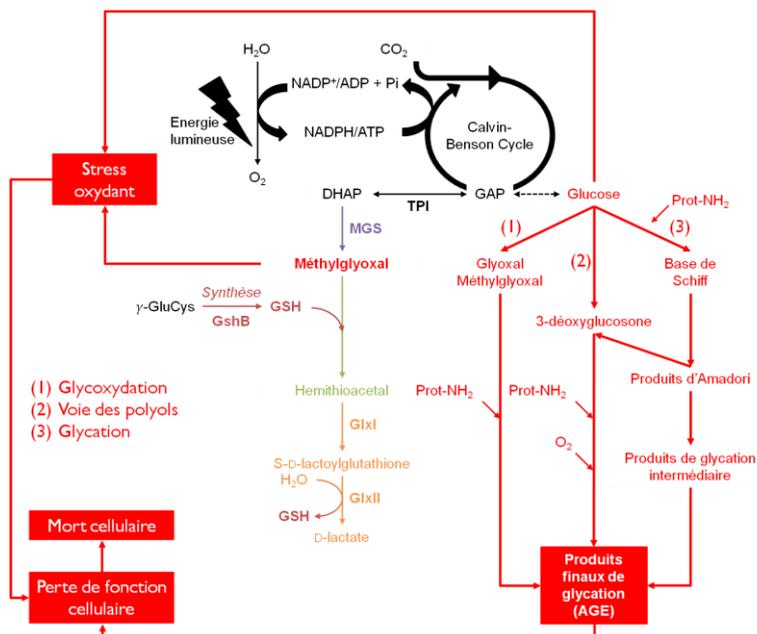


Figure 55 – Représentation du stress métabolique causé par le glucose et le méthylglyoxal

Le glucose est source de stress oxydant (Narainsamy et al., 2013). La dégradation du glucose en différents produits par glyoxydation, par la voie des polyols et par glycation entraîne la production d'AGE (Advanced Glycation End products), des molécules très réactives qui provoquent la glycation des protéines. Cela a pour conséquence la génération d'un stress oxydant par perte des fonctions assurées par les protéines et peut conduire à la mort cellulaire. Ces AGE ont été retrouvés comme impliqués dans de nombreuses pathologies humaines (diabète, angiopathie, maladies neurodégénératives, cancer...).

Parmi ces AGE, le méthylglyoxal a été très étudié. C'est un oxoaldéhyde issu principalement du catabolisme des glucides. Il peut néanmoins être produit enzymatiquement par la méthylglyoxal synthase (MGS) depuis la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) (Figure 55). Il est détecté par différents mécanismes dont celui des glyoxalases, un système de 2 enzymes également très étudiés dans la littérature en raison de ses implications dans les pathologies citées précédemment. La glyoxalase I (GlxI, S-D-lactoylglutathion lyase, EC

4.4.1.5) catalyse la conversion des 2 stéréoisomères de l'hémithioacétal en l'unique stéréoisomère S-D-lactoylglutathion. Cette molécule est ensuite convertie en D-lactate par la glyoxalase II (GlxII, S-2-hydroxyacylglutathione hydrolase, EC 3.1.2.6). Ce système est original puisqu'il a recours à une première étape non enzymatique de conjugaison entre le GSH et le méthylglyoxal formant l'hémithioacétal. Un système analogue existe pour la détoxification du formaldéhyde et sera présenté ultérieurement.

C. La gestion des stress chez les cyanobactéries

Les cyanobactéries présentent des stratégies diverses de lutte contre les divers stress auxquels elles sont confrontés. Parmi elles, on distingue : (i) les premières défenses à court et moyen-terme : (a) avec les barrières extracellulaires et les systèmes de séquestration, de réduction et d'export des métaux, (b) les enzymes de défense et de détoxification et (c) les thiols et les enzymes glutathion-dépendantes, (ii) des mécanismes de reprogrammation à long-terme *via* les régulateurs transcriptionnels (qui ne seront pas abordés ici).

1) Les barrières de défense à court-terme

a. Les exopolysaccharides : première barrière de défense

Toutes les cyanobactéries ne possèdent pas d'exopolysaccharides (EPS). A titre d'exemple, *Synechococcus* PCC 7942 n'en possède pas, tandis que *Synechocystis* PCC 6803 en synthétisent et sont vraisemblablement impliqués dans la protection contre le stress salin et métallique. Un mutant dépourvu d'EPS chez *Synechocystis* est d'ailleurs plus sensible au cadmium et au cobalt (Jittawuttipoka et al., 2013). De plus, de par leurs charges négatives, les EPS sont impliqués dans la séquestration des cations métalliques comme le fer, qui peut être séquestré-stocké puis re-largué en vue d'une utilisation par la cellule, ce qui la protège : (i) d'un excès en fer par séquestration et (ii) d'un appauvrissement en fer par stockage (Jittawuttipoka et al., 2013). Les EPS protègent également *Synechocystis* contre les nanoparticules de césium (CeO₂) et de titane (TiO₂) (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014b).

b. Les systèmes de séquestration, de réduction et d'export des métaux

Les systèmes de séquestration et d'export sont mis en jeu en cas de stress métallique. Comme déjà évoqué, l'homéostasie des métaux repose sur un équilibre fragile entre les flux entrants, les flux sortants, le stockage et l'utilisation des métaux par la cellule. En cas de dérégulation de cette homéostasie, la cellule peut mettre en place 3 principaux mécanismes:

- la séquestration et la précipitation organique ou inorganique des métaux,
- la réduction des métaux,
- et le transport/export des métaux (pour revue voir (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014b; Cassier-Chauvat and Chauvat, 2016) et leurs références)).

La figure ci-après présente ces mécanismes.

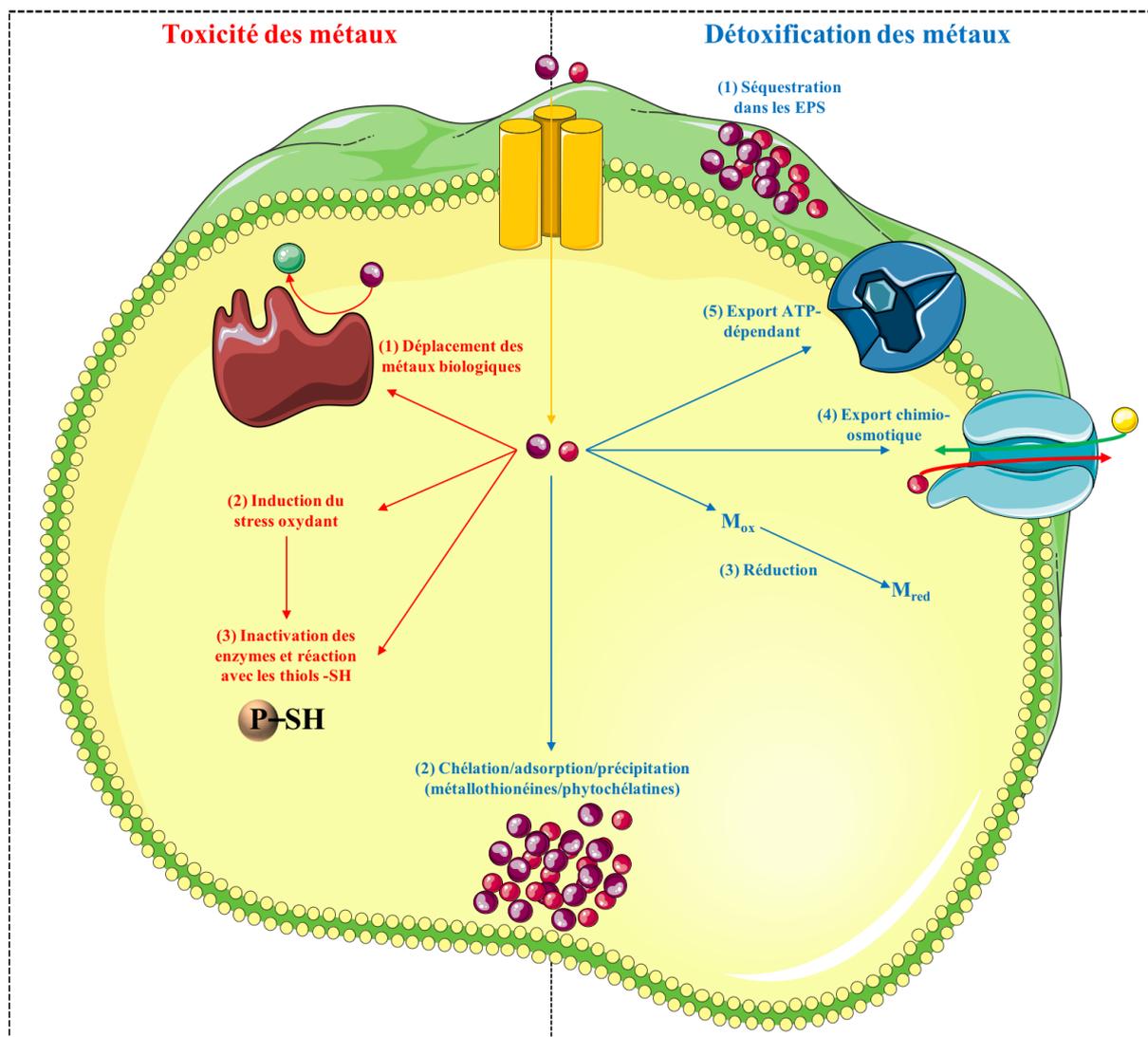


Figure 56 – Représentation schématique des mécanismes de toxicité et de détoxification des métaux

i. La séquestration des métaux par chélation, adsorption et précipitation

Les cyanobactéries limitent la réactivité des métaux dans la cellule en les complexant ou en les précipitant. Les cyanobactéries présentent de nombreuses stratégies comme la séquestration dans les exopolysaccharides ou dans les granules de polyphosphates intracellulaires ou encore au moyen de ferritines.

Elles possèdent également des métallothionéines (MT), qui sont de petites protéines riches en cystéines ayant la capacité de lier les métaux (As, Cd, Cu, Hg et Zn) au moyen du groupement thiol (-SH) des nombreuses cystéines qu'elles possèdent. Chez *Synechococcus* PCC 7942, la protéine MT est codée par le gène *smtA* qui est absent chez *Synechocystis* PCC 6803 mais remplacée par une pompe à efflux ATPase. De façon similaire à ces 2 organismes modèles, beaucoup de cyanobactéries possèdent soit une MT soit une pompe à efflux (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014b; Cassier-Chauvat and Chauvat, 2016).

Les phytochélatines, bien qu'identifiées chez d'autres organismes, ont aussi été décrites chez la cyanobactérie *Spirulina platensis* comme pouvant séquestrer le cadmium. Les phytochélatines sont des polymères issus du glutathion capables de fixer les ions métalliques grâce, encore une fois, à leur groupement thiol des résidus cystéine.

ii. La réduction des métaux

Ce mécanisme n'est possible que pour les ETM possédant plusieurs états d'oxydation (As, Cr, U et Hg). Les réductases à métaux impliquées dans ces mécanismes sont ubiquitaires.

L'un des exemples les mieux décrit est celui de la résistance à l'arsenic (As). Chez *Synechocystis* PCC 6803, le principal mécanisme est codé par l'opéron tricistronique *arsBHC* codant respectivement pour ArsB, un transporteur, pour ArsH, une quinone à FMN possédant une activité réductase dont la fonction est inconnue dans la résistance à As et ArsC, l'arsenate réductase qui en lien avec le système glutathion/glutarédoxines catalyse la réduction de l'arsenate (HAsO_4^{2-} , état d'oxydation +V) en arsenite (H_3AsO_3 , état d'oxydation +III) qui est ensuite exporté (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014b; Cassier-Chauvat and Chauvat, 2016). *Synechocystis* PCC 6803 possède une seconde arsenate réductase et un 3^{ème} système impliqué dans la résistance à l'As.

Un autre exemple de la réduction des métaux est celui de l'implication de l'enzyme MerA-like chez *Synechocystis* PCC 6803 dans la protection contre le mercure et l'uranium via un mécanisme de réduction NADPH-dépendant.

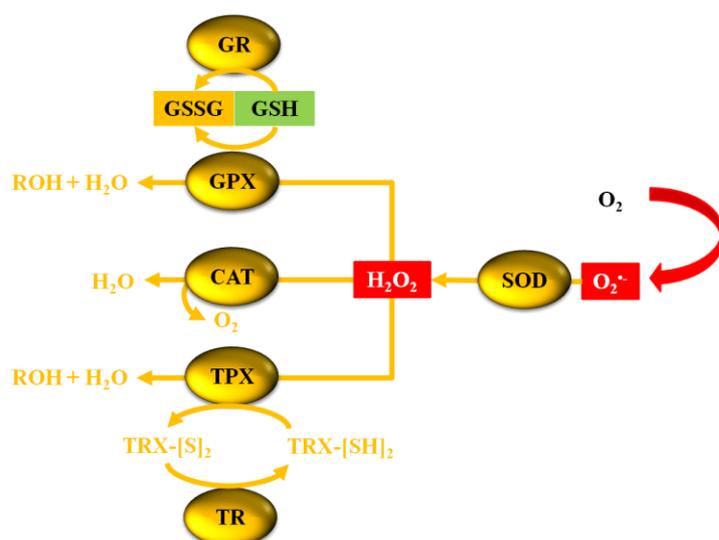
iii. Les transporteurs

Il existe de nombreux transporteurs dont la principale distinction est leur dépendance ou non à l'ATP.

Parmi les transporteurs dépendants de l'ATP, de nombreux appartiennent à la famille des P-type ATPase. Le membre le plus décrit est la pompe à efflux ZiaA impliquée dans l'export du Zn chez *Synechocystis* PCC 6803 et placée sous le contrôle du répresseur ZiaR. Ce transporteur ZiaA présente de nombreux homologues chez d'autres organismes (procaryotes, plantes, animaux) comme la pompe CadA sous contrôle transcriptionnel de CadR impliquée dans l'export du cadmium, le transporteur ZntA chez *E. coli* pour la réponse au cadmium, zinc et plomb et le transporteur de cuivre PacS identifié chez *Synechococcus* PCC 7942 (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014b; Cassier-Chauvat and Chauvat, 2016).

Les pompes chimioosmotiques d'efflux sont composées de 3 sous-unités (A, B et C) et sont des antiporteurs cations divalents/2 H^+ qui fonctionnent sans ATP.

2) Les enzymes de défense et de détoxification des ROS



SOD : superoxyde dismutase ; CAT : catalase ; GPX : glutathion peroxydase ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé ; GR : glutathion réductase ; TPX : thiorédoxine peroxydase ; TRX : thiorédoxine ; TR : thiorédoxine réductase

Parmi les enzymes de détoxification classiquement évoquée, on retrouve le système de la superoxyde dismutase et de la catalase totalement indépendant et celui des thiol-peroxydases dont la glutathion peroxydase (GPX) qui dépend du système glutathion et la thiorédoxine peroxydase (TPX) qui nécessite le système des thiorédoxines (TRX).

Figure 57 – Représentation schématique de la détoxification des ROS par les enzymes de détoxification classique

a. Le système SOD-CAT indépendant du pouvoir réducteur NADPH

La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation de l'ion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est ensuite dimuté par l'activité de la catalase (CAT) en eau (H_2O) et en dioxygène (O_2) grâce à leurs propriétés rédox et à leurs cofacteurs métalliques. L'activité SOD est retrouvée dans la plupart des organismes aérobies. Il existe 3 types de SOD en fonction de la nature du métal de transition impliqué dans la catalyse, on distingue : (i) les Fe-SOD, les Mn-SOD et les Cu/Zn-SOD. La catalase est une protéine homotétramérique dont l'activité catalytique repose sur un hème ferrique.

b. Les thiol-peroxydases GPX et TPX dépendantes du glutathion et des thiorédoxines

La glutathion peroxydase (GPX) et la thiorédoxine peroxydase (TPX) sont des thiol-peroxydase car leur activité catalytique nécessite une cystéine réactive. Leur site catalytique présente une cystéine réactive qui réalise une attaque nucléophile du groupement peroxyde entraînant alors la libération concomitante de la molécule d'eau ou d'alcool avec la formation d'un acide sulfénique (Cys-OH) au niveau de son site catalytique. La GPX détoxifie le H_2O_2 via un mécanisme glutathion dépendant. La TPX, quant à elle, catalyse la réduction du H_2O_2 en eau et celle des peroxydes organiques (ROOH) en leur alcool correspondant (ROH) en tirant profit du pouvoir réducteur du NADPH (ou du NADH), en lien avec le système des thiorédoxines (TRX) et des glutarédoxines (GRX).

c. *Les autres enzymes chez les cyanobactéries*

En plus du système SOD-CAT et thiol-peroxydases, d'autres enzymes de défense et de détoxification sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 13 – Les enzymes de défense et de détoxification des ROS des cyanobactéries

Enzyme	Centre catalytique	Substrat	Etudié chez
Superoxyde dismutase (SOD)	Fe, Mn, Cu/Zn	O ₂ • ⁻	<i>Synechococcus</i> PCC 7942 <i>Anabeana cylindrica</i> <i>Anabeana</i> PCC 7120 <i>Nostoc commune</i>
Catalases(CAT)			
- Monofonctionnelle	Hème	H ₂ O ₂	
- Bifonctionnelle	Hème	H ₂ O ₂ , ROOH	<i>Synechococcus</i> PCC 7942 <i>Anacystis nidulans</i> <i>Synechocystis</i> PCC 6803
	Mn	H ₂ O ₂	
Thiol-peroxydases			
- Thiorédoxine peroxydase (TRX)	Cys	ROOH	/
- Glutathion peroxydase (GPX)	/	H ₂ O ₂ , ROOH	<i>Synechocystis</i> PCC 6803
Péroxyrédoxines (PRX)	Cys (1 ou 2)	H ₂ O ₂ , ROOH, peroxy nitrite	<i>Synechococcus</i> PCC 7942 <i>Anabaena</i> PCC 7120
Rubrérythrine	Fe(Cys) ₄ et His	H ₂ O ₂	<i>Anabaena</i> PCC 7120
DNA-binding protein(Dps)	Fe	H ₂ O ₂	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> <i>Anabaena</i> PCC 7120 <i>Synechococcus</i> PCC 7942
	Hème		

Adapté de (Latifi et al., 2009)

3) Le système glutathion

a. Définition et classification des thiols

Les thiols sont une classe de dérivés sulfurés organiques (mercaptans) caractérisés par la présence d'un groupement thiol ($-SH$) lié à un atome de carbone. Deux thiols peuvent se condenser et forme alors un disulfure ($-S-S-$). Les thiols sont des composés qui ont en général une forte odeur et peuvent-être classés en 2 catégories :

- les thiols de faible poids moléculaires : cystéine libre, glutathion (le thiol le plus abondant chez les organismes photosynthétiques (plantes, cyanobactéries...) et chez les eucaryotes (levures, mammifères...)). Chez les bactéries des analogues du glutathion ont été décrits (mycothiol, bacillithiol, coenzyme A, respectivement chez les *Actinomycetes*, les *Firmicutes* et les *Archaea* ...) et dont une représentation est donnée ci-dessous :

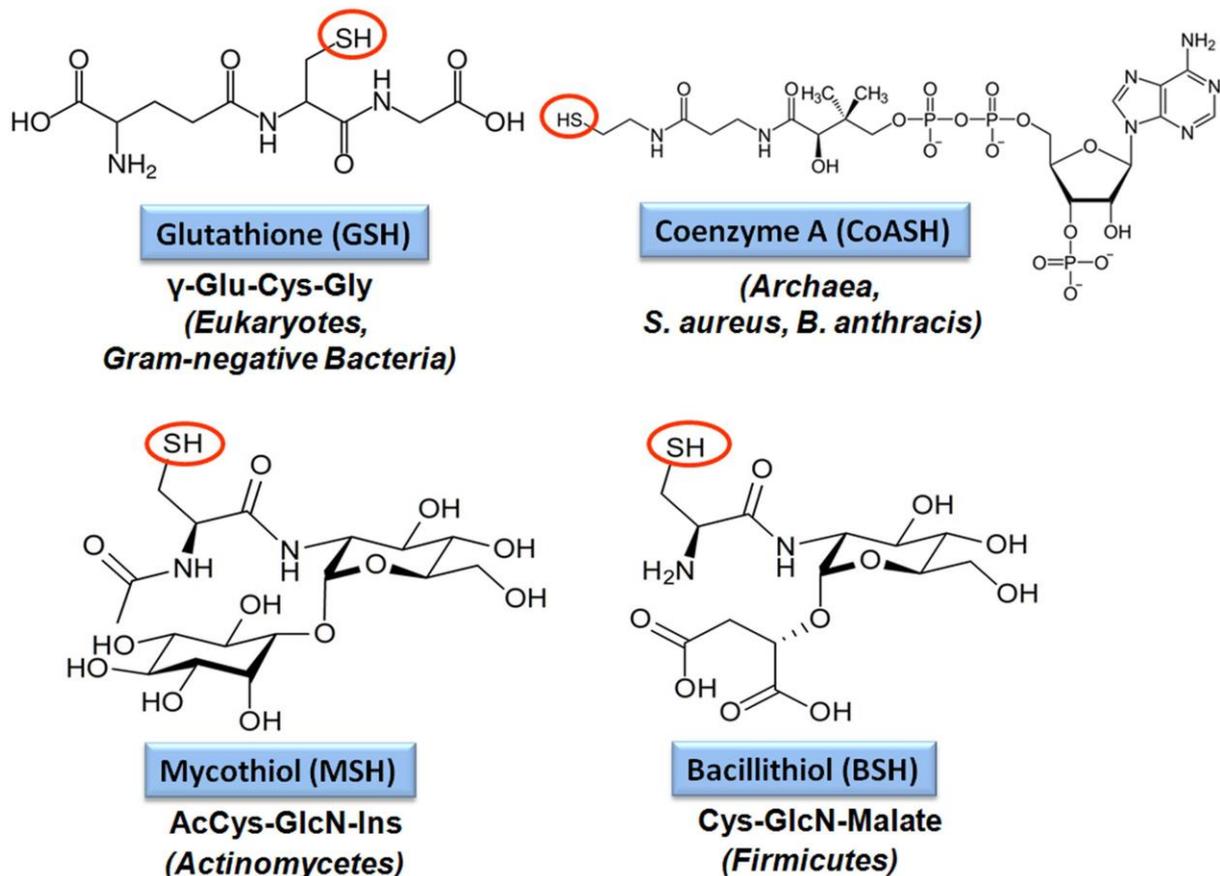


Figure 58 – Structure des principaux thiols de faible poids moléculaires chez les bactéries
Tiré de (Loi et al., 2015)

- les thiols de hauts poids moléculaires : ce sont des protéines contenant une ou plusieurs cystéine(s) pour lesquelles on distingue :
 - les protéines à cystéine(s) « inactive(s) », qui sont insensibles à l'état rédox de la cellule, du fait des propriétés des résidus cystéine qui ne possèdent généralement pas d'activité catalytique en raison de leur faible accessibilité depuis le solvant, de leur environnement proche riche en acides aminés acides et de leur pKa (Dalle-Donne et al., 2009),
 - les protéines à cystéine(s) « active(s) », qui sont sensibles à l'état rédox de la cellule en raison de la forte accessibilité depuis le solvant des résidus cystéine, de leur haute réactivité (liaison à des métaux Mg^{2+} , Ca^{2+} ou Zn^{2+}) et de leur environnement proche constitué d'acides aminés basiques (Dalle-Donne et al., 2009). Ces protéines sont le plus souvent impliquées dans des réactions d'oxydoréduction et utilisent parfois le glutathion comme cofacteur.

La figure ci-après donne une vue schématique de la sensibilité des cystéines en fonction de leur accessibilité depuis le solvant et de leur environnement :

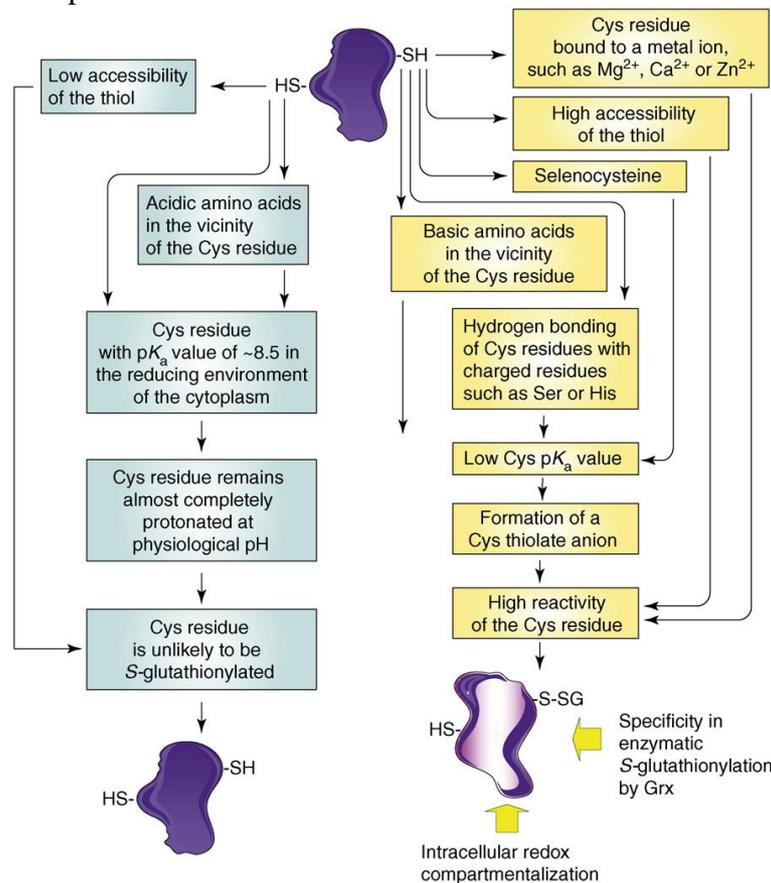


Figure 59 – Représentation schématique des bases moléculaires de la glutathionylation des cystéines sensibles à l'état rédox

Les 2 éléments majeurs déterminant la susceptibilité des thiols aux réactions rédox (incluant la glutathionylation) sont : (i) l'accessibilité de la cystéine dans la structure tridimensionnelle de la protéine et sa réactivité influencée par son environnement (nature des acides aminés, liaison de coordination avec des cations divalents...).

Tiré de (Dalle-Donne et al., 2009)

Parmi ces différents thiols, le glutathion a une place centrale chez les cyanobactéries. Sur le plan quantitatif, bien que structuralement plus complexe que la cystéine, le glutathion est le thiol, le plus abondant dans la plupart des organismes aérobies. En effet, la présence de cystéine libre est limitée par son auto-oxydation rapide, catalysée par de nombreux métaux et générant des peroxydes toxiques pour la cellule). Le glutathion étant un dérivé de la cystéine dans lequel ses groupements amines et carboxyles sont bloqués, l'auto-oxydation s'y trouve réduite. Sur le plan qualitatif, le glutathion est au centre du système glutathion comme représenté dans la figure 67.

b. Le glutathion

i. Définition et structure

Le glutathion est un tripeptide (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine, figure ci-dessous) dont la concentration intracellulaire peut varier de 1 à 10 mM chez les organismes qui le synthétisent (Zhang and Forman, 2012; Lu, 2013). Il existe sous 2 formes. La forme réduite (GSH, majoritaire, représentant 98 à 99% du glutathion total) maintient les compartiments intracellulaires dans un état réduits et fournit des électrons à diverses enzymes glutathion-dépendantes (glutarédoxines, glutathion-péroxydases, glutathion-S-transférases...). La forme oxydée (GSSG, minoritaire) résulte de l'oxydation du GSH par ces enzymes (Fahey, 2013). Le couple rédox GSH/GSSG a un potentiel standard d'oxydoréduction (E°) de -240 mV (le NADPH a un potentiel de -315 mV). En raison de son potentiel et des concentrations élevées (de l'ordre du mM) en GSH, ce dernier est un très bon réducteur et le couple GSH/GSSG est l'un des couples rédox majeur dans le vivant.

Chez les eucaryotes non photosynthétiques, la grande majorité du glutathion (85 à 90 %) est localisée dans le cytosol et le reste dans les mitochondries, le noyau et les peroxysomes. La liaison entre le glutamate et la cystéine est dite « γ » car elle s'établit entre le carboxyle de la chaîne latérale du glutamate et l'amine de la cystéine. Ce n'est donc pas une liaison peptidique au sens stricte, ce qui empêche la dégradation du glutathion par les protéases.

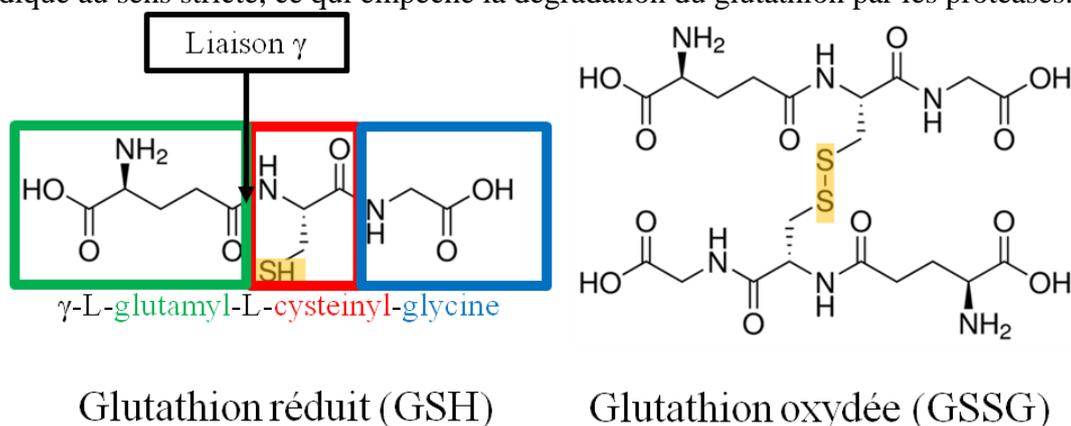


Figure 60 – Structure du glutathion réduit (GSH) et du glutathion oxydée (GSSG)
Adapté du rapport de stage de BTS 1^{ère} année – Julie GUERIN

ii. Biosynthèse, recyclage, homéostasie du couple rédox GSH/GSSG

Biosynthèse du GSH

La biosynthèse du GSH (**voir partie bleue dans la figure 67**) implique 2 enzymes qui nécessitent de l'ATP : (i) la γ -glutamyl-cystéine synthase (GshA) qui catalyse l'addition du glutamate à la cystéine pour former le γ -glutamyl-cystéine et (ii) la glutathion synthase (GshB) qui ajoute la glycine pour former le GSH.

Toutes les cyanobactéries dont le génome est séquencé possèdent les 2 gènes *gshA* et *gshB*. Le gène cyanobactérien *gshB* est généralement localisé en amont d'un gène codant pour une glutarédoxine (GRX). La délétion du gène *gshA* chez *Synechocystis* PCC 6803 génère une souche méropléide présentant des chromosomes mutants dépourvus du gène *gshA* ($\Delta gshA$) et des chromosomes sauvages (*gshA*⁺). Le gène *gshA* est donc essentiel à la viabilité cellulaire tout comme le gène *gshB* chez *Synechocystis* PCC 6803 (Naraimsamy et al., 2013).

Dégradation du GSH

En raison de la liaison γ entre le groupement amine de la cystéine et le groupement carboxyl du glutamate, le GSH n'est pas sensible aux protéases. En revanche, la peptidase GGT (γ -glutamyl-transpeptidase) peut cataboliser le GSH (Naraimsamy et al., 2013). La protéine GGT libère le dipeptide cystéinylglycine et transfère le glutamyl à une variété de molécule « accepteur » comme l'eau pour régénérer le glutamate.

Recyclage et homéostasie du couple rédox GSH/GSSG

De nombreux organismes possèdent un glutathion réductase (GR) qui convertit le GSSG (le plus souvent, issu de l'utilisation du GSH dans les différents processus du système glutathion) en GSH, assurant ainsi son recyclage. La GR est une protéine de la famille des pyridine disulfide oxydoréductases qui possède un cofacteur FAD et catalyse cette réaction par réduction intramoléculaire en utilisant le pouvoir réducteur du NADPH grâce à son cofacteur FAD. Cette enzyme constitue donc un lien entre le couple rédox GSH/GSSG et NADPH/NADP sans échange direct d'électron entre ces 2 couples ce qui assure le maintien au sein de la cellule des potentiels rédox nécessaires aux fonctions cellulaires.

Chez les cyanobactéries, on distingue 2 catégories : (i) les cyanobactéries qui possèdent un GR (*Anabeana* sp. PCC 7120, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Synechococcus* sp. PCC 7942) et (ii) celles qui n'en possède pas (*Synechococcus* sp. WH8102, *Synechocystis* sp. PCC 6803) (Naraimsamy et al., 2013). Il a d'ailleurs été montré que *Synechocystis* ne possédait pas d'activité GR dépendante du NADPH (Naraimsamy et al., 2013).

Le maintien de l'homéostasie du couple rédox GSH/GSSG provient aussi de la rétroinhibition du GSH exercée sur GshA. Cette voie est également régulée par la disponibilité des acides aminés précurseurs en particulier de la cystéine et assure ainsi la stabilité de la concentration en GSH intracellulaire. Le contrôle du niveau en GSH pourrait également être assuré au niveau de sa dégradation par les GGT.

c. *Activité biologique et rôles du GSH dans le système glutathion*

i. *Activité et rôle biologique du GSH*

Le groupement thiol (-SH) de la cystéine est responsable de l'activité biologique du glutathion. Il est difficile de proposer une classification des rôles du GSH tant ils sont nombreux et tant il intervient dans de nombreux processus. Néanmoins, il est possible de proposer 3 grands rôles :

- **un rôle de production**, puisque le GSH intervient dans la synthèse de composés dans le métabolisme :
 - o primaire : synthèse de protéines (Kosower et al., 1972) et d'acides nucléiques (Wu et al., 2004; García-Giménez et al., 2013; Sedgeman et al., 2017),
 - o secondaire : cofacteur d'enzymes GSH-dépendantes (comme les GST pour la synthèse de prostaglandines et de leucotriènes chez les mammifères,
- **un rôle de protection**, le GSH intervenant de façon central dans :
 - o la détoxification de composés endogènes et exogènes,
 - o la gestion du stress oxydant (un stress induit en conséquence de la plupart des autres stress : lumineux, thermique, salin, métabolique, osmotique, salin...) de façon ubiquitaire dans le règne du vivant (pour revue (Masip et al., 2006; Zhang and Forman, 2012; Deponte, 2013; Naraimsamy et al., 2013; Hasanuzzaman et al., 2017)),
 - o la séquestration des métaux lourds comme le cuivre, le cadmium ou le zinc () *via* les polymères de phytochélatines,
 - o et la protection des dommages liés à l'ADN a également été montré (Evans et al., 1984; Parsons and Chipman, 2000),

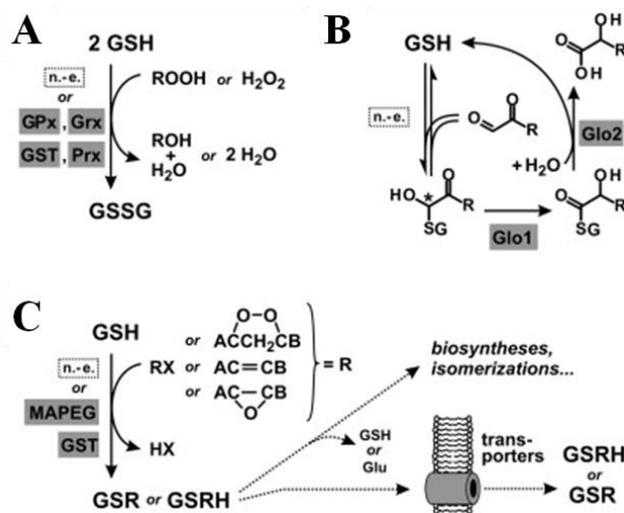


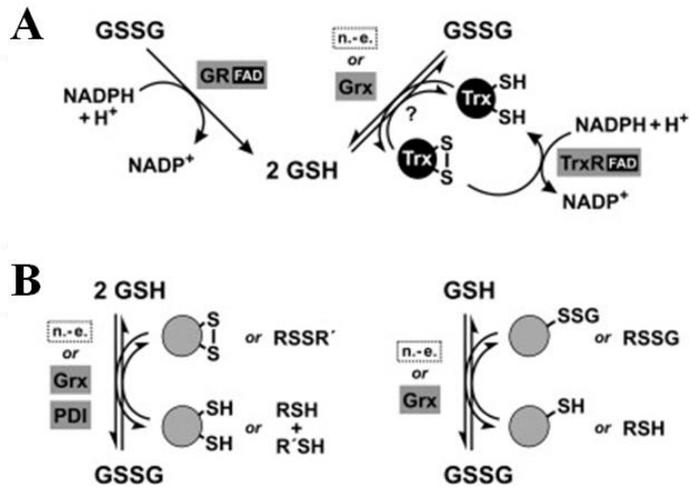
Figure 61 – Représentation schématique des activités GSH-dépendantes impliquées dans le rôle de production du GSH

(A) La détoxification GSH-dépendante du H₂O₂ et des hydroperoxydes est catalysée par de nombreuses enzymes (GPX, PRX, GST et GRX). (B) La conversion GSH-dépendante des 2-oxo-aldéhydes (glyoxal/méthylglyoxal) en acide 2-hydroxycarboxylique (D-lactate) est catalysée par la glyoxalase I (Glo1) et II (Glo2). (C) Une grande diversité d'électrophiles sont modifiées par le GSH au moyen des GST et MAPEG formant des précurseurs de métabolites secondaires ou favorisant ainsi leur élimination (pour les toxiques). GPX : glutathion peroxydase, PRX : peroxyrédoxine, GST : glutathion-S-transférase, GRX glutarédoxine, MAPEG : membrane-associated protein involved in ecosanoïd and glutathione metabolism

- **un rôle de régulation**, en particulier dans le maintien de l'homéostasie des thiols dont la glutathionylation est perçue comme une protection transitoire contre les effets des ROS mais est également de plus en plus décrit comme un moyen de régulation fine des activités des enzymes/transporteurs (Manevich et al., 2004; Townsend et al., 2009; Carvalho et al., 2016; Chandel and Bachhawat, 2017).

Figure 62 – Représentation schématique des activités GSH-dépendantes impliquées dans le rôle du GSH dans la régulation de l'homéostasie des thiols

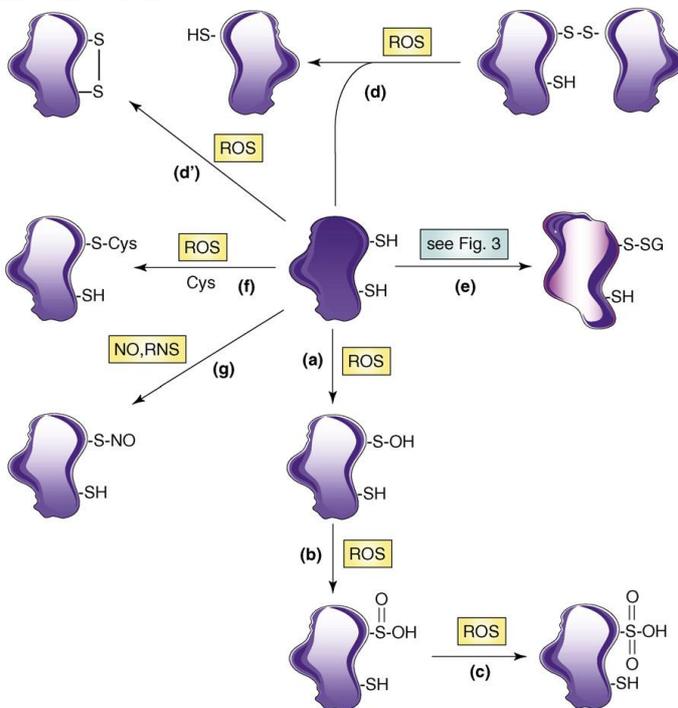
(A) Régénération NADPH-dépendante du GSH par l'activité GR ou TRX. (B) Réduction ou oxydation des thiols et des ponts disulfures intra- ou intermoléculaires par 2 GSH/GSSG (gauche) et déglutathionylation/glutathionylation des thiols par GSH/GSSG (droite). Ces réactions peuvent être non enzymatiques ou catalysées par les GRX, PDI et certaines GST. GR : glutathion réductase, PDI : protein disulfide isomerase



ii. Rôle de régulation du GSH dans l'homéostasie des thiols par glutathionylation et déglutathionylation

Rappels sur les modifications oxydatives des thiols

En présence d'une concentration élevée en ROS, de cystéine (Cys) et de NO et Reactive Nitrogen Species (RNS), les protéines à cystéines (Pr-SH) sont susceptibles à de nombreuses modifications.



Tiré de (Dalle-Donne et al., 2009, p.)

Figure 63 – Représentation schématique des modifications oxydatives des thiols

Les protéines à cystéine (Pr-SH) peuvent être oxydées sous diverses formes : (en un radical thiyl (-S°)) puis en :

- (a) en acide sulfénique (Pr-SOH),
- (b) en acide sulfinique (Pr-SO₂H)
- (c) en acide sulfonique (Pr-SO₃H).

L'oxydation des Pr-SH peut résulter en la formation de ponts disulfures :

- (d) intermoléculaires ou (d') intramoléculaires.

Les réactions entre les Pr-SH et les thiols de faible poids moléculaires (cystéine libre et GSH) conduit à la formation de :

- (e) protéine S-glutathionylée,
- (f) protéine S-cystéinylée.

Enfin, les Pr-SH peuvent être modifiées par (g) S-nitrosylation formant des protéines S-nitrosylées notées Pr-SNO.

La glutathionylation, un mécanisme réversible de protection et de régulation

Il est possible de considérer les S-thiolation (S-cystéinylation et S-glutathionylation) comme des mécanismes transitoires et réversibles assurant la protection des protéines à thiols des oxydations irréversibles. Parmi eux, la S-glutathionylation, une modification post-traductionnelle durant laquelle le GSH est conjugué de manière non enzymatique aux cystéines, formant des protéines du type Pr-SSG est l'un de ces mécanismes transitoires de protection mais qui est également décrit comme jouant un rôle régulateur de l'activité des protéines (Dalle-Donne et al., 2009; Naraimsamy et al., 2013; Loi et al., 2015; Zhang et al., 2018). Les protéines ainsi modifiées sont majoritairement réparées par les thiorédoxines (TRX) et les glutarédoxines (GRX) mais aussi par des glutathion-S-transférases (GST). Ces 3 types de protéines partagent une structure tridimensionnelle commune, le domaine thiorédoxine mais présente une certaine spécificité. Par exemple, les protéines glutathionylées (Pr-S-SG) sont ensuite déglutathionylées au moyen des glutarédoxines (GRX), alors que les points disulfures intra- ou intermoléculaires sont réparés par les thiorédoxines (TRX) (pont disulfure intramoléculaire uniquement) et/ou les glutarédoxines (GRX) (Naraimsamy et al., 2013). Il a également été reporté que certaines GST sont impliquées dans la déglutathionylation (GST de classe Omega) et d'autres dans la glutathionylation (GST de classe Pi) (Zhang et al., 2018). Je ne présenterai ici que le système TRX et GRX, le rôle des GST dans ces processus sera présenté ultérieurement dans la partie qui leur est dédiée.

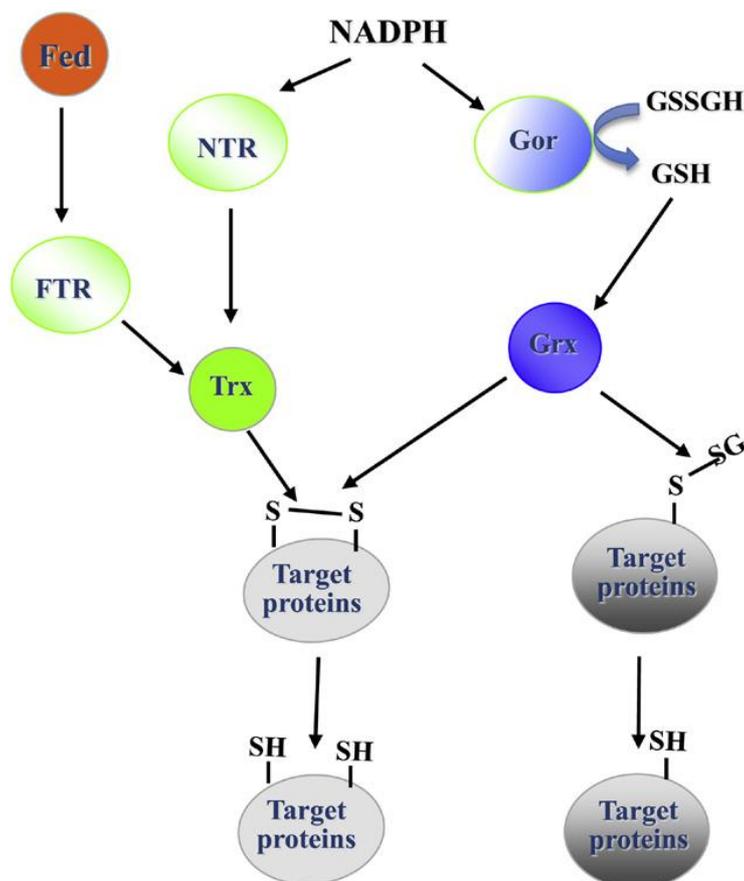


Figure 64 – Les 2 voies de réparation des thiols

Fed: Ferredoxin, FTR: Ferredoxin dependant thioredoxin reductase, GR: Glutathione reductase, Grx: Glutaredoxin, GSH: Glutathione (reduced form), GSSG: Glutathione disulfide (oxidized glutathione), NTR: NADPH-dependent thioredoxin reductase, -S-SG: Protein-glutathione mixed disulfide, Trx: Thioredoxin.

Tiré de (Naraimsamy et al., 2013).

Le système thiorédoxine NADPH-dépendant

Dans ce système, le NADPH transfère ces électrons à la thiorédoxine réductase NADPH-dépendante (NTR) pour réduire les TRX qui utilisent 2 cystéines rédox actives dans le motif CXXC conservé du site actif pour réduire les disulfides (Pr-S-S-Pr) (Naraimsamy et al., 2013). Alors que la plante modèle *Arabidopsis thaliana* possède 19 TRX (ref mcihelet et al2006 naraimsamy), *Synechocystis* PCC 6803, on en dénombre que 4 : TRXA, TRXB, TRXC et TRXQ. Les protéines TRXA et TRXC sont indispensables à la croissance en photoautotrophie standard alors que les gènes *trxB* et *trxQ* peuvent être complètement éliminés des différentes copies du chromosome de *Synechocystis*. Les cibles de TRXB sont multiples et impliquées dans la synthèse des protéines (protéines ribosomales), le métabolisme des acides aminés (glutamine et cystéine synthase) et des sucres (fructose bisphosphate aldolase, fructose-1,6-bisphosphatase...) et dans la protection contre le stress oxydant (1-Cys-peroxyrédoxine) (Naraimsamy et al., 2013).

Le système glutarédoxine

Toutes les cyanobactéries possèdent 2 types de GRX présentant respectivement un motif CxxC ou CGFS dans leur site catalytique. Chez *Synechocystis* PCC 6803, on compte 3 GRX (GRX1 et 2 de type CxxC et GRX3 de type CGFS).

Les GRX du type CxxC catalysent la réduction des disulfides, les protéines liées entre elles par un pont disulfure (Pr-S-S-Pr) et les protéines glutathionylées (Pr-S-SG), par un mécanisme dithiol ou monothiol. Dans le mécanisme dithiol, la cystéine active en N-terminal « enlève » le pont disulfure ou le GSH glutathionylé. Ensuite, la cystéine ainsi oxydée est réduite par une seconde cystéine active, elle-même réduite par les enzymes NTR ou FTR (.Dans le mécanisme monothiol, la première cystéine active oxydée est directement réduite par le GSH. La GRX3 de type CGFS chez *Synechocystis* forme un homodimère ponté par un cluster 2Fe-2S GSH-lié, conservé dans les orthologues bactérien, cyanobactérien, de levure, de plante et de mammifère. Le rôle de GRX3 chez *Synechocystis* est à élucider (Naraimsamy et al., 2013).

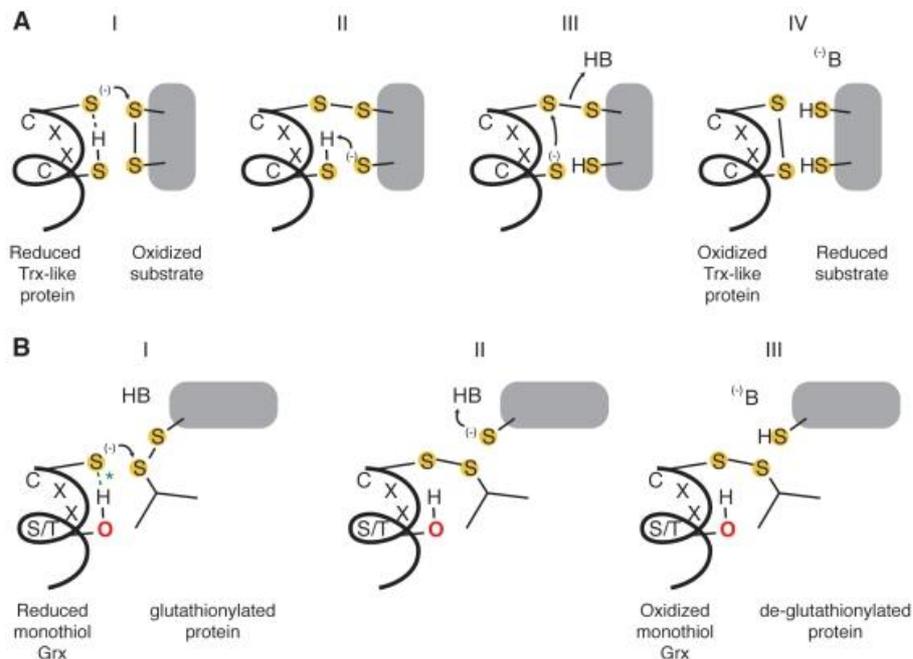


Figure 65 – Représentation schématique des mécanismes dithiol (A) et monothiol (B)
(A) Mécanisme réactionnel typique d'un processus dithiol au niveau du site actif CxxC. (B) Mécanisme réactionnel typique d'un processus monothiol. Tiré de (Atkinson and Babbitt, 2009a)

iii. Rôle de protection du GSH

Le GSH intervient de façon directe et/ou indirecte dans la détoxification de composés endogènes toxiques pour la cellule.

Neutralisation des ROS et des radicaux libres par oxydation du GSH

Le premier mécanisme de détoxification se fait par neutralisation des ROS et des radicaux libres par oxydation du GSH en disulfure de glutathion ou glutathion oxydé (GSSG). Le GSSG est en général re-réduit en GSH par l'enzyme NADPH-dépendante, la glutathion réductase (GR), qui n'est pas présente chez *Synechocystis* (Marteyn et al., 2009, p. 200).

Neutralisation/Élimination des électrophiles par conjugaison du GSH

Les toxiques électrophiles sont détoxifiés par les enzymes « GSH-dépendantes » glyoxalases (Glx) et/ou GST (Deponce, 2013).

Cas des réactions de conjugaison du GSH spontanée

Parmi les électrophiles qui sont détoxifiés par des réactions de conjugaison du GSH spontanée, le méthylglyoxal et le formaldéhyde sont les plus importants. En effet, ils sont produits par de multiples voies endogènes. Le méthylglyoxal provient majoritairement du catabolisme des sucres mais d'autres sources. Le formaldéhyde est, quant à lui, issu du catabolisme de la méthionine, du méthanol, du glyoxylate et de la méthylation oxydative des acides nucléiques. De plus, le méthylglyoxal est impliqué dans de nombreuses pathologies humaines (diabète, maladies neurodégénératives, cancer...) et le formaldéhyde est extrêmement réactif et toxique (pontage des protéines et des acides nucléiques). La détoxification de ces 2 molécules est donc cruciale et repose sur un schéma réactionnel commun représenté ci-dessous.

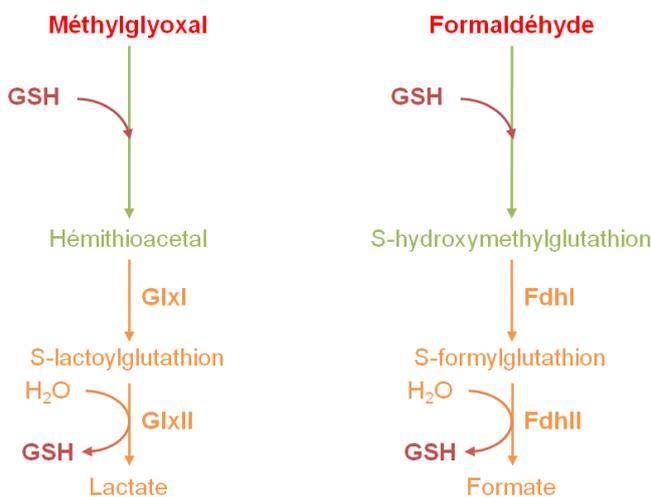


Figure 66 – Voies de détoxification du méthylglyoxal et du formaldéhyde

Les 2 voies présentent une première étape non enzymatique de conjugaison au GSH. Le conjugué obtenu (hémithioacétal ou S-hydroxyméthylglutathion) est pris en charge par une première enzyme (respectivement GlxI (glyoxalase I) et FdhI (S-hydroxyméthylglutathion deshydrogénase)) pour former un second intermédiaire. Ce dernier est alors converti en lactate pour la voie de détoxification du méthylglyoxal ou en formate pour celle du formaldéhyde, respectivement par les enzymes GlxII (glyoxalase II) et FdhII (S-formylglutathion hydrolase).

Cas des réactions de conjugaison catalysée du GSH

Ces réactions correspondent à la conjugaison catalysée par les glutathion-S-transférases (GST) et sera donc présenté dans la partie suivante qui porte justement sur les GST

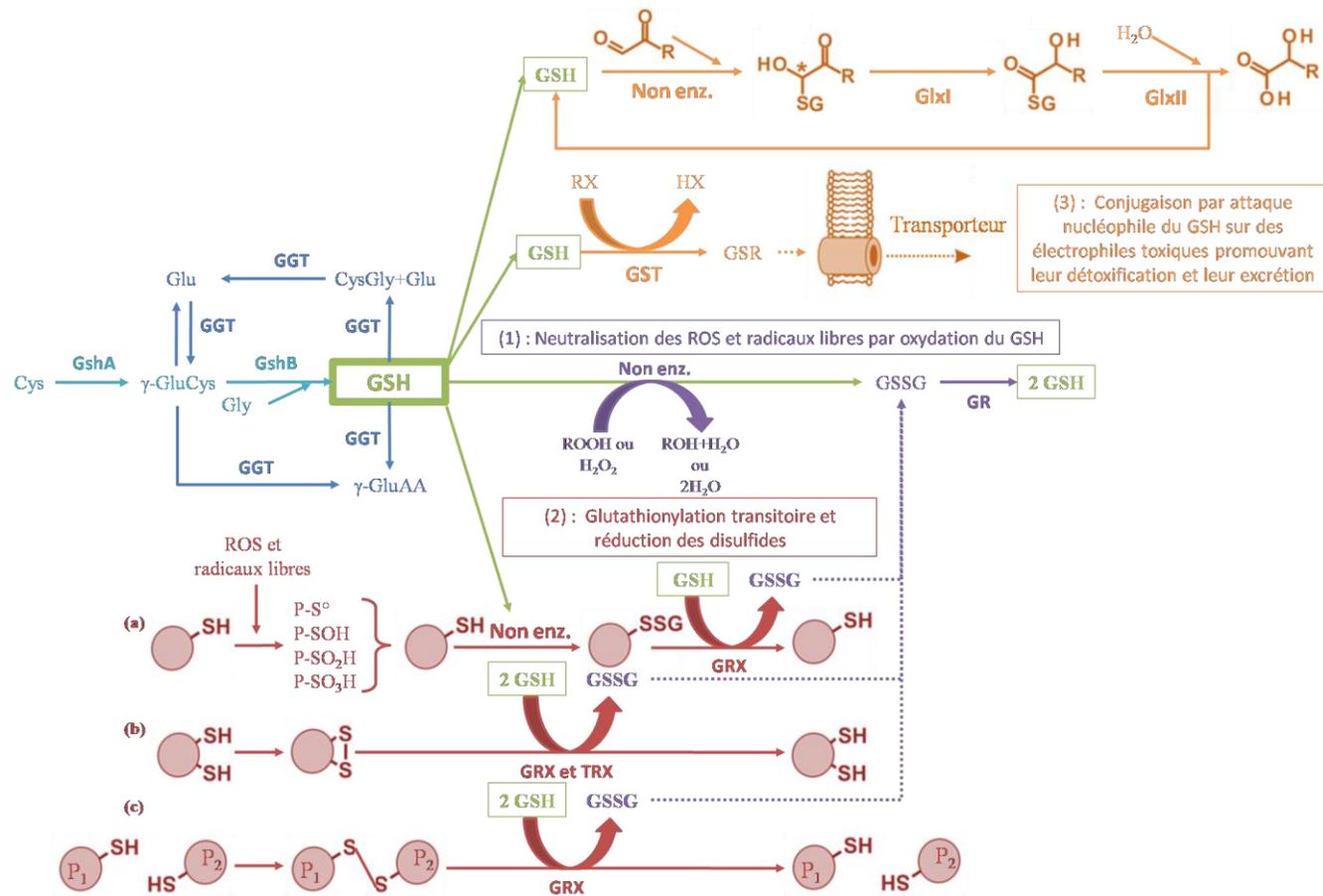


Figure 67 – Représentation schématique du système glutathion

En bleu clair : synthèse du GSH ; Cys : cystéine ; γ -GluCys : γ -glutamyl-cystéine ; Gly : glycine ; GshA : γ -glutamyl-cysteine synthase ; GshB : glutathion synthase ; **En bleu foncé** : recyclage du GSH ; GGT : γ -glutamyl-transpeptidase ; Glu : glutamate ; CysGly :cystéinyl-glutamate ; γ -GluAA : γ -glutamyl-acide aminé ; **En violet** : neutralisation des ROS et des radicaux libre; Non enz. : non enzymatique ; GSSG : glutathion oxydé ; **En rouge** : Glutathionylation transitoire et réduction des disulfides ; (a) cas des protéines glutathionylées ; (b) cas des ponts disulfures intramoléculaires ; (c) : cas des ponts disulfures intermoléculaires ; GRX : glutaredoxine ; TRX : thioredoxine ; **En orange** : Conjugaison par le GSH ; GST : glutathion-S-transférase ; GSR : composé conjugué au GSH ; GlxI : glyoxalase I ; GlxII : glyoxalase II

CHAPITRE III - LES GLUTATHION-S-TRANSFERASE (GST) : DES ENZYMES CRUCIALE DANS LA DETOXIFICATION ET LA GESTION DES STRESS

I. Définition, classification et évolution des GST

A. Définition et dogme fonctionnelle des GST

Les glutathion-S-transférases sont classiquement définies comme des enzymes qui catalysent la réaction de conjugaison entre le **glutathion réduit (GSH)** et des **toxiques généralement hydrophobes (RX)** qui produit un **conjugué (GS-X)** dont les propriétés physico-chimiques (augmentation de l'hydrosolubilité initiale du toxique par ajout du GSH, une molécule présentant de nombreux groupement hydrophiles) et biologiques (inactivation du groupement réactif du toxique et étiquetage par le GSH) favorisent son élimination. Le schéma ci-dessous décrit cette définition.

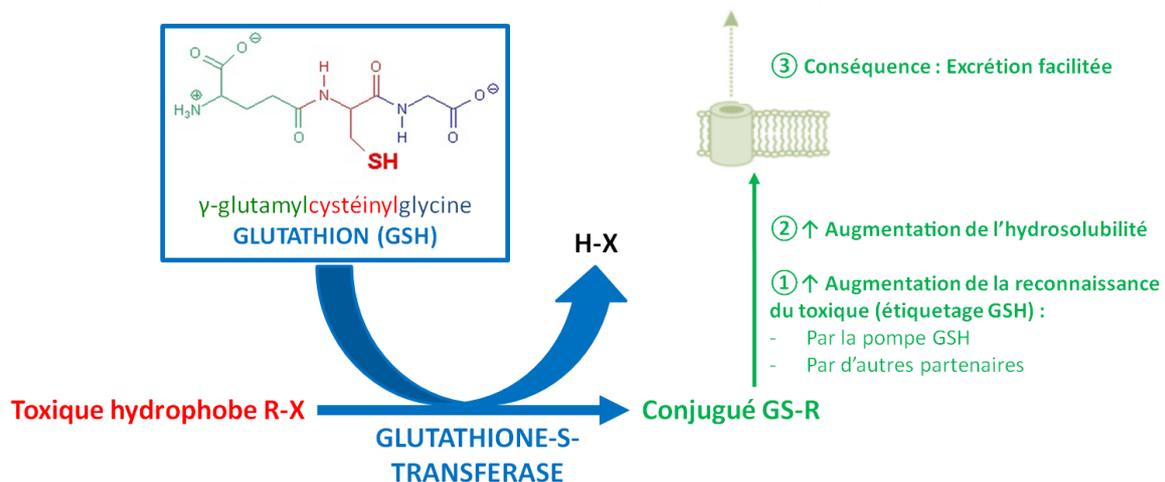


Figure 68 – Représentation schématique de la définition dogmatique des GST

B. Historique de la découverte et de la classification des GST

1) Historique de la découverte des GST

Les GST ont été découvertes en 1961 grâce à la mise en évidence, dans des extraits de foie de rat, de la conjugaison enzymatique du glutathion sur le sulfobromophtaléine par Combes et Stakelum (Deponte, 2013) et les chloronitrobenzènes, des composés aromatiques halogénés par Booth et al. (Booth et al., 1961). Ces enzymes ont alors été nommés GSH S-aryltransférases. D'autres enzymes catalysant la conjugaison du glutathion sur des époxydes et des alkyl-halides ont été identifiées et furent alors nommées époxyde S-transférases et alkyl-halide transférases ; et ainsi de suite en fonction du substrat identifié. En 1974, Clark et ses collaborateurs mirent en évidence que le 1,2-chloro-4-dinitrobenzène (CDNB) était un substrat partagé de plusieurs enzymes. Les noms originaux furent donc abandonnés et une nouvelle nomenclature à trois lettres (Habig et al., 1974) fut établie pour chacune des transférases du foie identifiées chez le rat. Cette nomenclature reposait sur l'ordre d'éluion des transférases sur une colonne de carboxyméthylcellulose (Habig et al., 1974). Puis, l'E.C.I.U.B.M.B (Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) proposa un nom systématique : « RX : glutathione R-transférase

E.C.2.5.1.18 ». Cette commission conseilla également de ne pas utiliser le « S », puisque ce n'est pas l'atome de soufre qui est transféré mais le groupement glutathionyl GS⁻. Néanmoins, la plupart des réactions catalysées par les GST sont des additions nucléophiles ou des substitutions, plus que des transferts. Le terme exact devrait donc être lyase et non transférase, de même que pour certaines GST dont l'activité est en réalité une activité isomérase (Fernández-Cañón and Peñalva, 1998; Johansson and Mannervik, 2001). De nos jours, la dénomination usuelle reste, cependant, glutathion-S-transférase.

En 1976, Prohaska et Ganther identifièrent une activité peroxydase pour une GST soluble (Prohaska and Ganther, 1976) et différentes activités isomérases et oxydoréductases GST-dépendantes furent également identifiées (Benson et al., 1977; Christ-Hazelhof and Nugteren, 1979). En 1977, Ogino et al. ont, en partie, purifié la première protéine microsomale GSH-dépendante de la superfamille des MAPEG (Membrane Associated Protein involved in Eicosanoid and Glutathione metabolism), la prostaglandine-E synthase microsomale issue des glandes vésiculaires bovines (mPGES1) (Ogino et al., 1977). Une activité GST fut décrite dans la mitochondrie en 1979 (Wahlländer et al., 1979) et Kraus purifia la première GST mitochondriale issue du foie de rat en 1980 (KRAUS, 2009). En 1981, la première démonstration d'une activité GST chez les bactéries fut montrée chez *E. coli* par Shishido (Allocati et al., 2009) mais ce ne fut que jusqu'à la fin des années 80 que les isoformes solubles des GST bactériennes furent purifiées et caractérisées (Ilio et al., 1988; Iizuka et al., 1989). En parallèle, les travaux de Smith et Johnson sur les GST de *Schistosoma japonicum* (ver plat parasite) offrirent un outil puissant de la biologie cellulaire moderne : l'étiquetage GST et la purification d'affinité (Smith and Johnson, 1988).

Vers la fin des années 80, Mannervik et al. démontrèrent que des isoformes de même classe existaient sous forme d'homodimères et d'hétérodimères dont l'activité est variable (Mannervik and Jansson, 1982; Mannervik et al., 1988). D'après ces travaux, les différentes isoformes de GST solubles sont nommées en fonction de leur classe (GST A pour la classe alpha) et de leur composition en sous-unité (GST A1-2 pour une GST hétérodimérique de classe alpha comportant les sous-unités codées par *gsta1* et *gsta2*) (Mannervik et al., 2005). En 1991, la première structure cristallographique d'une GST de mammifères de classe Pi fut résolue (Reinemer et al., 1991), suivi de celle d'une GST de classe Mu par Ji et al. (Ji et al., 1992). La première structure d'une GST de classe Kappa fut obtenue en 2004 (Ladner et al., 2004), confirmant ainsi les premières données montrant que les GST de classe Kappa sont radicalement différentes des autres isoformes solubles. La structure de la première GST de la superfamille des MAPEG, mGST1 (GST1 microsomale), fut obtenue en 2006 (Holm et al., 2006) et confirma l'absence de similarité avec les isoformes solubles des GST déjà observés en 1985 grâce à sa séquence primaire.

Depuis les années 80, au cours desquelles diverses GST ont été identifiées dans différents compartiments chez les eucaryotes (cytosol, mitochondrie, microsome) et dans les bactéries, et jusqu'au cours des dernières années où la démultiplication du nombre de nouvelles isoformes et de nouvelles classes de GST a été permise par l'augmentation du nombre de génome séquencé, la classification est devenue un élément central de la littérature portant sur les GST.

2) *Historique de la classification des GST*

a. *Critères de la classification*

Bien que de nombreuses GST partageant au moins 40 (Hayes et al., 2005) à 60 % d'identité de séquence, ont été regroupées au sein d'une même classe, la classification des GST ne repose pas sur cet unique critère d'identité de séquence. En effet, les GST ont également été classées, en fonction de leurs propriétés immunogènes et de leurs caractéristiques structurales et biochimiques (propriétés cinétiques, spécificité de substrat et profil de sensibilité aux inhibiteurs).

Sur le plan immunogène, Hayes et Mantle (Hayes and Mantle, 1986) ont démontré que l'utilisation de techniques d'immuno-détection permettait d'identifier l'expression tissu-spécifique des GST et les relations immunologiques entre elles. Ainsi, un sérum polyclonal dirigé contre une classe particulière de GST, provoque une réaction croisée, avec des GST de même classe pour d'autres espèces. L'absence de réaction croisée est généralement observée entre différentes classes, y compris au sein d'une même espèce, de laquelle est issu un sérum dirigé contre une classe particulière.

Au niveau biochimique, la comparaison des propriétés cinétiques est importante lorsqu'un faible pourcentage d'identité de séquence entre 2 GST est constaté (Mannervik et al., 1985).

Les données structurales sont également prises en compte dans la classification des GST. Il est apparu qu'un monomère d'une GST d'une classe donnée est capable d'interagir avec les monomères d'autres GST de même classe (Hayes and Pulford, 1995). Des données représentatives de chacune des classes en cristallographie révèlent effectivement, que les interactions établies au niveau de l'interface entre 2 monomères sont cruciales pour l'assemblage et la stabilité du dimère, et que celles-ci sont bien souvent classe spécifique.

b. *Historique de la classification*

Les GST ont été initialement caractérisées chez les mammifères, puis chez les insectes, les plantes, les champignons et les bactéries (Sylvestre-Gonon et al., 2019).

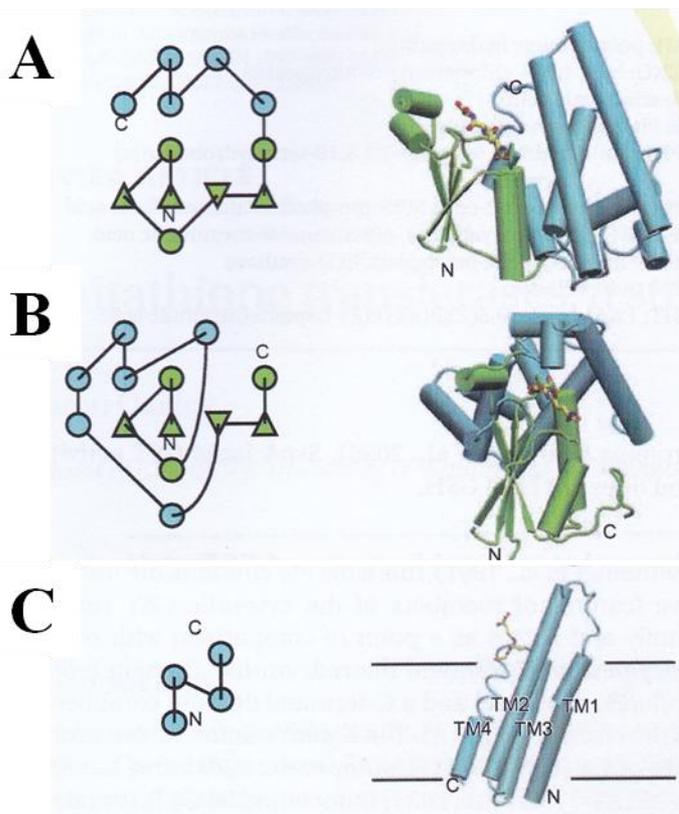
Chez les mammifères, les GST ont été originellement classées en fonction de leur localisation à savoir comme les GST cytosoliques, mitochondriales ou associées à la membrane (cette dernière classe ayant ensuite été sous-divisée en GST microsomales et en leucotriènes C₄ synthases) (Hayes and Pulford, 1995; KRAUS, 2009). Plus tard, ces 3 familles originelles furent respectivement renommés GST solubles, GST Kappa et MAPEG (pour Membrane-Associated Protein involved in Ecosanoid and Glutathione metabolism) (Jakobsson et al., 1999). L'étude approfondie de la classification des GST de mammifères (basée sur leur réactivité immunologique et leur identité de séquence) introduisit les différentes classes de GST suivantes : alpha, mu, pi, sigma, theta et zeta (Mannervik et al., 1985; Dixon et al., 1998; Hayes and McLellan, 1999). Les GST issus d'autres organismes (non-mammifères) furent toutes positionnées dans la classe theta (Buetler and Eaton, 1992).

Chez les plantes, la première classification des GST fut introduite en se basant sur l'homologie de séquence et sur la structure intron-exon des gènes. Ainsi, 4 types de GST furent identifiés : les GST de type I (présentant une activité de détoxification contre les herbicides), les GST de type II (proche de GST de mammifères de la classe zeta), les GST de

type III (composé principalement des GST dont l'expression est induite par l'auxine) et les GST de type IV (similaires à celles de la classe theta) (Sylvestre-Gonon et al., 2019). Finalement, à la fin des années 1990, du fait de l'accumulation de données biochimiques sur les GST de plantes, il est apparu que certaines GST se regroupent clairement des GST de mammifères alors que d'autres sont spécifiques aux plantes. Grâce au génome de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, une nouvelle classification apparut et introduisit les classes Phi (remplaçant le type I), Zeta (remplaçant le type II), Tau (remplaçant le type III) et Theta (pour le type IV), mais aussi la classe Lambda et DHAR (pour dehydroascorbate reductase) (Dixon et al., 2002; Sylvestre-Gonon et al., 2019). Les dernières études phylogénétiques menées il y a quelques années en utilisant les génomes annotés de nombreuses plantes terrestres (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Physcomitrella patens*, *Populus trichocarpa*...) et en ne retenant que les domaines N et C-terminal caractéristique des GST permis l'identification de 14 classes (Sylvestre-Gonon et al., 2019).

c. Nomenclature et classification actuelle

i. Les 3 grandes familles de GST



En se basant sur l'ensemble de ces données et en combinant ces classes avec celles des mammifères, des insectes, des poissons, des bactéries et des cyanobactéries, les GST sont classées en 3 grandes familles et en de multiples classes :

- (i) les GST cytosoliques,
- (ii) les GST mitochondriales (ou Kappa),
- (iii) et les MAPEG.

La figure ci-contre rend assez bien compte des différences structurales entre ces 3 groupes.

Figure 69 – **Comparaison structurale des (A) GST cytosoliques, (B) GST mitochondriales et (C) MAPEG**

ii. *Nomenclature et classification des GST solubles (cytosoliques et mitochondriales)*

La nomenclature des GST se base sur un système précis d'annotation dans lequel les 2 premières lettres désignent le genre et l'espèce (*Hs* pour *Homo sapiens*, *At* pour *Arabidopsis thaliana*...), suivi par l'acronyme GST, puis par la lettre grecque/latine de la classe.

Figure 70 – Nomenclature des GST
Tiré de (Dixon et al., 2002)

Italic letters denoting source organism. For example, *At*, *Arabidopsis thaliana*

Two numbers representing subunit composition. For example, U1-2 is a heterodimer of U1 and U2 subunits

Letter showing GST class:
F, phi U, tau
T, theta Z, zeta
L, lambda

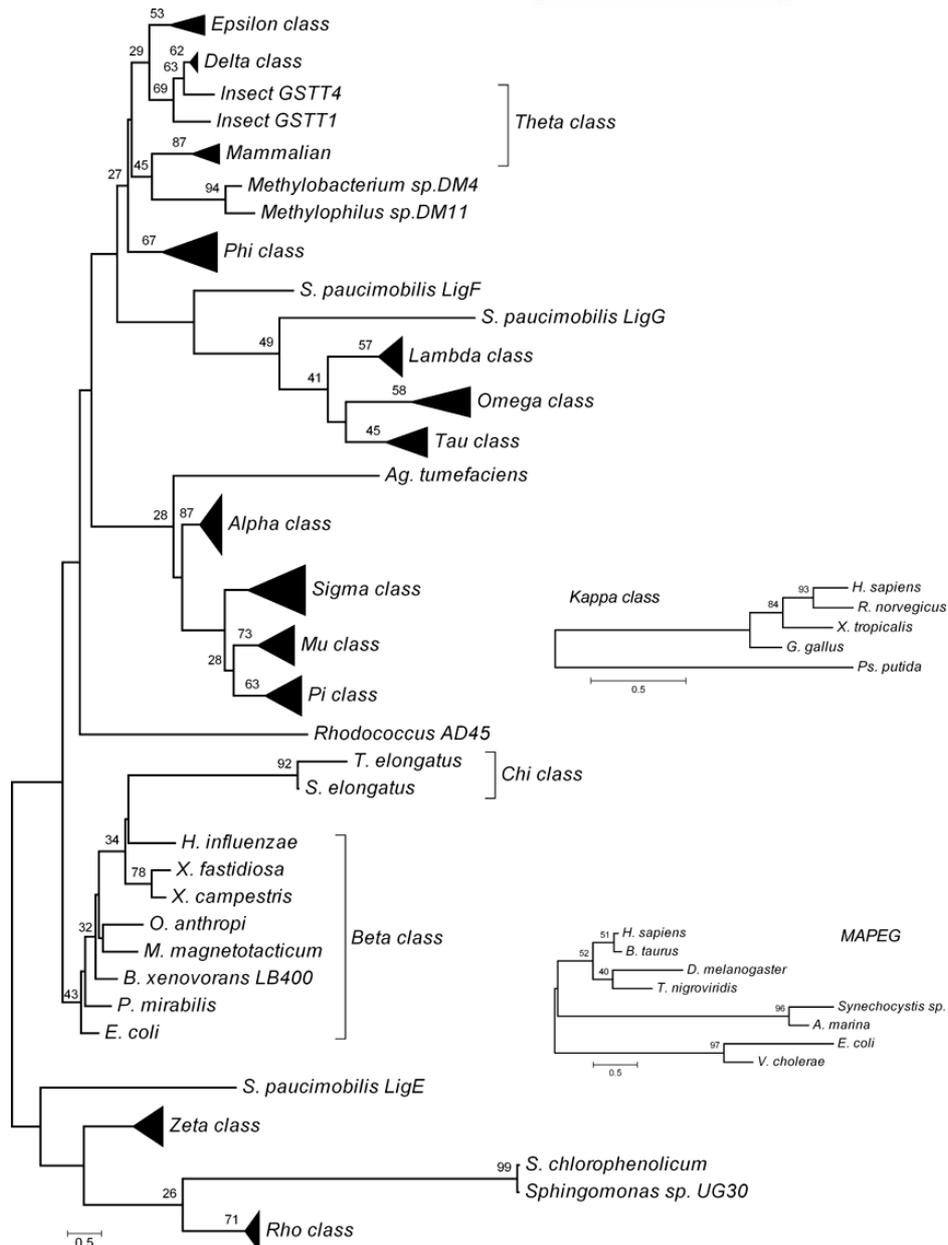



Figure 71 – Exemple d'arbre phylogénétique de la superfamille des GST obtenu à partir de GST eucaryotes et procaryotes représentatives de chacune des classes identifiées en 2009
Tiré de (Allocati et al., 2009)

Un autre arbre phylogénétique (Figure 73) est proposé plus loin en incluant les classes de GST-like (CLIC, Ure2, DHAR...).

iii. Classification des MAPEG

La superfamille des MAPEG est constituée de 6 types de protéines : (i) mGST1, (ii) mGST2 et (iii) mGST3 (glutathion-S-transférases microsomales, mGST) (iv) la protéine activant la 5-lipoxygénase (5-lipoxygénase-activating protein, FLAP), (v) la prostaglandine E synthase (PGES) et (vi) la leucotriène C4 (LTC4) synthase (Jakobsson et al., 2000; Bresell et al., 2005; Pearson, 2005; Deponte, 2013). Ces protéines sont regroupées en 2 familles :

- la famille MAPEG1 (mGST1 / PGES) avec :
 - o le sous-groupe IV contenant les isoformes de mGST1,
 - o le sous-groupe III contenant les isoformes bactériennes à mGST1,
- et la famille MAPEG2 (mGST2 / mGST3 / FLAP / LTC4 synthase) avec :
 - o le sous-groupe II contenant les isoformes de mGST3,
 - o le sous-groupe I contenant les isoformes de mGST2.

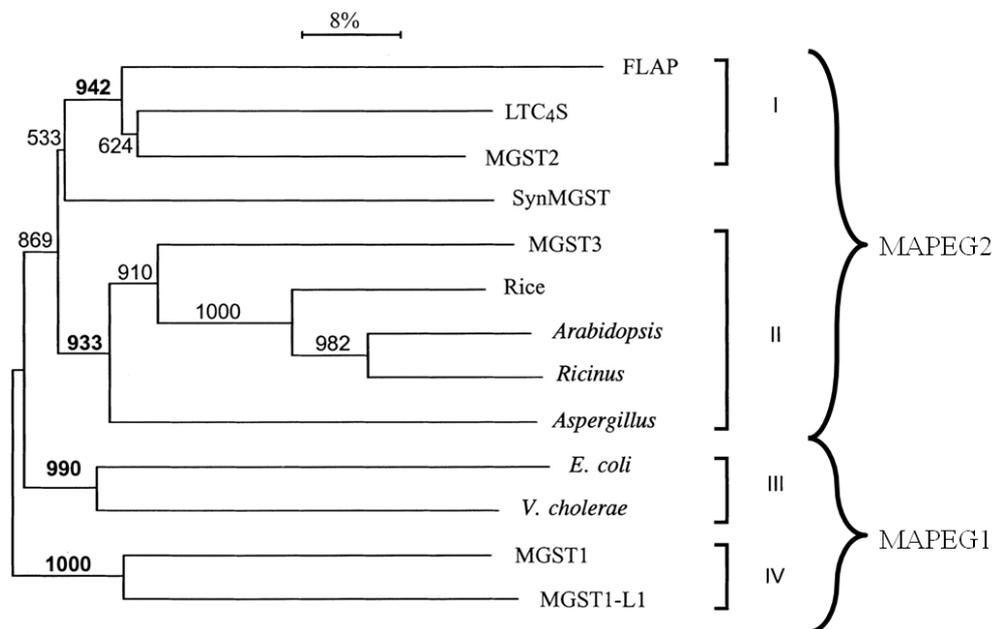


Figure 72 – Arbre phylogénétique de la famille des MAPEG

Adapté de (Jakobsson et al., 2000; Bresell et al., 2005; Pearson, 2005; Deponte, 2013)

Noter la position de la MAPEG de *Synechocystis* (SynMGST) entre les isoformes de mGST2 et mGST3.

Des homologues de MAPEG de mammifères ont été identifiés chez les insectes (*Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*) peuvent être placés dans la famille MAPEG1 (Bresell et al., 2005), tandis que les homologues de MAPEG présents chez les champignons (*Aspergillus nidulans*) et les plantes (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* et *Ricinus*)) appartiennent à la famille MAPEG2 (Bresell et al., 2005).

Des membres de la famille MAPEG1 et MAPEG2 ont été trouvés chez les procaryotes, rendant difficile l'étude de l'évolution des MAPEG, d'autant plus que le positionnement des MAPEG procaryotes n'est pas complètement admis (Jakobsson et al., 2000; Bresell et al., 2005; Pearson, 2005; Deponte, 2013).

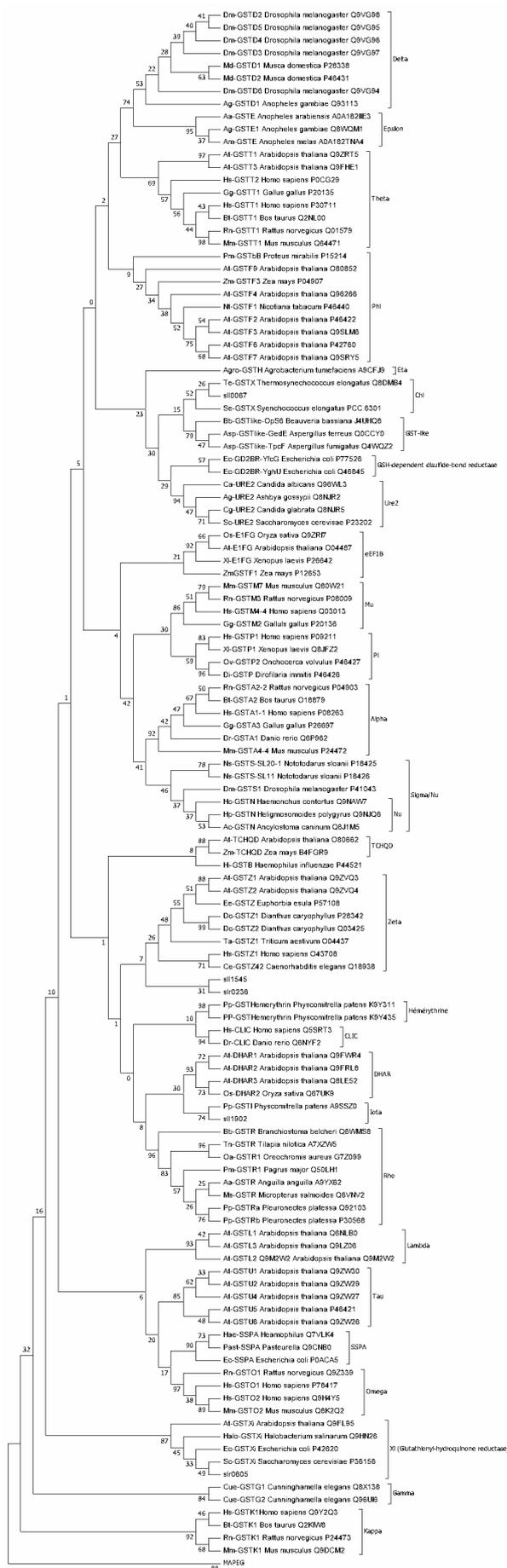


Figure 73 – Arbre phylogénétique de la superfamille des GST incluant les groupes de GST-Like (CLIC, eEF1By, DHAR, Ure2...)

The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method and JTT matrix-based model [1]. The tree with the highest log likelihood (-6552.14) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using a JTT model, and then selecting the topology with superior log likelihood value. This analysis involved 144 amino acid sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated (complete deletion option). There were a total of 36 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X [2].

[1] Jones D.T., Taylor W.R., and Thornton J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275-282.

[2] Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.

Les références par code UNIPROT des séquences protéiques utilisées pour la construction de cet arbre sont présentées dans l'annexe n°1.

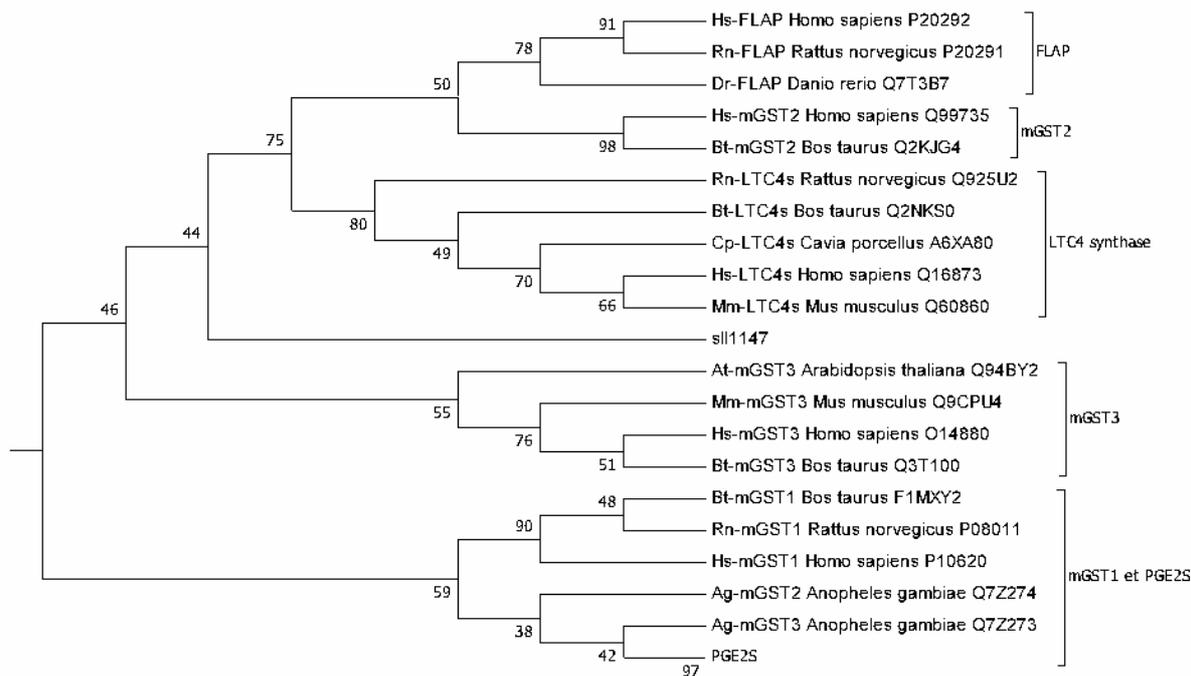


Figure 74 – Arbre phylogénétique de la famille des MAPEG

The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method and JTT matrix-based model [1]. The tree with the highest log likelihood (-6552.14) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using a JTT model, and then selecting the topology with superior log likelihood value. This analysis involved 144 amino acid sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated (complete deletion option). There were a total of 36 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X [2].

1. [1] Jones D.T., Taylor W.R., and Thornton J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* **8**: 275-282.
2. [2] Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**:1547-1549.

Les références par code UNIPROT des séquences protéiques utilisées pour la construction de cet arbre sont présentées dans l'annexe n°1.

C. Evolution des GST

La nécessaire classification des GST a également été utile pour comprendre et étudier l'histoire évolutive des GST. L'histoire évolutive des GST est d'autant plus intéressante que les membres de cette superfamille sont retrouvés dans tous le règne du vivant et que les enzymes de détoxification sont considérées comme ayant existé depuis plus de 2,5 milliards d'année (Sheehan et al., 2001). Néanmoins, l'histoire évolutive des GST est complexe et de nombreux scénarios évolutifs ont été proposés.

1) Evolution des GST cytosoliques

a. L'ancêtre commun des GST a été considéré comme dérivant de la classe Theta

En considérant la présence ubiquitaire de la classe Theta (bactéries aérobies jusqu'aux eucaryotes supérieurs), cette classe fut longtemps décrites comme étant à l'origine des autres classes de GST cytosoliques. Il a été en plus suggéré que l'ancêtre des GST de classe Theta présenterait un rôle dans la détoxification des ROS et serait apparu avant la séparation des procaryotes et des eucaryotes. Dans ce scénario, les GST spécifiques aux plantes et aux mammifères auraient alors divergé par duplication d'un gène ancestral Theta-like avant l'apparition des animaux et des champignons (Pemble et al., 1996).

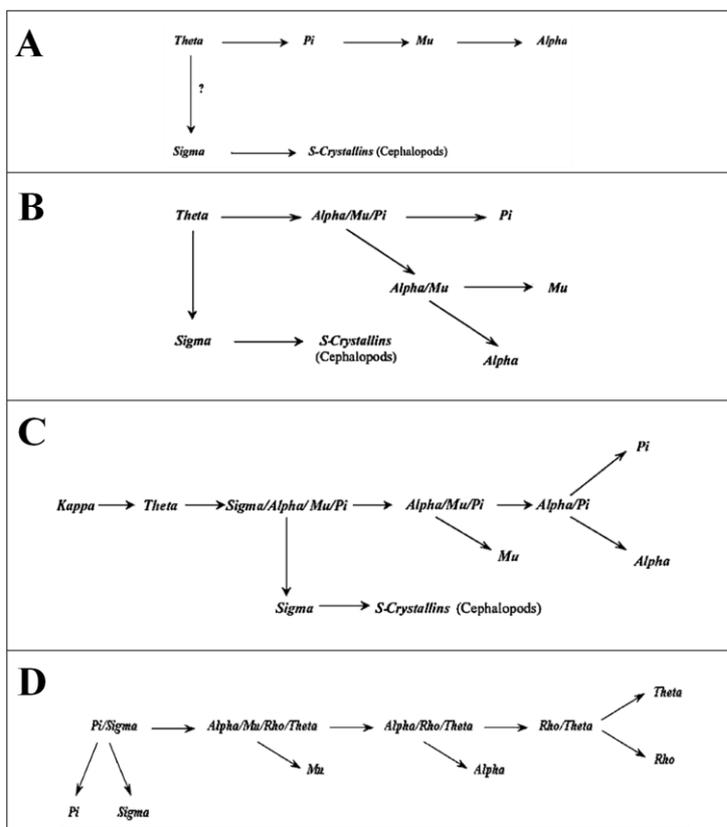


Figure 75 – Relations évolutives entre les GST cytosoliques de différents modèles historiques

(A) Modèle proposé par Buetler et Eaton (1992) ; (B) Modèle proposé par Salinas et Wong (1999) ; (C) Modèle proposé par Armstrong (1997) ; (D) Modèle proposé par Blanchette et al. (2007).

Ces modèles ont été abandonnés en raison de la forte conservation des structures tridimensionnelles entre les différentes classes de GST et avec d'autres protéines démontrant que l'évolution des GST doit s'observer dans un contexte plus large.

b. Le motif thiorédoxine : un motif structural ancestral des GST

Le premier point admis par la communauté est que les GST ont émergées et évoluées à partir d'un ancêtre comportant un motif structural thiorédoxine-like (Martin, 1995; Atkinson and Babbitt, 2009b). La représentation en diagramme de l'architecture des structures secondaires du motif thiorédoxine à celui des GST et d'autres enzymes comme :

- des protéines rédox catalysant la réduction de ponts disulfures dont les thiorédoxines, les glutarédoxines et les DsbA (thiol-interchange disulfide protein),
- des protéines impliquées dans la détoxification des peroxydes incluant les glutathion peroxydases et les peroxyrédoxines,
- des protéines ayant évolué vers d'autres fonctions comme :
 - o les calséquestrines qui fixent le calcium,
 - o les protéines CLIC (Chloride intracellular channel proteins),
 - o les DHAR (déhydroascorbate réductase) requise pour le cycle ascorbate-GSH,
 - o et eEF1B γ un facteur requis dans la synthèse des protéines.

Ce domaine adopte une topologie compacte $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ et présente un motif catalytique CXXC dans la boucle entre le second feuillet β et la seconde hélice α (voir figure ci-après). La perte de ce motif est associée avec la divergence fonctionnelle des homologues des thiorédoxines.

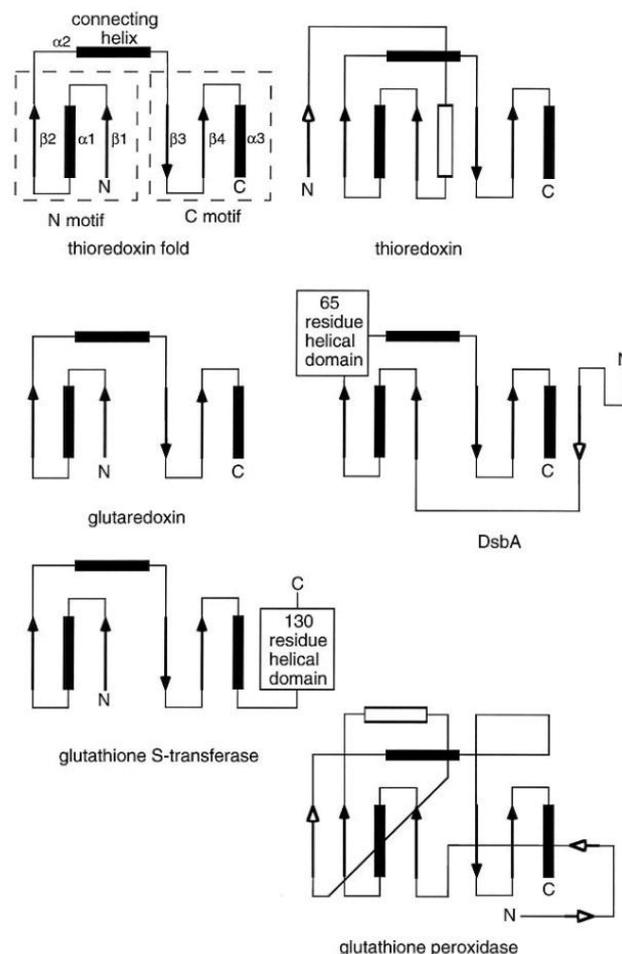


Figure 76 – Représentation de l'architecture du motif thiorédoxine pour les thiorédoxines, glutarédoxines, la protéine DsbA, les glutathion-S-transférases et les glutathion peroxydase

Les feuillets β sont représentés par les flèches et les hélices α par les rectangles. L'architecture consensus du motif thiorédoxine est représenté en haut à gauche et montre le domaine N-terminal ($\beta\alpha\beta$) et C-terminal $\beta\beta\alpha$ connectés par l'hélice $\alpha 2$.

c. Un premier modèle de duplication-divergence de la famille des GST

L'évolution des GST a probablement eu lieu grâce à la duplication de gène suivie par des phénomènes de divergence et impliquant peut être un mécanisme similaire à un remaniement de l'ADN ayant permis l'apparition de nouvelles activités catalytiques (Armstrong, 1998; Hansson et al., 1999; Sheehan et al., 2001). Grâce aux nombreuses analyses phylogénétiques, la communauté scientifique a identifié des protéines non-GST pourtant appartenant à la superfamille des GST. Parmi ces protéines, on retrouve les protéines SSPA (Stringent Starvation Protein A) chez les bactéries (Kanai et al., 2006), des protéines de plantes impliquées dans la résistance au stress et aux plantes pathogènes, la protéine URE2 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Rai et al., 2003) et le facteur d'élongation de la traduction (eEF1B γ) chez les eucaryotes (Jeppesen et al., 2003) et la protéine MIF (macrophage migration inhibitory factor) (Blocki et al., 1993). Ces apparentés suggèrent l'existence d'une protéine ancestrale liée aux stress qui a précédé l'évolution du motif thiorédoxine (Sheehan et al., 2001) présenté dans la figure ci-dessous.

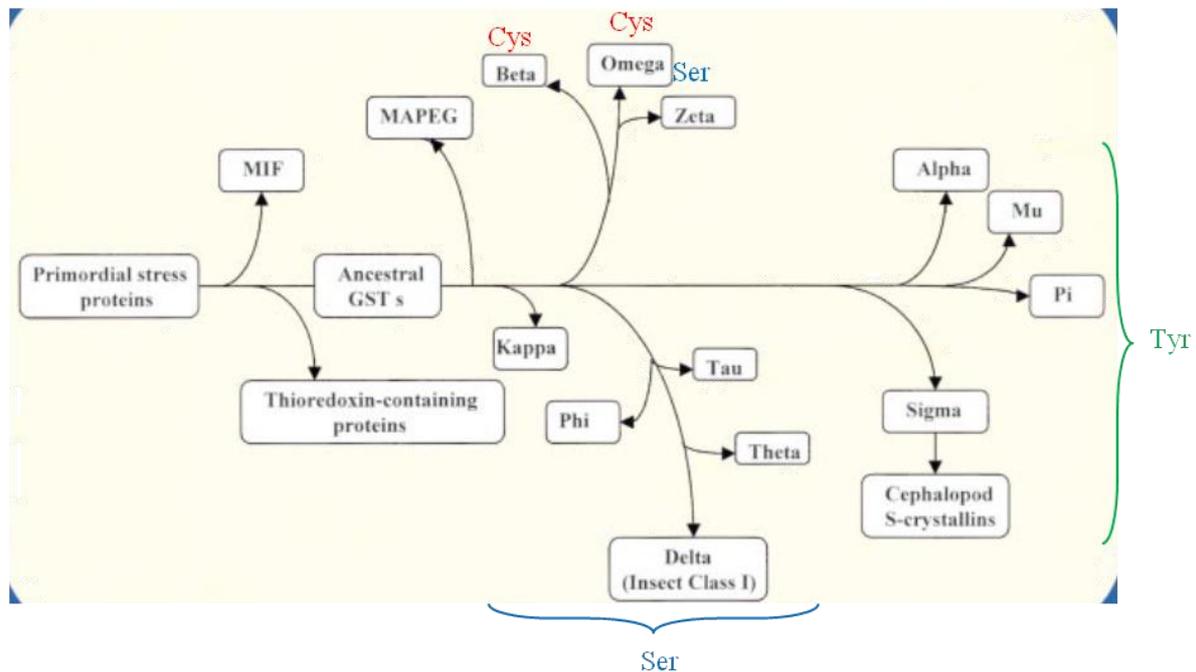


Figure 77 – Modèle possible de divergence de la superfamille des GST

Ce modèle présente pour limite majeure, celle de regrouper des GST comportant dans leur site actif un acide aminé catalytique (Cys, Ser, Tyr) différent. Un autre modèle a été proposé et explique d'une part, (i) la divergence entre les GST cytosoliques et mitochondriales (Kappa) et d'autre part (ii) la divergence entre les GST cytosoliques supportés par l'apparition de la dimérisation des GST et des modifications de l'acide aminé catalytique du

d. *Un second modèle d'émergence des GST solubles (cytosoliques et mitochondriales)*

Dans ce modèle, l'apparition d'un domaine hélicoïdal, la dimérisation et la modification de l'acide aminé catalytique du site actif sont d'autant d'évènements évolutifs qui ont été pris en compte. Ce modèle aurait conduit à l'émergence, d'une part des GST cytosoliques (voie A) et mitochondriales (voie B).

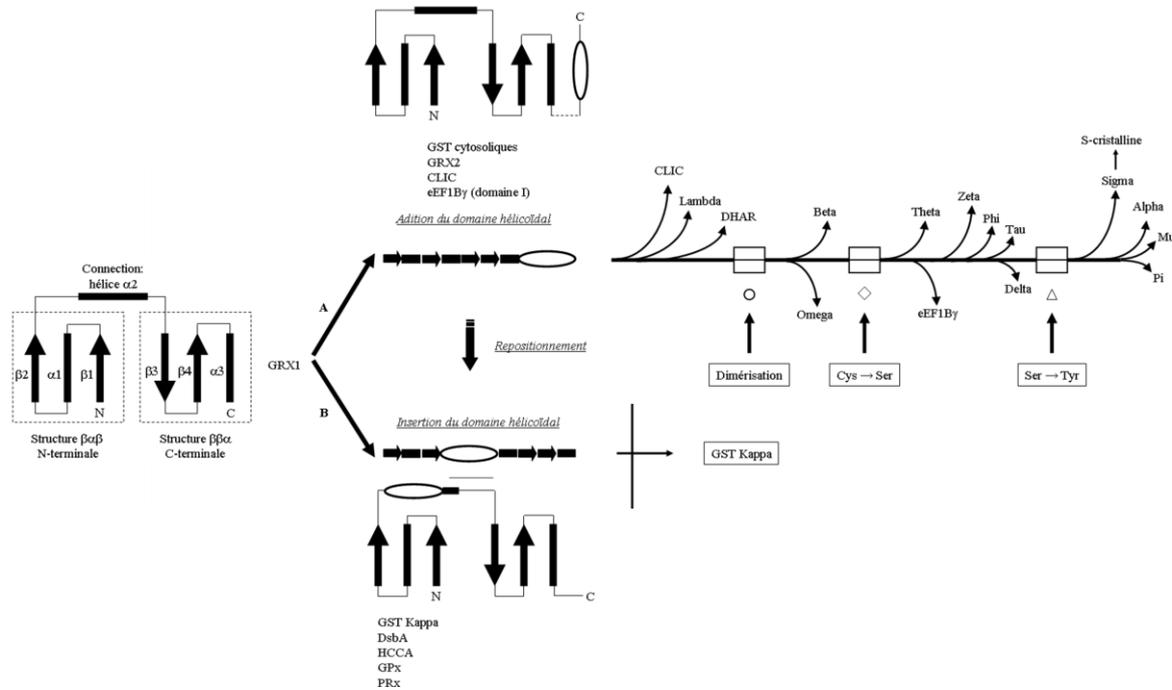


Figure 78 – Représentation schématique du scénario évolutif proposé par Frova des GST solubles (cytosoliques et mitochondriales)

Les feuillettes β sont représentés par des flèches noires et les hélices α par des rectangles. Le domaine hélicoïdal supplémentaire est représenté par une forme ovale.

Adapté de (Frova, 2006)

i. *La voie A : émergence des GST cytosoliques*

Dans la voie évolutive A, l'ajout d'un domaine hélicoïdal (composé uniquement d'hélices α) en position C-terminale, à partir du motif thiorédoxine, a conduit à l'émergence d'un motif thiorédoxine-like retrouvé dans les protéines de la famille des GST cytosoliques et dans GRX2, les CLIC et eEF1By. Les différentes GST cytosoliques auraient ensuite divergés de ce motif ancestral commun, avec l'apparition de la dimérisation après l'émergence des CLIC, des DHAR et des GST de classe Lambda. Un premier évènement évolutif (la dimérisation) a conduit à l'apparition des GST de classe Beta et Omega. Jusque là toutes les protéines de cette famille possèdent une cystéine comme résidu catalytique. A ce titre, ces enzymes peuvent ou pas d'activité de conjugaison et ont plutôt une activité inverse de déglutathionylation (activité thiol-transférase ou déhydroascorbate réductase) (Frova, 2006).

Le deuxième évènement évolutif correspond au remplacement de la cystéine catalytique par une Sérine (Cys → Ser). Parmi les Ser-GST, la classe Theta, Zeta et la protéine eEF1By auraient évolués relativement tôt et la classe Theta présente chez les bactéries aurait constitué leur ancêtre commun. A l'inverse, l'évolution des classes Phi, Tau et Delta aurait été plus tardive étant uniquement présentes chez les plantes (Phi et Tau) ou chez les insectes (Delta). De plus, la structure des gènes et la forte identité de séquences au sein de ces classes suggèrent des évènements de duplication récents (Frova, 2006).

Le dernier évènement évolutif correspond au remplacement de la sérine par la tyrosine (Ser → Tyr) et est supporté par des analyses phylogénétiques (Board et al., 1997; Frova, 2006). Plus récemment, une hypothèse a été émise selon laquelle l'évolution des Tyr-GST est liée à la défense contre le NO puisque les Tyr-GST présente une forte affinité pour le substrat DNDGIC (un transporteur naturel de NO) alors que les Ser- et Cys-GST ont une affinité 10^3 - 10^4 fois plus faible (Bocedi et al., 2013).

ii. *Lavoie B : apparition des GST mitochondriales*

Dans la voie B, le domaine hélicoïdal aurait également été ajouté mais inséré cette fois-ci au centre du motif thiorédoxine et aurait conduit à l'émergence des GST mitochondriales (Kappa). La présence d'un résidu sérine et les similitudes entre les GST Theta et Kappa dans leur structure dimérique a suggéré une histoire évolutive commune. Cependant, le faible pourcentage d'identité de séquence, la position du domaine hélicoïdal sont en contradiction. Cela suggère alors que la dimérisation et le changement de résidu soient apparus 2 fois au cours de l'évolution. De plus, l'ajout du domaine hélicoïdal aurait pu survenir depuis le motif thiorédoxine ou être déplacé depuis le motif thiorédoxine-like ancestral des GST cytosoliques (Frova, 2006).

Si les différentes étapes majeures de l'évolution des GST restent admises, le modèle actuel reste incomplet et n'inclut pas les classes récemment identifiées chez les plantes (mPGES2, GHR, Metaxine, Hemerythrine, Iota et Ure2p (Sylvestre-Gonon et al., 2019)), chez les cyanobactéries (Chi et Rho, (Wiktelius and Stenberg, 2007; Pandey et al., 2015a, 2015b, 2017)).

2) *La diversification fonctionnelle des GST solubles*

La modèle proposé précédemment par Frova (Frova, 2006) est d'autant plus intéressant et pertinent qu'il discute de la diversité des substrats que les GST ont au regard de leur propre diversité. Ainsi, les classes ubiquitaires Theta, Zeta, Omega et Sigma sont représentés par 2 à 3 membres maximum dans chaque espèce suggérant d'une part (i) peu d'évènement de duplication ou que ceux-ci ont été perdus dans l'évolution et d'autre part (ii) une fonction conservée et probablement un rôle « naturel » ou « ancestral » en lien avec la physiologie des organismes qui les possèdent.

A l'inverse, les classes spécifiques de GST est à corrélé avec leurs fonctions « modernes » de détoxification d'une immense variété de xénobiotiques. Au cours de l'évolution, ce besoin de défense contre ces toxiques a été assouvi par (i) une augmentation du nombre de GST par de multiples cycles de duplication de gène ou (ii) favorisant une diversification rapide de leur spécificité de substrat tout en conservant leur chimie GSH-dépendante. Ce dernier point peut s'expliquer structuralement par un site de fixation du GSH (site G) très conservé combiné à un site de fixation des toxiques hydrophobes (site H) extrêmement variable.

3) *Evolution des GST mitochondriales (Kappa)*

La structure des GST de classe Kappa est très différente de celle des GST cytosoliques et des MAPEG suggérant un motif structural ancestral différent, bien que le motif thiorédoxine (nécessaire à la fixation du GSH) soit très conservé. Comme déjà évoqué, les GST Kappa dérivent de différents ancêtres du type « thiol-disulfide oxidoreductase » qui ont dérivé parallèlement entre les GST cytosoliques d'une part et celles de classe Kappa d'autre part

(Ladner et al., 2004; Morel and Aninat, 2011), comme représenté dans la figure ci-dessous, respectivement par l'addition ou l'insertion d'un domaine

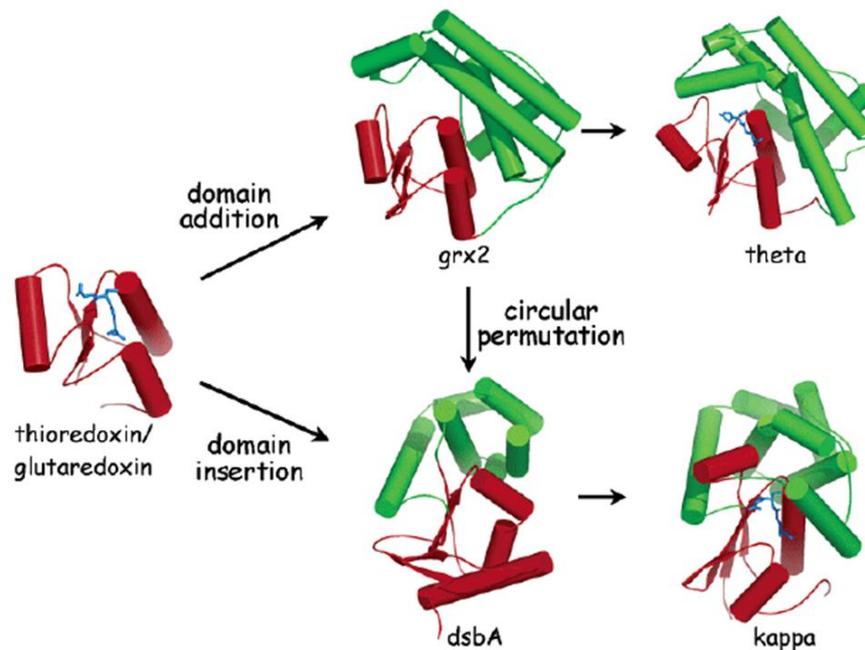


Figure 79 – Représentation des voies parallèles proposées pour l'évolution des GST cytosoliques (cf. vers Theta) par addition d'un domaine et GST Kappa (cf. vers Kappa) par insertion d'un domaine (ou permutation circulaire depuis l'intermédiaire de type DsbA-GRX2). Le motif thiorédoxine est représenté en rouge.

4) Evolution des GST membranaires (MAPEG)

L'évolution des MAPEG n'est pas ou peu connue (Frova, 2006), en dépit de la reconnaissance par la communauté des différentes classes de MAPEG décrite par (Bresell et al., 2005).

II. Structure et caractéristiques des différentes classes de GST

A. Structure et caractéristiques des GST cytosoliques

1) Structure des GST cytosoliques

Les données structurales ont eu un impact important sur la connaissance des mécanismes catalytiques et des bases moléculaires de la capacité de détoxification des GST et sur leur évolution. Les GST sont, le plus souvent, biologiquement actives sous forme de dimère constitué de sous unités dont la masse moléculaire varie entre 23 et 30 kDa (soit 200 à 250 acides aminés). Il existe néanmoins des exceptions pour lesquelles on observe des isoformes monomériques pour la classe de GST Lambda et chez les DHAR et des tétramères pour la GST canonique de *Plasmodium falciparum* (Deponte, 2013).

A ce jour, une douzaine de structures cristallines ont été obtenues et résolues à partir de GST de plantes, d'animaux et de bactéries. L'analyse globale de leur structure montre clairement que toutes les GST partagent un fort degré de conservation dans leur architecture tridimensionnelle, présentent des repliements similaires et une même organisation dimérique et ce, en dépit du fait, que leurs séquences primaires soient très divergentes.

Chaque sous-unité est composée de 2 domaines distincts : (i) un domaine N-terminal (domaine I) plutôt conservé constitué d'hélices α et de feuillets β contenant le site de fixation du glutathion ou site G formé par le motif thioredoxine et (ii) un domaine C-terminal (domaine II) variable constitué uniquement d'hélices α qui se compose d'un site variable de liaison des substrats électrophiles hydrophobes ou site H, qui dépend grandement du domaine II et qui est localisé au niveau de l'interface entre le domaine I et II (Deponte, 2013). Le domaine I et le domaine II sont reliés par une courte séquence d'environ 10 acides aminés.

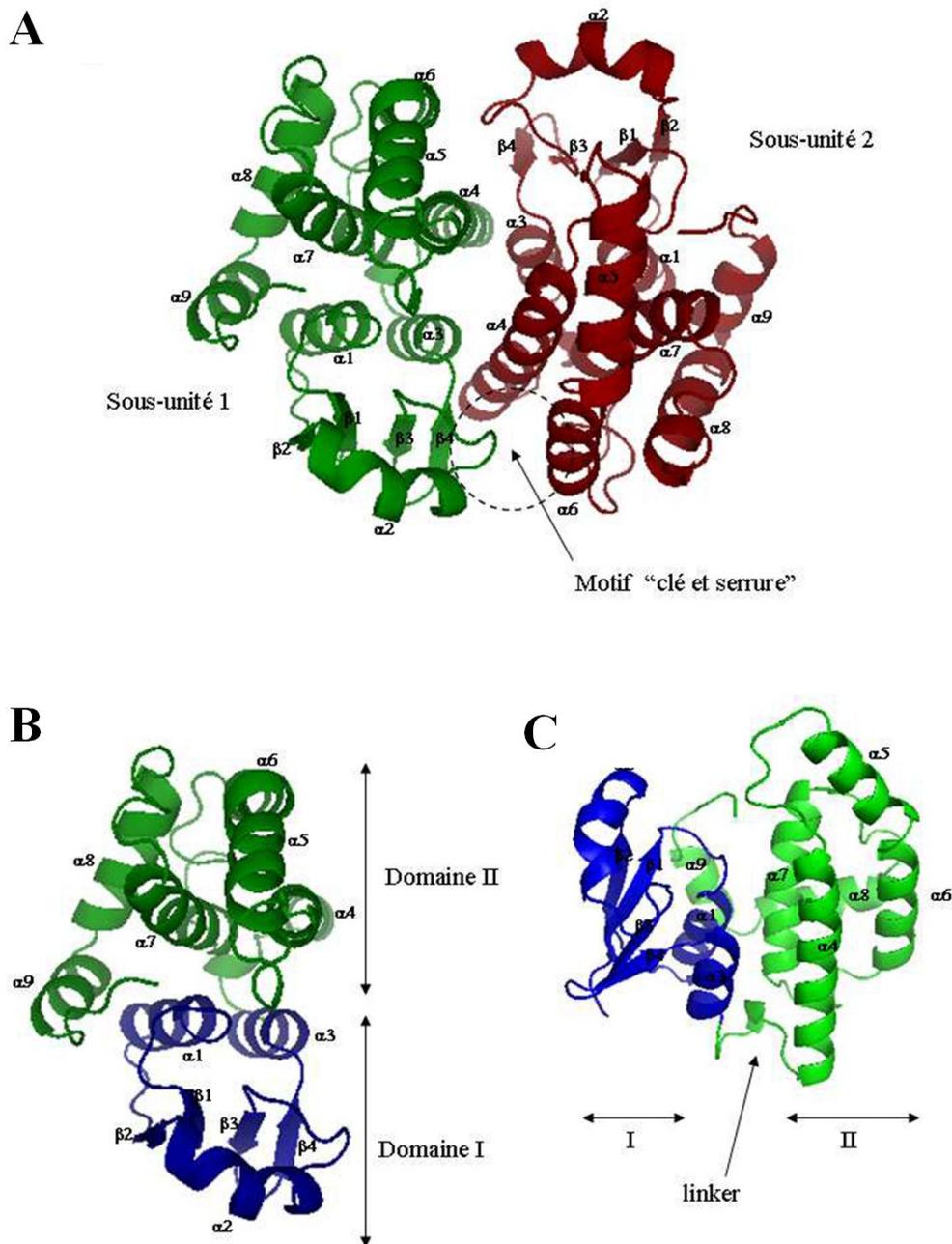


Figure 80 – Structure tridimensionnelle de la GST Sigma du rat indiquant le caractère dimérique de la plupart des GST cytosoliques et identifiant les domaines I et II (A) Vue du dimère par-dessus. (B) Vue du monomère par-dessus et latérale (C). Le motif thioredoxine est coloré en vert dans les panels (B) et (C).

a. Le motif thiorédoxine, un motif conservé du domaine I

Le domaine N-terminal (résidus 1 à 80 environ) adopte un repliement typique du motif thiorédoxine ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$), tel que représenté dans la figure ci-dessous, constitué de 2 motifs structuraux : la structure $\beta\alpha\beta$ ($\beta_1\alpha_1\beta_2$) en N-terminal et la structure $\beta\beta\alpha$ ($\beta_3\beta_4\alpha_3$) en C-terminal, reliés par une boucle contenant une hélice α (α_2).

Ces 2 motifs forment ensemble un feuillet β de 3 brins β parallèles ($\beta_1\beta_2\beta_4$) et d'un brin β antiparallèle (β_3) entouré par l'hélice α_2 d'un côté et par les hélices α_3 et α_4 de l'autre. Les 4 brins β sont dans le même plan, les 2 hélices α_1 et α_3 sont situées derrière ce plan et l'hélice α_2 se positionne en avant de ce plan. La boucle reliant l'hélice α_2 au brin β_3 contient une proline, très conservée dans toutes les classes de GST, non catalytique mais nécessaire au maintien de la structure protéique indispensable à l'activité des GST.

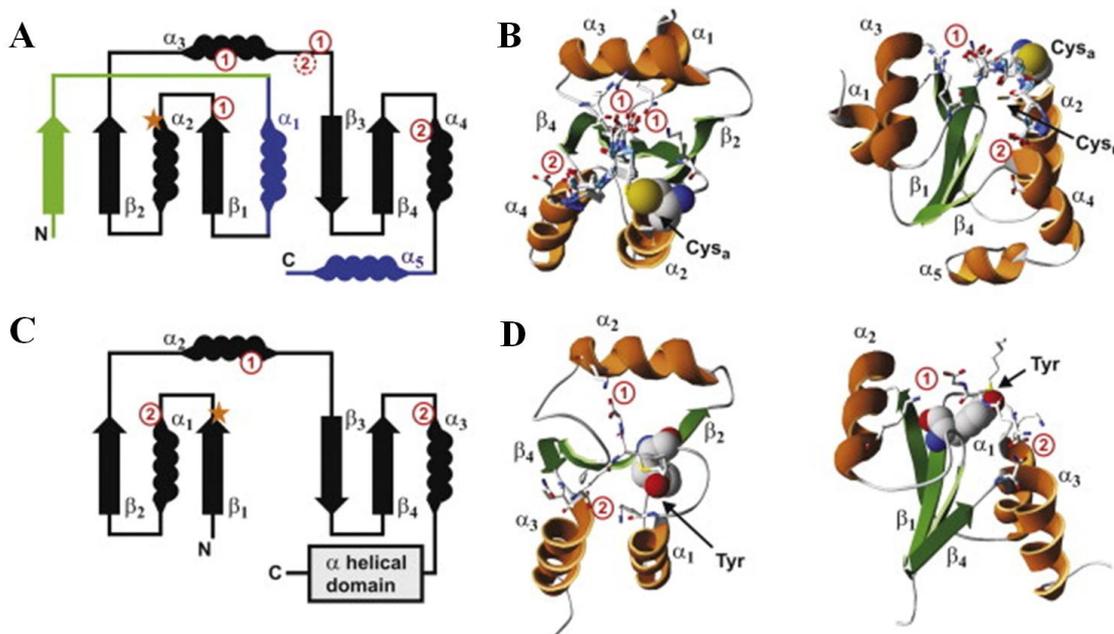


Figure 81 – Comparaison structurale entre la GRX1 humaine et une GST de *Plasmodium falciparum*

- (A) Architecture topologique de la GRX1 humaine. (B) Structure RMN de la GRX1 humaine glutathionylée avec 6c conformations du glutathion (PDB ID : 1B4Q). (C) Architecture topologique du domaine N-terminal d'un monomère d'une GST de *Plasmodium falciparum*. (D) Structure cristallographique du domaine N-terminal d'un monomère d'une GST de *Plasmodium falciparum*. En complexe avec le S-hexylglutathion (PDB ID : 2AAW).

Le motif thiorédoxine typique est représenté en noir.

Le repliement caractéristique de ce motif thiorédoxine est retrouvé non seulement dans le domaine N-terminal des GST mais également dans au moins 12 familles de protéines dont : les thiol-transférases (incluant les thiorédoxines et les glutarédoxines), les glutathion-peroxydases, les isomérases de ponts disulfures (protein disulphide isomerase-like), les calséquestrines, les phosducines, le domaine N-terminal des protéines ERP29 du réticulum endoplasmique, la protéine U5-15kD du spliceosome, la protéine DsbA et le domaine C-terminal de DsbC (respectivement disulphide-bond formation facilitator et disulphide-bond isomerase), les férredoxines 2Fe-2S thiorédoxines-like et l'arsenate réductase ArsC.

b. Le site catalytique des GST, une combinaison entre site G et site H

L'activité des GST repose sur leur capacité à conjuguer du glutathion sur des composés électrophiles hydrophobes. Il existe donc 2 sites de fixation par sous-unité. D'une part, le site de fixation du glutathion ou site G composé principalement des résidus du domaine I. D'autre part, le site de fixation du substrat électrophile hydrophobe ou site H majoritairement constitué de résidus non polaires du domaine II. Le site G et H forment le site actif de l'enzyme.

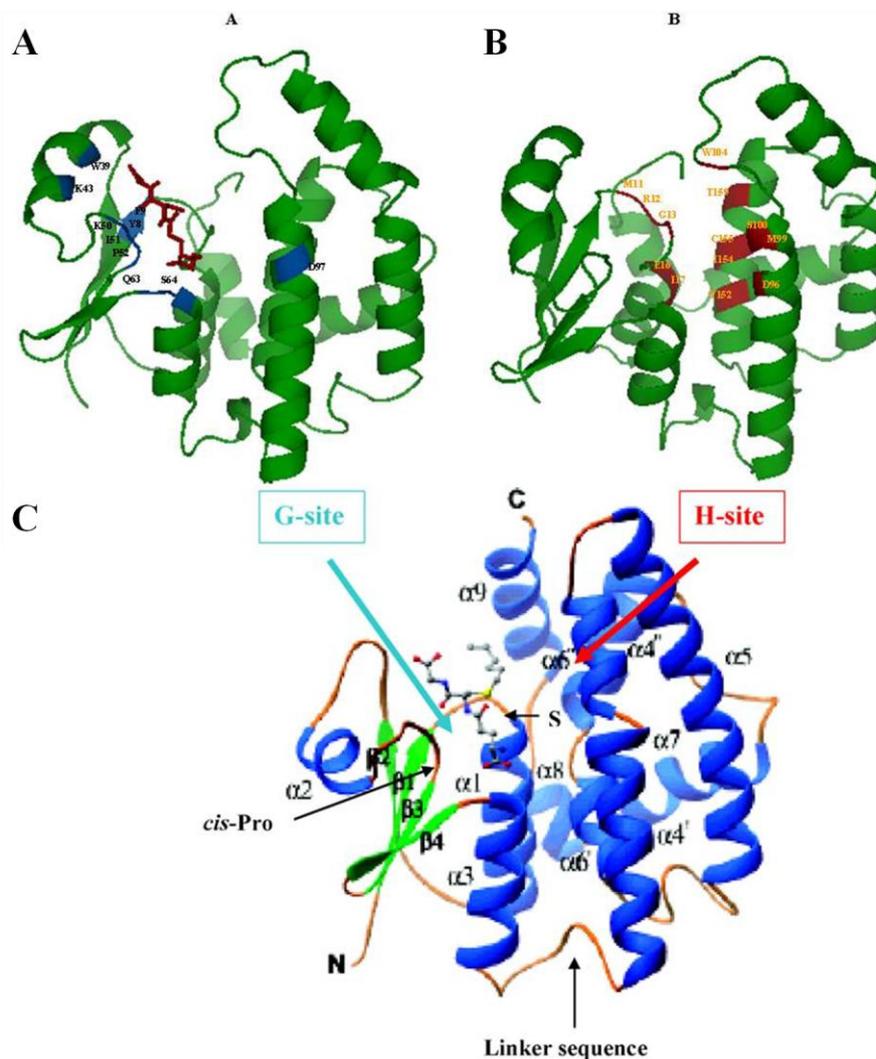


Figure 82 – Structure tridimensionnelle de la GST Sigma du rat montrant le site G en bleu (A) et le site H en rouge (B) & Structure tridimensionnelle d'un monomère de la GST Tau du blé (*TaGSTU4*) montrant les sites G et H (C)

i. Le site de fixation du glutathion ou site G

Le glutathion est lié aux GST dans une conformation étendue et présente son résidu γ -glutamyl vers l'interface du dimère, son résidu cystéinyl, porteur de l'atome de soufre, est orienté vers la sous-unité qui le fixe et le résidu glycyl est dirigé vers la surface de l'enzyme. La glutathion interagit avec la protéine au sein du site G par l'intermédiaire d'une dizaine d'interactions électrostatiques, comme représenté ci-dessous.

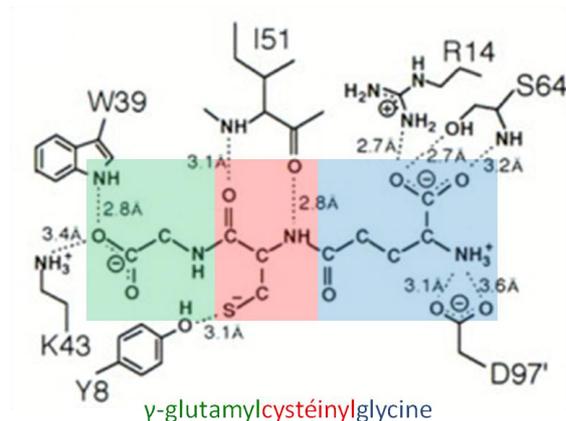


Figure 83 – Interactions entre le glutathion et le site de fixation du glutathion (site G) de la GST Sigma du rat (PDB ID : 1PD2)

L'orientation du glutathion est conservée dans toutes les classes de GST et seuls les résidus impliqués dans les liaisons hydrogènes varient. Toutefois, le domaine I étant relativement bien conservé, il comporte des résidus essentiels pour la fixation du glutathion et pour la catalyse enzymatique. Ainsi, le principal résidu « actif » dans le site G des GST soluble est soit une tyrosine (Tyr_a retrouvée dans les classes Alpha, Mu, Pi et Sigma), une sérine (Ser_a identifiée dans les classes Theta, Zeta et Phi) ou une cystéine (Cys_a chez les GST de classe Beta, Omega, Lambda et DHAR plante).

Par exemple, la tyrosine 7 est très conservée dans les classes Alpha, Mu, Pi et Sigma et joue le même rôle que la sérine 17 des classes ubiquitaires Theta et Zeta ou des classes spécifiques Phi et Tau. Le groupement hydroxyle (-OH) de la tyrosine et de la sérine permet de créer une liaison hydrogène avec le groupement thiol (-SH) du glutathion, formant et stabilisant ainsi un anion thiolate (GS⁻). Cet anion est très réactif et peut donc être la cible d'une attaque nucléophile par un substrat électrophile. Le rôle essentiel de ces 2 résidus (tyrosine ou sérine) dans la catalyse enzymatique a été démontré par mutagenèse dirigée. La mutation de la tyrosine 7 d'une GST porcine de classe Pi (Dirr et Reinemer 1991), de la sérine 11 d'une GST humaine de classe Theta (Tan et al. 1996), de la sérine 9 d'une GST Delta d'insecte (Caccuri et al 1997) et de la sérine 17 d'une GST Zeta chez *Arabidopsis thaliana* (Thom et al 2001) ont entraîné la perte de l'activité catalytique des enzymes.

Certaines classes de GST n'ont pas une tyrosine ou une sérine active dans le site G, mais une cystéine. Celle-ci induit la formation d'un pont disulfure avec le glutathion et non pas celle d'un anion thiolate (GS⁻). La présence d'une telle cystéine a été observée parmi les classes Beta, Lambda et Omega, pour la famille des DHARs et des CLICs et pour le glutarédoxines. Toutes ces enzymes n'ont qu'une faible activité ou une activité nulle de conjugaison du glutathion mais sont plutôt impliquées dans des réactions rédox grâce notamment à leur activité thiol-transférase ou réductase. Ainsi, les GST Omega présentent une activité de transfert du groupement thiol (-SH) et catalysent également la réduction du déhydroascorbate.

ii. Le site de fixation du substrat hydrophobe ou site H

A l'inverse du domaine I, le domaine II présente de grandes variations dans sa séquence et dans sa topologie. Ces variations sont à l'origine de la dimérisation des GST avec uniquement des sous-unités de même classe et de la diversité des substrats hydrophobes potentiels des GST. Dans la plupart des GST, on constate qu'à l'interface des 2 sous-unités, une crevasse en forme de V (V-shaped)

c. Le domaine II, un domaine variable

Le domaine II (résidus 87 à 210 environ) débute après les 10 résidus de la courte séquence la reliant au domaine I. Le domaine II est constitué d'un nombre variable d'hélices α (4 à 7) : on en dénombre 5 pour les GST de la classe Pi et Mu contre 6 pour la classe Alpha. La variabilité du domaine II explique en partie la spécificité plus ou moins large de substrat des différentes classes de GST ainsi que la dimérisation des GST avec uniquement des sous-unités de même classe.

i. Le domaine II, un domaine indispensable à la dimérisation

Pour toutes les GST, les 2 sous-unités interagissent selon un axe de symétrie radiale. L'interaction majeure s'établit entre le domaine I d'une sous-unité et le domaine I de l'autre et permet le maintien de la structure quaternaire. On distingue alors différents types d'interaction : (i) elles sont plutôt de nature hydrophiles chez les GST de classe Theta, Sigma, Beta et Tau et (ii) elles sont plutôt de type hydrophobes pour les classes Alpha, Mu, Pi, Omega et Phi.

L'interaction de type hydrophobe qui s'établit au niveau de l'interface des 2 sous-unités est caractérisée par un repliement de type « clé et serrure » (« lock and key ») (ref article GST). En effet, l'interaction s'établit entre un résidu aromatique de la première sous-unité (Phe52 pour la classe Alpha, Phe56 pour la classe Mu, Tyr49 pour la classe Pi), jouant le rôle de « clé » qui s'étend de la boucle précédant le brin β 3, qui s'introduit dans la « serrure » hydrophobe formée par les hélices α 4 et α 5 de la seconde sous-unité, formant une crevasse en forme de V accessible au solvant. L'interaction de type hydrophile a notamment été décrite pour une GST de classe Nu où des interactions ioniques s'opèrent entre les résidus Arg69 et Asp 89 (Schuller et al., 2005).

2) Les différentes classes de GST cytosoliques

Ici, je fais le choix délibéré de ne pas présenter les classes unes à unes et ce, pour plusieurs raisons : (i) une telle présentation reviendrait à faire un catalogue qui ne donnerai pas ou peu de sens, (ii) la redondance fonctionnelle des GST m'aurait obligé à présenter plusieurs fois des caractéristiques et des fonctions communes à différente classe de GST, comme le montre la figure ci-dessous dans laquelle les activités de différentes GST de plantes se chevauchent suggérant que la classification actuelle n'est pas suffisante pour présumer de la fonction d'une GST

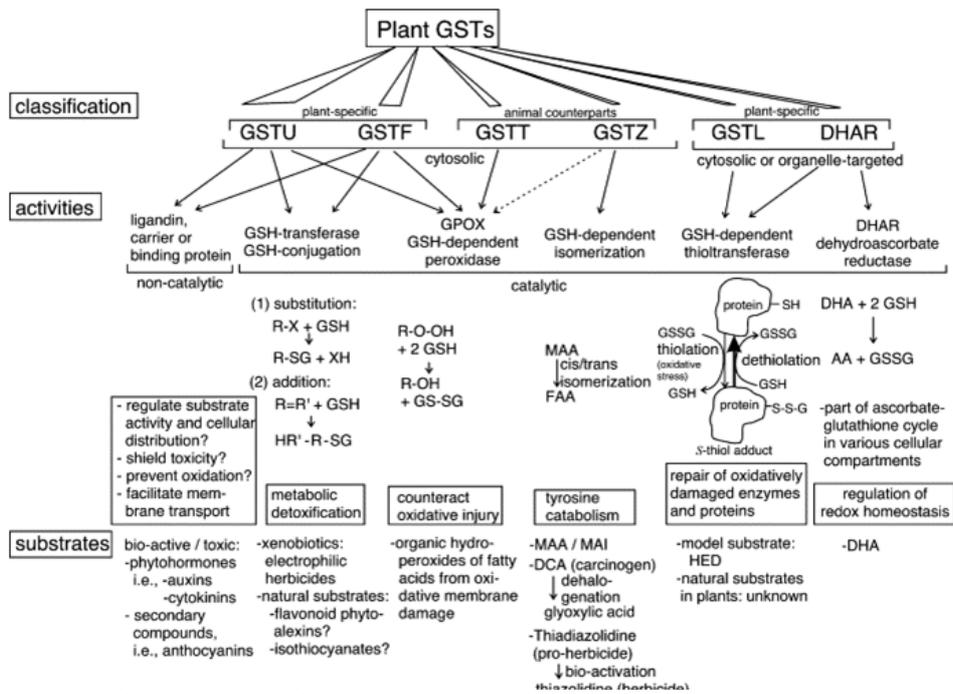


Figure 84 – Représentation schématique de la redondance fonctionnelle des GST de plantes
Tiré de (Moons, 2005)

La figure ci-contre a pour objectif de montrer la forte apparenté structurale de quelques GST cytosoliques. A l'inverse, le tableau ci-après tend à montrer les différences entre les différentes classes de GST afin de donner une vue globale en remplacement d'une description ponctuelle des caractéristiques majeures de chacune des classes.

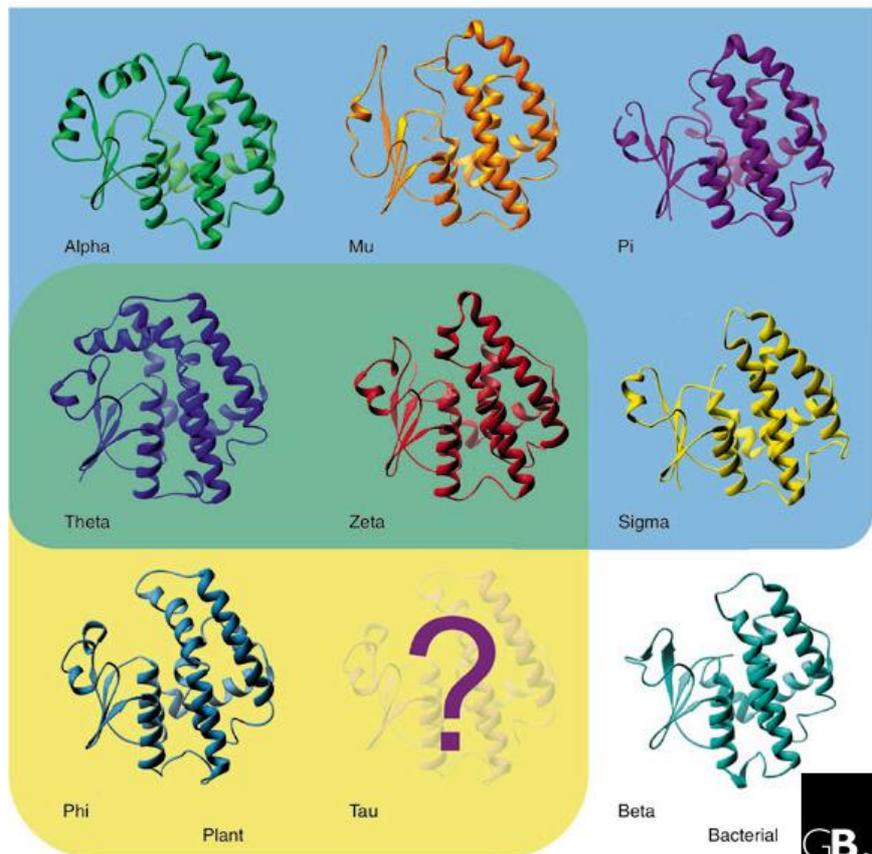


Figure 85 – Quelques structures tridimensionnelles de monomère représentatif des différentes classes de GST

Les GST spécifiques des mammifères, des plantes et des bactéries sont respectivement dans les encarts bleu, jaune et blanc.

			Origine	Classe		Domaine hélicoïdal	Oligomérisation	Résidu catalytique	Activité							
									GT	P	I	TT	DHAR	L	GHQR	
GST solubles	GST cytosoliques	Organismes dépendants	Mammifères	Alpha	A	C-ter	Dimère	Tyr	+	+	+	-	-	-	/	
				Mu	M	C-ter	Dimère	Tyr	+	+	+	-	-	-	/	
				Pi	P	C-ter	Dimère	Tyr	+	+	+	+	-	-	/	
			Animaux	Omega	O	C-ter	Dimère	Cys	±	-	-	+	+	/	/	
			Bactéries	Beta	B	C-ter	Dimère	Cys(Ser)	+			+	/	/	/	
			Champignons	Gamma	G	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
			Insectes	Delta	D	C-ter	Dimère	Ser	+	/	/	/	/	/	/	/
				Epsilon	E	C-ter	Dimère	Ser	+	/	/	/	/	/	/	/
			Plantes	Lambda	L	C-ter	Monomère	Cys	-	-		+	-	/	/	
				Tau	U	C-ter	Dimère	Ser	+	+	-	-	-	+	/	
		Phi		F	C-ter	Dimère	Ser	+	+	+	-	-	+	/		
		Nématodes	Nu	N	C-ter	Dimère	Tyr	+	±	-	-	-	+	/		
		Poissons	Rho	R	C-ter	Dimère	/	/	/	/	/	/	/	/		
		Non organisme dépendant	Mammifères, nématodes, plantes & bactéries	Zeta	Z	C-ter	Dimère	Ser	±	+	-	-	/	/	/	
			Animaux, poissons, plantes	Theta	T	C-ter	Dimère	Ser	±	+	-	/	/	/	/	
			Animaux, insectes, nématodes, algues rouges/brunes	Sigma	S	C-ter	Dimère	Tyr	+	±	+	-	-	-	/	
			Bactéries, champignons, plantes	Xi	X	C-ter	Dimère	Cys	/	/	/	/	/	/	+	
			Nouvelles classes	<i>Agrobacterium</i>	Eta	H	C-ter	Dimère	Arg	+	+	-	-	-	/	/
		<i>Physcomitrella</i>		Iota	I	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
		Cyanobactérie		Chi	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
GST mitochondriales	Kappa		Entre C-ter/N-ter	Dimère	Ser	+	+	/	/	/	/	/				

GT : GSH-transférase, P : Peroxydase GSH-dépendante, I : Isomérase GSH-dépendante, DHAR : Déhydroascorbate réductase, L : Ligandine, GHQR, Glutathionyl-hydroquinone réductase

Tableau 14 – Principales caractéristiques structurales et catalytiques des différentes classes de GST
 Les classes « GST-like » du type CLIC, DHAR, Ure2, eE1FB γ , ne sont pas détaillées ici par souci de clarté.

B. Structure et localisation des GST mitochondriales

Bien que les GST Kappa présentent une activité de conjugaison sur des substrats modèles en commun avec les GST cytosoliques, la structure et la localisation mitochondriale en fait une classe à part.

1) Structure des GST Kappa

La comparaison des séquences protéiques entre GST Kappa et GST cytosoliques montrent que les GST Kappa n'ont pas d'homologie avec les GST cytosoliques mais sont plutôt proche de la protéine DsbA de *E. coli* et des HCCA bactériennes (2-hydroxychromène-2-carboxylate isomère) (Ladner et al., 2004; Robinson et al., 2004) confirmant ainsi le modèle d'évolution proposé précédemment.

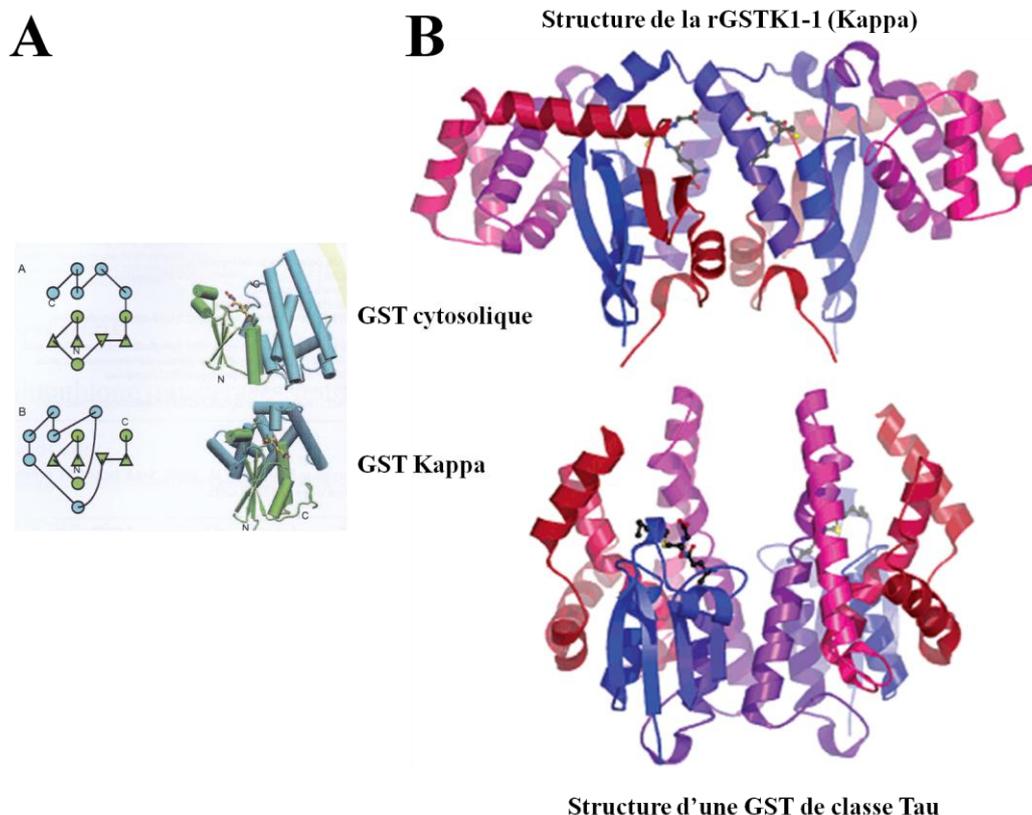


Figure 86 – Comparaison des structures des GST cytosoliques aux GST de classe Kappa
(A) Topologie et structure des GST montrant le motif thiorédoxine en vert et le domaine hélicoïdal en bleu ajouté en C-terminal chez les GST cytosoliques et inséré entre le domaine C-terminal et N-terminal du motif thiorédoxine chez les GST Kappa. (B) Structure du dimère de la GST rGSTK1-1 du rat en complexe avec le GSH et d'une GST de classe Tau en complexe avec le S-hexyl-GSH. Adapté de (Ladner et al., 2004; Oakley, 2011)

Comme représenté dans la figure ci-avant, les GST de classe Kappa présentent leur domaine II hélicoïdal entre les structure $\beta\alpha\beta$ N-terminales et $\beta\beta\alpha$ C-terminales du motif thiorédoxine alors que ce domaine II est situé en aval du motif thiorédoxine pour les GST cytosoliques. A l'inverse de la séquence primaire divergente, l'alignement des structures secondaires fait converger les GST Kappa avec les GST cytosoliques Theta dont les sites de dimérisation sont similaires (Ladner et al., 2004; Li et al., 2005).

2) Localisation et conséquence fonctionnelle des GST Kappa

a. Localisation

Les GST mitochondriales ou de classe Kappa, comme leur nom l'indique sont présentes dans les mitochondries et plus précisément dans la matrice mitochondriale (Morel and Aninat, 2011). Elles ont également été localisées dans les peroxysomes (Morel et al., 2004; Morel and Aninat, 2011). Leur localisation est discutée au regard de leurs activités.

b. Activités

En effet, le tableau ci-dessous montre que les GST Kappa ont des activités de conjugaison sur le substrat modèle CDNB mais aussi sur le *n-tert*-butylhydroperoxyde et le cumene hydroperoxyde, des substrats qui caractérisent une activité de détoxification des lipides peroxydés (Morel and Aninat, 2011). De plus, les GST Kappa possèdent une activité peroxydase GSH-dépendante. Or, la chaîne respiratoire mitochondriale et le métabolisme des lipides dans les peroxysomes sont des sources majeures de ROS et de lipides peroxydés. Les GST Kappa pourraient donc avoir un rôle dans la détoxification des lipides peroxydés.

Tableau 15 – Activités de GST de classe Kappa

Substrat	Activité spécifique (en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)		
	mGSTK1	rGSTK1	hGSTK1
CDNB	154,8 \pm 25	54,4 \pm 17	7,4 \pm 17
<i>n-tert</i> -butylhydroperoxyde	0,03 \pm 0,01	< 0,01	0,1 \pm 0,02
Cumene hydroperoxyde	1,05 \pm 0,04	0,09 \pm 0,02	0,2 \pm 0,03

Moyenne \pm écart-type de 3 essais

Tiré de (Morel and Aninat, 2011)

Enfin, la délétion des gènes *gstk-1* et *gstk-2* chez le *C. elegans* provoque une diminution de la respiration et du niveau en acide gras monosaturés suggérant un rôle des GST Kappa dans le métabolisme énergétique des lipides, fonctions justement assurées par les mitochondries et les peroxysomes (Morel and Aninat, 2011).

C. Structure et localisation des GST membranaires ou MAPEG

1) Structure des MAPEG

La structure des MAPEG n'est pas connue pour tous ces membres. Je prendrai donc ici l'exemple de la LTC₄ synthase (LTC₄S) qui reste le mieux décrit.

a. Structure de la LTC₄ synthase

Le premier élément à noter que les MAPEG présentent toutes des domaines transmembranaires. La comparaison du profil d'hydrophobicité de plusieurs MAPEG va d'ailleurs dans ce sens (Jakobsson et al., 1999). La résolution de la structure 3D de la LTC₄ synthase a d'ailleurs confirmé cela, puisque cette protéine possède 4 hélices transmembranaires (voir figure-ci dessous).

La cristallographie aux rayons X montre que la LTC₄S est un homotrimère comme attendu d'après la cristallisation bidimensionnelle et les études cristallographiques pour LTC₄S ainsi que mGST1 (Holm et al., 2002) et mPGE2S. Pour un monomère de LTC₄S, il y a 5 hélices α , dont 4 sont transmembranaires (hélices I, II, III et IV). L'hélice V s'extrude dans le solvant. Les extrémités N- et C-terminales d'un monomère sont orientés du même côté de la membrane.

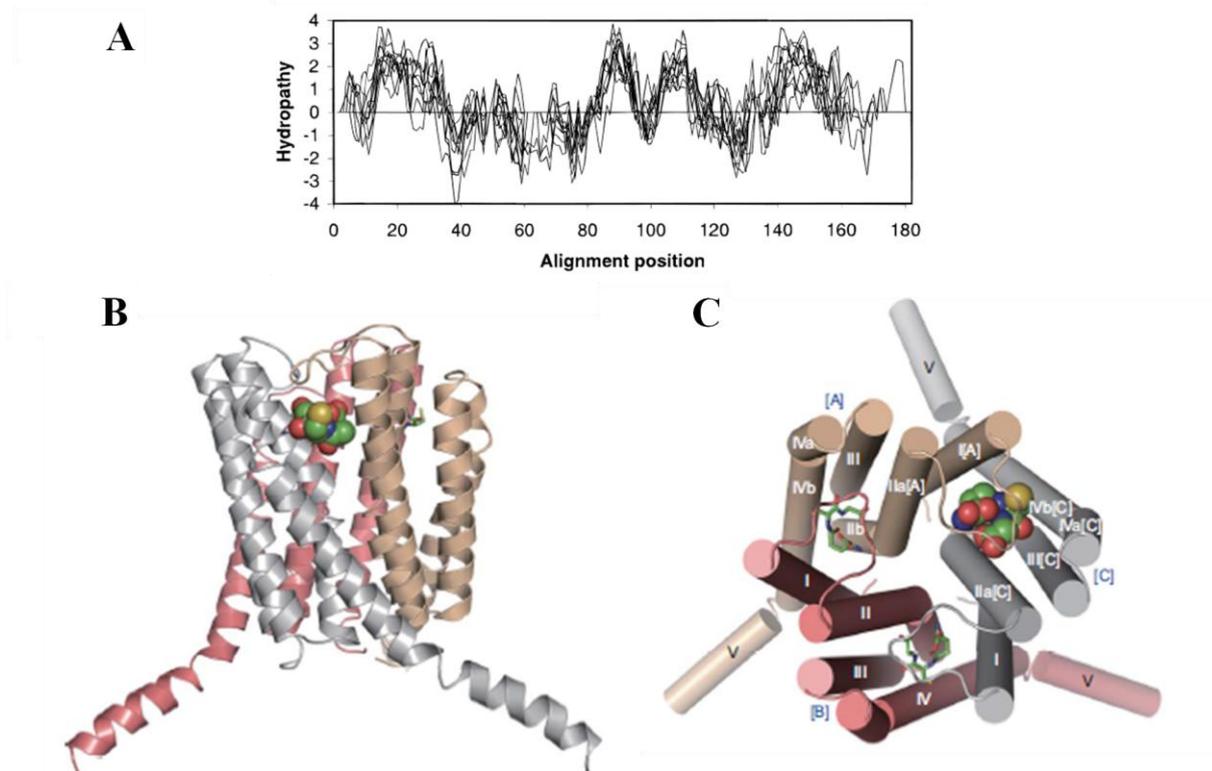
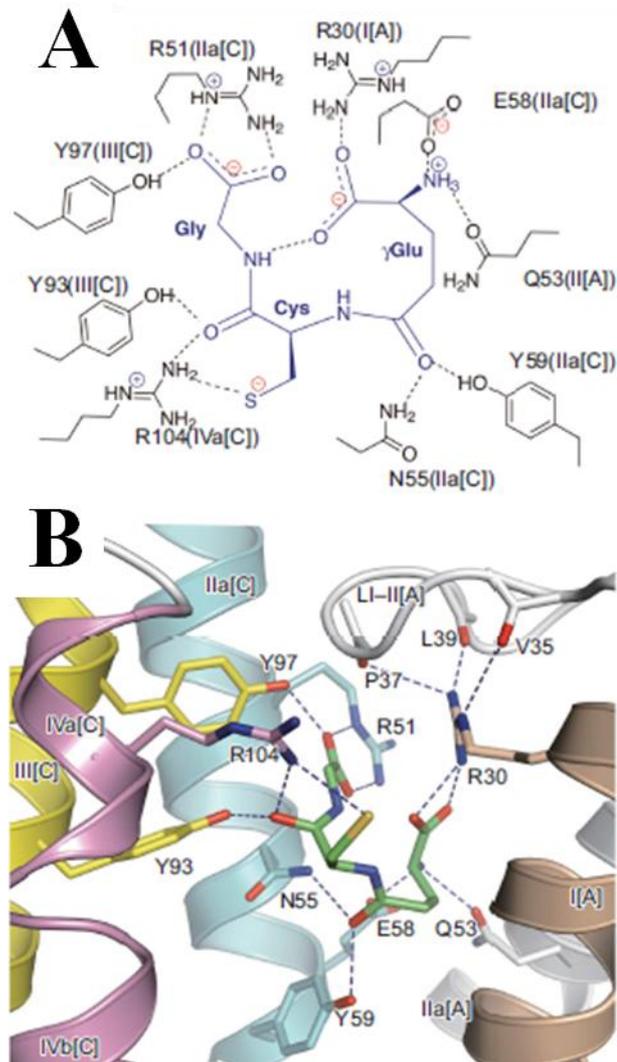


Figure 87 – (A) Comparaison du profil d'hydrophobicité de plusieurs MAPEG et Structure de la LTC₄ synthase vue de côté (B) et vue du dessus (C)
Adapté de (Jakobsson et al., 1999; Ago et al., 2007)

b. Site de fixation du glutathion

Contrairement aux GST cytosoliques où le GSH est en conformation tendu, le GSH est ici en forme de U et forme de nombreuses interactions de type liaison hydrogène comme représenté ci-dessous.



2) Localisation et conséquences fonctionnelles des MAPEG

a. Localisation

L'acronyme des MAPEG est trompeur car ces protéines ne sont pas associées à la membrane mais sont de véritables protéines transmembranaires en accord avec leur profil d'hydrophobicité montrant la présence de 4 hélices transmembranaires et de la structure de la LTC₄ synthase décrite précédemment.

En terme de localisation, les MAPEG de mammifères sont localisés au niveau de l'enveloppe nucléaire et sont généralement colocalisés comme c'est le cas pour la LTC₄ synthase et une mGST (Surapureddi et al., 2000).

b. Activités des MAPEG

Le tableau ci-dessous donne un aperçu des activités des MAPEG humaines. Leurs activités peroxydase est en accord avec leur localisation membranaire, leur préférence en termes de substrats (dérivés lipidiques) et leur rôle dans la synthèse de lipoides complexes et dans la gestion de la peroxydation lipidique.

Tableau 16 – Activités des MAPEG humaines

Gene symbol	Name	Properties	Acc. no.
FLAP	5-Lipoxygenase activating protein	Activation of cellular leukotriene biosynthesis	M60470
LTC ₄ S	Leukotriene C ₄ synthase	Glutathione S-transferase specific for LTA ₄	U09353, U11552
MGST1	Microsomal glutathione S-transferase 1	Glutathione S-transferase Glutathione peroxidase	J03746
MGST1-L1	Microsomal glutathione S-transferase 1-like 1	Induced by p53	AF010316, AF027740
MGST2	Microsomal glutathione S-transferase 2	Glutathione S-transferase Glutathione peroxidase	U77604
MGST3	Microsomal glutathione S-transferase 3	Glutathione S-transferase Glutathione peroxidase	AF026977

Tiré de (Jakobsson et al., 1999)

III. Activités et fonctions des GST

A. Les différentes activités des GST

Les GST possèdent une variété de d'activité qui explique en partie leur capacité à agir sur une multitude de substrats. Parmi ces activités, on distingue :

- les activités non catalytiques : ligandine
- les activités catalytiques :
 - o dédiées à la détoxification
 - activité GSH-transférase
 - activité peroxydase GSH-dépendante
 - activité DHAR
 - o dédiées au métabolisme : activité GSH-isomérase
 - o dédiées à la protection et à la régulation de l'homéostasie des thiols
 - activité thiol-transférase : glutathionylation et/ou déglutathionylation

1) Les activités non catalytiques des GST

En plus de leur activité catalytique de conjugaison du glutathion, les GST peuvent jouer le rôle de protéine de transport ou ligandine. L'activité ligandine a originellement été identifié comme une protéine cytoplasmique se liant à divers composés (bilirubine, hème, xénobiotique, stéroïdes...). L'activité ligandine des GST est intéressante car elle participe à la séquestration intracellulaire et au transport des xénobiotiques et des hormones. Le site de fixation du ligand varie et la première démonstration de cette fixation fut réalisée avec la détermination de la structure d'une GST de classe Mu issu de *Schistosoma japonica* où le ligand se trouva en dehors des sites G et H. D'autres sites furent identifiés au niveau N-terminal à la fin du feuillet $\beta 2$ d'une GST Pi humaine ou au niveau du site de dimérisation pour une GST Alpha (Oakley, 2011).

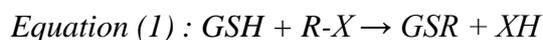
L'activité ligandine des GST permet notamment le transport intracellulaire de stéroïdes, de la bilirubine, des hèmes et des sels biliaries dans les cellules animales (Oakley, 2011). Chez les plantes, les GST Tau et Phi ont respectivement une activité ligandine sur les anthocyanines et sur les auxines/cytokinines. Cette fixation non-enzymatique pourrait d'ailleurs assurer un stockage temporaire de l'hormone et moduler ainsi son activité (Moons, 2005).

2) Les activités catalytiques des GST

a. Les activités dédiées à la détoxification

i. L'activité GSH-transférase (conjugaison et réduction)

Bien que les GST soient classiquement décrites comme des enzymes catalysant cette réaction de conjugaison, elles possèdent néanmoins d'autres activités catalytiques que nous décrirons ci-après et pour lesquelles les réactions catalysées suivent ce schéma réactionnel de base qu'est la réaction de conjugaison représentée ci-dessous :



La réaction de conjugaison se réalise entre la glutathion (GSH) et un substrat électrophile, noté R-X, c'est-à-dire un composé chimique, le plus souvent hydrophobe, pour lequel il manque des électrons qu'il est ainsi susceptible d'attirer. Cette réaction forme un conjugué noté GSR et libère XH. D'un point de vue chimique, cette réaction est une attaque nucléophile sur un composé électrophile. Elle repose donc sur l'attaque d'un anion ou d'une molécule ayant un doublet non liant libre sur un atome de carbone appauvri en électron pour engager une liaison dative avec l'atome de carbone ainsi attaqué.

On distingue alors 2 cas :

- (i) la substitution nucléophile, dans laquelle la fixation par liaison dative du réactif nucléophile (ici l'atome d'iode I⁻) via une attaque nucléophile sur l'atome de carbone impose le départ nucléofuge du substituant initial (ici l'atome de chlore Cl). Le départ nucléofuge du substituant est un départ au cours duquel la liaison ou doublet liant formé entre l'atome de carbone et son substituant est arraché à l'atome de carbone et restitué au substituant, désormais libre, sous forme d'un doublet non liant.

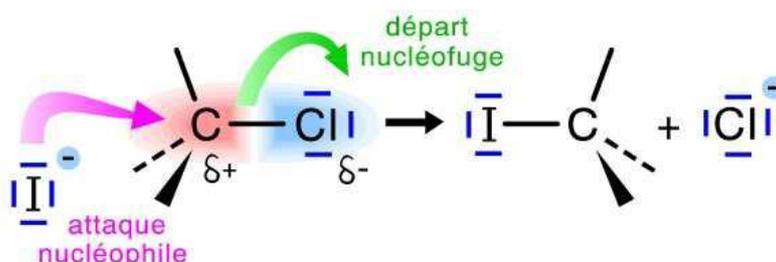


Figure 89 – Représentation schématique du mécanisme de la substitution nucléophile

- (ii) et l'addition nucléophile sur le groupement carbonyle, pour laquelle la fixation par liaison dative du réactif nucléophile via une attaque nucléophile sur l'atome de carbone nécessite la rupture de la double liaison. Ce type de mécanisme est mis en jeu lors de réaction d'isomérisation catalysée par les GST et non pas une réelle réaction de conjugaison puisqu'il se forme un conjugué transitoire permettant le déplacement d'électrons et l'isomérisation du substrat R-X.

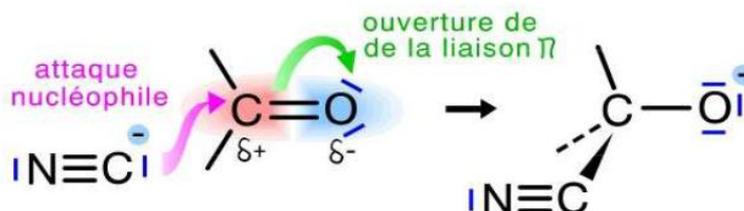


Figure 90 – Représentation schématique du mécanisme de l'addition nucléophile

Grâce à cette activité GSH-transférase, les GST réalisent des réactions de conjugaison et de réduction pour lesquels plusieurs mécanismes catalytiques ont été décrits en fonction de la nature du substrat considéré. Parmi ces substrats, le CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène) est devenu le substrat par excellence pour caractériser les réactions de conjugaison des GST en raison de sa forte réactivité avec de nombreuses isoformes de GST et de son coefficient d'extinction molaire élevée ($9,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 340 nm) (Deponte, 2013). La structure et les propriétés du CDNB sont présentées dans la figure ci-après.

D'autres substrats artificiels ont été utilisés pour étudier les mécanismes catalytiques des GST et en particulier des substrats aromatiques et non aromatiques pour lesquels les mécanismes sont radicalement différents. On distingue ainsi 3 types de mécanismes en fonction de la nature physico-chimique du substrat modèle :

- un mécanisme de substitution aromatique nucléophile (S_{N2Ar}) avec un mécanisme d'addition-élimination (pour les substrats aromatiques comme le CDNB),
- un mécanisme de simple ou de double substitution nucléophile (S_{N2}) avec un atome de carbone (C), d'oxygène (O) ou de soufre (S) comme centre électrophile (pour les substrats non aromatiques avec un centre réactionnel électrophile sp^3 -hybride comme les haloalkanes, les hydroperoxydes (dont le H_2O_2) et les thiols (comme le HED)). Pour les Cys-GST avec des substrats du type thiols (Pr-S-SG ; Pr-S-S-Pr...) et hydroperoxydes, le mécanisme pourrait être similaire aux GRX et aux GPX, ce qui inclut la formation d'un lien covalent avec le résidu Cys catalytique ensuite régénéré par le GSH,
- un mécanisme d'addition nucléophile (de Michael) (pour les substrats non aromatiques avec un centre réactionnel électrophile sp^2 -hydride comme le 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)).

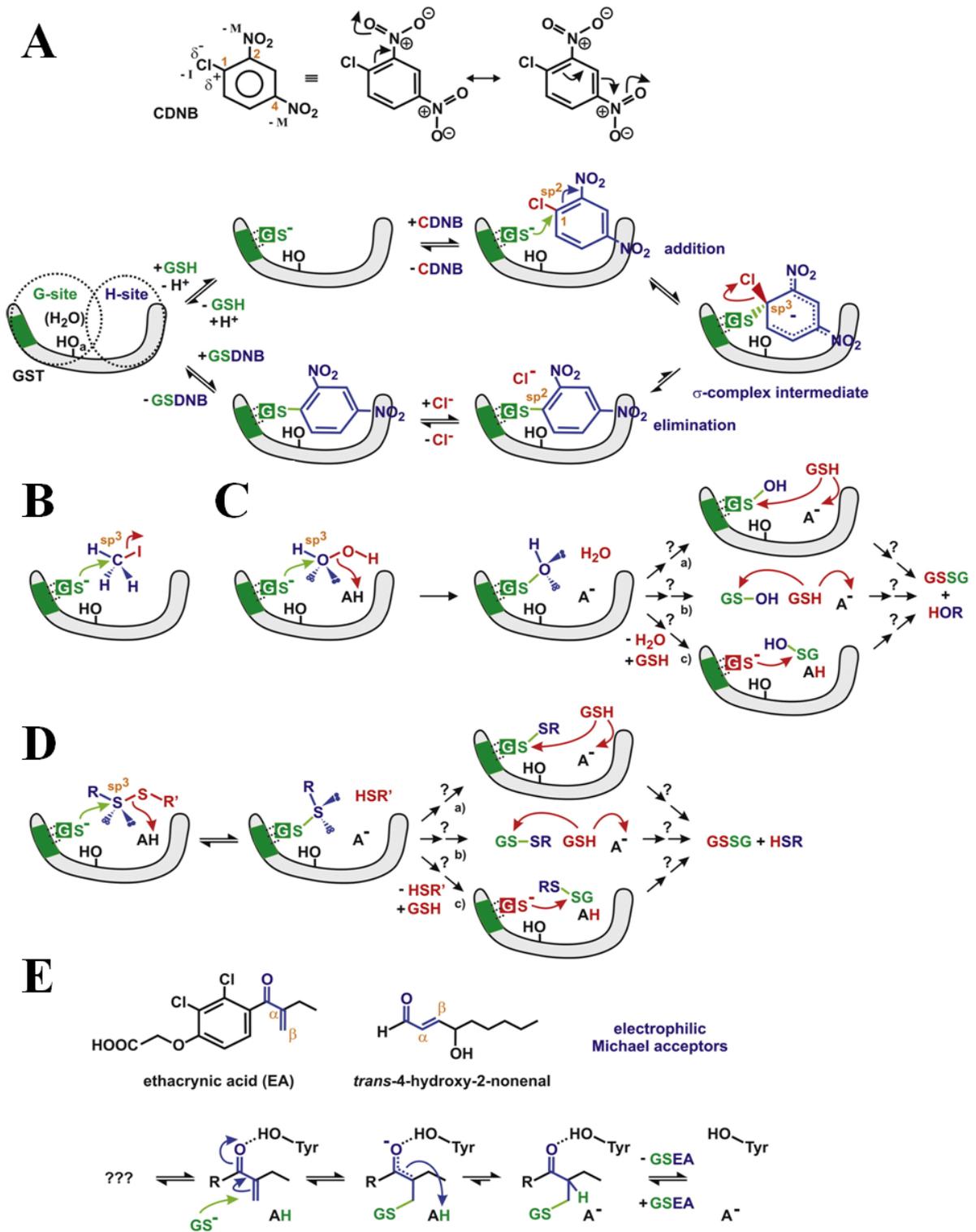


Figure 91 – Représentation schématique des différents modèles catalytiques des réactions de conjugaison et de réduction des GST en fonction du substrat

(A) Structure et propriété du CDNB & Mécanisme substitution aromatique nucléophile S_{N2Ar} avec le CDNB. (B) Mécanisme de simple (B) et de double (C) substitution nucléophile S_{N2} respectivement avec l'iodométhane (B) et le peroxyde d'hydrogène (C). (D) Mécanisme de double substitution nucléophile S_{N2} avec un thiol de type (R-S-S-R'). (E) Mécanisme d'addition nucléophile avec des accepteurs électrophiles de Michael.

Tiré de (Deponte, 2013)

ii. *L'activité peroxydase GSH dépendante*

L'activité GPX (GSH-dependent peroxidase) a été décrite pour la glutathion peroxydase. En raison de la conservation du motif thiorédoxine, il a été proposé que les GST présentent un mécanisme similaire à celui présenté dans la figure ci-dessous.

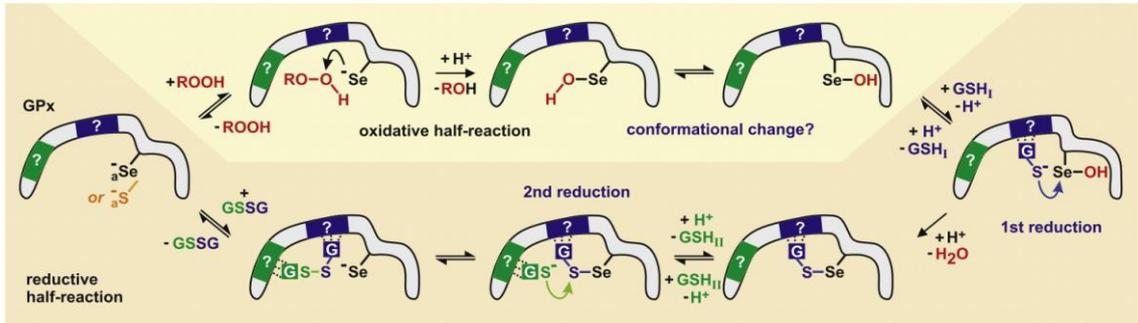
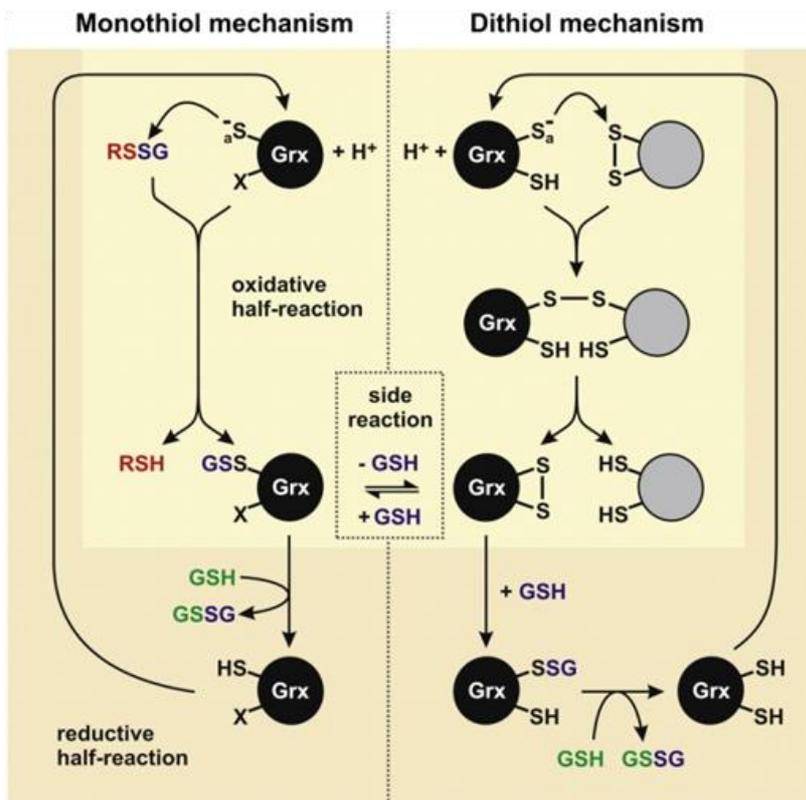


Figure 92 – Modèle catalytique de l'activité glutathion peroxydase

Le site actif contient soit une sélénocystéine ou une cystéine déprotoné (ici noté Se). Un changement conformationnel aurait lieu à la fin de la demi-réaction rédox (oxydation : oxidative half-reaction), suivie par 2 demi-réactions rédox réduction. Les sites de fixation du GSH dépendant des isoformes des GPX, leur représentation est accompagnée d'un point d'interrogation.

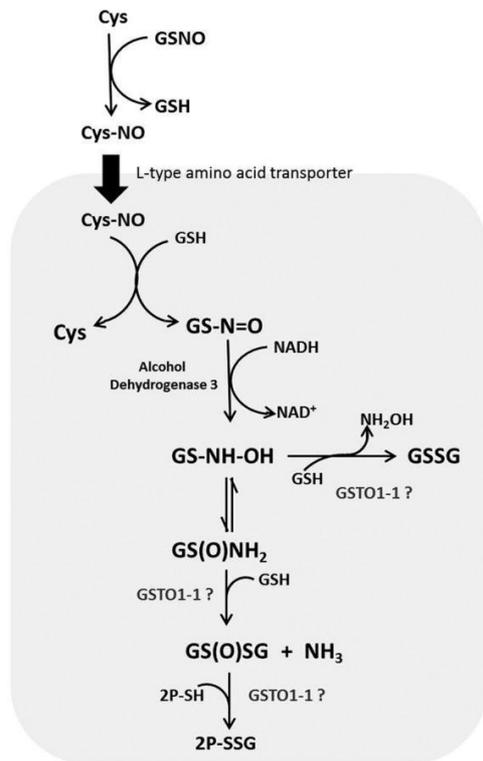
b. *Les activités dédiées à l'homéostasie des thiols et à la régulation*

i. *L'activité thiol-transférase*



L'activité thiol-transférase des GST n'est pas encore décrite mais comme pour l'activité GPX, la conservation du motif thiorédoxine peut probablement indiquer que les mécanismes monothiol et dithiol des GRX a été conservé chez les GST et ce d'autant plus que le modèle actuellement admis sur l'évolution des GST fait des GRX un patron ancestral aux GST. Ainsi, la représentation schématique ci-dessous donne le modèle traditionnel de ces mécanismes.

Figure 93 – Modèle traditionnel de la catalyse des GRX



Ainsi, les GST de classe Omega sont impliquées dans la glutathionylation en réponse à la nitrosylation des protéines (voir figure ci-contre. Un modèle a également été proposé pour une activité de déglutathionylation catalysée par les GSTO (pour revue (Board and Menon, 2016)).

Figure 94 – Représentation schématique de l'implication des GSTO dans la glutathionylation en réponse à la nitrosylation

ii. L'activité DHAR

L'activité DHAR (déhydroascorbate réductase) est impliquée dans le cycle ascorbate-glutathion, une voie métabolique de détoxification du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Cette voie implique une ascorbate peroxydase qui réduit le H₂O₂ en eau (H₂O) au moyen de l'ascorbate (ASC) comme donneur d'électron. Le radical monodéshydroascorbate (MDA) qui en résulte se dismute en ASC et en déshydroascorbate (DHA) grâce à la monodéshydroascorbate réductase NADH dépendante (MDAR). Le DHA est alors ensuite réduit par la DHAR qui nécessite l'oxydation concomitante du GSH en GSSG. Le glutathion oxydé est alors converti en GSH par la glutathion réductase (GR).

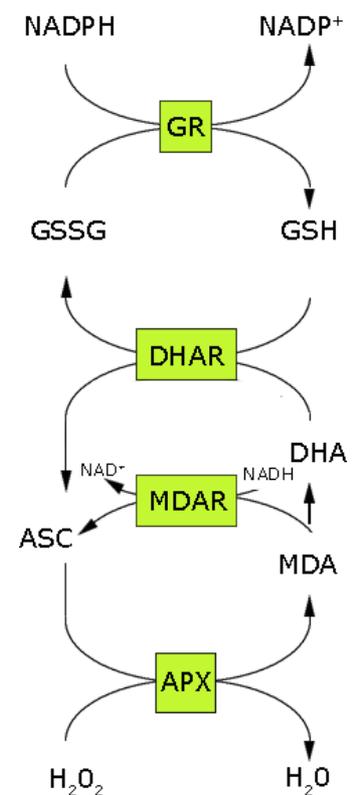


Figure 95 – Représentation schématique du cycle ascorbate-glutathion

c. Les activités dédiées au métabolisme

Les GST catalysant des réactions d'isomérisation avec 3 mécanismes : (i) par déplacement de double liaison carbone-carbone, (ii) par réaction rédox intramolécule et (iii) par isomérisations *cis-trans*, dont un schéma propose une représentation ci-dessous.

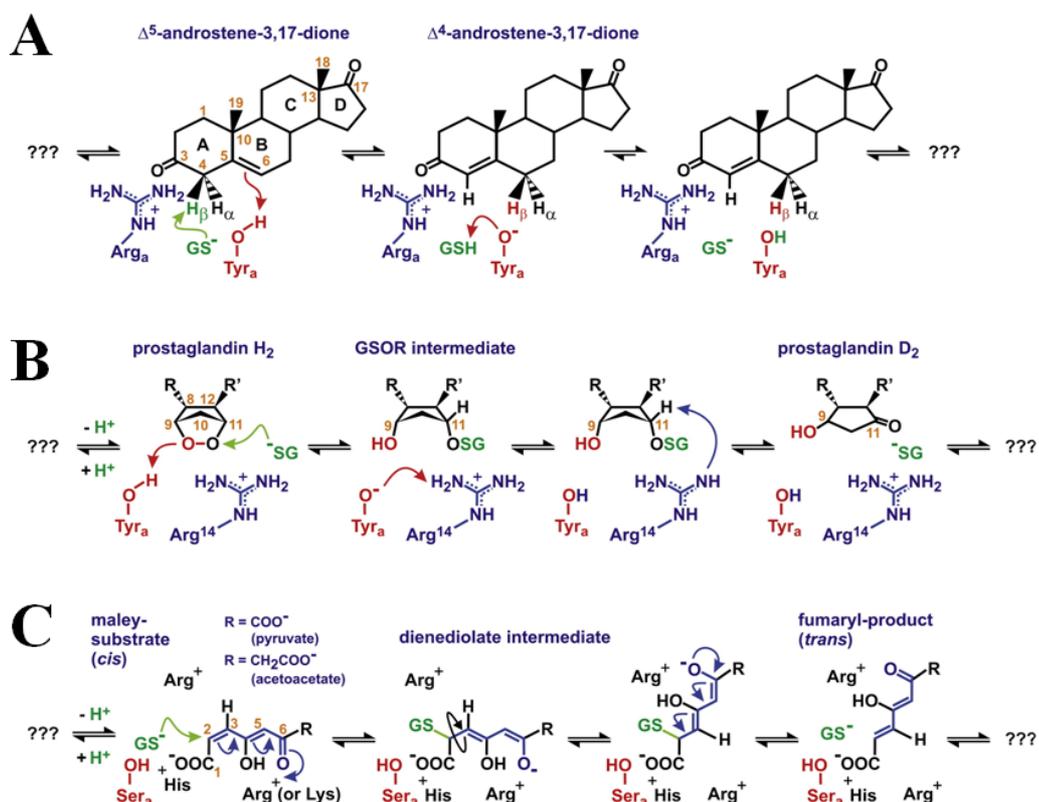


Figure 96 – Représentation schématique des mécanismes d'isomérisation catalysés par les GST
 (A) Modèle mécanistique d'isomérisation par déplacement de double liaison carbone-carbone d'un stéroïde catalysé par la GST A3-3. (B) Modèle mécanistique de réaction rédox intramolécule d'une prostaglandine catalysé par la GST S1-1 (et des GST de classe Sigma). (C) Modèle mécanistique d'isomérisation *cis-trans* des maleylacetoacetate isomérase ou GST de classe Zeta. Tiré de (Deponte, 2013)

3) Mécanisme enzymatique des GST de type MAPEG

Les activités et les mécanismes des MAPEG peuvent également être classés en (i) réactions de conjugaison-réduction d'une part et en (ii) réactions d'isomérisation d'autre part. En effet, bien que la structure et les résidus catalytiques soient radicalement différents des GST cytosoliques, les principes et les limites des modèles sont applicables au MAPEG. On retrouve donc des mécanismes analogues : (i) de conjugaison-réduction par substitution nucléophile simple et/ou double S_N2 et aromatique S_{N2Ar} et (ii) d'isomérisation par réaction rédox intramolécule, comme représenté dans l'exemple ci-après.

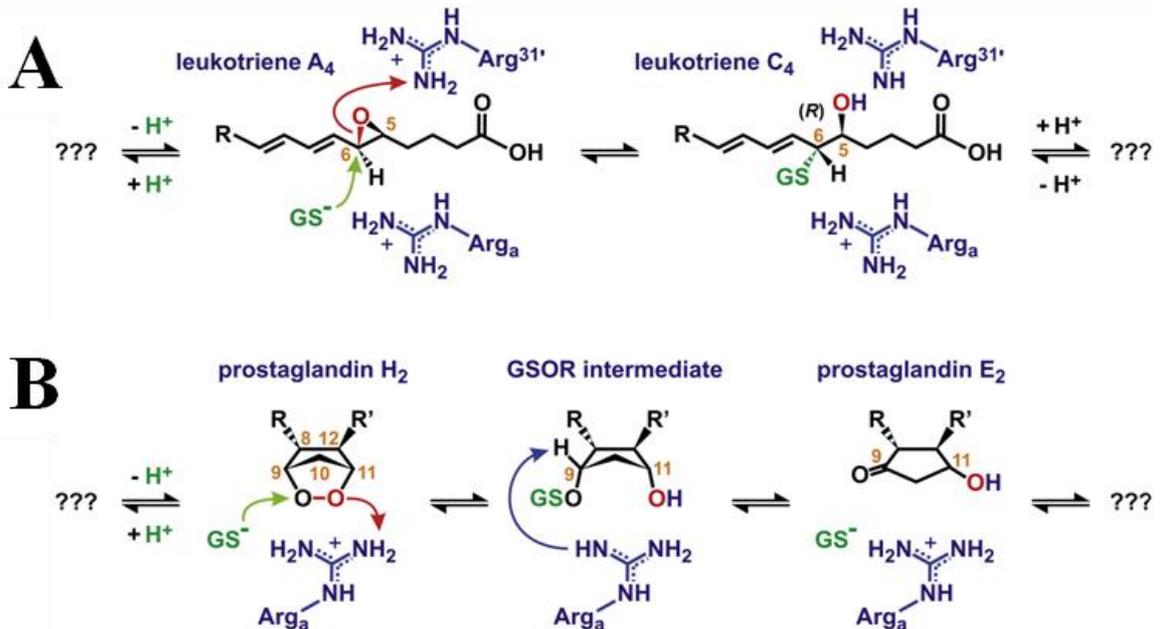


Figure 97 – Modèle préliminaire des mécanismes catalytiques des MAPEG

(A) Cas de la conjugaison du leucotriène A₄ formant le leucotriène C₄ (LTC₄) par la LTC₄ synthase. (B) Cas de l'isomérisation de la prostaglandine H₂ en prostaglandine E₂ (PGE₂) par la PGE₂ synthase.

B. Les différentes fonctions des GST

Il est classiquement admis que les GST sont impliquées dans la détoxification des xénobiotiques. Néanmoins, elles présentent d'autres fonctions et interviennent ainsi dans :

- le métabolisme des composés exogènes (ou xénobiotiques) :
 - détoxification des xénobiotiques
 - bioactivation des xénobiotiques
- le métabolisme de composés endogènes
 - détoxification des produits du stress oxydant :
 - détoxification des ROS
 - homéostasie des thiols et réparation des protéines oxydées
 - synthèse/dégradation de composés endogènes : dégradation des acides aminés aromatiques, synthèse des hormones stéroïdiennes et des écosanoïdes
- le transport, l'adressage et la régulation
 - activité ligandine
 - rôle intégré et régulateur

1) Métabolisme des xénobiotiques

a. Détoxification des xénobiotiques

La détoxification correspond à l'ensemble des biotransformations que subissent des composés endogènes ou exogènes en vue de leur élimination par l'organisme. On distingue alors la détoxification des composés endogènes de celle des composés exogènes.

Dans le cas de composés exogènes ou xénobiotiques, la détoxification s'entend comme un processus composé de 3 phases :

- la phase I
- la phase II
- la phase III

La détoxification ciblant des composés (i) toxiques, généralement (ii) hydrophobes et (iii) exogènes, elle vise donc à : (i) inactiver les xénobiotiques (perte de l'activité biologique) (phase I), (ii) les rendre plus hydrophile (phase II) facilitant ainsi (iii) leur transport et leur élimination/excrétion hors de l'organisme (phase III).

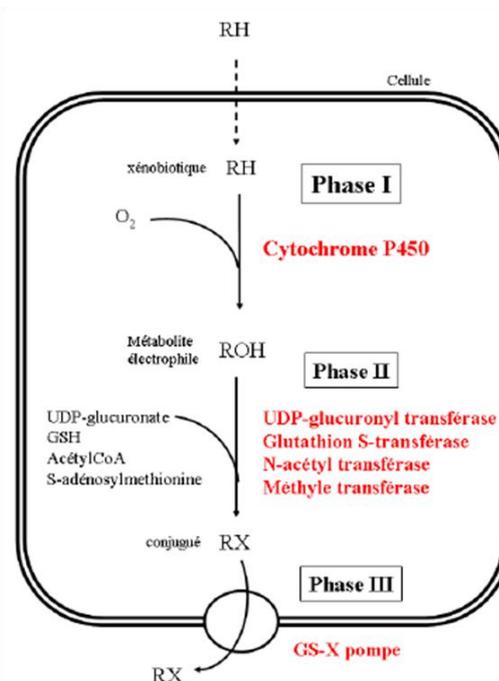


Figure 98 – Représentation schématique du processus de détoxification des xénobiotiques

i. Phase I : Inactivation des xénobiotiques

Les réactions de phase I assurent l'inactivation des xénobiotiques et mettent en jeu, pour cela, des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse.

Les réactions d'oxydation

Une majorité des réactions d'oxydation est catalysée par des cytochromes P450 (CYP450). Ces enzymes sont généralement localisés dans le réticulum endoplasmique lisse mais sont également présente dans les mitochondries et dans l'enveloppe nucléaire. Les CYP450 sont des protéines globulaires ancrées dans la membrane et ont ainsi accès aux composés lipophiles et hydrophiles. On distingue 2 groupes fonctionnels au sein de la famille des CYP450 : (i) les CYP450 impliqués dans la détoxification des xénobiotiques et (ii) les CYP450 impliqués dans la synthèse de composés endogènes (stéroïdes, leucotriènes).

Des oxydoréductases non microsomales, localisées dans les mitochondries (monoamine oxydase, aldéhydes déshydrogénase) catalysent aussi l'oxydation de composés toxiques.

Les réactions de réduction et d'hydrolyse

Les xénobiotiques peuvent également être réduits par des réductases. D'autres composés toxiques comme les esters, les amides et les composés phosphorés contiennent des liaisons sensibles à l'hydrolyse. La catalyse de ces réactions se fait par des estérases non spécifiques et des amidases.

ii. Phase II : Conjugaison

La phase II consiste en la conjugaison d'une molécule « transporteur » polaire endogène sur le composé exogène toxique préalablement inactivé. Cette conjugaison permet de générer des conjugués plus hydrosolubles et donc plus facilement excrétés hors de la cellule ou de l'organisme. Ce type de réaction de conjugaison a lieu sur des molécules possédant des fonctions alcools ou acides et sont de plusieurs types en fonction du « transporteur » polaire utilisé :

- *les glucuronates pour la glucurono-conjugaison*, pour laquelle la catalyse est assurée par des UDP-glucuronyl-transférases. Cette enzyme, localisée dans le réticulum endoplasmique, utilise l'acide UDP- β -glucuronique comme substrat de conjugaison sur 5 classes de molécules capables d'y être conjugué : les alcools aliphatiques ou aromatiques, les acides carboxyliques, les composés soufrés et les amines.
- *l'acétate pour l'acétyl-conjugaison*, pour laquelle le transfert de groupements acétyles se fait sur des amines aromatiques primaires, des hydrazines, des sulfonamides et sur certaines amines aliphatiques primaires. Ce type de réaction est catalysé par des N-acétyl-transférases en présence d'acétyl-CoA.
- *les groupements méthyles pour la méthyl-conjugaison*, qui impliquent des réactions de méthylation catalysées par des méthyl-transférases utilisant la S-adénosylméthionine comme substrat de conjugaison. Cette voie est minoritaire en raison de la grande biodisponibilité en acide UDP- β -glucuronique dans les cellules et de la faible incidence sur l'hydrosolubilité de la conjugaison à des groupements méthyles.
- *les sulfates pour la sulfo-conjugaison*, catalysée par des sulfo-transférases, en présence de phosphoadénosine 5-phosphosulfate comme substrat de conjugaison, sur des groupements fonctionnels que sont les phénols, les alcools aliphatiques et les amines aromatiques.
- *et le glutathion pour la mercapto-conjugaison*, catalysée par les glutathion-S-transférases impliquées dans la détoxification des radicaux libres, des époxydes et des halogénés par addition du groupement thiol du glutathion sur des électrophiles hydrophobes.

iii. *Phase III : Transport & élimination de l'organisme*

La phase III consiste en l'excrétion unidirectionnelle du xénobiotique conjugué hors de la cellule ou de l'organisme. Chez les plantes supérieures, ces métabolites hydrosolubles issus de la phase I et II sont stockés dans la vacuole ou éliminés de la cellule. Chez les mammifères, ils sont excrétés par voie biliaire ou urinaire en fonction de leur taille. Les composés conjugués sont bien souvent trop hydrosolubles pour diffuser librement à travers la membrane plasmique. Leur excrétion nécessite des transporteurs membranaires parmi lesquels les protéines de la famille multigénique des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) joue un rôle majeur. Ces transporteurs sont retrouvés chez les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux. Ils assurent un transport actif primaire puisqu'il nécessite l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie pour transporter le xénobiotique conjugué. A ce titre, les transporteurs ABC sont impliqués dans la résistance aux herbicides, aux pesticides et aux métaux lourds mais aussi dans la croissance et le développement des plantes (transport des phytohormones). La pompe à glutathion (GS-X pump) est la principale ATPase membranaire impliquée dans le transport des conjugués au glutathion. Chez l'homme, cette pompe fait partie de la famille des MRP (Multidrug Resistance-associated Protein).

La conjugaison de glutathion sur des substrats endogènes permet d'étiqueter ces composés qui seront alors reconnus et pris en charge par la pompe à glutathion. Ce système est comparable au peptide signal et aux séquences d'adressage qui oriente les protéines néo-synthétisées vers leur compartiment cellulaire final.

Chez les plantes, des métabolites secondaires tels que les phénylpropanoïdes (des phytotoxiques, l'adressage de ces composés vers la vacuole ou vers le milieu extracellulaire est essentiel à la survie de la cellule ou les anthocyanines requièrent conjugaison au glutathion pour être transporté jusque dans la vacuole. Un exemple récent est celui de la GSTF4 issu de la patate douce (Kou et al., 2019). Cette étape est également essentielle, non seulement à la synthèse mais aussi au transport par la pompe à glutathion, des leucotriènes chez les animaux.

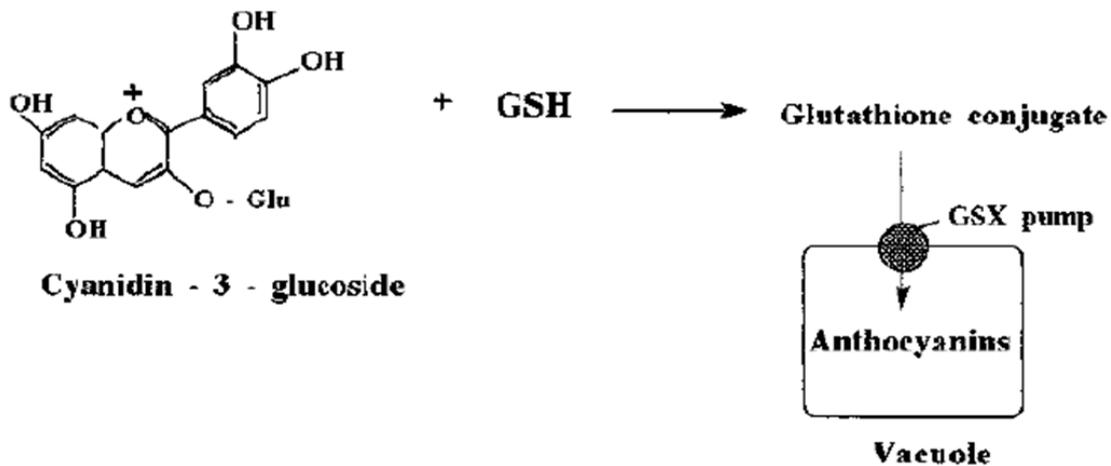


Figure 99 – Représentation schématique de la conjugaison au GSH d'une anthocyanine par une GST Tau menant à la séquestration intra-vacuolaire

iv. *Diversité des xénobiotiques*

La figure ci-dessous ne suffirait pas à elle seule de rendre compte de l'immense diversité des xénobiotiques détoxifiés par les GST, mais elle donne une certaine idée de molécules qui sont prises en charge par les GST et de leur diversité structurale.

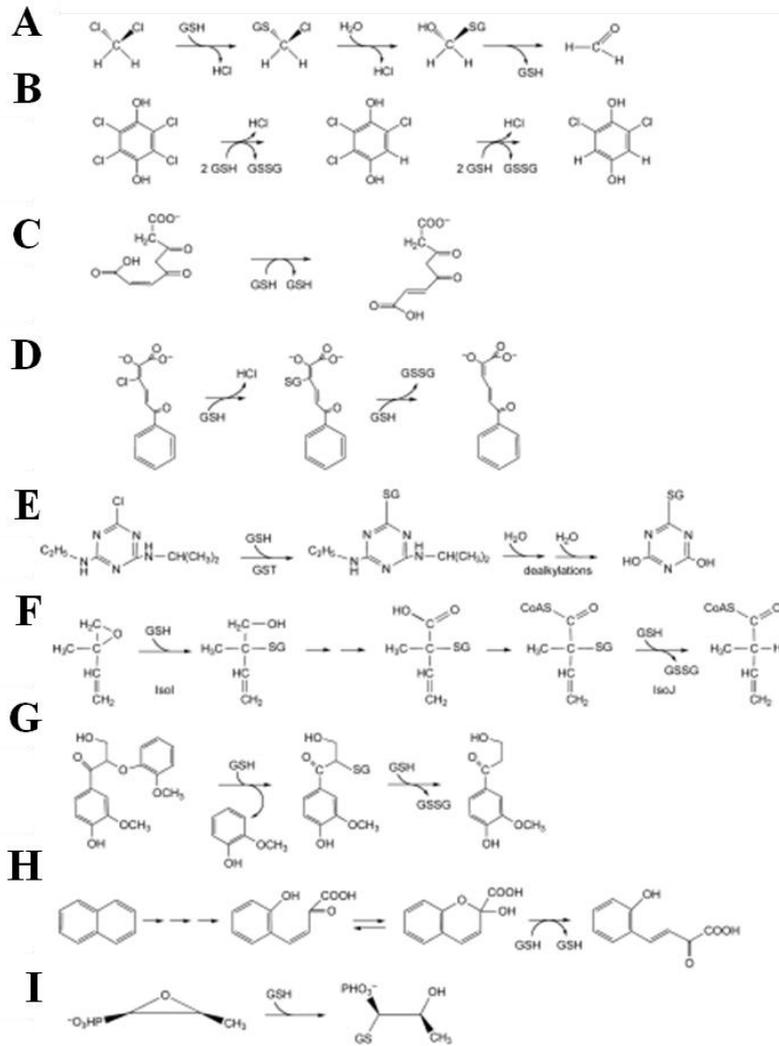


Figure 100 - Diversité des réactions de conjugaison catalysées par les GST bactériennes pour la détoxification de xénobiotiques

Cas de (A) la déhalogénéation du DCM en formaldéhyde, (B) de la déhalogénéation réductrice du TCHQ en trichloroquinone et de la trichloroquinone en 2,6-dichlorohydroquinone, (C) de l'isomérisation *cis-trans* du maleylacetoacetate (ce n'est pas une xénobiotique), (D) de la déhalogénéation du 3-chloro-HOPDA, (E) de la détoxification de l'atrazine, (F) de l'ouverture des cycles époxydes et de la réduction du GSH dans le métabolisme de l'isoprène, (G) du clivage des β -aryl éther, (H) de l'étape 4 de la voie catabolique du naphthalène et (I) de l'ouverture du cycle époxyde de la fosfomycine. Adapté de (Allocati et al., 2009)

Un étude relativement récente a été mise en place pour l'identification des substrats spécifiques de la GSTM du vert plat *Schistosoma japonicum* dans un mélange d'herbes médicinales chinoises (S. Feng et al., 2014).

b. Bioactivation des xénobiotiques

Même la conjugaison du GSH sur des toxiques exogènes conduit le plus souvent à la formation d'un conjugué moins réactif et plus facilement excrétable, elle peut parfois provoquer la formation d'un produit plus réactif que le composé initial. A titre d'exemple, le dichlorométhane forme un GSH-conjugué, le S-chlorométhylglutathion, qui contient un centre électrophile capable de modifier l'ADN (Hayes et al., 2005).

En chimiothérapie, la capacité des GST à produire des composés plus réactifs a été exploitée pour cibler les cellules tumorales qui expriment certaines GST. Par exemple, le cytotoxique TER286 (ou TLK286) est activé grâce à une GST au moyen d'une β -élimination provoquant la formation de cyclophosphamide (Hayes et al., 2005).

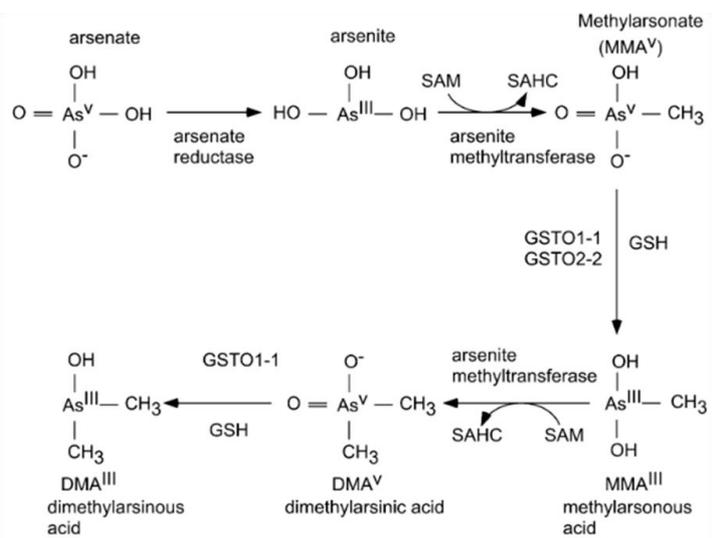
2) Métabolisme et adressage-transport de composés endogènes

a. Détoxification de composés endogènes

Tout comme les xénobiotiques, les GST sont capables de détoxifier de nombreux composés endogènes. Ainsi, les GST de plantes (Tau, Phi et Theta) présentent des activités sur des acides gras hydroperoxydes et sur les produits de la peroxydation lipidique comme les alkénals et les aldéhydes insaturés (Nianiou-Obeidat et al., 2017). La GST Tau 19 de *Arabidopsis thaliana* a une très forte activité contre l'acroléine, un produit majeure de la peroxydation lipidique faisant partie des RES (Reactive Electrophilic Species) (Mano et al., 2017). C'est également le cas de la GST P1-1 chez les mammifères (Hayes et al., 2005) et de la GSTA4-4 qui agit sur le 4-HNE (un autre RES).

Les GST microsomales de la famille des MAPEG ont de nombreux substrats qui sont des dérivés lipidiques issus de la peroxydation lipidique mais aussi des lipides endogènes aux fonctions biologiques importantes (Mosialou et al., 1995).

Figure 101 – Rôle des GST Omega dans la biotransformation de l'arsenic
Tiré de (Board and Menon, 2016)



Enfin, un dernier exemple concerne le rôle des GST dans la détoxification des métaux comme les GST Omega pour la biotransformation de l'arsenic inorganique (voir figure ci-dessus) (Board and Menon, 2016; Chen et al., 2018). Plus récemment encore, le clivage oxydatif de la GSTF1 du maïs semble être importante comme voie de détoxification du Cu(II) (Alqarni et al., 2019).

b. Synthèse de composés endogène

i. Exemple de l'isomérisation de l'acide rétinol

Les GST de classe Pi peuvent catalyser l'isomérisation de l'acide 13-*cis* rétinol en plusieurs formes d'acide *trans*-rétinol, comme représenté ci-dessous.

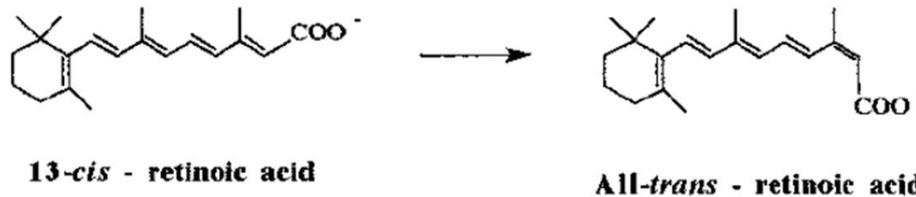


Figure 102 – Réaction d'isomérisation de l'acide rétinol catalysée par les GST Pi

ii. Rôle des GST Zeta dans le métabolisme des acides aminés aromatiques

Chez les mammifères, les champignons, et les plantes, les GST de la classe Zeta catalysent l'isomérisation *cis-trans* GSH-dépendante du fumarylacétoacétate, un métabolite clé dans le catabolisme de la tyrosine et de la phénylalanine (figure ci-contre). Les GST Zeta sont d'ailleurs parfois nommées maleylacétoacétate isomérase et participent donc à la dégradation des acides aminés aromatiques par cette voie (Thom et al., 2001; Hayes et al., 2005; Moons, 2005; Oakley, 2011; Board and Menon, 2013). Dans la figure ci-dessous, les GST Zeta catalysent la conversion d'une part, du maleylacétoacétate en fumarylacétoacétate et d'autre part, le maleylacétone en fumarylacétone.

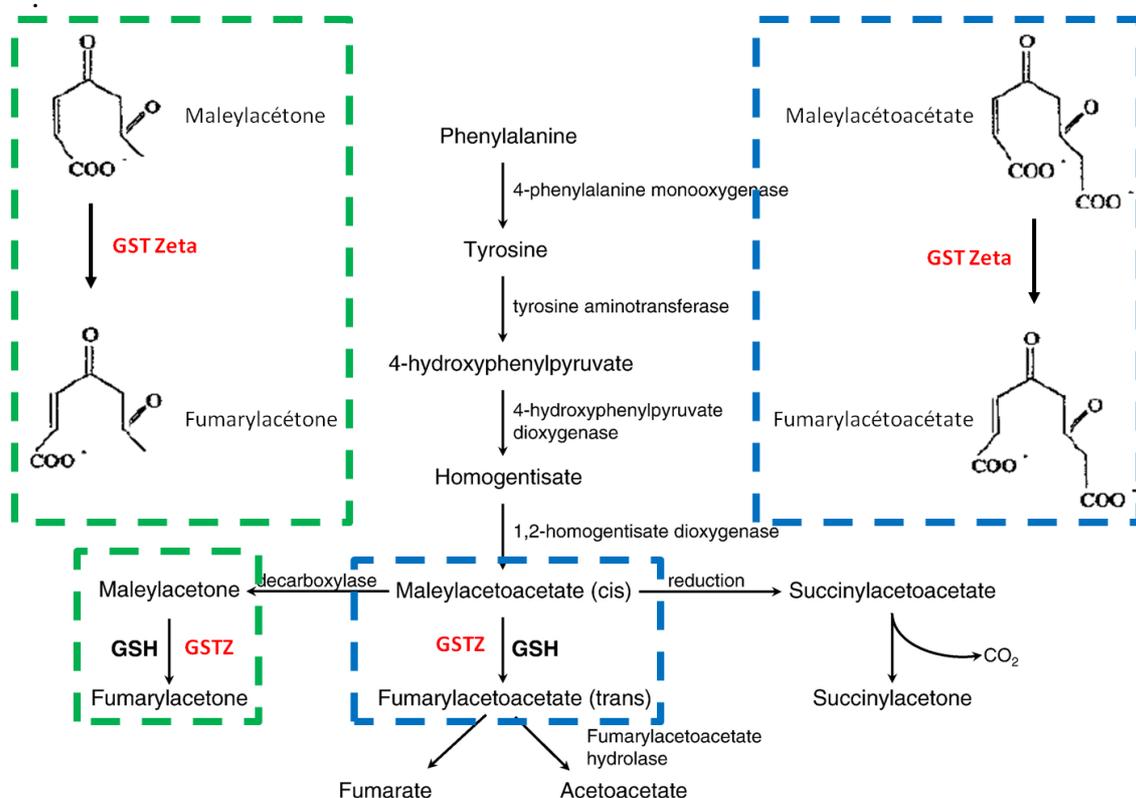


Figure 103 – Voie catabolique de la phénylalanine

iii. Rôles des GST dans la synthèse des écosanoïdes et des hormones stéroïdiennes

Certaines GST sont impliquées dans la biosynthèse des écosanoïdes (leucotriènes et prostaglandines) et des hormones stéroïdiennes. J'ai choisi de combiner ces 3 types de molécules car : (i) ce sont toutes des molécules de communication (prostaglandines (=cytokines), leucotriène (=signal pro-inflammatoire), hormones stéroïdiennes (=communication hormonale)), (ii) ce sont toutes des molécules de nature hydrophobe (ce sont des lipoides, composés à caractère lipidique) et (iii) leur synthèse fait appel à des étapes d'isomérisation catalysées par des GST. Parmi elles, les GST Sigma de mammifère et la GST cytosolique de type mPGES (PGE₂ synthase) catalysent respectivement et successivement l'isomérisation de la prostaglandine PGH₂ en PGD₂ puis en PGE₂ en utilisant le GSH comme cofacteur (Oakley, 2011). L'isoforme GSTM2-2 (classe Mu) catalyse aussi l'isomérisation de PGH₂ en PGE₂ (Board and Menon, 2013). Les MAPEG PGE₂S (PGE₂ synthase) et LTC₄S (LTC₄ synthase) participent elles-aussi respectivement à la synthèse des écosanoïdes : PGE₂ et LTC₄ (leucotriène C₄). La figure ci-dessous rend compte de l'importance de ces GST dans les voies de synthèse de ces composés

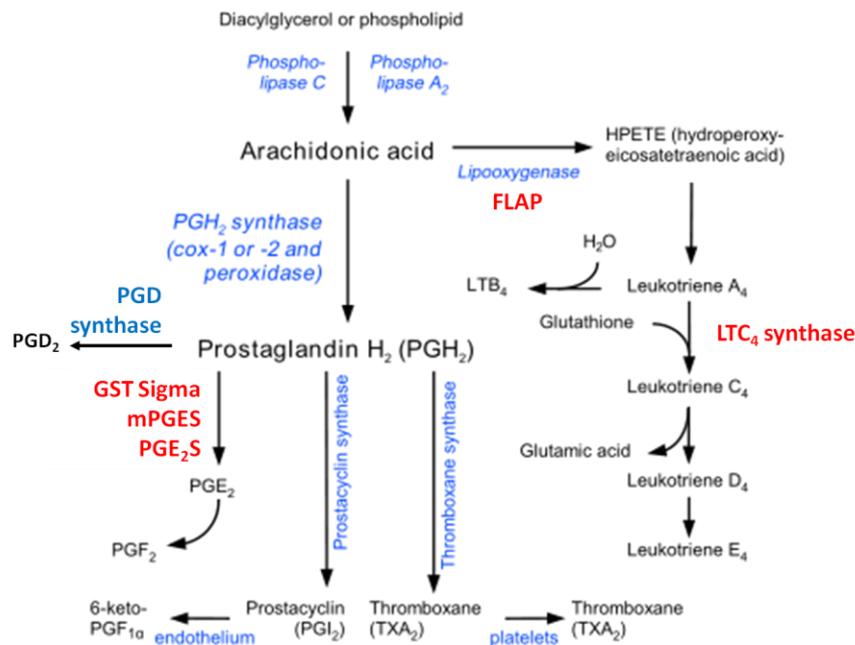


Figure 104 – Voies de biosynthèses des écosanoïdes (leucotriènes et prostaglandines) montrant le rôle de différentes GST

Les GST Alpha présentent une activité céto-stéroïde isomérase dépendante du GSH. L'isoforme GSTA3-3 catalyse en particulier l'isomérisation des stéroïdes Δ^5 -androstène-3,17-dione et Δ^5 -pregnane-3,20-dione respectivement en stéroïdes Δ^4 -androstène-3,17-dione et en Δ^4 -pregnane-3,20-dione (Board and Menon, 2013), tel que représenté dans un exemple ci-contre.

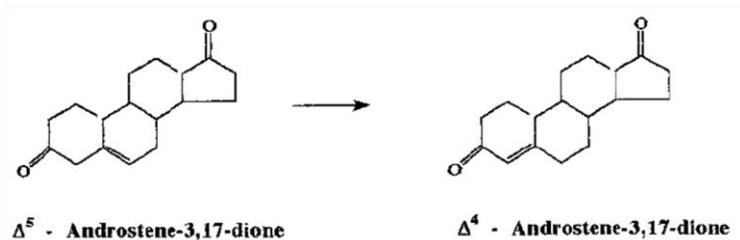


Figure 105 – Exemple de l'isomérisation d'un stéroïde catalysée par les GST Alpha

iv. Des GST impliquées dans le métabolisme secondaire chez les bactéries et les plantes

Récemment, une GST hétérodimérique a été identifiée chez *Novosphingobium aromaticivorans* comme étant impliquée dans la voie de synthèse des lignines et des composés de type β -aryl éther où une GST et du GSH sont impliqués (voir ci-dessous) (Kontur et al., 2018).

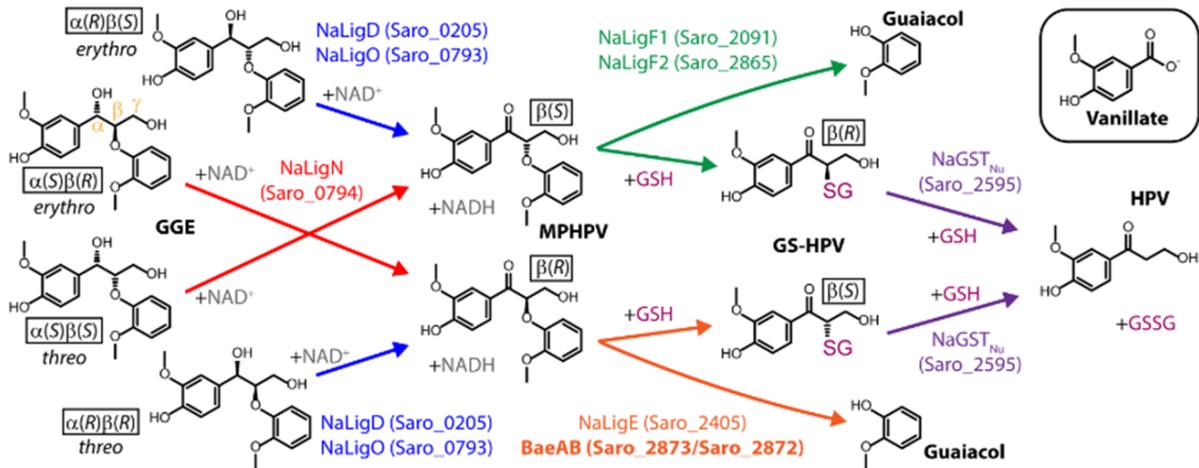


Figure 106 –Rôle du GSH et d’une GST dans la synthèse de composés de type β -aryl éther

Une mini-revue a également fait état du rôle des GST dans la synthèse de phytoalexines contenant du soufre (Czerniawski and Bednarek, 2018) comme représenté ci-dessous.

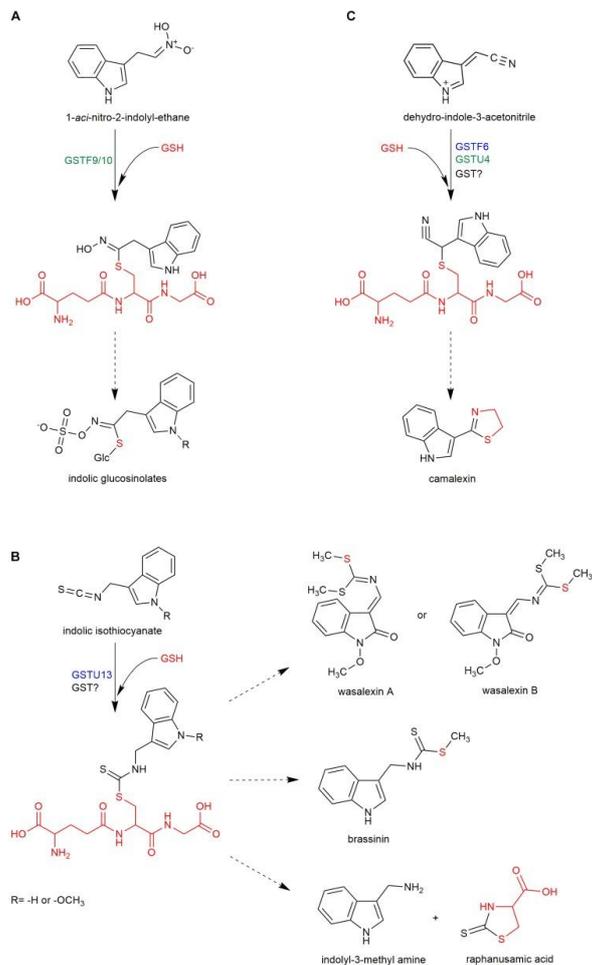


Figure 107 – Modèle proposant l’implication de GST dans la synthèse des phytoalexines

3) Vers des fonctions plus intégrées

Du fait de leur capacité à transporter-séquestrer des molécules comme les phytohormones chez les plantes par exemple, les GST ont un rôle modulateur évident. Leur rôle dans la synthèse de molécules de communication et d'information (hormones, écosanoïdes...) renforce l'idée de rôle intégré des GST dans le métabolisme et la physiologie des organismes. Parmi les fonctions intégrées auxquelles participent les GST qui émergent dans la littérature, on trouve :

- la régulation des voies de signalisation en réponse au stress abiotique,
- la pathogénéicité dans les interactions plante-pathogène (stress biotique).

a. Les GST régulent des voies de signalisation en réponse à des stress abiotiques

i. Chez les mammifères et la levure

Cas de l'activité ligandine et des interactions des GST Pi et Mu avec des molécules de signal

Certaines GST sont exprimées de façon différente si l'on compare un tissu sain à un tissu tumoral. Cette observation fut corrélée avec la capacité des GST à détoxifier les thérapeutiques anticancéreux. En réalité, dans le cas des GST de classe Pi, leur rôle provient de leur capacité à inhiber des molécules de signalisation comme la kinase Jun (JNK), ASK1 et TRAF2. L'inhibition se fait par une interaction protéine-protéine entre GSTP et JNK mais aussi entre GSTP et TRAF2. Cette interaction est rompue en présence d'un stress qui provoque la formation d'un pont disulfure sur GSTP ou d'un pont intramoléculaire entre 2 GSTP, tel que représenté dans la figure ci-dessous. Ce mécanisme a des implications dans l'intolérance au glucose par augmentation de la gluconéogenèse hépatique (Ghosh Dastidar et al., 2018) et dans la différenciation neuronale de cellules de la rétine (en lien avec l'isomérisation de l'acide rétinoïque) (Sciarretta et al., 2019).

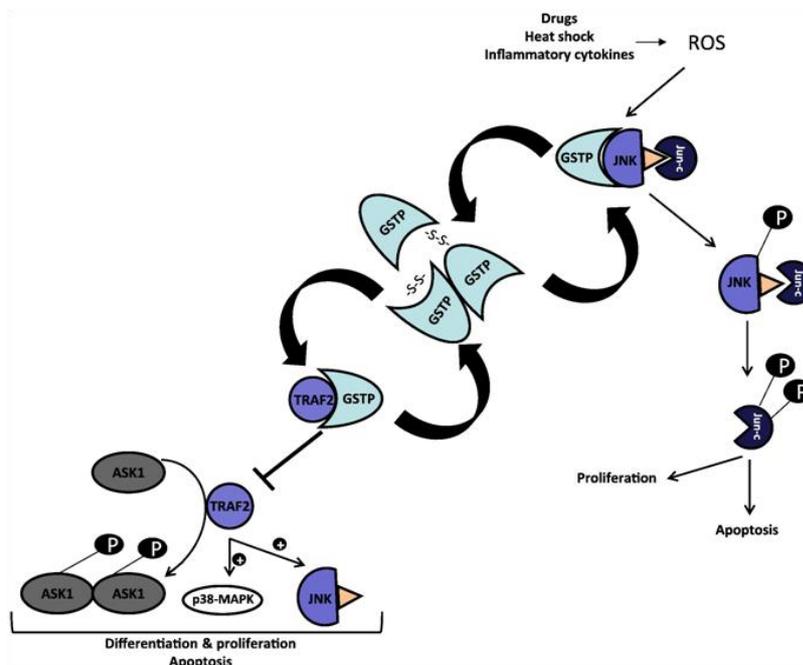


Figure 108 – Régulation des voies JNK et TRAF2 par GSTP

La prolifération et l'apoptose sont respectivement induites lorsque l'exposition au stress oxydant est faible ou, au contraire, élevée. Tiré de (Board and Menon, 2013)

Les GST de la classe Mu inhibent également la protéine ASK1 (Apoptosis Stress-related Kinase 1), une MAPKKK impliquée dans la régulation de l'apoptose chez la souris, qui active la kinase JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et la voie de signalisation de p38. Dans des conditions normales, ce mécanisme d'inhibition repose uniquement sur une interaction directe entre la GST Mu et ASK1, et ne nécessite donc pas l'activité de conjugaison du GSH de la GST Mu mais sur une activité du type ligandine. L'interaction est rompue suite à un stress thermique ou oxydant, activant ainsi la kinase ASK1, tel que représenté dans la figure ci-dessous (Board and Menon, 2013).

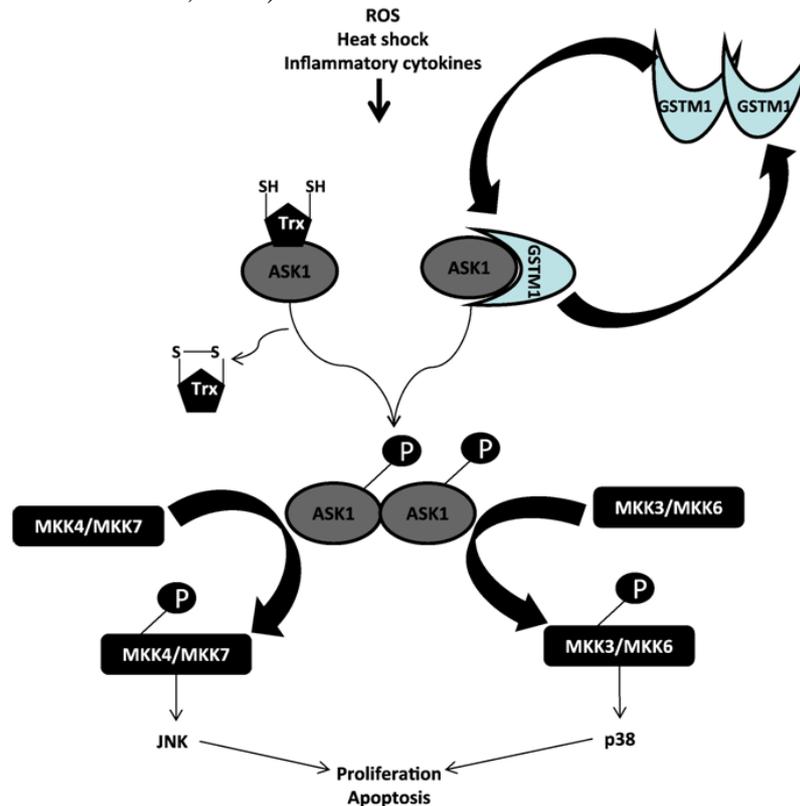


Figure 109 – Régulation des voies JNK et p38 par interaction GSTP-ASK1
 La prolifération et l'apoptose sont respectivement induites lorsque l'exposition au stress oxydant est faible ou, au contraire, élevée.
 Tiré de (Board and Menon, 2013)

Cas de l'activité de glutathionylation des GST

L'interaction des GST Pi n'est le seul mécanisme de régulation. Leur capacité de glutathionylation par hétérodimérisation provoque l'activation de la peroxyrédoxine (Manevich et al., 2004) et les GST Pi sont donc considérées comme de régulateurs de la glutathionylation en réponse à un stress oxydant (Townsend et al., 2009).

L'exemple le mieux décrit reste néanmoins celui de la GST de levure (Gtt1p) qui glutathionyle les canaux Ca^{2+} voltage dépendant tandis que la thiorédoxine TRX2 les déglutathionyle (Chandel et al., 2016; Chandel and Bachhawat, 2017). Les récepteurs Ryanodine (RyR) nécessaires à la libération d'ions Ca^{2+} en réponse à différents stimuli et jouant donc un rôle de signalisation chez les mammifères sont également régulés par des GST (GSTO1-1, GSTA1-1, GSTM2-2 et la protéine CLIC2, qui activent les RyR du muscle squelettique et inhibe les RyR2 du muscle cardiaque) (Board and Menon, 2013).

ii. *Chez les plantes*

Les GST de plantes peuvent réguler de façon indirecte l'apoptose comme les GST Tau de tomate qui grâce à leurs activités GSH-transférase et GPOX, inhibe la voie Bax pro-apoptotique chez la levure (Moons, 2005). Les potentialités d'interaction des GST de tomate ont également été étudiées très récemment et montrent qu'elles pourraient interagir avec de nombreux partenaires et en particulier des protéines indispensables à la gestion du stress oxydant (Islam et al., 2017). L'hypothèse tirée de cette observation est le rôle de régulateur et coordinateur central des réponses au stress que pourrait jouer les GST Tau chez la tomate.

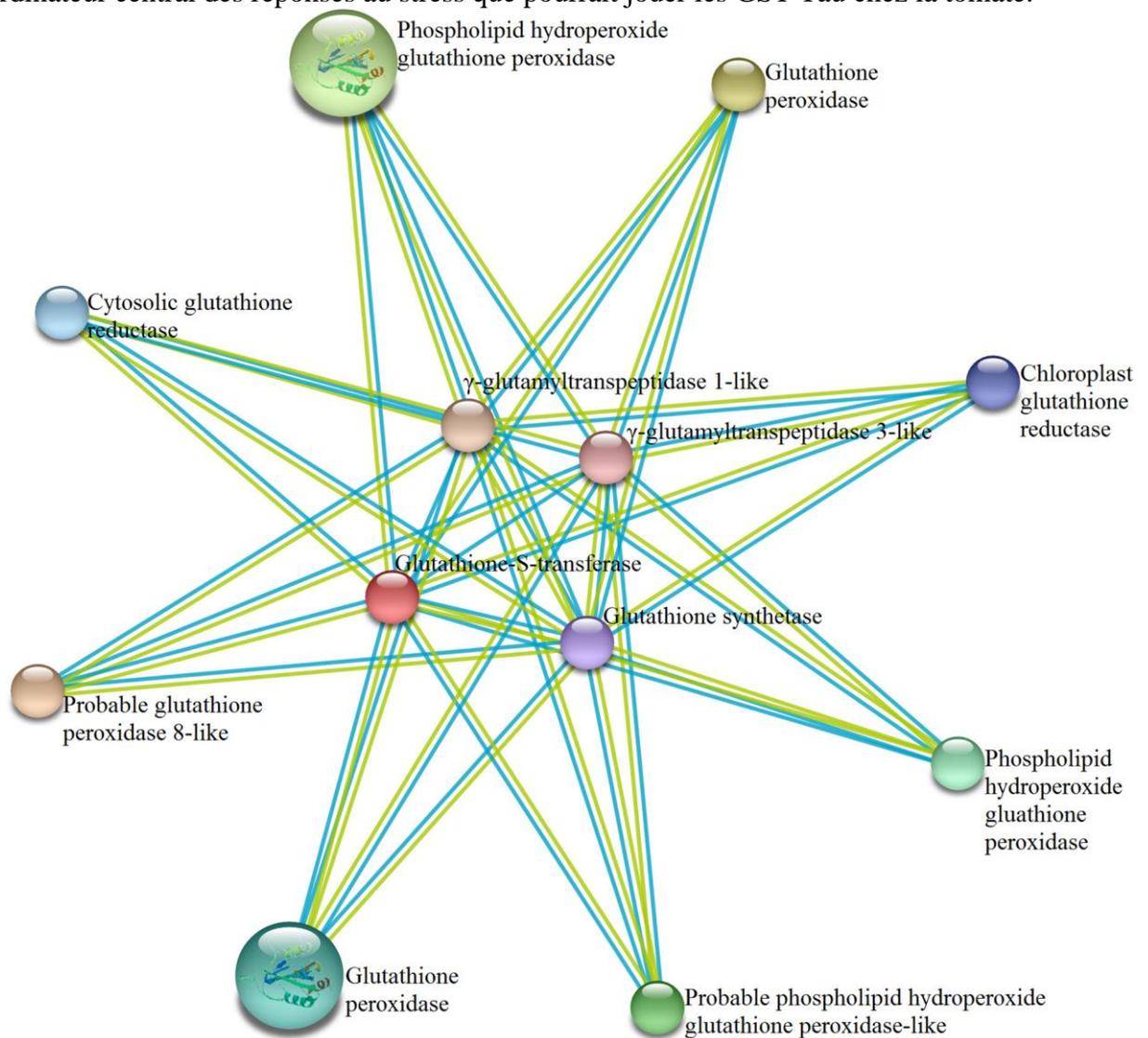


Figure 110 – Représentation du réseau d'interaction protéine-protéine d'une GST Tau de tomate avec d'autres partenaires
Tiré de (Islam et al., 2017)

b. Les GST sont importantes dans les interactions plante-pathogène

Du côté des plantes, il a été observé une induction de l'expression de nombreux gènes codant pour des GST ou une augmentation de leur activité en réponse à des pathogènes durant la phase précoce d'infection bactérienne, fongique et virale. Des études fonctionnelles ont confirmé ces observations, puisque la surexpression ou des stratégies de « silencing » de GST spécifiques ont modifiés grandement les symptômes et le taux de multiplication des pathogènes (pour revue (Gullner et al., 2018)).

Du côté des pathogènes, une étude relativement récente montra qu'un mutant du pathogène *Alternaria brassicicola* déficient en GST était plus susceptible aux isothiocyanates (des molécules toxiques) produits par les *Brassicaceae* et était moins agressif que la souche sauvage (Calmes et al., 2015). Ce travail suggère que la détoxification de certains composés (ici des isothiocyanates) a un rôle dans un processus physiologique intégré.

c. Importance des études fonctionnelles in vivo

L'émergence de ces nouvelles fonctions passe par un changement de pensée et de stratégie d'analyse des GST. En effet, les études sur les GST se reposent essentiellement sur la caractérisation structurale et biochimique de GST nouvellement identifiée grâce à l'avènement de la génomique qui a donné accès à des nombreux génomes. Néanmoins, ces études donnent peu d'information fonctionnelle sur le rôle intégré des GST dans la physiologie des cellules.

Pour répondre à ce manque, les stratégies de délétion ou de « silencing » des gènes codant pour des GST sont prometteuses. C'est ainsi que la construction et la caractérisation de souris déficiente en certaine GST a fournit de nouvelles idées sur le rôle des GST non seulement sur la résistance aux thérapeutiques mais aussi dans le rôle dans le métabolisme cellulaire endogène (Board and Menon, 2013). Le tableau ci-contre rend compte de l'importance de cette stratégie expérimentale pour l'élucidation du rôle des GST.

La revue (Frova, 2006) souligne également l'importance des analyses *in vivo* par délétion de gène en particulier pour étudier la redondance-sélectivité des GST.

Tableau 17 – Les différents phénotypes observés pour différents mutants de délétion de gène GST chez la souris

GST gene	Phenotype	Reference.
<i>GstP1</i> and <i>GstP2</i>	Increased skin tumorigenesis	[332,333]
	Resistant to acetaminophen toxicity	[334]
	Enhanced lung carcinogenesis	[335]
	Enhanced colon carcinogenesis	[336]
	Allergic response in the lung	[337]
	Increased cisplatin induced nephrotoxicity	
	Increased cyclophosphamide-induced urinary bladder toxicity	[338]
	Increased sensitivity to tobacco smoke induced endothelial dysfunction	[339]
	Decreased protein S-glutathionylation	[241,267]
	Increased constitutive c-Jun N-terminal kinase signaling	[265]
	Increased sensitivity of dopaminergic neurons to MPTP induced neurodegeneration	[240,340]
<i>GstA3</i>	Susceptibility to aflatoxin B1	[298]
<i>GstA4</i>	Susceptible to oxidative stress	[341]
	Increased susceptibility to CCl ₄	[342]
<i>GstM1</i>	Increased mitochondrial dysfunction,	[343]
	Increased protein carbonylation	
	Decreased conjugation of DCNB	[344]
	Methemoglobinemia	[345]
<i>GstT1</i>	Increased sensitivity to VPA-induced neural damage	[346]
	Model of human GSTT1-1 deficiency	[347]
<i>GstS1</i>	Delayed hypersensitivity	[348]
<i>GstO1</i>	Normal phenotype	[349]
<i>GstZ1</i>	Sensitive to tyrosine/phenylalanine	[221,222]
	Oxidative stress model	[223]
<i>GstK1</i>	Mild glomerular nephropathy	[9]
<i>Clic1</i>	Mild platelet dysfunction	[350]
<i>Clic4</i>	Defective angiogenesis	[351]
	NOS-induced deactivation of macrophages	[352,353]

Tiré de (Board and Menon, 2013)

C. Les GST chez les cyanobactéries

Peu de données sont disponibles sur les GST cyanobactériennes. Les seules informations disponibles sont que les classes Chi et Rho ont été identifiées par des analyses *in silico* et/ou *in vitro* (sans donnée structurale) à partir de l'analyse de gènes codant pour des GST chez *Synechococcus elongatus* PCC6301 et *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 pour la classe Chi (Wiktelius and Stenberg, 2007) et chez *Synechocystis* PCC 6803 pour la classe Chi (la GST S10067) (Pandey et al., 2015b) et la classe Rho (la GST S111545) (Pandey et al., 2015a, 2017). Notons ici que la classe Rho est normalement destinée aux GST issus des poissons et leur est spécifique. L'annotation S111545 comme une nouvelle classe Rho apparaît donc comme probablement erronée.

Sur le plan fonctionnel, les GST de classe Chi ont une forte activité contre les isothiocyanates, mais cela ne renseigne pas réellement sur leur rôle *in vivo* chez ces cyanobactéries. La présence d'une activité peroxydase GSH-dépendante pour S111545 est importante car elle pourrait avoir des implications dans la tolérance au stress oxydant, un stress majeur des cyanobactéries.

Enfin, la GST S111147 a été identifiée comme une MAPEG au cours de l'analyse phylogénétique de cette famille (Jakobsson et al., 2000; Bresell et al., 2005). Son rôle est néanmoins inconnu.

Figure 111 – Figure-bilan de l'état des connaissances sur le rôle des GST dans la physiologie et le métabolisme de *Synechocystis*

Noter que le rôle des GST chez *Synechocystis* n'est pas connu.

RESULTATS ET DISCUSSION

Pour répondre (i) à l'absence de connaissance sur les GST de *Synechocystis*, (ii) à l'intérêt croissant d'une étude plus « physiologique » centrée sur les rôles « ancestraux » et intégrés des GST dans la physiologie et le métabolisme cellulaire et (iii) au manque d'analyse de la redondance-sélectivité des GST, nous avons opté pour la construction de mutants de délétion (mutant Δgst) pour chacun des gènes codant pour une des 6 GST de *Synechocystis* (à savoir, *sll0067*, *sll1147*, *sll1545*, *slr0236*, *sll1902* et *slr0605*) et l'analyse systématique de leurs phénotypes en réponse à différents stress.

Parmi ces stress, le premier que nous avons étudié est celui provoqué par la présence de terpènes exogènes (ajoutés dans le milieu) pour répondre à l'objectif d'amélioration de la tolérance aux terpènes (biocarburants). Dans un second temps, je présenterai l'étude du rôle des GST dans la réponse aux stress chez *Synechocystis*.

CHAPITRE I – ANALYSE DE LA TOXICITE DES TERPENES ET DE L'IMPLICATION DES GST DANS LA TOLERANCE AUX BIOCARBURANTS (TERPENES & ALCOOLS)

Une des activités du laboratoire est centrée sur la production de terpènes en raison de leurs diverses finalités), j'ai donc étudié, la toxicité d'une vingtaine de terpènes aux propriétés physico-chimiques variées sur la souche sauvage de *Synechocystis*. De plus, en raison de l'intérêt relatif à l'amélioration de la tolérance aux biocarburants (terpènes et alcools) et du possible rôle des GST dans ce phénomène, j'ai également étudié la tolérance-sensibilité des mutants de délétion Δgst à ces molécules.

I. L'analyse systématique de la toxicité des terpènes et terpénoïdes révèlent leur

A. Les terpènes sont des molécules toxiques pour *Synechocystis*

1) Les terpènes inhibent la croissance de *Synechocystis*

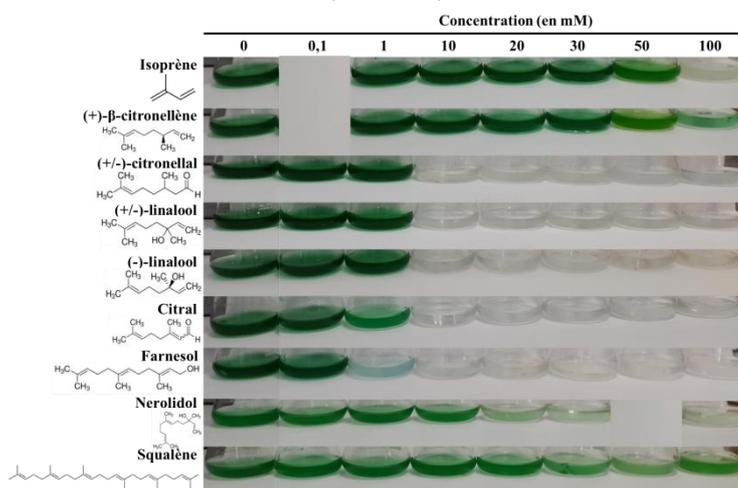


Figure 112 – Les terpènes acycliques inhibent la croissance de *Synechocystis*

Photographies des cultures obtenues après 72h d'incubation dans les conditions de photoautotrophie standard (DO initiale à 580 nm = 0,1) en absence ou en présence de concentrations croissantes en différents terpènes acycliques.

Pour tester la toxicité potentielle de diverses molécules de cette famille, j'ai donc cultivé pendant 72h en absence (concentration 0) ou en présence de concentrations croissantes de divers terpènes la souche sauvage (WT) de *Synechocystis*. Comme on le constate aisément (photographies des cultures Figures 112, 113 et 114) les terpènes sont des molécules toxiques pour *Synechocystis* puisque sa croissance est inhibée (absence de coloration verte) pour des doses allant de 10 mM (exemple du (+/-)-citronellal) à plus de 50 mM (exemple de l'isoprène), et ce à la fois pour les terpènes acycliques (112) et pour les terpènes monocycliques qui dérivent du noyau p-menthane (113). Ce résultat est cohérent avec l'utilisation des huiles essentielles comme antimicrobien puisqu'elles contiennent des mélanges de terpènes issus des plantes. Parmi eux, l'eucalyptol, un monoterpène de type « camphane, bornane, fenchane », présente lui aussi une toxicité aux alentours de 10 mM (Figure 114).

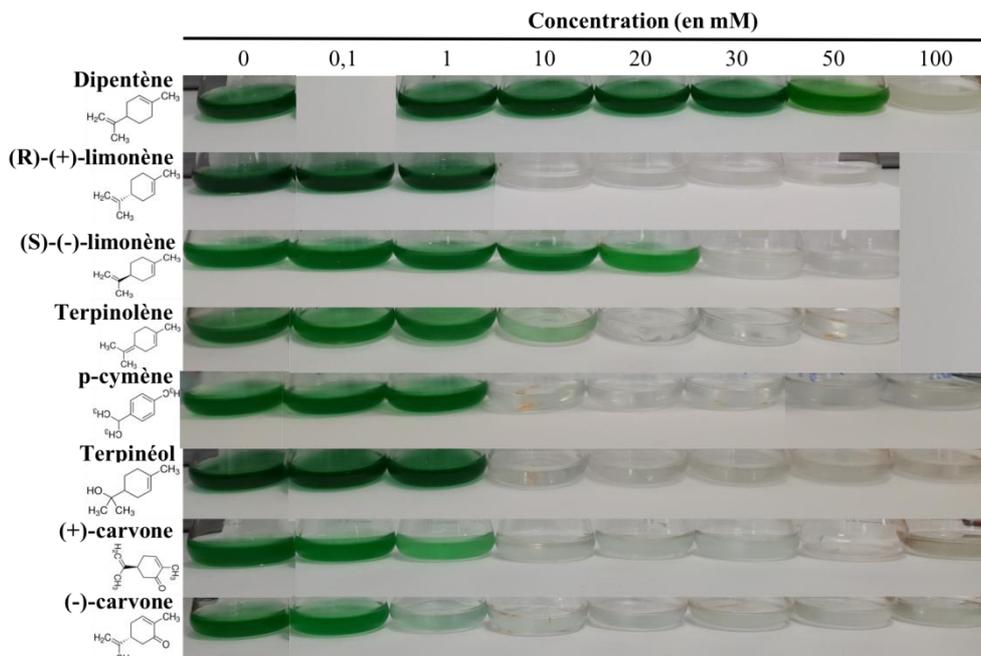


Figure 113 – Les terpènes monocycliques de type p-menthane inhibent la croissance de *Synechocystis*

Photographies des cultures obtenues après 72h d'incubation dans les conditions de photoautotrophie standard (DO initiale à 580 nm = 0,1) en absence ou en présence de concentrations croissantes en différents terpènes monocycliques de type p-menthane.

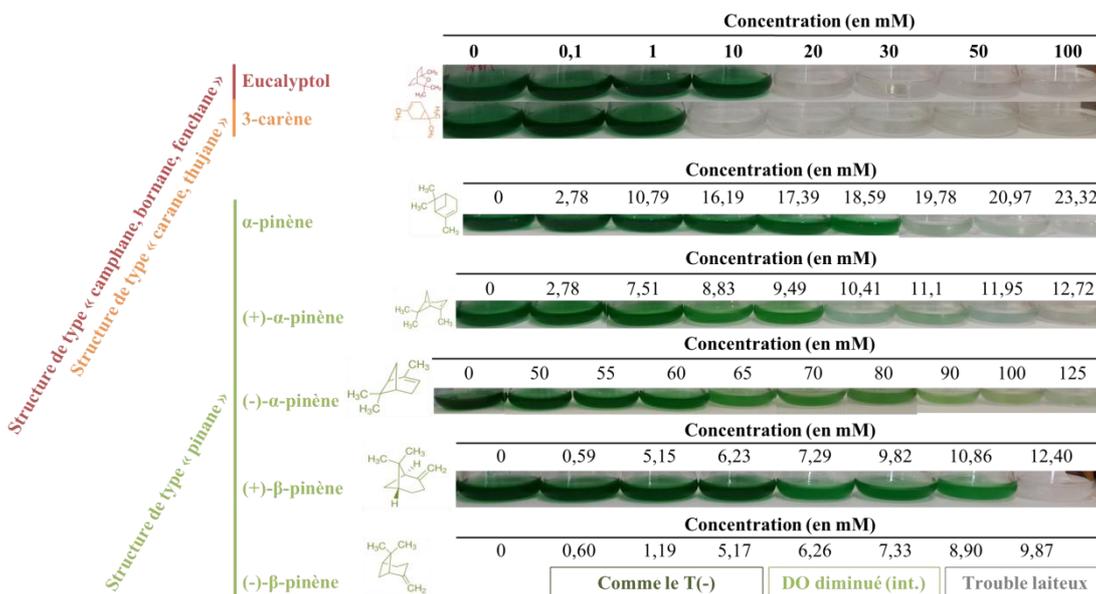


Figure 114 – Les terpènes bicycliques inhibent la croissance de *Synechocystis*

Photographies des cultures obtenues après 72h d'incubation dans les conditions de photoautotrophie standard (DO initiale à 580 nm = 0,1) en absence ou en présence de concentrations croissantes en différents terpènes bicycliques.

2) Les terpènes peuvent induire une modification du contenu pigmentaire

Au cours de mon analyse, d'autres phénotypes ont été observés. Parmi eux, une modification de la coloration a été constatée comme le représente la figure 115. Les cultures exposées à des concentrations comprises entre 4 et 6 mM de (+/-)-citronellal présentant un aspect blanc légèrement jaunâtre laiteux. Cette observation peut s'expliquer par la lyse des cellules mais aussi par la diminution du contenu en pigments. En présence de terpinéol (1 mM), la culture de *Synechocystis* arbore une coloration verte-jaune souvent corrélée à une diminution en phycocyanine (pigment bleu) et/ou à une augmentation en caroténoïdes (pigment jaune). Enfin, la présence de farnésol (1 mM) a probablement induit une diminution dans le contenu en chlorophylle (pigment vert) puisque la culture est bleue. De plus, le farnésol est un analogue structural du phytol qui est ajouté à la chlorophyllide *a* pour synthétiser la chlorophylle *a* « mature ». La présence de farnésol pourrait ainsi inhiber la voie de synthèse des chlorophylles ce qui provoque cette coloration bleue.

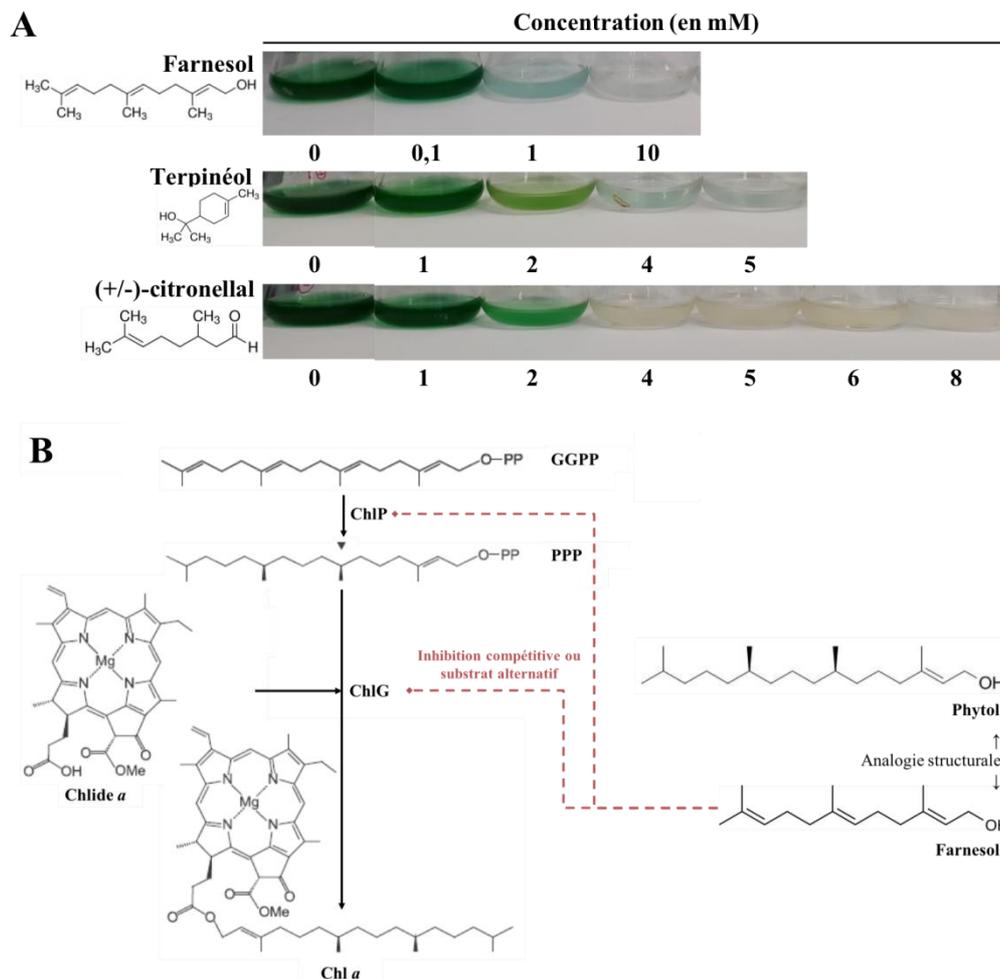


Figure 115 – Les terpènes modifient la coloration des cultures de *Synechocystis*

(A) Aspect des cultures obtenues après 72h d'incubation en absence et en présence de concentrations croissantes en terpènes (comme indiqué) ; (B) Le farnésol est un analogue structural de la queue phytol et qui peut donc potentiellement perturber la voie de biosynthèse de la chlorophylle *a*, conduisant à une diminution du contenu en chlorophylle expliquant la coloration bleue observée en (A).

3) Les terpènes favorisent l'agrégation et l'attachement des cellules

La figure 116A rend compte de l'effet des terpènes sur l'attachement des cellules contre la paroi du flacon de culture qui est bien moins importante en absence de terpènes (concentration 0). De plus, certains terpènes (comme le nerolidol, voir figure 116A) induisent la formation d'agrégats. Ces phénotypes suggèrent que les exopolysaccharides (très abondants chez *Synechocystis*) peuvent jouer un rôle dans la tolérance aux terpènes. Pour démontrer cela, une comparaison de la croissance entre une souche WT et un souche dépourvue d'exopolysaccharides (mutant $\Delta slr1875-sll1581$, (Jittawuttipoka et al., 2013)) a été réalisée (figure 116B à E). La croissance du mutant dépourvu d'exopolysaccharides est ralentie par rapport à la souche WT en présence de (+/-)-limonène (20 mM) et de (S)-(-)-limonène (5 mM). Ce mutant présente en plus une phase de latence allongée.

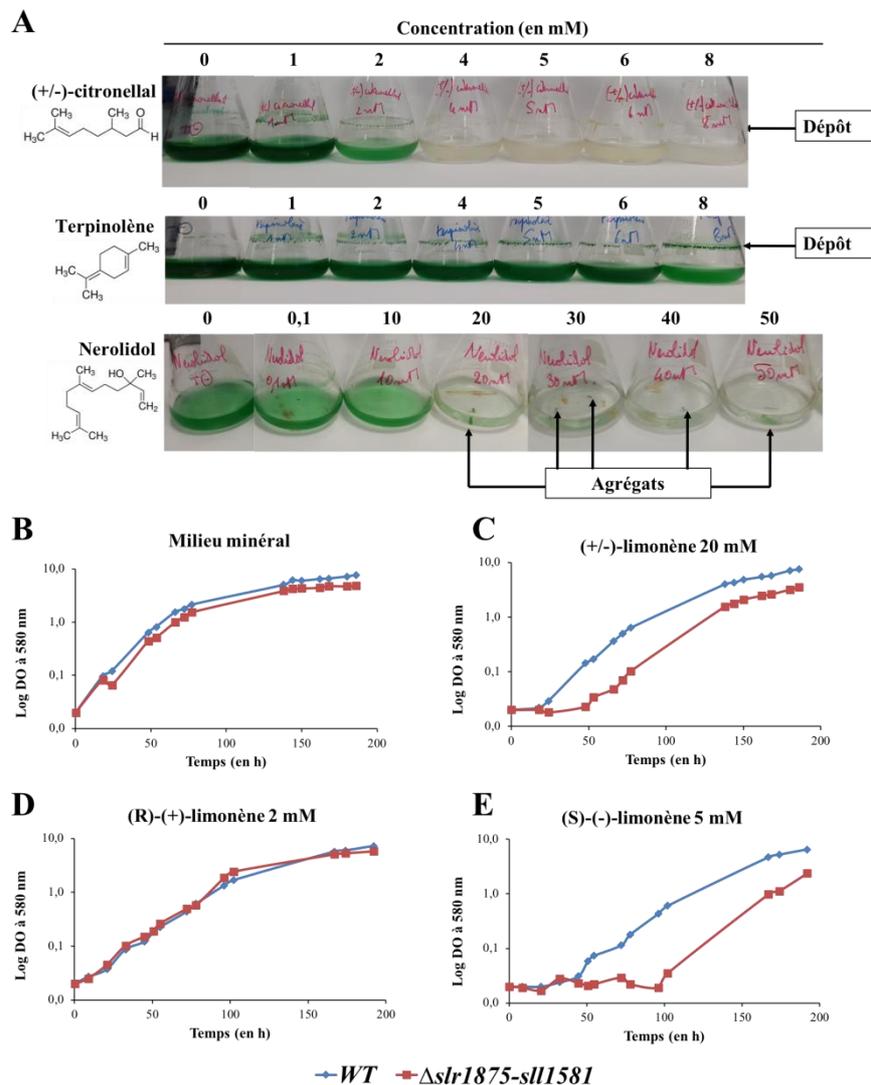


Figure 116 – Les exopolysaccharides protègent *Synechocystis* contre la toxicité des terpènes
 (A) Aspect des cultures obtenues en absence et en présence de concentrations croissantes en terpènes montrant la présence d'agrégats et d'un dépôt des cellules sur les parois du flacon de culture ; (B à E) Courbe de croissance des souches sauvage (WT) et mutante (dépourvue d'exopolysaccharides) en absence de terpènes (milieu minéral) et en présence de différents terpènes.

B. La toxicité des terpènes dépend de leur structure tridimensionnelle

J'ai également comparé la toxicité de différents stéréoisomères d'un même terpène comme ceux du limonène (stéréoisomérisation R et S ou + et -) et du pinène (stéréoisomérisation + et - ; et isomérisation de position de la double liaison : α et β) (Figure 117B et C).

La figure ci-dessous rend bien compte des différences de toxicité pour les différents stéréoisomères du limonène. Ainsi, la forme S est relativement peu toxique et sa toxicité est progressive (diminution de la DO à 580 nm des cultures pour des doses s'étalant de 15 et 20 mM). A l'inverse, la forme R est plus toxique (vers 10 mM) et sa toxicité est « radicale » (en « tout ou rien ») : entre 0-9 mM, pas de toxicité et à 10 mM et au-delà, toxicité élevée. Enfin, le mélange commercial des 2 stéréoisomères R et S présente une toxicité progressive et très faible comparativement aux 2 stéréoisomères seuls (Figure 117A). Bien que le ratio de forme R sur la forme S ne soit pas connu dans ce mélange commercial, cette observation n'est pas évidente à expliquer. Ce résultat est d'autant plus surprenant que dans le cas du α -pinène, celui-ci présente une toxicité progressive et intermédiaire (entre 12 et 20 mM) entre sa forme α -(+) (entre 8 et 10 mM) et α -(-) (entre 50 et 70 mM) (Figure 117D). Quoiqu'il en soit la différence de toxicité des différents stéréoisomères du limonène et du pinène suggère que leurs cibles cellulaires présentent une stéréospécificité.

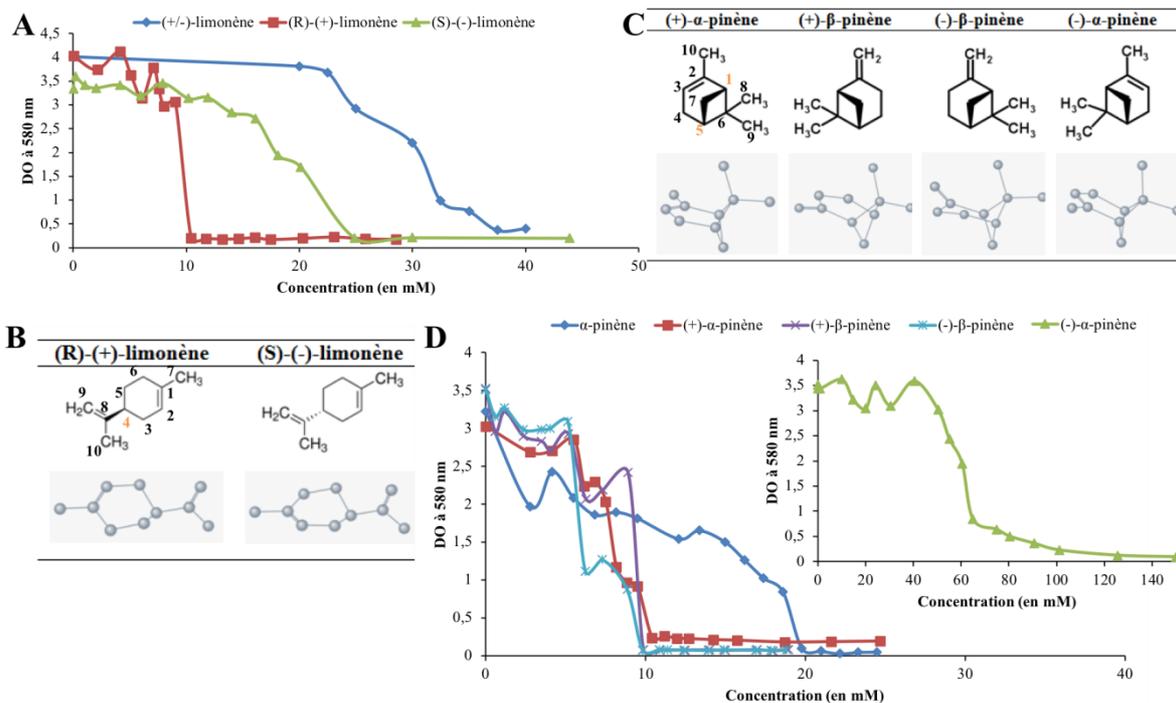


Figure 117 – La toxicité des terpènes dépend de leur structure tridimensionnelle
 (A) Evolution de la DO à 580 nm mesurée après 72h de culture en fonction de la concentration en diverses formes de limonène ; (B et C) Structure tridimensionnelle des 2 stéréoisomères du limonène (B) et des 4 stéréoisomères du pinène (C) ; (D) Evolution de la DO à 580 nm mesurée après 72h de culture en fonction de la concentration en diverses formes de pinène.

C. La toxicité des terpènes dépend plus de la présence de groupements fonctionnels (aldéhyde, alcool, cétone) que de la longueur de leur chaîne carbonnée

Comme décrit dans l'introduction traitant de la classification et de la diversité des terpènes, les dérivés des terpènes présentant des groupements fonctionnels (alcool, cétone...) sont appelés terpénoïdes. J'ai donc souhaité comparer la toxicité entre les terpénoïdes et les terpènes. En observant l'aspect des cultures pour diverses concentrations en terpènes/terpénoïdes, il est aisé de constater que la croissance de *Synechocystis* est inhibée pour des doses inférieures à 10 mM par les terpénoïdes contre plus de 50 mM pour les terpènes (Figure 118A). Cette observation est cohérente avec l'évolution de la DO à 580 nm en fonction de la concentration en terpènes/terpénoïdes (Figure 118B) qui montrent très clairement un décalage dans l'ordre de grandeur des concentrations qui inhibent la croissance. De plus, si l'on compare précisément la toxicité entre un terpène C10 (citronellène) à celle de son analogue terpénoïde (le (+/-)-citronellal), on confirme bien ce décalage dans la toxicité. Cette analyse a également révélé que la toxicité des terpènes linéaires (acycliques) ne dépend pas de la longueur de leur chaîne carbonnée.

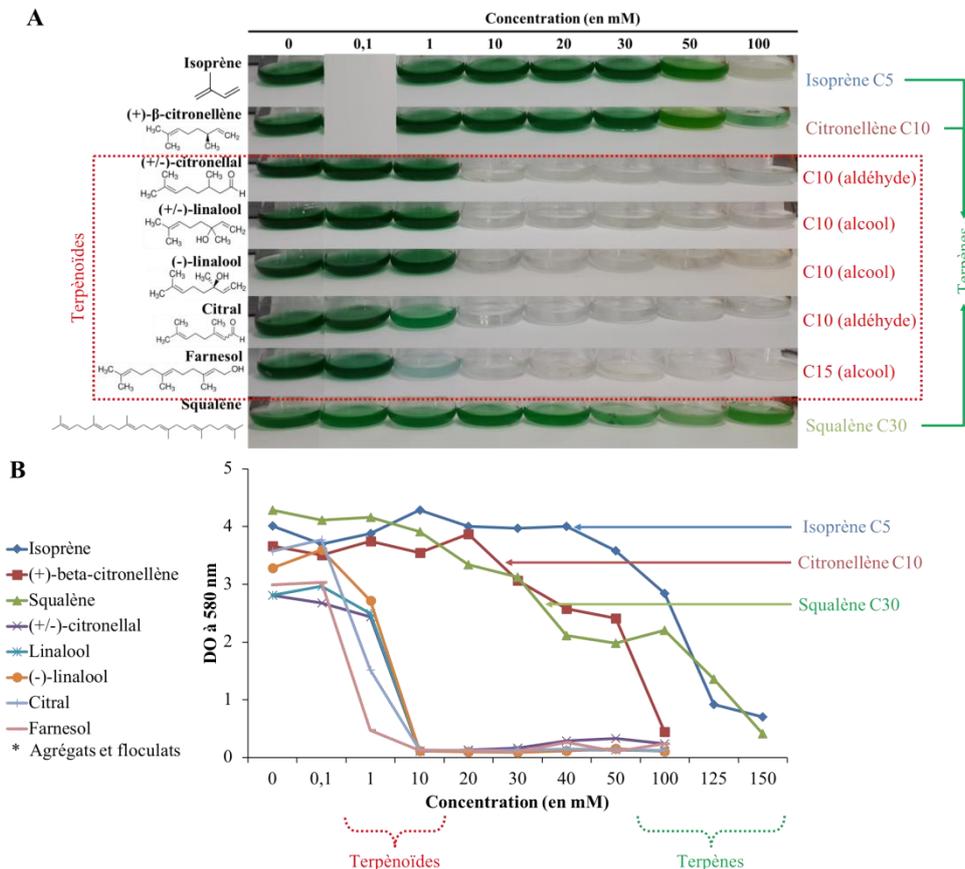


Figure 118 – La toxicité des terpènes acycliques ne dépend pas de la longueur de leur chaîne carbonnée mais plutôt de la présence d'un groupement fonctionnel

(A) Aspect des cultures obtenues en absence et en présence de concentrations croissantes en terpènes/terpénoïdes acycliques (comme indiqué) ; (B) Evolution de la DO à 580 nm mesurée après 72h de culture en fonction de la concentration en divers terpènes/terpénoïdes acycliques.

L'analyse de l'influence de la présence d'un groupement fonctionnel (alcool, cétone...) sur la toxicité des terpènes a également été réalisée pour des terpènes cycliques afin de vérifier si cette propriété s'applique pour diverses classes de terpènes (acycliques *versus* cycliques). L'évolution de la DO à 580 nm en fonction de la concentration en terpènes/terpénoïdes (Figure 119B) rend une nouvelle fois compte du décalage de toxicité entre les terpènes (au-delà de 10 mM) et les terpénoïdes (inférieure à 5 mM).

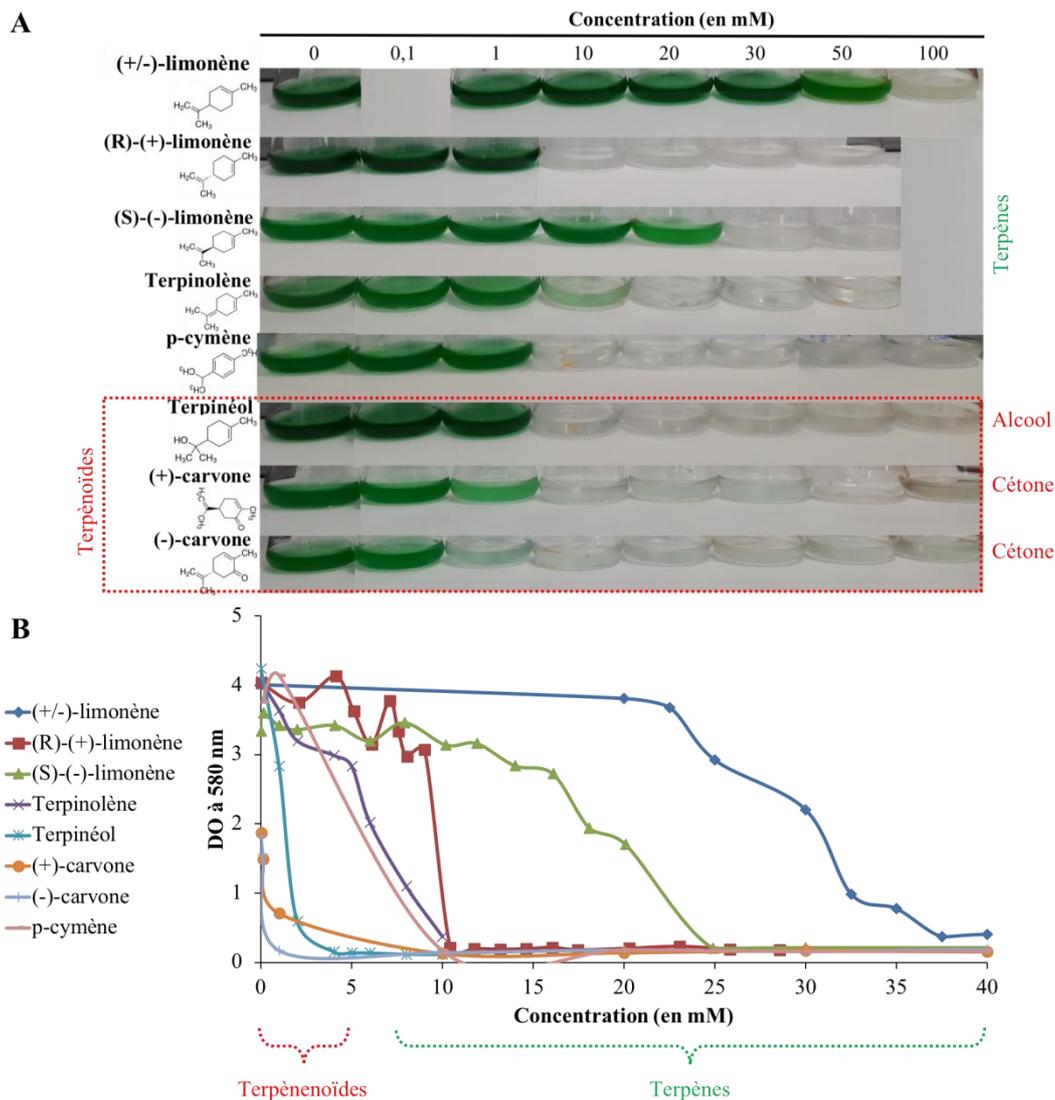
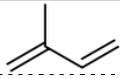
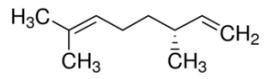
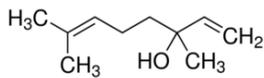
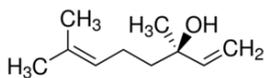
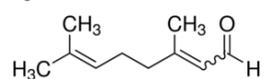
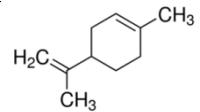
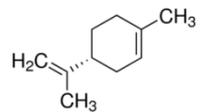
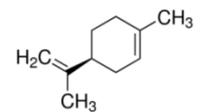
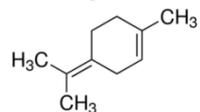
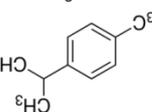
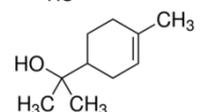
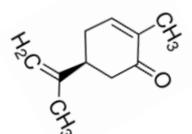
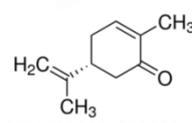
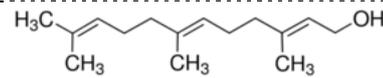
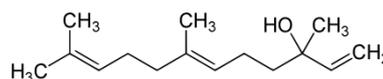
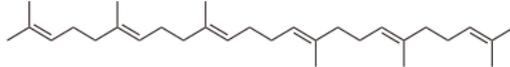


Figure 119 – La toxicité des terpénoïdes cycliques est également plus forte que leurs analogues terpènes

(A) Aspect des cultures obtenues en absence et en présence de concentrations croissantes en terpènes/terpénoïdes cycliques (comme indiqué) ; (B) Evolution de la DO à 580 nm mesurée après 72h de culture en fonction de la concentration en divers terpènes/terpénoïdes cycliques.

Le tableau ci-après offre un bilan de ces résultats (pour les terpènes/terpénoïdes acycliques et cycliques) et permet de mieux observer les différences structurales entre terpènes et terpénoïdes.

Tableau 18 – La toxicité des terpénoïdes est plus forte que celle des terpènes

Nom	Formule	Caractéristiques structurales	Groupe fonctionnel	DMI
Isoprène		Hémiterpène (C5) acyclique	-	> 150 mM
(+)-β-citronellène		Monoterpènes (C10) acycliques	-	> 100 mM
(+/-)-linalool			Alcool	> 1 mM
(-)-linalool			Alcool	> 2 mM
Citral			Aldéhyde	> 2 mM
(+/-)-limonène		Monoterpènes (C10) monocycliques	-	> 35 mM
(R)-(+)-limonène			-	> 10 mM
(S)-(-)-limonène			-	> 20 mM
Terpinolène			-	> 10 mM
p-cymène			-	> 10 mM
Terpinéol			Alcool	> 2 mM
(+)-carvone			Cétone	> 1 mM
(-)-carvone		Cétone	> 0,1 mM	
Farnesol		Sesquiterpènes (C15) acycliques	Alcool	> 1 mM
Nerolidol			Alcool	> 30 mM*
Squalène		Triterpène (C30) acyclique	-	> 150 mM

DMI : Dose Minimale Inhibitrice ; dose minimale pour laquelle on observe plus de croissance ; * : présence d'agrégats et de flocculats

II. Analyse de la tolérance-sensibilité des mutants Δgst aux terpènes et aux alcools-solvants

Les GST étant initialement définies comme des enzymes impliquées dans la détoxification des xénobiotiques, j'ai donc émis l'hypothèse qu'elles pouvaient jouer un rôle dans la tolérance-sensibilité aux terpènes. C'est pourquoi, j'ai comparé la tolérance-sensibilité des différents simples mutants de délétion Δgst aux différentes formes du limonène et pinène (les terpènes d'intérêt du laboratoire).

Pour cela, des cultures de la souche WT et des différents mutants Δgst calibrées à $DO_{580\text{ nm}} = 0,1$ ont été incubées pendant 72h à 30°C sous une intensité lumineuse de 2500 lux en absence et en présence de concentrations croissantes en limonène et pinène.

A. Résultats de l'analyse de la tolérance-sensibilité au limonène et au pinène

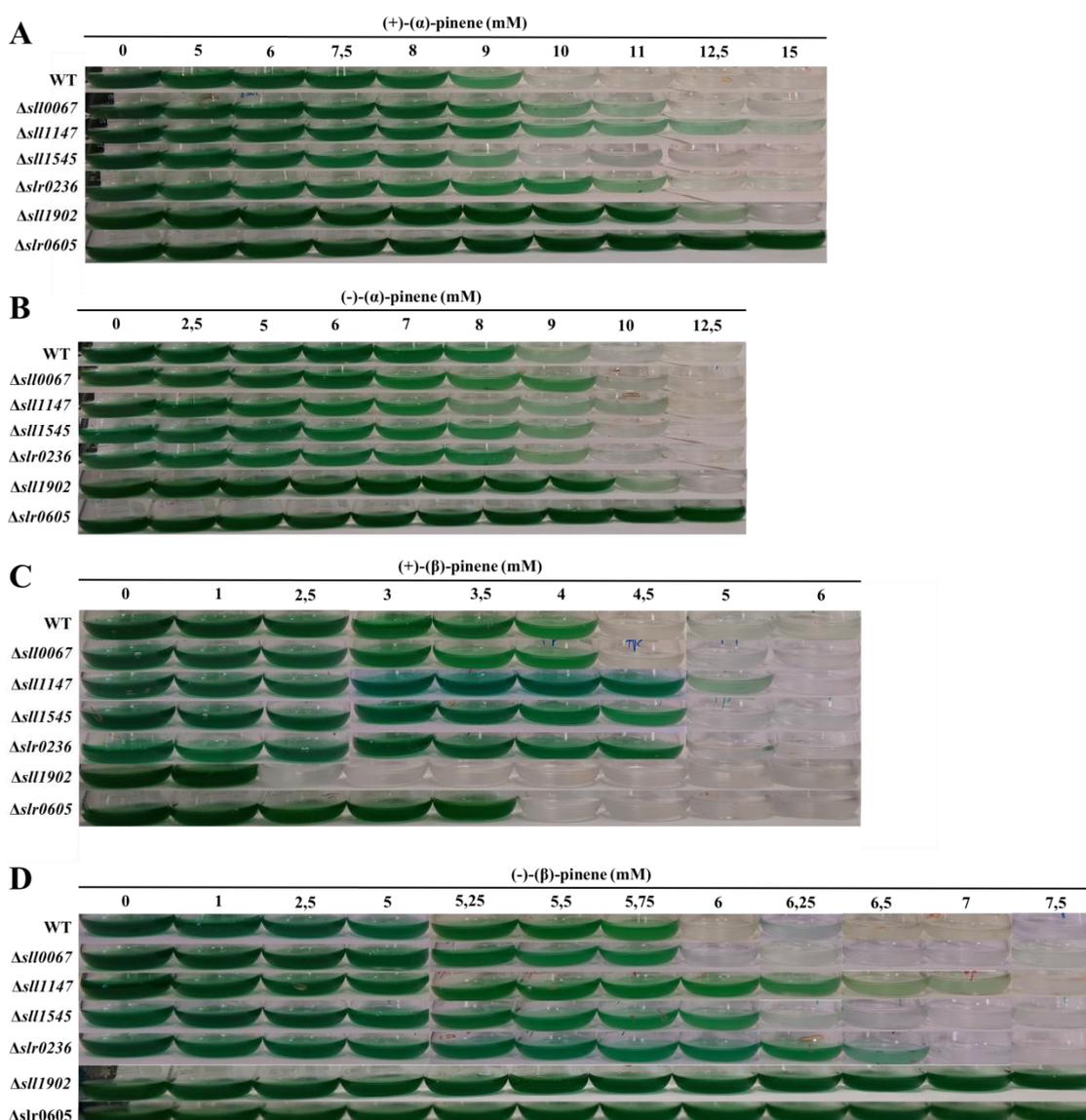


Figure 120 – Photographies des cultures obtenues après 72h d'incubation en absence ou en présence de concentrations croissantes en (A) : (+)- α -pinène ; (B) : (-)- α -pinène ; (C) (+)- β -pinène et (D) (-)- β -pinène

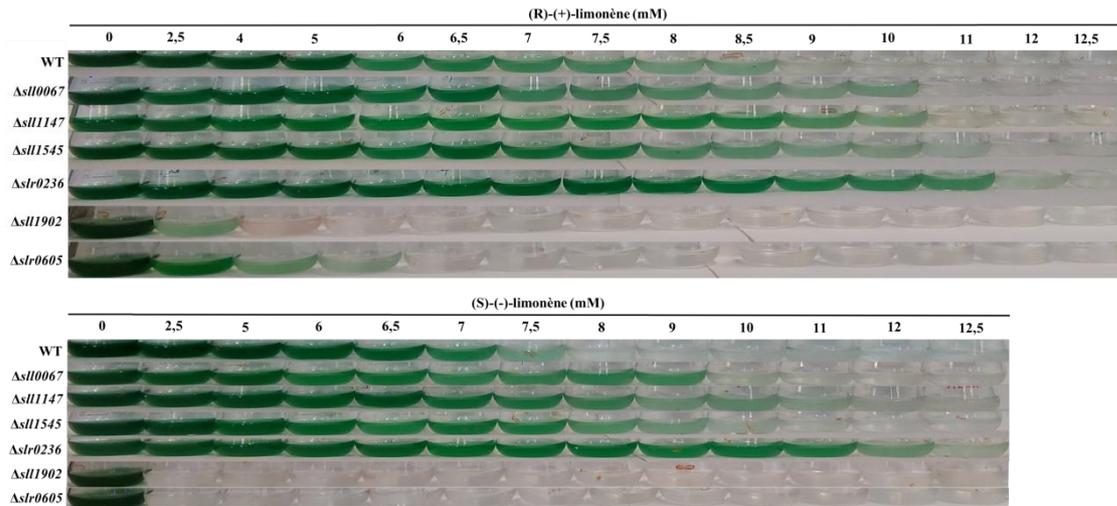


Figure 121 – Photographies des cultures obtenues après 72h d'incubation en absence ou en présence de concentrations croissantes en (A) : (R)-(+)-limonène et (B) : (S)-(-)-limonène

B. Résultats de l'analyse de la tolérance-sensibilité aux alcools-solvants

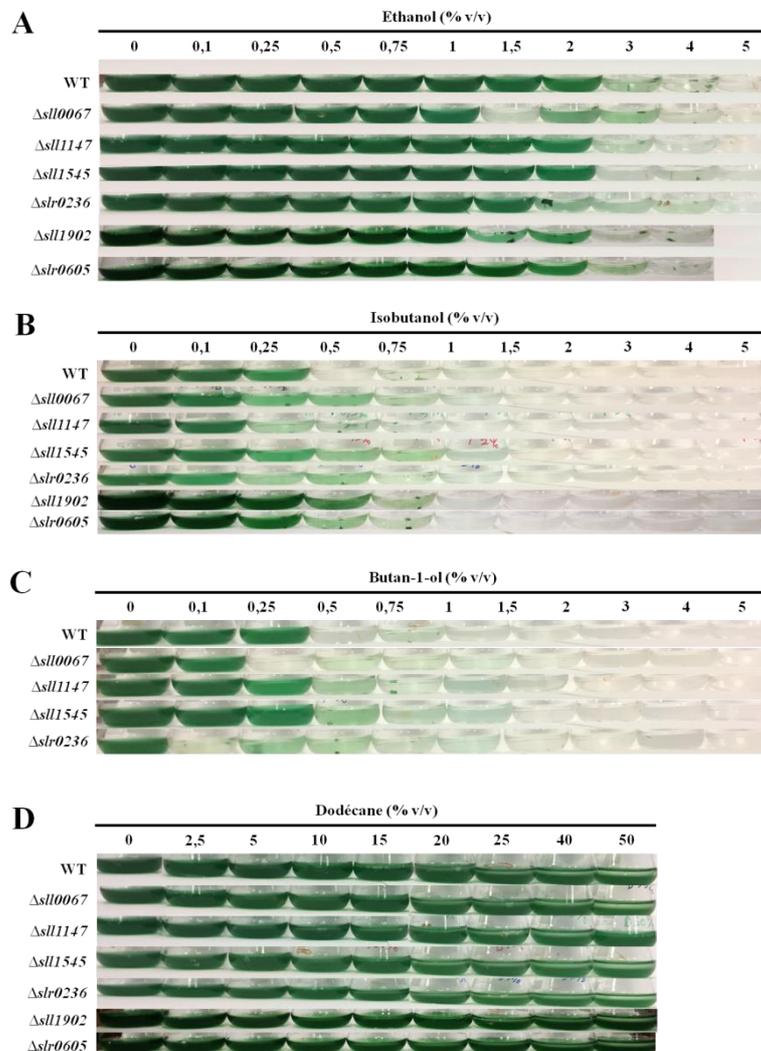


Figure 122 – Photographies des cultures obtenues après 72h d'incubation en absence ou en présence de concentrations croissantes en (A) : éthanol ; (B) isobutanol ; (C) butan-1-ol et (D) dodécane

C. Bilan des résultats

Le tableau 14 résume de manière synthétique les résultats. On constate que le mutant $\Delta sll0067$ est un peu plus résistant au limonène et à la forme α du pinène, que la souche sauvage. Tandis qu'il a un phénotype similaire à celui de la souche sauvage en présence de la forme β . Le mutant $\Delta sll1147$ est quant à lui plus résistant au limonène et au pinène que la souche sauvage quelque soit le stéréoisomère. Il serait intéressant de vérifier si ce mutant est résistant à d'autres terpènes pour conclure quant à son possible rôle direct ou indirect dans la résistance aux terpènes, notamment du fait que Sll1147 soit une protéine membranaire et que les terpènes (molécules hydrophobes) puissent interagir avec les membranes.

Les mutants $\Delta sll1545$ et $\Delta slr0236$ sont globalement plus tolérants au limonène et au pinène. A l'inverse, les mutants $\Delta sll1902$ et $\Delta slr0605$ sont très sensibles au limonène indiquant une possible spécificité de réponse aux terpènes chez ces mutants.

Tableau 19 – Bilan des résultats sur la tolérance-sensibilité des mutants Δgst aux terpènes (limonène et pinène) et aux alcools-solvants

	$\Delta sll0067$	$\Delta sll1147$	$\Delta sll1545$	$\Delta slr0236$	$\Delta sll1902$	$\Delta slr0605$
Terpènes						
Limonène						
(R)-(+)-limonène	r	r	r	R	S	S
(S)-(-)-limonène	R	R	R	R	S	S
Pinène						
(+)- α -pinène	R	R	WT	r	R+	R+
(-)- α -pinène	R	r	WT	WT	R+	R+
(+)- β -pinène	WT	R	r	r	S	S
(-)- β -pinène	WT	R	r	R	R+	R+
Alcools et solvants						
Ethanol	WT					
Isobutanol						
Butan-1-ol						
Dodécane						
WT : Comme la souche WT r : légèrement résistant ; R : résistant ; R+ : très résistant S : sensible						

CHAPITRE II – ÉTUDE DU RÔLE DES GST DANS LA TOLÉRANCE AUX STRESS

Pour explorer la redondance/sélectivité des 6 GST (SII0067, SII1147, SII1545, SII0236, SII1902 et SII0605) chez *Synechocystis*, j'ai construit les mutants de délétion de chacun des gènes codant pour une GST et j'ai analysé leur tolérance/sensibilité à différents stress (lumineux, oxydant, métabolique, thermique...) de façon systématique et sans *a priori*. Pour présenter les résultats issus de cette approche, j'ai choisi d'inclure les différents manuscrits (accepté, soumis ou en cours de rédaction) séparant ainsi l'analyse du rôle de chaque GST afin de montrer leur forte sélectivité fonctionnelle chez *Synechocystis*.

C'est dans cet état d'esprit que je m'appuierais sur mon premier manuscrit accepté dans la revue *Frontiers in Microbiology* qui présente la première démonstration *in vivo* que des GST (SII1545 et SII0236) sont impliquées dans la tolérance au stress photo-oxydant chez un organisme photosynthétique. Puis, je présenterai le rôle, conservé durant l'évolution des bactéries à l'Homme, de la GST SII1147 de type MAPEG dans la gestion des stress membranaires en incluant le manuscrit récemment soumis à *Frontiers in Microbiology*.

Le rôle essentiel de la GST SII0067 dans la détoxification du méthylglyoxal, un oxoaldehyde ubiquitaire dérivé du métabolisme, qui remet en cause le dogme selon lequel la première étape de conjugaison du méthylglyoxal au glutathion est non-enzymatique, sera ensuite présenté à l'aide d'un manuscrit en cours de rédaction. Enfin, je terminerai par une présentation plus classique des résultats que j'ai obtenus plus récemment lors de l'analyse du rôle des GST SII1902 et SII0605.

La conclusion finale que je propose sera l'occasion de discuter des possibles redondances, des interactions et des régulations potentiellement mises en jeu entre les GST et avec d'autres partenaires. Cette discussion offrira également une réflexion sur les perspectives à venir et sur des hypothèses de travail qui doivent nous motiver à poursuivre ces travaux.

I – Les GST homologues Sll1545 et Slr0236 sont impliquées dans la tolérance au stress photo-oxydant

A. Résumé du manuscrit

Parmi les 6 GST de *Synechocystis*, Sll1545 et Slr0236 ont attiré notre attention rapidement pour plusieurs raisons : (i) les premières analyses phénotypiques des mutants $\Delta sll1545$ et $\Delta slr0236$ a rapidement révélé leur sensibilité quasi-exclusive à des traitements oxydants (bleu de méthylène, H_2O_2 , ménadione...), (ii) ces résultats étaient en accord avec l'activité peroxydase de Sll1545 sur le cumene hydroperoxyde (Pandey et al., 2015a, 2017) et semble cohérent avec la physiologie des cyanobactéries qui sont sans cesse confrontées au stress photo-oxydant, et (iii) le fort pourcentage d'identité de séquence (32%) entre Sll1545 et Slr0236 nous a semblé indiqué une possible redondance fonctionnelle. Enfin, aucune donnée, autre que, *in vitro*, ne renseignait sur leur rôle et leur fonction *in vivo*. C'est donc pour toutes ces raisons que nous avons approfondi, en premier lieu, l'analyse du rôle de ces 2 GST Sll1545 et Slr0236.

La construction des mutants de délétion de *sll1545* et *slr0236* et l'analyse de leur phénotype a tout d'abord révélé que le gène *slr0236* est indispensable à la croissance en photoautotrophie chez *Synechocystis*, alors que le gène *sll1545* est quant à lui indispensable dans ces conditions (Figure 1 du manuscrit). En d'autres termes, le mutant $\Delta slr0236$ est totalement ségrégé c'est-à-dire que toutes les copies du gène *slr0236* ont été remplacées par la cassette de délétion alors que le mutant $\Delta sll1545$ n'est pas totalement ségrégé et conserve quelques copies du gène *sll1545* parmi les multiples copies du chromosome de *Synechocystis* (10-12). En dépit de cette observation et du fait qu'il existe une homologie entre Sll1545 et Slr0236, J'ai également construit le double mutant $\Delta slr0236-sll1545$ dans lequel j'ai pu confirmé le caractère essentiel de *sll1545*. Nous verrons par la suite que c'est le seul gène essentiel parmi les 6 gènes codant pour une GST que j'ai déléétés. Par abus de langage mais pour plus de simplicité j'appellerai le mutant déléété de Slr1545 mutant $\Delta sll1545$

J'ai testé la sensibilité au stress lumineux (photo-oxydant) et pu montrer (Figure 2 du manuscrit) que le double mutant $\Delta slr0236-sll1545$ est photosensible tandis que chacun des simples mutants ($\Delta sll1545$, $\Delta slr0236$) ne le sont pas. Ceci suggère un(e) rôle/activité redondant(e) des deux GST Sll1545 et Slr0236 dans la photo-tolérance.

En poursuivant les analyses, il a été montré que le mutant combinant l'absence totale de Slr0236 avec l'absence partielle de Sll1545 (c'est-à-dire le double mutant $\Delta slr0236-sll1545$) accumule de façon transitoire et séquentielle des ROS, puis du glutathion réduit (GSH) et enfin du glutathion oxydé (GSSG). Ce résultat suggère que Sll1545 et Slr0236 agissent dans la protection contre les ROS en utilisant un mécanisme rédox qui transforme le GSH en GSSG (Figure 3 du manuscrit). Des résultats similaires ont été obtenus après une exposition au bleu de méthylène (qui induit de l'oxygène singulet (1O_2)), au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et à la ménadione (qui produit de radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)) (voir Figures 4 et 5 du manuscrit).

En plus de la redondance fonctionnelle entre Sll1545 et Slr0236, nous avons également constaté une certaine sélectivité. En premier lieu, la différence de ségrégation entre le mutant $\Delta slr0236$ (ségrégation totale) et le mutant $\Delta sll1545$ (ségrégation partielle) laissait suggérer que certaines fonctions remplies par la protéine Sll1545 sont essentielles et ne peuvent donc pas être remplacées par son homologue Slr0236 (ou par d'autres protéines). De

plus, nous avons montré que seul un mutant dépourvu en partie de la protéine Sll1545 ($\Delta sll1545$ ou $\Delta slr0236-sll1545$) présente une forte accumulation en glutathion réduit en réponse au H₂O₂ en accord l'activité peroxydase de la protéine Sll1545 déjà décrite dans la littérature (Pandey et al., 2015a, 2017).

Enfin, nous avons montré que la plus grande tolérance du double mutant $\Delta slr0236-sll1545$ au H₂O₂ et à la ménadione était due en partie à la forte accumulation de GSH pour prendre en charge les ROS qui s'accumulent dans la cellule en réponse à ces traitements, mais aussi à l'activité augmentée de la catalase, suggérant un lien de régulation et/ou d'interaction entre les GST Sll1545 et Slr0236 et la catalase bifonctionnelle de *Synechocystis* (voir figure 6 et 7 du manuscrit).

B. *Format du manuscrit*

Nature/Etat du manuscrit : **Manuscrit accepté** (Accepted manuscript)

Version/Format : **PDF en ligne**

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01899>

Journal/Revue cible : ***Frontiers in Microbiology***

Le manuscrit implémenté à ce mémoire de thèse correspondant à la version PDF publiée en ligne en Open Access. Il est intitulé « First *in vivo* evidence that glutathione-S-transferase operates in photo-oxidative stress in cyanobacteria » et a été accepté dans la revue *Frontiers in Microbiology* est composé de façon classique :

- d'un résumé en première page,
- d'une introduction,
- d'une section « Résultats » comprenant 9 figures,
- d'une section « Discussion »
- et d'une section « Matériels et Méthodes ».

A cela s'ajoute les données supplémentaires qui correspondent respectivement au tableau des plasmides et au tableau des amorces, et qui sont présentés après le manuscrit.

C. *Manuscrit n°1*



First *in vivo* Evidence That Glutathione-S-Transferase Operates in Photo-Oxidative Stress in Cyanobacteria

Xavier Kammerscheit*, Franck Chauvat and Corinne Cassier-Chauvat*

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Davide Zannoni,
University of Bologna, Italy

Reviewed by:

Francisco J. Florencio,
University of Seville, Spain
Mirko Zaffagnini,
University of Bologna, Italy

*Correspondence:

Xavier Kammerscheit
xavier.kammerscheit@u-psud.fr
Corinne Cassier-Chauvat
corinne.cassier-chauvat@cea.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Physiology and Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 13 May 2019

Accepted: 31 July 2019

Published: 13 August 2019

Citation:

Kammerscheit X, Chauvat F and
Cassier-Chauvat C (2019) First *in vivo*
Evidence That
Glutathione-S-Transferase Operates
in Photo-Oxidative Stress
in Cyanobacteria.
Front. Microbiol. 10:1899.
doi: 10.3389/fmicb.2019.01899

Although glutathione (GSH) and GSH-dependent enzymes, such as glutathione transferases (GSTs), are thought to have been developed by cyanobacteria to cope with the reactive oxygen species (ROS) that they massively produced by their active photosynthesis, there had been no *in vivo* analysis of the role of GSTs in cyanobacteria so far. Consequently, we have analyzed two of the six GSTs of the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803, namely Sll1545 (to extend its *in vitro* study) and Slr0236 (because it is the best homolog to Sll1545). We report that Sll1545 is essential to cell growth in standard photo-autotrophic conditions, whereas Slr0236 is dispensable. Furthermore, both Sll1545 and Slr0236 operate in the protection against stresses triggered by high light, H₂O₂, menadione and methylene blue. The absence of Slr0236 and the depletion of Sll1545 decrease the tolerance to methylene blue in a cumulative way. Similarly, the combined absence of Slr0236 and depletion of Sll1545 decrease the resistance to high light. Attesting their sensitivity to high-light or methylene blue, these Δ slr0236-sll1545 cells transiently accumulate ROS, and then reduced and oxidized glutathione in that order. In contrast, the absence of Slr0236 and the depletion of Sll1545 increase the tolerance to menadione in a cumulative way. This increased menadione resistance is due, at least in part, to the higher level of catalase and/or peroxidase activity of these mutants. Similarly, the increased H₂O₂ resistance of the Δ slr0236-sll1545 cells is due, at least in part, to its higher level of peroxidase activity.

Keywords: *Synechocystis* PCC 6803, light tolerance, methylene blue, menadione, hydrogen peroxide, catalase-peroxidase, glutathione

INTRODUCTION

Glutathione, the highly abundant (1–10 mM) tripeptide L-glutamyl-L-cysteinyl-L-glycine (Lu, 2013), plays a crucial role in cell resistance to oxidative and metabolic stresses in most organisms. Glutathione occurs under two forms (Zhang and Forman, 2012; Lu, 2013). The reduced (major) form (GSH) maintains the intracellular compartment in a reduced state and supplies electrons to various enzymes, such as glutaredoxins, glutathione peroxidases and glutathione-S-transferases (GSTs) that detoxify reactive oxygen species (ROS), xenobiotics and/or heavy metals (Yadav, 2010; Noctor et al., 2012). The resulting oxidized form of glutathione, the dimeric disulfide form (GSSG), can be reduced back to GSH by various factors, such as the NADPH-using enzyme glutathione reductase (GR) that occurs in many but not all organisms (Fahey, 2013). For example, the presently studied model cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 has no GR (Marteyn et al., 2009; Naraimsamy et al., 2013). ROS can also function in signaling but it is important to note that

the changes in ROS required for signaling do not cause significant changes in intracellular ratio of GSH to GSSG signaling (Schieber and Chandel, 2014).

The superfamily of GSTs (EC 2.5.1.18) catalyzes the nucleophilic attack by the reduced (thiol) sulfur atom (SH) of the cysteinyl residue of GSH on the electrophilic center of diverse hydrophobic compounds (R-X). This generates water-soluble glutathione conjugates linked by a thioether bond (GS-R) that can then be degraded, or excreted out of the cell (Deponte, 2013). Physiologically, this transferase activity operates in the detoxification of endogenous ROS (Noctor et al., 2012) and peroxides compounds, as well as xenobiotics, heavy metals (Yadav, 2010; Noctor et al., 2012) and phytotoxics (for review, see Nianiou-Obeidat et al., 2017).

Glutathione-S-transferases can also display a GSH-dependent thiol-transferase activity that generates disulfide bridges, which can link the thiols of the cysteinyl residue of two molecules of GSH, yielding GSSG (Deponte, 2013), or the cysteinyl thiols of one molecule of GSH and of one cysteine residue of a protein (a phenomenon termed glutathionylation) (Manevich et al., 2004; Carvalho et al., 2016). The reduction of these disulfide bridges (called deglutathionylation) can be catalyzed by various enzymes (glutaredoxins, thioredoxins) including GSTs (for a recent review, see Sylvestre-Gonon et al., 2019). In photosynthetic organisms, deglutathionylation was found to operate in redox regulation, protection and recovery of oxidized enzymes (Moons, 2005; Marteyn et al., 2013; Nianiou-Obeidat et al., 2017).

Glutathione-S-transferases can also have GSH-dependent peroxidase (GPOX) and dehydroascorbate reductase (GDHAR) activities (Moons, 2005). For example, in plants a tau-class GST operates in the transcriptional activation of flavonoid biosynthesis genes involved in cell defenses (Moons, 2005).

In addition, GSTs can also have a non-catalytic “ligandin” activity that binds non-substrate ligands (Oakley, 2011). In plants, this activity is involved in the cellular distribution of phytohormones and anthocyanin (Nianiou-Obeidat et al., 2017).

Glutathione-S-transferases are commonly divided in three different families: (i) cytosolic GSTs, (ii) mitochondrial GSTs, and (iii) microsomal (membranous) GSTs designated as MAPEGs (membrane-associated protein involved in ecosanoid and glutathione metabolism) (Oakley, 2011). Cytosolic GSTs, which constitute the largest GST family, can be divided in many classes according to their protein sequence and structure (Oakley, 2011), the nature of their xenobiotic substrates and their antibody cross reactivity (Blanchette et al., 2007). Members of a same cytosolic GSTs class possess greater than 40% amino-acid (aa) sequence identity, whereas GSTs belonging to different classes share less than 25% of aa identity (Oakley, 2011). The currently recognized classes of cytosolic GSTs are: alpha, beta, delta, epsilon, zeta, theta, lambda (Lallement et al., 2014), mu, nu, pi, sigma, tau, phi, and omega (for review, see Oakley, 2011). More recently, others GST classes were described in bacteria: nu, zeta, and eta (for review, see Shehu et al., 2018) and in cyanobacteria: chi (Wikteliu and Stenberg, 2007; Pandey et al., 2015) and rho (Pandey et al., 2017). The mitochondrial GSTs share an evolutionary pattern with the cytosolic GSTs but differ from them by their structure and their subcellular localization

(Morel and Aninat, 2011). The MAPEG GSTs operate in the detoxification of lipid peroxidation (Johansson et al., 2010), or the biosynthesis of hormone (leukotrienes, prostaglandins, and steroids) (Ago et al., 2007; Oakley, 2011; Sjögren et al., 2013).

Very little is known about GSTs in cyanobacteria, even though these prokaryotes are regarded as the inventor of the oxygen-evolving photosynthesis (William Schopf, 2011), as well as the GSH and the GSH-dependent GST enzymes to protect themselves against the ROS that they massively produce by their active photosynthesis (William Schopf, 2011). ROS can also operate in signaling (see above). Furthermore, cyanobacteria produce a large of the biomass and oxygen for the food chain, have a high interest for basic research (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2018). They are widely used to decipher the molecular processes of photosynthesis (they are viewed, as the ancestors of the plant chloroplast Archibald, 2009) and the related carbon fixation process (Montgomery et al., 2016), as well as nitrogen fixation and cell communication (Herrero et al., 2016), cell differentiation (Magnuson, 2019) and division. Moreover, cyanobacteria are increasingly studied and engineered for the future photosynthetic (carbon-neutral) production of high-value chemicals (Knoet et al., 2018). The realization of this important goal requires a better understanding of the cyanobacterial tolerance to stresses (Cassier-Chauvat et al., 2016), again highlighting the interest of studying the cyanobacterial GST.

The chi and rho classes of cytosolic GSTs were first identified by *in silico* and/or *in vitro* analyses of GST genes from the unicellular cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 6301 and *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 for chi class (Wikteliu and Stenberg, 2007), and *Synechocystis* PCC 6803 for chi (Pandey et al., 2015) and rho classes (Pandey et al., 2017). The cyanobacterial chi GSTs produced in *Escherichia coli* were found to efficiently catalyze the conjugation of GSH to the plant defense isothiocyanate compounds (Wikteliu and Stenberg, 2007). The *Synechocystis* PCC 6803 rho GST produced in *E. coli* was shown to have a strong dichloro-acetate dehalogenase activity and a glutathione-dependent peroxidase activity with a high preference for cumene hydroxyperoxide (Pandey et al., 2017).

In the frame of our long-term interest in stress responses in cyanobacteria (for a review, see Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014) we carried out the first *in vivo* analysis of cyanobacterial GSTs. For this purpose, we used the widely studied model *Synechocystis* PCC 6803 (hereafter *Synechocystis*) that possesses a small genome (about 4.0 Mb) comprising six chromosomal GST genes (designated as *sll0067*, *sll1147*, *sll1545*, *sll1902*, *slr0236*, and *slr0605* in cyanobase)¹. We focused our attention on *sll1545* and *slr0236* because Sll1545 was shown *in vitro* to possess a genuine GST activity (Pandey et al., 2017) and Slr0236 because we found that it shares the greatest sequence identity with Sll1545 (about 32%). We show that Sll1545 is essential to the growth of *Synechocystis* in standard photo-autotrophic conditions, whereas Slr0236 is dispensable. Both Sll1545 and Slr0236 operate in the tolerance to stresses triggered by high light, H₂O₂, menadione and methylene blue. We also report on the impact of Sll1545 and

¹<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>

Slr0236 on the kinetics of appearance and elimination of ROS, and the subsequent oxidation and re-reduction of glutathione used for their detoxification.

RESULTS

The *sll1545* GST Gene Is Essential for the Viability of *Synechocystis* Whereas *slr0236* Is Dispensable for the Photoautotrophic Growth

To analyze *in vivo* the role of Sll1545 and Slr0236, the two best homologous GSTs of *Synechocystis* (about 32% of amino-acids sequence identity, data not shown), we constructed the deletion mutants of the *sll1545* and *slr0236* genes, using the standard procedure. Practically, the full protein-coding sequences of *sll1545* and *slr0236* were independently replaced by a transcription-terminator-less antibiotic-resistance gene *Km^r* or *Sm^r/Sp^r* for selection, while preserving 300 bp of the *sll1545* and *slr0236* flanking DNA regions for homologous recombination mediating targeted gene replacement upon transformation to *Synechocystis* (Labarre et al., 1989). The resulting deletion cassettes cloned in an *E. coli* plasmid (Supplementary Table S1) were independently introduced in *Synechocystis* by transformation (Labarre et al., 1989). In each case a few (antibiotic resistant) transformants were selected and analyzed by PCR with specific oligonucleotide primers (Supplementary Table S2 and Figures 1A,C,E) to verify that the *Km^r* or *Sm^r/Sp^r* marker genes had properly replaced *sll1545* or *slr0236* in the polyploid *Synechocystis* chromosome (it occurs, at about ten copies per cell Labarre et al., 1989). Then, we assayed whether the segregation of WT and mutant (*Km^r* or *Sm^r/Sp^r*) chromosome copies was complete (the gene is dispensable to cell growth) or not (the gene is essential to cell viability).

All $\Delta slr0236:Km^r$ transformants possessed only $\Delta slr0236:Km^r$ chromosomes [Figure 1D, see the presence of a 941 bp PCR product characteristic of $\Delta slr0236:Km^r$ chromosomes, and the absence of a 443 bp DNA band typical of WT (*slr0236⁺*) chromosomes]. The absence of WT (*slr0236⁺*) chromosome copies in $\Delta slr0236:Km^r$ mutants was confirmed by growing the cells for multiple generations in absence of *Km* to stop counter-selecting WT (*slr0236⁺*, i.e., *Km^S*) chromosome copies. These $\Delta slr0236:Km^r$ cells grown in absence of *Km* harbored only $\Delta slr0236:Km^r$ mutant chromosomes, no WT (*slr0236⁺*, *Km^S*) chromosomes (Figure 1A, see the 941 bp PCR product and the absence of a 443 bp PCR band). Together, these results show that *slr0236* is dispensable to cell viability.

In contrast, the attempted deletion of the *sll1545* gene invariably generated *Km^r* clones carrying two types of chromosomes, mutant ($\Delta sll1545:Km^r$) and WT (*sll1545⁺*) irrespectively of the duration of growth in the presence of *Km* used for selection (Figure 1B, see the 941 bp and 355 bp PCR products characteristic of, respectively, $\Delta sll1545:Km^r$ and *sll1545⁺* chromosomes). Similarly, the attempted deletion of *sll1545* with the $\Delta sll1545:Sm^r/Sp^r$ cassette generated clones harboring the two types of chromosomes, mutant

$\Delta sll1545:Sm^r/Sp^r$) and WT (*sll1545⁺*). Collectively, these results show that *sll1545* is essential to the photoautotrophic growth of *Synechocystis*.

In a parallel experiment, we also attempted to delete the *sll1545* gene in the $\Delta slr0236:Km^r$ mutant because we reasoned that the highly homologous Slr0236 and Sll1545 proteins could perform similar roles, which should be more affected, and thereby more identifiable, in the mutant combining the absence of Slr0236 and the depletion of Sll1545 than in the corresponding single mutants (lack of Slr0236 or depletion of Sll1545). Practically, we transformed the $\Delta slr0236:Km^r$ mutant with the $\Delta sll1545:Sm^r/Sp^r$ cassette. As anticipated, the resulting *Km^r*, *Sm^r/Sp^r* mutant lacked the *slr0236⁺* WT gene and retained the *sll1545⁺* WT gene (Figure 1F, see the typical PCR DNA bands of $\Delta slr0236:Km^r$, $\Delta sll1545:Sm^r/Sp^r$ and *sll1545⁺* chromosomes, and the absence of the *slr0236⁺* chromosome). These findings confirmed that *slr0236* and *sll1545* are, respectively, dispensable and crucial to cell growth in standard photoautotrophic conditions. The three mutants constructed in this study are designated as $\Delta slr0236$ (absence of *slr0236*), $\Delta sll1545$ (depletion of *sll1545*), and $\Delta slr0236-sll1545$ (combined absence of *slr0236* and depletion of *sll1545*).

The Combination of the Deletion of *slr0236* and the Depletion of *sll1545* Confers a Light Sensitive Phenotype

Cyanobacteria are often challenged by toxic ROS that are produced when photosynthesis generates more electrons than what is needed for CO₂ assimilation (Naraimsamy et al., 2013). Consequently, to investigate the role of the Sll1545 and Slr0236 GSTs in the tolerance to light stress, we have tested the influence of various light intensities (1750, 2500, 7500, and 10000 lux) on the growth of our mutants in solid (Figure 2A) and liquid (Figures 2B–E) culture media. The two single mutants $\Delta slr0236$ (absence of *slr0236*) and $\Delta sll1545$ (depletion of *sll1545*) grew as fit as the WT strain and our other GST mutants (their construction and analysis will be published elsewhere) under all light fluences. These other mutants were showed here merely to avoid manipulating the image for not showing them. In contrast, the growth of the $\Delta slr0236-sll1545$ mutant was increasingly affected under increasing illumination, indicating that the combined absence of *slr0236* and depletion of *sll1545* decrease the tolerance to light.

The Light-Sensitive Mutant Combining the Deletion of *slr0236* and the Depletion of *sll1545* Exposed to High-Light Undergoes a Transient Sequential Accumulation of ROS and Then of Reduced (GSH) and Oxidized (GSSG) Glutathione

To analyze the influence of high-light on the mutants $\Delta slr0236$ (absence of *slr0236*), $\Delta sll1545$ (depletion of *sll1545*), $\Delta slr0236-sll1545$ (combined absence of *slr0236* and depletion of *sll1545*) and the WT strain we measured the ROS content (Figures 3A,B),

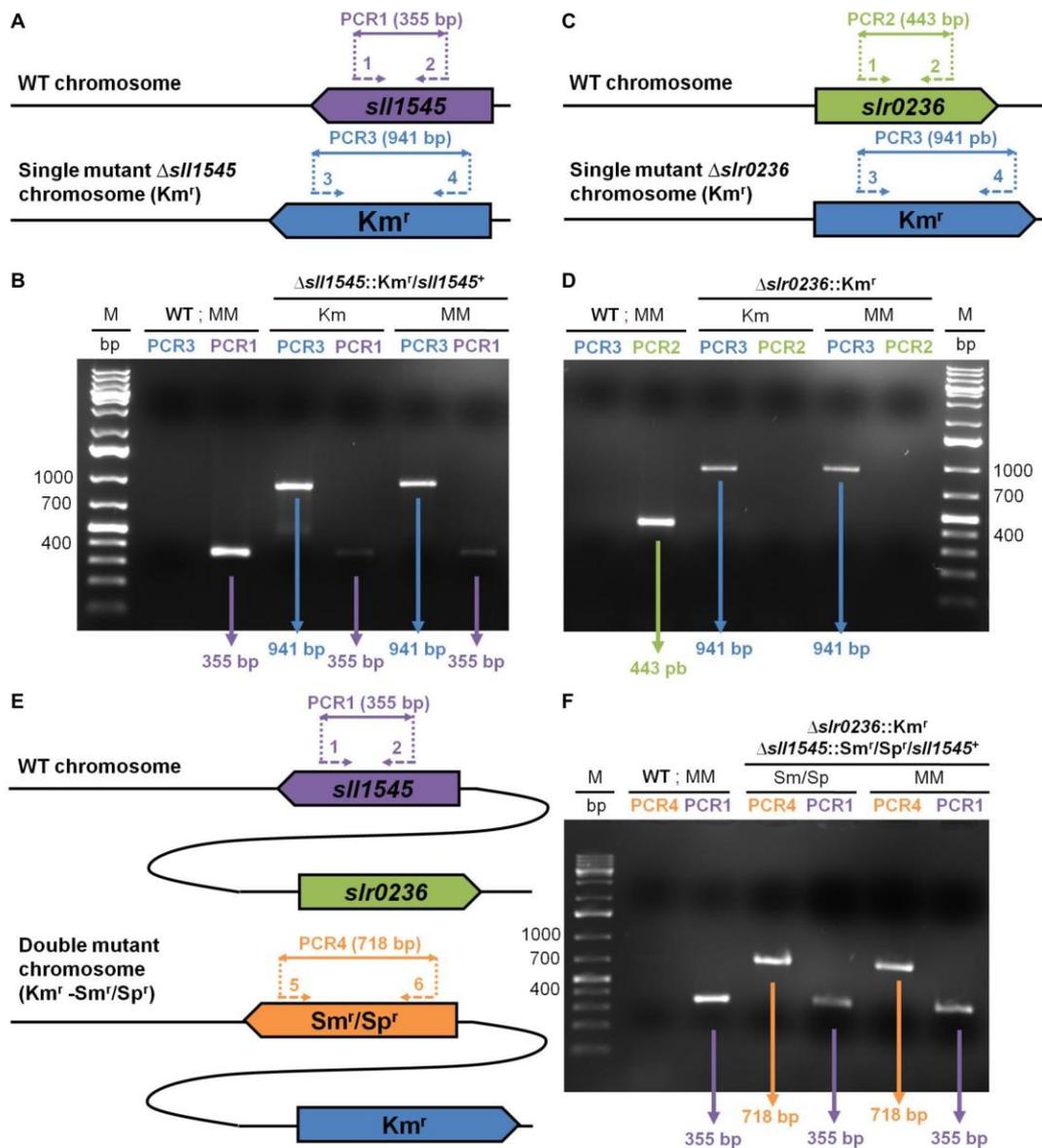
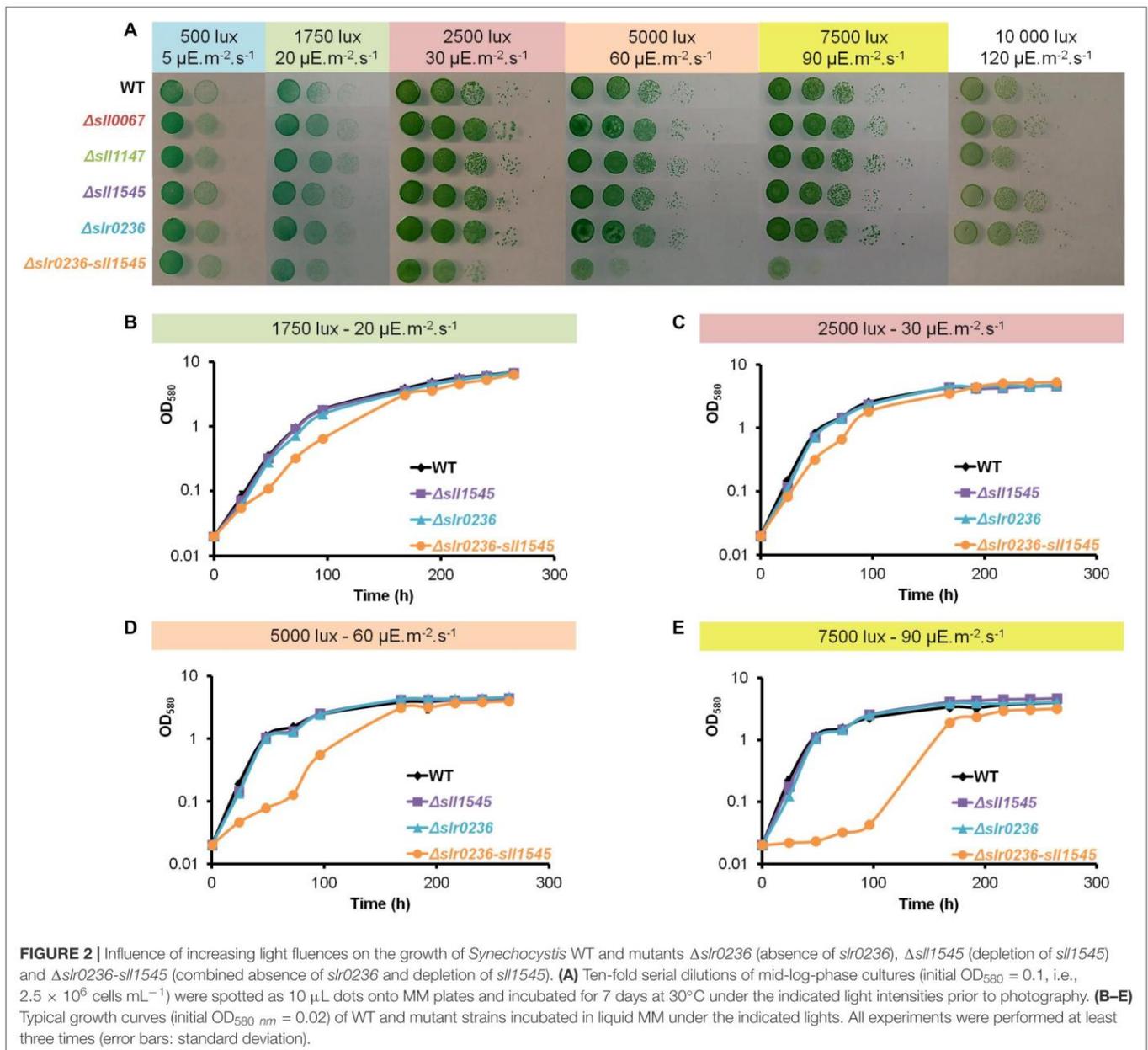


FIGURE 1 | PCR analysis of the studied chromosome loci in *Synechocystis* WT strain and the mutants constructed in this study, which were grown in absence (MM) or presence of the selective antibiotics (Km or Sm/Sp). **(A,C,E)** The genes are represented by colored arrows (*sll1545*: purple; *slr0236*: green; *Km^r*: blue, and *Sm^r/Sp^r*: orange) which point into the direction of their transcription. The same color code is used to represent the PCR primers (dotted arrows see **Supplementary Table S2** for their sequence) and the corresponding PCR products (double arrows) typical of the presence of the WT, *Km^r* or *Sm^r/Sp^r* chromosome copies. **(B,D,F)** Typical UV-light images of the agarose gels showing the PCR products corresponding to the genes *sll1545* (PCR1: purple), *slr0236* (PCR2: green), *Km^r* (PCR3: blue) and *Sm^r/Sp^r* (PCR4: orange). M indicates the GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Note that (1) WT cells harbors only WT chromosomes; (2) the $\Delta slr0236::Km^r$ mutant possesses only $\Delta slr0236::Km^r$ chromosomes; (3) the $\Delta sll1545::Km^r/sll1545^+$ mutant has both WT (*sll1545*⁺) and mutant ($\Delta sll1545::Km^r$) copies of the chromosomes. The mutant $\Delta slr0236::Km^r - \Delta sll1545::Sm^r/Sp^r - sll1545^+$ harbors only $\Delta slr0236::Km^r$ chromosome copies some of which possess the *sll1545*⁺ WT allele whereas the other possess the $\Delta sll1545::Sm^r/Sp^r$ mutant allele.

using the standard fluorescent probe DCHF-DA (Gomes et al., 2005). As GSTs are generally involved in glutathione-dependent reactions, we also measured the levels of the reduced (GSH), oxidized (GSSG) and total glutathione ($GS_{total} = GSH + GSSG$) (Figures 3G,H) using the relevant standard assay (Akerboom and Sies, 1981). In accordance with its light-sensitivity the $\Delta slr0236-sll1545$ mutant facing high light (7500 lux) rapidly (in 1 h)

accumulated ROS (Figure 3B). Subsequently (at 3 h), the content of ROS decreased while the level of both GSH (the major form of glutathione) and GS_{total} increased (Figures 3B,D,F). Later (at 8 h) the decline of ROS has progressed and the decline of GSH and GS_{total} has begun, whereas the content of GSSG has increased (Figures 3B,D,F,H). In contrast, the two single mutants $\Delta slr0236$ and $\Delta sll1545$ exposed to high light showed (i) no accumulation



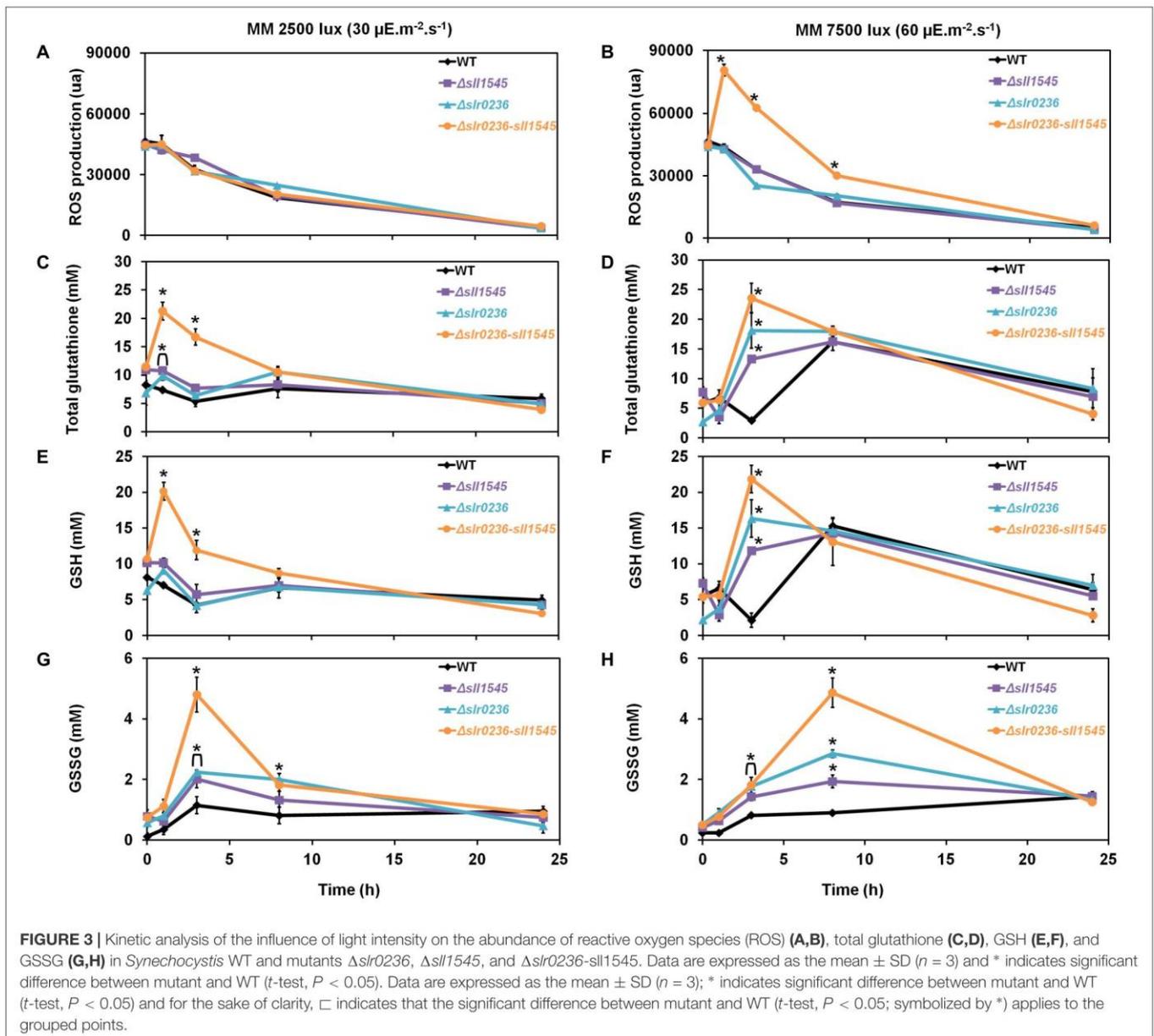
of ROS and (ii) weaker glutathione responses, in agreement with their low susceptibility to high-light (**Figures 3B,D,E,H**). In a very different way, the WT strain exposed to high light exhibited a slight decrease (not increase) in GSH and GS_{total} (at 3 h), while the GSSG content was little affected, in agreement with the strong light tolerance of WT cells.

Collectively, these findings indicate that Slr0236 and Sll1545 normally operate in the protection against the ROS elicited by high-light, using a redox process that transforms reduced glutathione (GSH) in oxidized glutathione (GSSG). This process takes about 24 h. The transient changes in the levels of free GSH observed at 3 h: a decrease in the WT strain and an increase in mutants (higher in the $\Delta slr0236-sll1545$ mutant) are consistent with GST mediating the conjugation of GSH onto various types

of ROS to detoxify them. The present data indicate that in *Synechocystis* the protection against ROS via their conjugation with GSH involves, at least in part, the Slr0236 and Sll1545 GST.

The Deletion of *slr0236* and the Depletion of *sll1545* Decrease the Tolerance to Methylene Blue in a Cumulative Way

As an excess of light can produce various type of ROS: singlet oxygen (1O_2), superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH^\bullet), we have tested the influence of methylene blue (MB), which produces singlet oxygen 1O_2 (Shao et al., 2013), on the growth and survival of the WT strain and the mutants $\Delta slr0236$ (absence of *slr0236*), $\Delta sll1545$

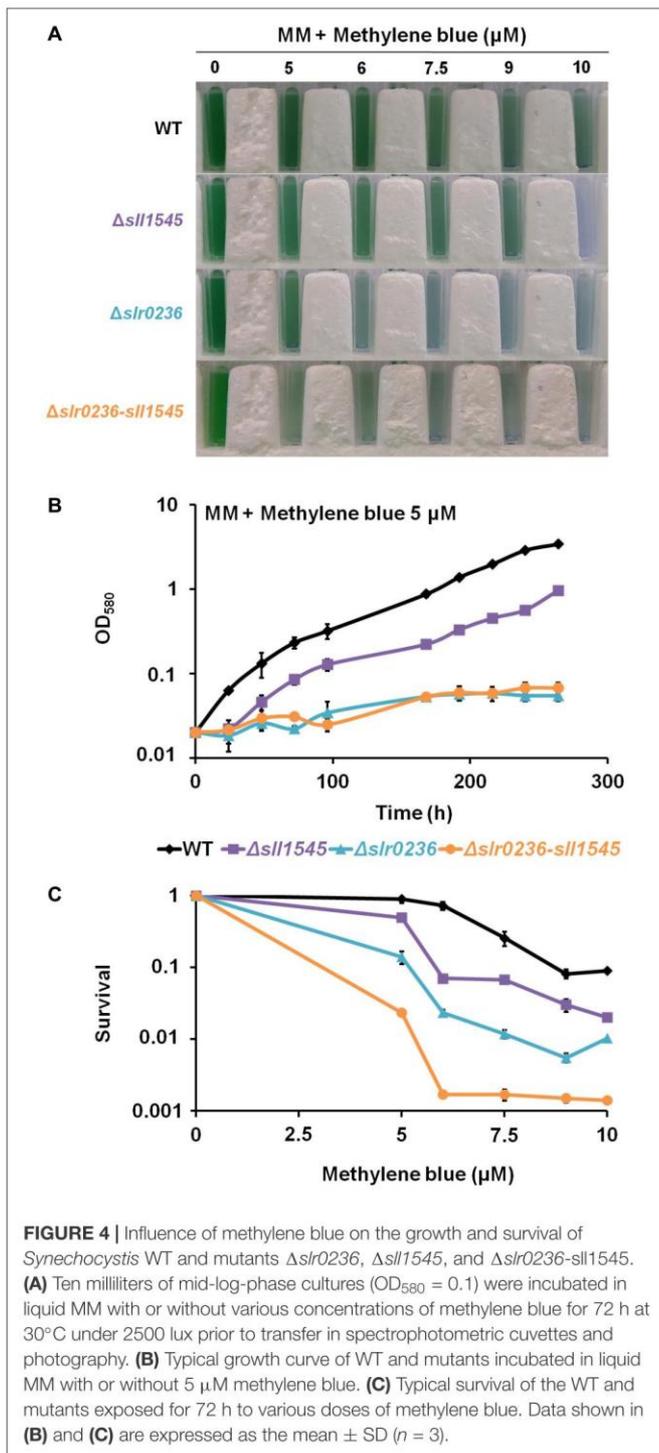


(depletion of *slr1545*) and $\Delta slr0236-slr1545$ (combined absence of *slr0236* and depletion of *slr1545*). The growth and survival of the mutants were more affected than those of the WT strains (Figure 4), showing that both *Slr0236* and *Sll1545* operate in the protection against MB. The higher tolerance of the $\Delta slr1545$ mutant as compared to $\Delta slr0236$ can be due to their difference in chromosome segregation. $\Delta slr1545$ cells in retaining wild-type allele of *slr1545* still possess *Sll1545* proteins that can operate in resistance to MB. In contrast, $\Delta slr0236$ cells in harboring no WT allele of *slr0236* have no *Slr0236* protein that cannot participate to MB resistance. The test of the effects of various doses of MB on cell growth and survival showed that the $\Delta slr0236-slr1545$ strain was more stress-sensitive than the two corresponding single mutants $\Delta slr0236$ and $\Delta slr1545$ as shown above in the case of the high light stress. These data show that the combined depletion of

slr1545 and deletion of $\Delta slr0236$ elicit a cumulative decrease in the *Synechocystis* tolerance to high light or MB.

The $\Delta slr0236$, $\Delta slr1545$, and $\Delta slr0236-slr1545$ Mutants Exposed to Methylene Blue Undergo a Transient Sequential Accumulation of ROS, and Then of Reduced and Oxidized Glutathione

The effects of methylene blue on the content of ROS and glutathione were similar but lower in amplitude than those triggered by the high-light stress (Figure 5), in agreement with the fact that singlet oxygens generated by MB (Shao et al., 2013)



are not detected *per se* by the ROS-detecting DCHF-DA probe (Gomes et al., 2005) that we used. The similar difference in the glutathione responses triggered by high light (strong effect) and methylene blue (lower impact) stresses could indirectly result from this explanation. The mutants displayed a rapid (in 1 h) and low increase in ROS (Figure 5B). Then (at 3 h), the ROS started their continuous decline while both GSH and GS_{total}

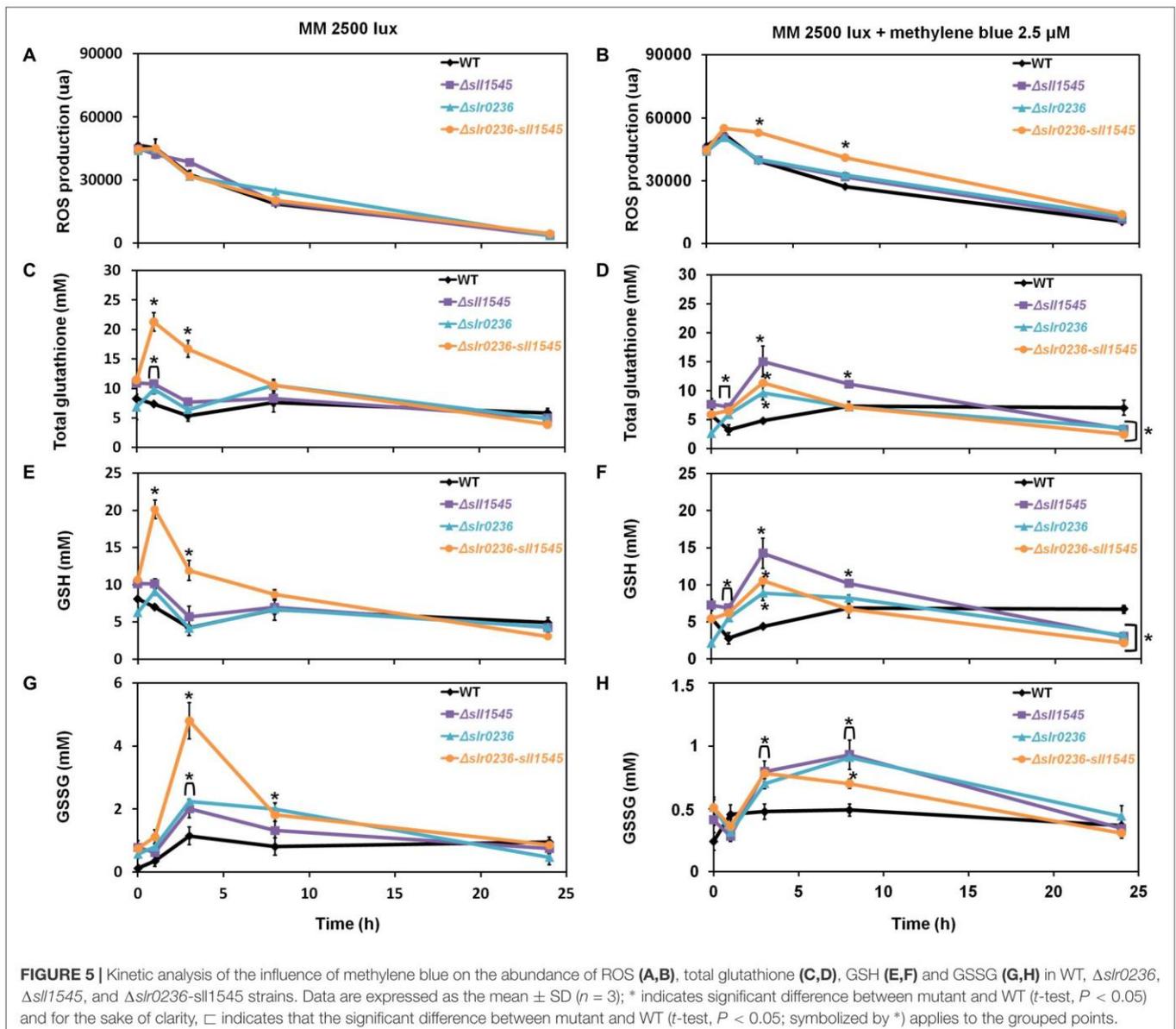
increased (Figures 5B,D,F). Later (at 8 h) the levels of ROS, GSH, and GS_{total} have declined, whereas the GSSG has increased before returning to a lower (unstressed) level (around 24 h) (Figures 5B,D,F,H). In contrast, WT cells exposed to methylene blue exhibited a slight decrease (at 1 h) in GSH and GS_{total} levels, and a slight increase in GSSG, before returning to unstressed levels. Collectively, these findings indicate that Slr0236 and Sll1545 normally operate in the GSH-dependent protection against the ROS elicited by methylene blue.

The Combined Deletion of *slr0236* and Depletion of *sll1545* Increase the Tolerance to Menadione Accompanied by a Transient Accumulation of GSH and GSSG

As part of the *in vivo* analysis of the physiological role of the Slr0236 and Sll1545 GST, we have also tested the influence of menadione, which generates superoxide anions ($O_2^{\bullet-}$) (Moirangthem et al., 2014), on the growth (on solid medium) of the WT strain and the mutants $\Delta slr0236$, $\Delta sll1545$ and $\Delta slr0236-sll1545$ (Figure 6A). The mutants $\Delta sll1545$, $\Delta slr0236$, and $\Delta slr0236-sll1545$, in that order, appeared to be more resistant than the WT strain. This finding indicates that the protein Sll1545 and Slr0236 have a negative influence on the protection against menadione. The different level of menadione resistance exhibited by the mutants could be explained by the above-mentioned absence of *slr0236* in $\Delta slr0236$ cells, the depletion of *sll1545* in $\Delta sll1545$ cells, and their cumulative influence on MB resistance. As controls, we have tested other GST deleted mutants (their construction and analysis will be published elsewhere). That they behaved as the WT strain indicate that not all *Synechocystis* GST operate (directly or indirectly) in the protection against menadione, thereby emphasizing GST selectivity. In the mutants $\Delta sll1545$, $\Delta slr0236$, and $\Delta slr0236-sll1545$, the presence of menadione prevented the steadily decline of ROS triggered by light (Figures 7A,B). In the (sensitive) WT strain, menadione triggered a rapid (at 1 h) and temporary decline of GSH, indicative of the GSH-mediated ROS detoxification. In contrast, in the $\Delta slr0236-sll1545$ mutant, the best menadione resistant strain, menadione slightly amplified the light-induced transient accumulation of GSH (at 1 h) and then of GSSG (at 3 h) (Figures 7D,E,H). This glutathione response was not really observed in the single mutants $\Delta sll1545$ and $\Delta slr0236$, in spite of their (lower) menadione resistance. Collectively these data indicate that in addition to GSH other players contribute to the menadione resistance of the mutants $\Delta sll1545$, $\Delta slr0236$, and $\Delta slr0236-sll1545$.

The Increased Menadione Resistance of the Mutants $\Delta slr0236$, $\Delta sll1545$, and $\Delta slr0236-sll1545$ Is Due, at Least in Part, to Their Higher Level of Catalase and/or Peroxidase Activity

To search for players involved in the high menadione resistance of the mutants, we used standard protocols to measure the



catalase and peroxidase activities of the *Synechocystis* bifunctional catalase/peroxidase enzyme (Tichy and Vermaas, 1999) because menadione generated superoxide anions ($O_2^{\bullet-}$) are detoxified by superoxide dismutase, which produces dioxygen (O_2) and hydrogen peroxide (H_2O_2), and catalase, which transforms H_2O_2 to water and dioxygen. The strains were incubated before or after a 1 h exposure to 5 μ M menadione (a concentration well discriminating the level of menadione tolerance). In all strains both catalase and peroxidase activities appeared to be decreased by menadione (Figures 6B,C). The decline was highest in the menadione sensitive WT strain, whereas it was lowest in the highest menadione-resistant $\Delta slr0236-sll1545$ mutant. In single mutants $\Delta sll1545$ and $\Delta slr0236$ with an intermediate level of menadione tolerance, the peroxidase activity was less decreased by menadione than in the menadione-sensitive WT strain. Collectively, these data indicate that the higher level of

catalase and/or peroxidase activities of the mutants $\Delta slr0236$, $\Delta sll1545$ and, particularly, $\Delta slr0236-sll1545$ contribute to their increased menadione resistance. These findings also indicate that Slr0236 and Sll1545 play a negative (direct or indirect) role on the catalase and/or peroxidase activities of *Synechocystis*.

The $\Delta sll1545$ Mutant Is Sensitive to H_2O_2 , Unlike the Mutants $\Delta slr0236$ (Insensitive) and $\Delta slr0236-sll1545$ (Resistant)

We have also tested the influence of H_2O_2 on the growth and survival of the WT, $\Delta slr0236$, $\Delta sll1545$, and $\Delta slr0236-sll1545$ strains (Figures 8A,B). In comparison to the WT strain, the mutant $\Delta sll1545$ appeared to be sensitive, in agreement with the GSH-dependent peroxidase activity of Sll1545 protein described

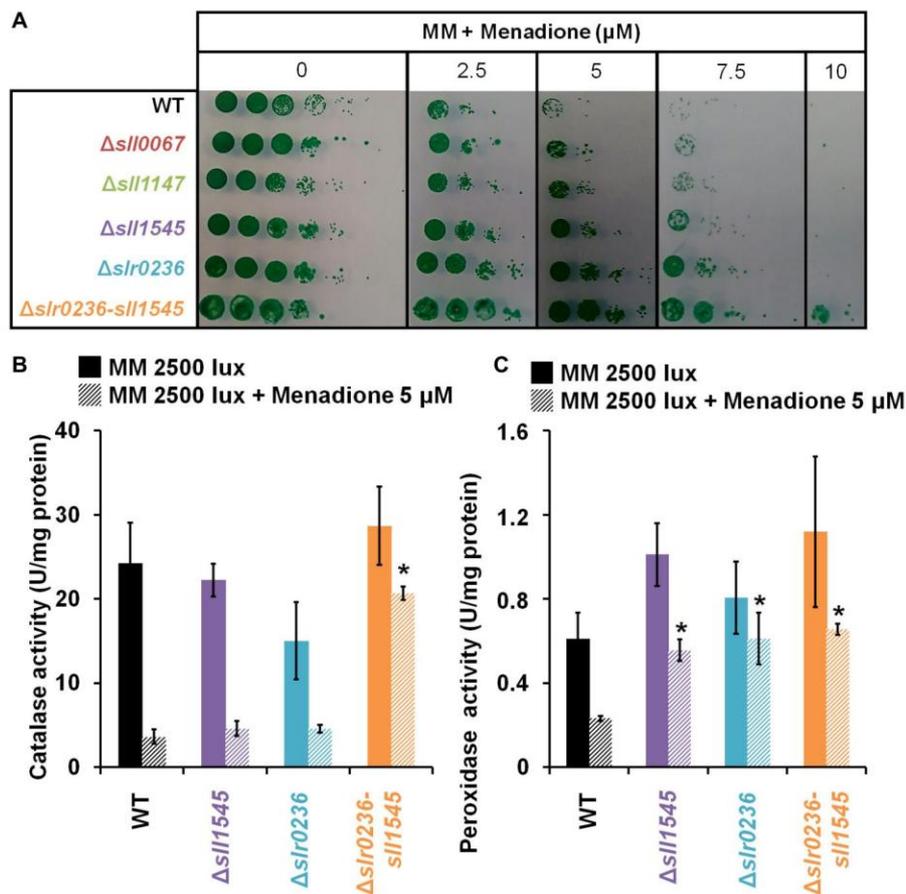


FIGURE 6 | Influence of menadione treatment on the growth, and catalase and peroxidase activities, of *Synechocystis* WT and mutants $\Delta sll1545$, $\Delta slr0236$ and $\Delta slr0236-sll1545$. **(A)** Ten-fold serial dilutions of mid-log-phase cultures (initial $OD_{580\text{ nm}} = 0.1$) were spotted as 10 μL dots onto MM plates with or without menadione and incubated for 7 days at 30°C under 2500 lux, prior to photography. Histogram plot representation of **(B)** catalase and **(C)** peroxidase activities of cells before or after a 1 h menadione treatment. Data are expressed as the mean \pm SD ($n = 3$) and * indicates significant difference between mutant and WT (t -test, $P < 0.05$).

in vitro (Pandey et al., 2017). In contrast, the mutant $\Delta slr0236$ behaved as the WT strain, suggesting that Slr0236 is not involved in the protection against H_2O_2 . The H_2O_2 resistance of the $\Delta slr0236-sll1545$ mutant is not easy to explain as it combines the depletion of *sll1545*, a positive player in H_2O_2 detoxication, with the absence of *slr0236*, a neutral player.

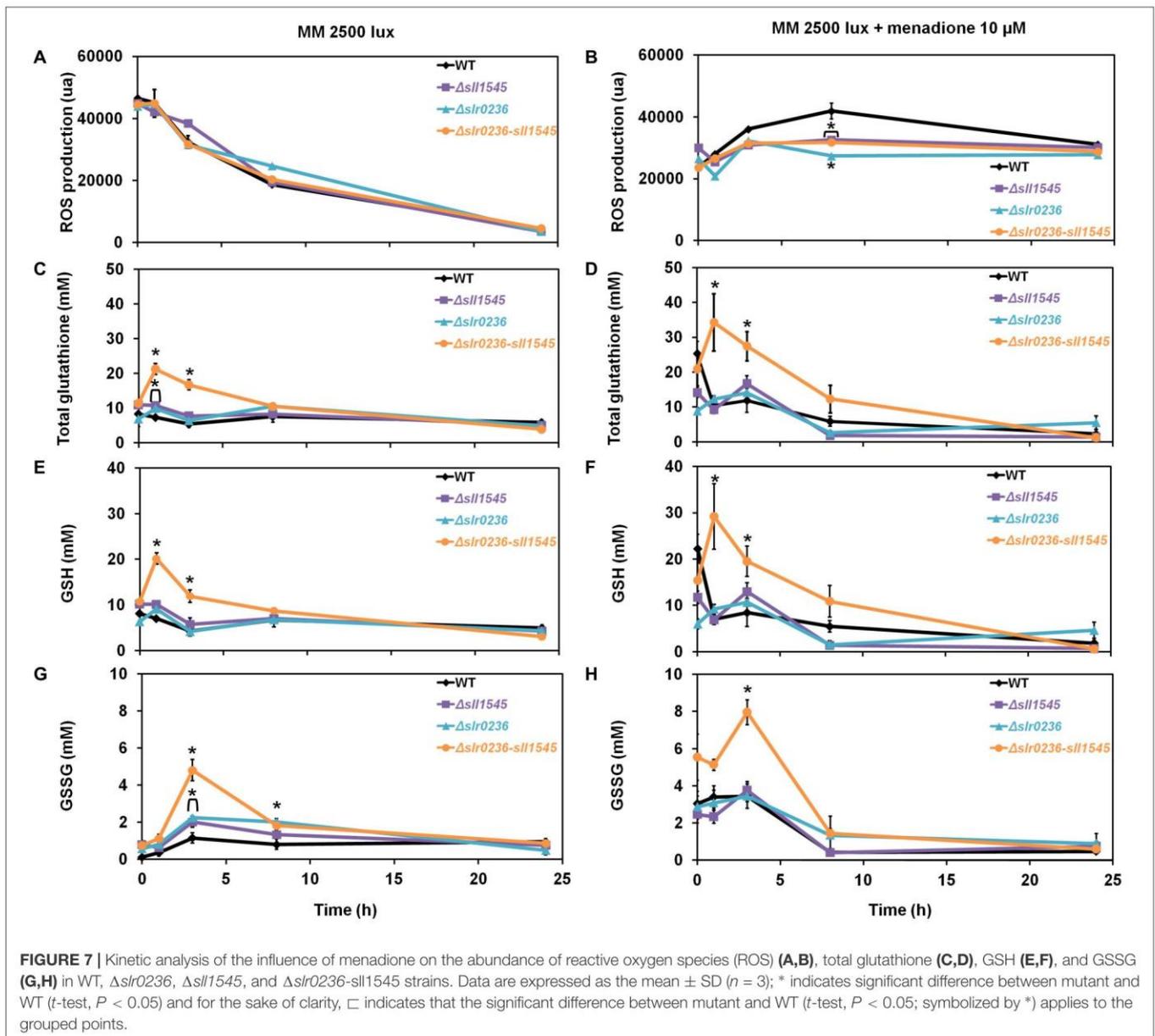
Influence of H_2O_2 on the Levels of ROS and Glutathione in the Mutants $\Delta slr0236$, $\Delta sll1545$, and $\Delta slr0236-sll1545$

In response to 250 μM H_2O_2 , the mutant $\Delta sll1545$ exhibited a high level of ROS that lasted during 8 h, a time during which we noticed a low and transient decrease of GSH (at 1 h) followed by a strong and temporary increase (at 3 h) of GSSG, followed by a strong and transient increase of GSSG (peak at 8 h). These findings (Figure 9) are consistent with the H_2O_2 sensitivity of $\Delta sll1545$ cells (Figure 8).

In contrast, the WT and $\Delta slr0236$ strains exhibited no ROS accumulation (Figures 9B,D,F,H), in agreement with their low

sensitivity to this dose (250 μM) of H_2O_2 (Figure 8). These WT and $\Delta slr0236$ cells showed only minor changes of their level of GSH (low and transient decrease at 1 h followed by a small and temporary increase at 8 h) and GSSG (two low and transitory increases at 1 and 8 h, intersected by a low and temporary decrease at 3 h).

In the H_2O_2 -treated $\Delta slr0236-sll1545$ cells, the levels of ROS and glutathione were not increased above the level driven by light alone (Figures 9A,B). The responses of GSH and GSSG were slightly modified only in term of kinetic, possibly contributing to the H_2O_2 resistance of these cells. At 1 h we noticed a H_2O_2 -mediated concomitant decrease of GSH and increase of GSSG indicative of ROS detoxification. At 3 h, instead of the GSSG accumulation peak triggered by light alone, we observed a H_2O_2 -mediated peak of GSH accumulation and a little decrease in GSSG. Then, at 8 h, we observed a normal level of only GSH, not GSSG which returned to normal level only after 20 h. These findings are not sufficient to explain the difference in the H_2O_2 sensitivity/tolerance of these strains; other players need to be searched for.



The Increased H₂O₂ Resistance of the $\Delta slr0236-sll1545$ Mutant Is Due, at Least in Part, to Its Higher Level of Peroxidase Activity

To test the influence of the catalase and peroxidase in the H₂O₂ tolerance, we measured these enzyme activities in the $\Delta sll1545$, $\Delta slr0236$, and $\Delta slr0236-sll1545$ mutants and the WT strain incubated before or after a 1 h exposure to 250 μ M H₂O₂ (an effective but none-lethal concentration). Both catalase and peroxidase activities of the WT strain and the $\Delta sll1545$ and $\Delta slr0236$ mutants were strongly decreased by H₂O₂ (Figures 8C,D). In contrast, the catalase activity of the $\Delta slr0236-sll1545$ mutant was declined by H₂O₂, whereas its peroxidase activity was stable. This finding suggests that

the H₂O₂-insensitive efficient peroxidase activity of the mutant $\Delta slr0236-sll1545$ contribute to its high resistance to H₂O₂.

DISCUSSION

It is important to analyze the glutathione (GSH) and the GSTs in cyanobacteria, the environmentally crucial photosynthetic prokaryotes (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2018), because these microorganisms are regarded as having developed GSH and GSTs to cope with the ROS often produced by their active photosynthesis (William Schopf, 2011). While low changes of ROS levels can function in signaling (Schieber and Chandel, 2014) large changes are merely toxic (Yadav, 2010; Noctor et al., 2012). Cyanobacteria also have valuable biotechnological

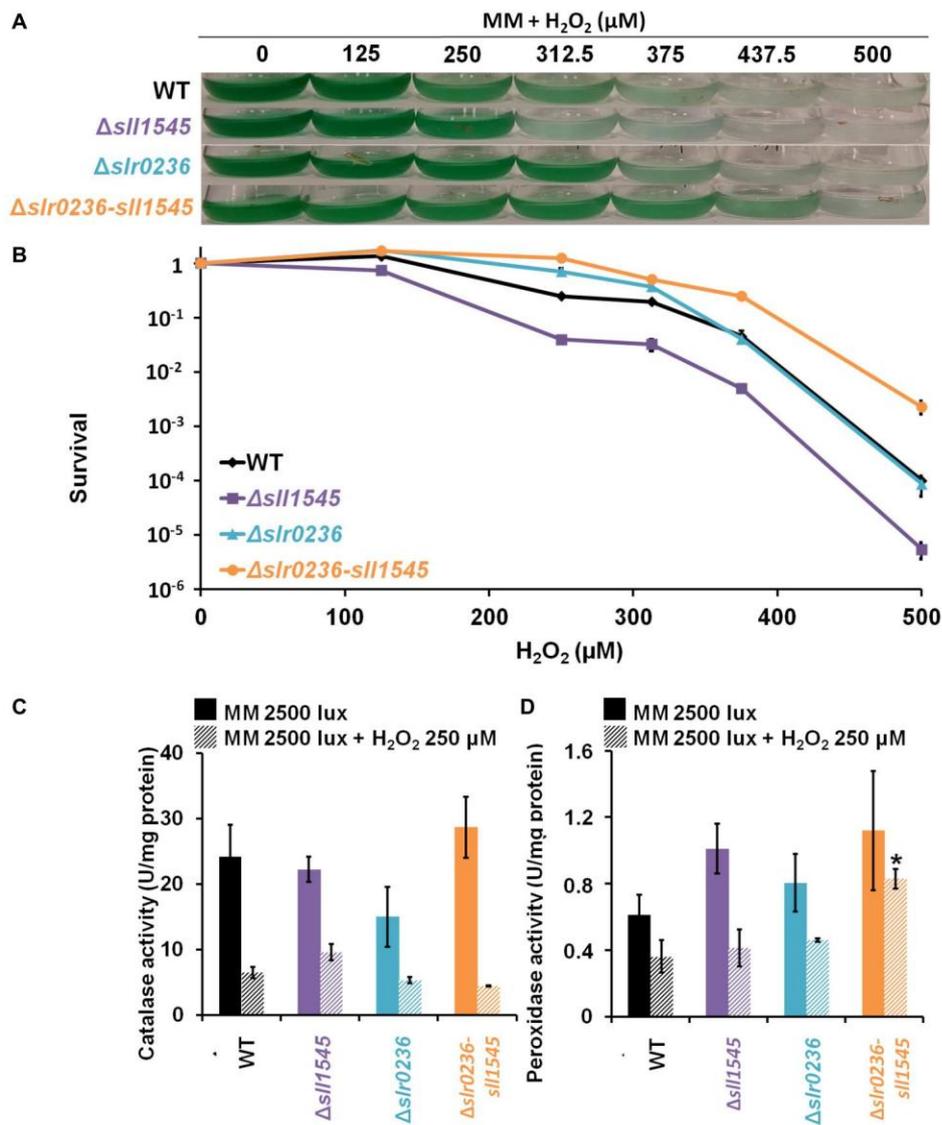


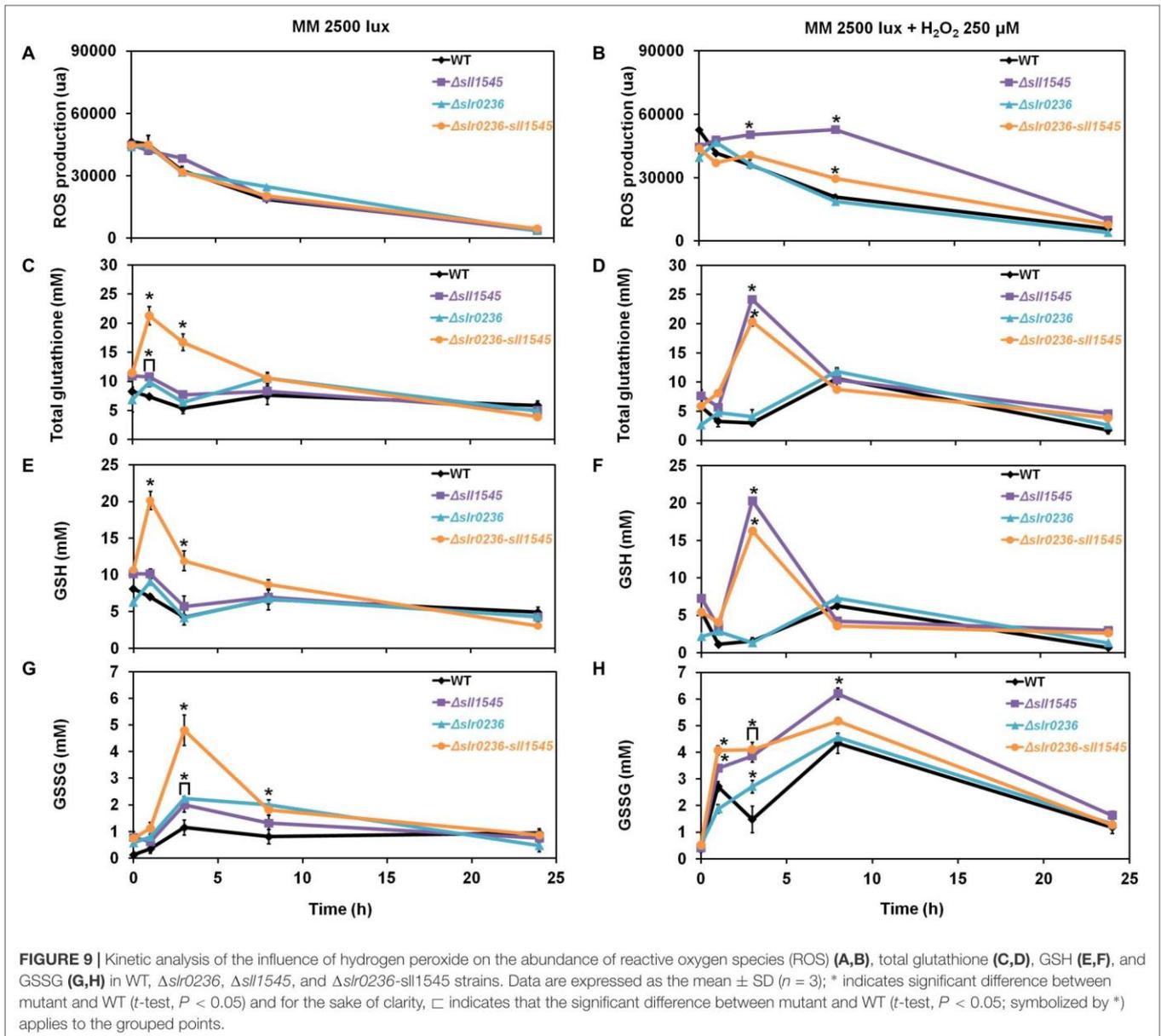
FIGURE 8 | Influence of hydrogen peroxide on the growth, survival and catalase-peroxidase activities of *Synechocystis* WT and mutant strains $\Delta sll1545$, $\Delta slr0236$, and $\Delta slr0236-sll1545$. **(A)** Ten milliliters of mid-log-phase (initial $OD_{580\text{ nm}} = 0.1$) were incubated in liquid MM at 30°C under 2500 lux with or without hydrogen peroxide for 72 h prior to photography of the Erlenmeyer flasks. **(B)** Typical survival of the WT and mutants after 72 h-exposure to hydrogen peroxide. Histogram plot representation of catalase **(C)** and peroxidase **(D)** activities of cells before and after a 1 h H₂O₂ treatment. Data are expressed as the mean \pm SD ($n = 3$) and * indicates significant difference between mutant and WT (t -test, $P < 0.05$).

potentials (ecological production of chemicals), which are often hampered by a lack of knowledge of their responses to stresses that limit the engineering of powerful cell factories (for a discussion, of this fact see Jones, 2014; Cassier-Chauvat et al., 2016). Furthermore, many of the effective anti-oxidant processes that likely emerged in cyanobacteria have been conserved and complexified in higher plants and mammals, which are more complex to study than cyanobacteria, in possessing various types of tissue. Moreover, plants and mammals often possess large families of enzymes that renders difficult the analysis of the selectivity/redundancy of these enzymes. For example, the model plant *Arabidopsis thaliana* has about 55 GSTs (Gallé et al., 2018)

whereas the best-studied cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 (*Synechocystis*), possesses only six GSTs.

In this study, we have analyzed *in vivo* the role of the GST Sll1545 to extend previous *in vitro* studies (Pandey et al., 2017), and of Slr0236 because we found that it shares the greatest sequence identity (about 32%) with Sll1545.

We demonstrate that the *sll1545* gene is essential for the photoautotrophic growth of *Synechocystis* whereas *slr0236* is dispensable, and that the combination of the deletion of *slr0236* and the depletion of *sll1545* decreases the photo-tolerance of *Synechocystis*. The finding that the phenotype of the $\Delta slr0236-sll1545$ mutant is more severe than the phenotypes of the two



single mutants $\Delta slr0236$ and $\Delta sll1545$ taken individually, suggest that Sll1545 and Slr0236 operates in similar but not completely overlapping light resistance processes. Consistently with its light-sensitive phenotype, only the $\Delta slr0236-sll1545$ mutant exposed to high light (Figure 2), transiently accumulates ROS (at 1 h) and then reduced and oxidized forms of glutathione in that order (at 3 h and 8 h, respectively, Figure 3F). These data indicate that to detoxify high-light-triggered ROS, cells accelerate the synthesis of reduced GSH, which is oxidized in glutathione disulfide (GSSG) upon detoxification. Our findings are consistent with other studies in *A. thaliana* (Queval et al., 2009). An increase in GSH synthesis has been also observed in *Chlamydomonas reinhardtii* challenged by high-light (Lin et al., 2018).

To get a comprehensive view of the role of Sll1545 and Slr0236, the mutants $\Delta slr0236$, $\Delta sll1545$, and $\Delta slr0236-sll1545$

were also challenged with methylene blue, menadione and H_2O_2 . We found that the deletion of *slr0236* and the depletion of *sll1545* decrease the tolerance to methylene blue in a cumulative way. As light-stressed cells, methylene-blue challenged cells temporarily accumulated ROS, and then GSH and GSSG in that order (Figure 5) indicating that Slr0236 and Sll1545 operate in the GSH-dependent detoxification of the ROS elicited by light or methylene blue.

Unlike what was observed with high-light and methylene blue, the mutants $\Delta slr0236$, $\Delta sll1545$, and $\Delta slr0236-sll1545$ mutants appeared to be more resistant to menadione than the WT strain (Figure 7). The single mutants $\Delta sll1545$ and $\Delta slr0236$ exhibited no menadione-induced change in glutathione level, whereas the $\Delta slr0236-sll1545$ mutant, the most menadione resistant strain, transiently accumulated GSH and then GSSG (Figure 7). These

data indicate that besides GSH other players contribute to the menadione resistance of the mutants $\Delta sll1545$, $\Delta slr0236$, and $\Delta slr0236-sll1545$. Indeed, we found that the increased menadione resistance of the mutants $\Delta slr0236$, $\Delta sll1545$, and $\Delta slr0236-sll1545$ is due, at least in part, to their higher level of catalase and/or peroxidase activity (Figure 6). In turn, these findings suggest that in WT cells the Sll1545 and Slr0236 proteins negatively influence (directly or indirectly) the catalase and/or peroxidase activity. Finally, we also challenged the mutants $\Delta slr0236$, $\Delta sll1545$, and $\Delta slr0236-sll1545$ with hydrogen peroxide. In response to 250 μM H_2O_2 , the WT and $\Delta slr0236$ strains showed no ROS accumulation (Figure 9) and only minor changes of their levels of GSH, in agreement with these cells being weakly affected by this H_2O_2 dose (Figure 8). In contrast, the $\Delta sll1545$ mutant exhibited a high level of ROS that lasted 8 h, a time during which we noticed mainly a strong and transient increase of GSH at 3 h, followed by a strong and temporary increase of GSSG at 8 h. These findings (Figure 9) are consistent with the H_2O_2 sensitivity of $\Delta sll1545$ cells (Figure 8). In the H_2O_2 -treated $\Delta slr0236-sll1545$ cells, the levels of ROS and glutathione were not increased above the level driven by light alone (Figure 9). The responses of GSH and GSSG were slightly modified only in term of kinetic, possibly contributing to the H_2O_2 resistance phenotype of these cells. Finally, we found that the active H_2O_2 -insensitive peroxidase activity of the mutant $\Delta slr0236-sll1545$ contribute to its high resistance to H_2O_2 . This may contribute to the difference in H_2O_2 -tolerance of the single mutant $\Delta sll1545$ (sensitive) and the $\Delta slr0236-sll1545$ mutant (resistant).

In conclusion, we report the first *in vivo* analysis of cyanobacterial GSTs, namely Sll1545 and Slr0236, two of the six GSTs of the widely studied model *Synechocystis* PCC 6803. Our results indicate that these two homologous GST operate with glutathione and/or the catalase/peroxidase activities (directly or indirectly) to protect cells against photo-oxidative stresses triggered by high light, H_2O_2 , methylene blue and menadione, using as yet uncharacterized molecular mechanisms. These findings are interesting for readers studying bacterial stress responses, including in the view of increasing the stress resistance of cyanobacteria that are engineered for the photoproduction of toxic chemicals. Furthermore, our data may facilitate the analysis of the multiple GSTs of complex organisms (plants, mammals) with multiple cell types and tissues.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains, Growth, and Stress Assays

Escherichia coli TOP10 (Invitrogen) used for gene manipulation was grown on LB at 37°C. Antibiotic selections were performed with ampicillin (Amp) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, kanamycin (Km) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, or both streptomycin (Sm) 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and spectinomycin (Sp) 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Synechocystis PCC 6803 (*Synechocystis*) was routinely grown at 30°C in liquid mineral medium (MM), i.e., BG11 medium (Rippka et al., 1979) enriched with 3.78 mM Na_2CO_3

(Jittawuttipoka et al., 2013), under continuous agitation (140 rpm) and white light (2500 lux; 30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 30°C unless stated otherwise. Antibiotic selections were performed with Km 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ or both Sm 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and Sp 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. For stress analyses in *Synechocystis*, mid-exponential phase cultures ($\text{OD}_{580 \text{ nm}} = 0.3$ to 0.8) were adjusted to $\text{OD}_{580} = 0.02$ (5.10^5 cells mL^{-1}) for growth analysis or $\text{OD}_{580} = 0.1$ (2.5×10^6 cells mL^{-1}) for survival analysis and subsequently incubated for various durations in liquid or on solid media containing the indicated noxious agents prior to measuring OD_{580} or photographing the flasks culture or plates. For survival analysis cells were serially diluted in MM, spread on MM solidified with 1% agar (Difco) and incubated during 5–7 days under standard conditions (2500 lux; 30°C) before counting.

Construction of the DNA Cassette for Targeted Deletion of the *sll1545* and *slr0236* Genes

Synechocystis DNA regions (about 300 bp in length) flanking the studied protein coding sequence (CS) were independently amplified by PCR, using specific oligonucleotides primers (Supplementary Table S2). These two DNA regions were joined by standard PCR-driven overlap extension (Heckman and Pease, 2007) in a single DNA segment harboring a *SmaI* restriction site in place of the studied CS. After cloning in pGEMT (Promega) the resulting plasmids (Supplementary Table S1) were opened at the unique *SmaI* site where we cloned the Km^r cassette (a *HincII* fragment of the commercial pUC4K plasmid) in the same orientation as the coding sequence it replaced. The $\Delta sll1545:\text{Sm}^r/\text{Sp}^r$ cassette was generated by replacing the Km^r DNA cassette by the Sm^r/Sp^r DNA cassette from pFC1 plasmid (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994) using a DNA assembly strategy (NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix, New England BioLabs).

The resulting deletion cassettes $\Delta sll1545:\text{Km}^r$, $\Delta slr0236:\text{Km}^r$ and $\Delta sll1545:\text{Sm}^r/\text{Sp}^r$ were verified by PCR and nucleotide sequencing (Mix2Seq Kit, Eurofins Genomics) before and after transformation (Labarre et al., 1989) to *Synechocystis* WT cells (to generate the $\Delta sll1545:\text{Km}^r$ and $\Delta slr0236:\text{Km}^r$ mutants) or to the $\Delta slr0236:\text{Km}^r$ mutant (to generate the $\Delta sll1545-slr0236$ mutant).

Cell Culture and Assay of the Reduced (GSH) and Oxidized (GSSG) Forms of Glutathione

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich. Fifty milliliters of exponentially growing cultures were diluted twofold down to $\text{OD}_{580} = 0.4$, and incubated for various durations under white light (2500, 5000, or 7500 lux) or at 2500 lux in the presence of various agents as indicated. Cells were rapidly collected by filtration on a 0.45 μm cellulose membrane (Millipore) under light; re-suspended in 1 mL of acidic extraction phosphate buffer [100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$; 1 mM EDTA; 5% (w/v) 5-sulfosalicylic acid (SSA)]; disrupted by a three freezing-thawing cycles in liquid nitrogen and hot water bath and strong mixing (Vibrax VXR, Ika) for 10 min at 4°C; prior to centrifugation

(14,000 rpm, 4°C, 5 min) to eliminate unbroken cells and membranes. Cell extracts containing glutathione (GSH + GSSG) were purified by a 20 min centrifugation at 14,000 rpm at 4°C through a filter (Amicon Ultra – 0.5 mL 30K; Millipore) to eliminate proteins larger than 30 kDa. Filtrates were stored at –80°C until use. Before GSSG assay, 100 µL of filtrate were treated with 2 µL of neat 2-vinylpyridine for 1 h on ice to block reduced GSH and then with 2 µL of fourfold diluted triethanolamine solution. For assays, 10 µL untreated filtrate samples (total glutathione assay) and 20 µL treated samples (oxidized GSSG assay) were loaded on a UV-compatible 96-well plate (Greiner bio-one). Then, a first reaction mixture containing yeast GR at final concentration 1.25 U/mL in phosphate buffer (100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer and 1 mM EDTA, pH 7.5) was prepared and then distributed to each well. A second reaction mixture containing 0.2 mM DTNB [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)] and 0.3 mM NADPH in phosphate buffer was automatically added in each well by a microplate reader (ClarioStar; BMG Labtech). The reaction was immediately followed by measuring for 1 min at 30°C the absorption at 412 nm of the yellow TNB (5'-thio-2-nitrobenzoic acid) product (Akerboom and Sies, 1981). In parallel, standard curves prepared with various concentrations of GSH (50 to 200 µM) or GSSG (10 to 250 µM) were used to calculate the GSSG (oxidized) and total glutathione (GSSG + reduced GSH) using the *Synechocystis* cell volume value of 1.2·10⁻¹¹ mL (Mazouni et al., 2004). The GSH content was calculated by subtracting the GSSG content from the total glutathione content.

Assay of the Cellular Reactive Oxygen Species (ROS) Content

The level of ROS was assayed with the fluorescent reactant 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCHF-DA; Sigma-Aldrich) that is converted into the non-fluorescent derivative DCHF by cellular esterases (Gomes et al., 2005). Subsequently, DCHF can be oxidized to the highly fluorescent DCF probe by intracellular ROS (hydrogen peroxide H₂O₂, hydroxyl radical OH• and peroxy radical ROO•). ROS triggered by the indicated treatments was evaluated on exponentially growing cultures calibrated to OD₅₈₀ = 0.3. Then, DCHF-DA solubilized in ethanol was added (5 µM final concentration) and the cell suspensions were incubated in the dark to prevent auto-oxidation of the probe. The signal fluorescence (λ_{exc} = 485 nm and λ_{em} = 520 nm) was measured with a microplate spectrofluorimeter (CLARIOstar; BMG LABTECH), and normalized on the basis of the OD₅₈₀.

Catalase-Peroxidase Activity Assay

Cells treated for 1 h under the indicated conditions were broken with an Eaton press and cell free protein protein

extracts were prepared as previously described (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994). Then, catalase activity was determined spectrophotometrically by monitoring the rate of H₂O₂ decomposition at 240 nm (ϵ_{240} = 43.6 M⁻¹ cm⁻¹) (Moirangthem et al., 2014) in reaction mixtures containing 10 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer and 10 mM H₂O₂. Peroxidase activity was determined spectrophotometrically by following the rate of pyrogallol oxidation at 430 nm (ϵ_{430} = 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹) (Moirangthem et al., 2014) in reaction mixtures containing 10 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer, 20 mM pyrogallol and 0.1 mM H₂O₂. Catalase and peroxidase activities were expressed in units per mg of protein measured using Bradford assay (Biorad). One unit corresponds the decomposition of 1 µmol of H₂O₂ or the oxidation of 1 µmol of pyrogallol in 1 min, respectively.

DATA AVAILABILITY

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CC-C and FC conceived the project. XK, CC-C, and FC conceived the experiments and analyzed the data. XK performed the experiments. XK, CC-C, and FC wrote the manuscript. CC-C agreed to serve as the author responsible for contact and ensures communication.

FUNDING

This work was partly supported by the CEA-DRF Remember project. XK received a Ph.D. fellowship from the MENESR.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Stéphane Lemaire for helpful discussions, Mathias Raguin for help in performing glutathione assay, and Drs. Gwenaëlle Le Pavéc and Agnès Delaunay-Moisán for their help in using the microplate reader.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01899/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Ago, H., Kanaoka, Y., Irikura, D., Lam, B. K., Shimamura, T., Austen, K. F., et al. (2007). Crystal structure of a human membrane protein involved in cysteinyl leukotriene biosynthesis. *Nature* 448, 609–612. doi: 10.1038/nature05936
- Akerboom, T. P., and Sies, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373–382.
- Archibald, J. M. (2009). The puzzle of plastid evolution. *Curr. Biol.* 19, R81–R88. doi: 10.1016/j.cub.2008.11.067

- Blanchette, B., Feng, X., and Singh, B. R. (2007). Marine glutathione S-transferases. *Mar. Biotechnol.* 9, 513–542. doi: 10.1007/s10126-007-9034-0
- Carvalho, A. N., Marques, C., Guedes, R. C., Castro-Caldas, M., Rodrigues, E., Horsen, J. V., et al. (2016). S-Glutathionylation of Keap1: a new role for glutathione S-transferase pi in neuronal protection. *FEBS Lett.* 590, 1455–1466. doi: 10.1002/1873-3468.12177
- Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2014). Responses to oxidative and heavy metal stresses in cyanobacteria: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 871–886. doi: 10.3390/ijms16010871
- Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2018). Cyanobacteria: wonderful microorganisms for basic and applied research. *eLS* 26, 1–11. doi: 10.1002/9780470015902.a0027884
- Cassier-Chauvat, C., Veaudor, T., and Chauvat, F. (2016). Comparative genomics of DNA recombination and repair in cyanobacteria: biotechnological implications. *Front. Microbiol.* 7:1809. doi: 10.3389/fmicb.2016.01809
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3217–3266. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.018
- Fahey, R. C. (2013). Glutathione analogs in prokaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3182–3198. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.10.006
- Gallé, Á., Czékus, Z., Bela, K., Horváth, E., Ördög, A., Csizsár, J., et al. (2018). Plant glutathione transferases and light. *Front. Plant Sci.* 9:1944. doi: 10.3389/fpls.2018.01944
- Gomes, A., Fernandes, E., and Lima, J. L. F. C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* 65, 45–80. doi: 10.1016/j.jbbm.2005.10.003
- Heckman, K. L., and Pease, L. R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat. Protoc.* 2, 924–932. doi: 10.1038/nprot.2007.132
- Herrero, A., Stavans, J., and Flores, E. (2016). The multicellular nature of filamentous heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 831–854. doi: 10.1093/femsre/fuw029
- Jittawuttipoka, T., Planchon, M., Spalla, O., Benzerara, K., Guyot, F., Cassier-Chauvat, C., et al. (2013). Multidisciplinary evidences that *Synechocystis* PCC6803 exopolysaccharides operate in cell sedimentation and protection against salt and metal stresses. *PLoS One* 8:e55564. doi: 10.1371/journal.pone.0055564
- Johansson, K., Järviden, J., Gogvadze, V., and Morgenstern, R. (2010). Multiple roles of microsomal glutathione transferase 1 in cellular protection: a mechanistic study. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1638–1645. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.013
- Jones, P. R. (2014). Genetic instability in cyanobacteria – an elephant in the room? *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2:12. doi: 10.3389/fbioe.2014.00012
- Knoct, C. J., Ungerer, J., Wangikar, P. P., and Pakrasi, H. B. (2018). Cyanobacteria: promising biocatalysts for sustainable chemical production. *J. Biol. Chem.* 293, 5044–5052. doi: 10.1074/jbc.R117.815886
- Labarre, J., Chauvat, F., and Thuriaux, P. (1989). Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 171, 3449–3457.
- Lallement, P.-A., Meux, E., Gualberto, J. M., Prosper, P., Didierjean, C., Saul, F., et al. (2014). Structural and enzymatic insights into Lambda glutathione transferases from *Populus trichocarpa*, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants. *Biochem. J.* 462, 39–52. doi: 10.1042/BJ20140390
- Lin, T.-H., Rao, M.-Y., Lu, H.-W., Chiou, C.-W., Lin, S.-T., Chao, H.-W., et al. (2018). A role for glutathione reductase and glutathione in the tolerance of *Chlamydomonas reinhardtii* to photo-oxidative stress. *Physiol. Plant.* 162, 35–48. doi: 10.1111/ppl.12622
- Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3143–3153. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008
- Magnuson, A. (2019). Heterocyst thylakoid bioenergetics. *Life* 9:E13. doi: 10.3390/life9010013
- Manevich, Y., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2004). Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 3780–3785. doi: 10.1073/pnas.0400181101
- Marteyn, B., Domain, F., Legrain, P., Chauvat, F., and Cassier-Chauvat, C. (2009). The thioredoxin reductase-glutaredoxins-ferredoxin crossroad pathway for selenate tolerance in *Synechocystis* PCC6803. *Mol. Microbiol.* 71, 520–532. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06550.x
- Marteyn, B., Sakr, S., Farci, S., Bedhomme, M., Chardonnet, S., Decottignies, P., et al. (2013). The *Synechocystis* PCC6803 MerA-like enzyme operates in the reduction of both mercury and uranium under the control of the glutaredoxin 1 enzyme. *J. Bacteriol.* 195, 4138–4145. doi: 10.1128/JB.00272-13
- Mazouni, K., Domain, F., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2004). Molecular analysis of the key cytokinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE. *Mol. Microbiol.* 52, 1145–1158. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04042.x
- Mermet-Bouvier, P., and Chauvat, F. (1994). A conditional expression vector for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942 and PCC6301. *Curr. Microbiol.* 28, 145–148.
- Moirangthem, L. D., Bhattacharya, S., Stensjö, K., Lindblad, P., and Bhattacharya, J. (2014). A high constitutive catalase activity confers resistance to methyl viologen-promoted oxidative stress in a mutant of the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 3809–3818. doi: 10.1007/s00253-013-5443-3
- Montgomery, B. L., Lechno-Yossef, S., and Kerfeld, C. A. (2016). Interrelated modules in cyanobacterial photosynthesis: the carbon-concentrating mechanism, photorespiration, and light perception. *J. Exp. Bot.* 67, 2931–2940. doi: 10.1093/jxb/erw162
- Moons, A. (2005). Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitam. Horm.* 72, 155–202. doi: 10.1016/S0083-6729(05)72005-7
- Morel, F., and Aninat, C. (2011). The glutathione transferase kappa family. *Drug Metab. Rev.* 43, 281–291. doi: 10.3109/03602532.2011.556122
- Naraimsamy, K., Marteyn, B., Sakr, S., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2013). Genomics of the pleiotropic glutathione system in cyanobacteria. *Adv. Bot. Res.* 65, 157–188. doi: 10.1016/B978-0-12-394313-2.00005-6
- Nianiou-Obeidat, I., Madesis, P., Kissoudis, C., Voulgari, G., Chronopoulou, E., Tsafaris, A., et al. (2017). Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: functions and biotechnological applications. *Plant Cell Rep.* 36, 791–805. doi: 10.1007/s00299-017-2139-7
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., et al. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ.* 35, 454–484. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x
- Oakley, A. (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab. Rev.* 43, 138–151. doi: 10.3109/03602532.2011.558093
- Pandey, T., Shukla, R., Shukla, H., Sonkar, A., Tripathi, T., and Singh, A. K. (2017). A combined biochemical and computational studies of the rho-class glutathione s-transferase sll1545 of *Synechocystis* PCC 6803. *Int. J. Biol. Macromol.* 94, 378–385. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.040
- Pandey, T., Singh, S. K., Chhetri, G., Tripathi, T., and Singh, A. K. (2015). Characterization of a highly pH stable chi-class glutathione S-transferase from *Synechocystis* PCC 6803. *PLoS One* 10:e0126811. doi: 10.1371/journal.pone.0126811
- Queval, G., Thominet, D., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Gakière, B., and Noctor, G. (2009). H₂O₂-activated up-regulation of glutathione in *Arabidopsis* involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast. *Mol. Plant* 2, 344–356. doi: 10.1093/mp/ssp002
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., and Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology* 111, 1–61. doi: 10.1099/00221287-111-1-1
- Schieber, M., and Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* 24, R453–R462. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034
- Shao, N., Duan, G. Y., and Bock, R. (2013). A mediator of singlet oxygen responses in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Arabidopsis* identified by a luciferase-based genetic screen in algal cells. *Plant Cell* 25, 4209–4226. doi: 10.1105/tpc.113.117390
- Shehu, D., Abdullahi, N., and Alias, Z. (2018). Cytosolic glutathione S-transferase in bacteria: a review. *Pol. J. Environ. Stud.* 28, 515–528. doi: 10.15244/pjoes/85200
- Sjögren, T., Nord, J., Ek, M., Johansson, P., Liu, G., and Geschwindner, S. (2013). Crystal structure of microsomal prostaglandin E2 synthase provides insight into diversity in the MAPEG superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 3806–3811. doi: 10.1073/pnas.1218504110

- Sylvestre-Gonon, E., Law, S. R., Schwartz, M., Robe, K., Keech, O., Didierjean, C., et al. (2019). Functional, structural and biochemical features of plant serinyglutathione transferases. *Front. Plant Sci.* 10:608. doi: 10.3389/fpls.2019.00608
- Tichy, M., and Vermaas, W. (1999). In vivo role of catalase-peroxidase in *synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 181, 1875–1882.
- Wikteliu, E., and Stenberg, G. (2007). Novel class of glutathione transferases from cyanobacteria exhibit high catalytic activities towards naturally occurring isothiocyanates. *Biochem. J.* 406, 115–123. doi: 10.1042/BJ20070328
- William Schopf, J. (2011). The paleobiological record of photosynthesis. *Photosynth. Res.* 107, 87–101. doi: 10.1007/s11120-010-9577-1
- Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South Afr. J. Bot.* 76, 167–179. doi: 10.1016/j.sajb.2009.10.007
- Zhang, H., and Forman, H. J. (2012). Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 722–728. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.03.017

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Kammerscheit, Chauvat and Cassier-Chauvat. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

First *in vivo* evidence that glutathione-S-transferase operates in photo-oxidative stress in cyanobacteria

Supplementary Table S1 – List and characteristics of the plasmids used in this study

Plasmid	Relevant features	Reference
pGEMT	AT overhang cloning vector Amp ^R	Promega
pUC4K	Source of the Km ^R marker gene	Pharmacia
pFC1	Source of the Sm ^R /Sp ^R marker gene	(Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994)
pGEMT-ABs <i>ll1545</i>	pGEMT with the <i>sl11545</i> gene and its flanking sequences, where most of the <i>sl11545</i> coding sequence (from the 5 th bp downstream of the ATG codon down to 5 th bp upstream to the TAG stop codon) was replaced by a <i>Sma</i> I restriction site	This study
pGEMT-Δ <i>sl11545</i> ::Km ^R	pGEMT-ABs <i>ll1545</i> with the Km ^R marker inserted in the unique <i>Sma</i> I site	This study
pGEMT-Δ <i>sl11545</i> ::Sm ^R /Sp ^R	pGEMT-ABs <i>ll1545</i> with the Sm ^R /Sp ^R marker inserted in the unique <i>Sma</i> I site	This study
pGEMT-ABs <i>sr0236</i>	pGEMT with the <i>slr0236</i> gene and its flanking sequences, where most of the <i>slr0236</i> coding sequences (from the 26 th bp downstream of the ATG codon down to the 22 th bp upstream the TAG stop codon up) was replaced by a <i>Sma</i> I restriction site	This study
pGEMT-Δ <i>slr0236</i> ::Km ^R	pGEMT-ABs <i>sr0236</i> with the Km ^R marker inserted in the unique <i>Sma</i> I site	This study
pGEMT-Δ <i>slr0236</i> ::Sm ^R /Sp ^R	pGEMT-ABs <i>sr0236</i> with the Sm ^R /Sp ^R marker inserted in the unique <i>Sma</i> I site	This study

Supplementary Table S2 – List and characteristics of the PCR primers used in this study

Name	Sequence (5'→3')	Purpose
Amplification of the Km^r cassette		
KmHincII-FW	GGCGCTGAGGTCGACCTCGTGAAGAAG	Amplification of the Km ^r cassette to be cloned as a <i>HincII</i> fragment
KmHincII-RV	ACCTGCAGGGGGTCGACGGAAAGCCAC	
Amplification of a part of the Km^r cassette		
Km-FW (3)	GGTGTATGAGCCATATTCAACGGG	Amplification of Km ^r cassette to verify targeted gene replacement and assay chromosome segregation
Km-RV (4)	GGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTC	
Amplification of a part of the Sm^r/Sp^r cassette		
Sm/Sp-FW (5)	ATCTCGAACCGACGTTGCTG	Amplification of Sm ^r /Sp ^r cassette to verify targeted gene replacement and assay chromosome segregation
Sm/Sp-RV (6)	CCGACTACCTGGTGATCTC	
Deletion of <i>slr0236</i>		
R0236-FWa	CTGGGAACAGCGGAAGTG	Amplification of the <i>slr0236</i> downstream region and simultaneous introduction of a <i>SmaI</i> site
R0236-RVa	AGACCCGGGGGCAACAGCAACAACATCCTA	
R0236-FWb	GTTGCCCCCGGGTCTAGGTTAGGGATCGTT	Amplification of the <i>slr0236</i> upstream region and simultaneous introduction of a <i>SmaI</i> site
R0236-RVb	TTGGAAAAAAGCAGAAATTAAC	
SLR0236-FW (1')	GTGTCCATGCCCTGCAACTTAAACC	Amplification of a part of <i>slr0236</i> to verify chromosome segregation
SLR0236-RV (2')	CGTTAGGTCGCTATGGTCAACTGG	
Deletion of <i>sll1545</i>		
For simple mutant Km ^r construction		
L1545-FWa	TGGTCTAAATTTTAAATTTCCCACT	Amplification of the downstream region of the <i>sll1545</i> coding sequence and simultaneous introduction of a <i>SmaI</i> site
L1545-RVa	TTGTTCCCGGGTACTAAGCATGGTAGGAATTTAG	
L1545-FWb	TAGTACCCGGGAACAAAGTAGGTGGTTTCAACAA	Amplification of the upstream region of the <i>sll1545</i> coding sequence and simultaneous introduction of a <i>SmaI</i> site
L1545-RVb	CCTGGATTGGGCCTTATTTG	
SLL1545-FW (1)	GGACATTGTCATTGCAGATTCGACG	Amplification of a part of <i>sll1545</i> to verify chromosome segregation
SLL1545-RV (2)	CAGAGTTAAAGCCTCCAAGTCCTGA	
For double mutant Km ^r and Sm ^r /Sp ^r construction		
Vect1545-FW	GGGAACAAAGTAGGTGG	Amplification of pGEMt-ABs <i>sll1545</i>
Vect1545-FV	GGGTACTAAGCATGGTAGG	
Sm/Sp-A1545-FW	TCCTACCATGCTTAGTACCCGCGCTCACGCAACTGGTCCA	Amplification of Sm ^r /Sp ^r cassette from pFC1 plasmid
Sm/Sp-B1545-RV	AAACCACCTACTTTGTTCCTCCCAATTGTGTAGGGCT	

FW: forward ; RV: reverse ; Numbers [(1); (2); (1'); (2'); (3); (4); (5) and (6)]: correspond to primers represented as dotted arrows in Figure 1

II – La GST Sll1147 de type MAPEG est requise dans la tolérance aux stress membranaires, une fonction conservée dans l'évolution des (cyano)bactéries à l'Homme

A. Résumé du manuscrit

Après l'analyse de Sll1545 et Slr0236, il était logique de poursuivre avec celle portant sur la GST Sll1147 puisque l'analyse sans *a priori* des phénotypes du mutant correspondant ($\Delta sll1147$) a révélé une sensibilité à certains agents oxydants (H_2O_2 et *n-tert*butylhydroperoxyde (*n-t*BOOH)) et laissait donc supposer une possible redondance fonctionnelle avec Sll1545 et Slr0236 dans la gestion du stress oxydant.

Néanmoins, les quelques données (bio-informatiques) de la littérature sur Sll1147 indiquent que cette GST fait partie de la famille des MAPEG (Membrane-Associated Proteins involved in Ecosanoïd and Glutathione metabolism). Cette famille est divisée en 2 sous-familles : (i) la première, MAPEG1, comprend les protéines mGST1 (pour microsomal glutathione-S-transférase) et PGES (pour prostaglandin E synthase) et (ii) la seconde, MAPEG2, contient les protéines mGST2, mGST3, FLAP (pour 5-lipoxygénase-activating protein) et LTC₄ synthase (pour leukotrien C₄ synthase). Parmi ces protéines, la FLAP, la PGES et la LTC₄ synthase participent au processus d'inflammation chez l'Homme en participant à la synthèse de composés lipidiques pro-inflammatoires. La protéine humaine hmGST1, quant à elle, joue un rôle dans la tolérance à la peroxydation lipidique, dans la carcinogénèse et la résistance aux médicaments.

A l'inverse, le rôle précis *in vivo* des protéines hmGST2 et hmGST3 n'est pas encore décrit alors qu'il pourrait être intéressant pour le développement de nouvelles cibles thérapeutiques. De plus, ces protéines hmGST2 et hmGST3 partagent une homologie de séquence élevée avec leurs homologues (MAPEG-like) identifiées chez *E. coli* et *Synechocystis*, elles-mêmes considérées comme des protéines ancestrales assurant une élucidation plus fine de la superfamille des MAPEG. Enfin, en comparant le profil d'hydrophobicité de ces différentes protéines, il a été décrit que la protéine Sll1147 possède 3 hélices transmembranaires.

L'ensemble de ces données nous ont conforté dans l'idée (i) d'une possible convergence entre le rôle de Sll1147 dans la gestion des stress lié à la membrane et sa localisation membranaire, qui va à l'encontre de celle des GST Sll1545 et Slr0236 qui sont cytosoliques et (ii) que l'homologie forte entre hmGST2/hmGST3 et Sll1147 peut se traduire en une fonction conservée dans l'évolution depuis les cyanobactéries jusqu'à l'Homme.

C'est dans cet objectif que j'ai choisi de présenter les résultats portant sur l'analyse du rôle de la MAPEG de *Synechocystis* (Sll1147), en analysant les phénotypes et les réponses à divers stress en lien avec la membrane (peroxydation lipidique, température...) du mutant de délétion $\Delta sll1147$.

Les premiers résultats sont conformes à ce qui est décrit la littérature puisque le mutant $\Delta sll1147$ (la construction du mutant de délétion est présentée dans Figure 1 du manuscrit) est plus sensible au H_2O_2 et au *n-tert*butylhydroperoxyde (*n-t*BOOH), des molécules qui induisent la peroxydation lipidique (voir Figure 2 du manuscrit soumis). En explorant un peu plus la physiologie du mutant $\Delta sll1147$, nous avons systématiquement constaté que sa forte sensibilité s'accompagnait d'une forte accumulation transitoire de MDA

(un marqueur de la peroxydation lipidique) suivie d'une augmentation de la concentration intracellulaire en glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG) indiquant le rôle GSH-dépendant de la MAPEG Sll1147 dans la détoxification des lipides peroxydés (Figure 3 du manuscrit soumis).

Moins attendu, le mutant $\Delta sll1147$ est également plus sensible à la chaleur (39°C) et à une exposition au froid (4°C) suggérant un rôle de la MAPEG Sll1147 dans la tolérance aux changements de température (Figure 4 du manuscrit soumis). Ce résultat est cohérent puisque (i) la forte température induit de la peroxydation lipidique, (ii) le glutathion intervient dans la tolérance au stress thermique, (iii) la localisation membranaire des MAPEG est compatible avec son rôle dans la gestion de ces stress qui influent justement sur l'intégrité et la fluidité des membranes, et enfin (iv) si l'on transpose les variations de température que les cyanobactéries subissent dans leur environnement naturel (alternances jours/nuit et saisonnières) à un contexte pathologique chez l'Homme, il s'avère pertinent de souligner que certaines MAPEG (FLAP, PGES et LTC₄ synthase) ont un rôle dans la réponse inflammatoire qui induit notamment l'apparition de la fièvre.

Motivés par cette observation, nous avons démontré par complémentation fonctionnelle hétérologue (en remplaçant le gène cyanobactérien *sll1147* par une cassette surexprimant les gènes humains codant pour hmGST2 et hmGST3), que le rôle dans la tolérance à la peroxydation lipidique et à une élévation de température est conservé dans les GST humaine (voir Figure 7) et dans l'évolution.

B. *Format du manuscrit*

Nature/Etat de manuscrit : **Manuscrit soumis** (Submitted manuscript)

Version/Format : PDF assemblé

Journal/Revue cible : *Frontiers in Microbiology*

Le manuscrit implémenté à ce mémoire de thèse intitulé « From cyanobacteria to human, MAPEG-type glutathione-S-transferases operate in cell tolerance to heat, cold and lipid peroxidation » a été soumis dans la revue *Frontiers in Microbiology*.

C. *Manuscrit n°2*

1 **Full title**

2 **From cyanobacteria to human, MAPEG-type glutathione-S-transferases operate in cell**
3 **tolerance to heat, cold and lipid peroxidation**

4 **Short title**

5 MAPEG glutathione-S-transferases operate in membrane-stress tolerance

6 **Author list and author affiliations**

7 Xavier Kammerscheit¹, Franck Chauvat^{1,*}, Corinne Cassier-Chauvat^{1,*}

8 ¹Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ Paris-Sud, Université
9 Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

10 **Corresponding author e-mail address:**

11 *Correspondence: corinne.cassier-chauvat@cea.fr

12 *Correspondence: franck.chauvat@cea.fr

13 **Abstract**

14 The MAPEG2 sub-family of glutathione-S-transferase proteins (GST) has been poorly
15 investigated *in vivo*, even in prokaryotes such as cyanobacteria the organisms that are regarded as
16 having developed glutathione-dependent enzymes to protect themselves against the reactive oxygen
17 species often produced by their powerful photosynthesis. We report the first *in vivo* analysis of a
18 cyanobacterial MAPEG2-like protein (Sl1147) in the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC
19 6803. While Sl1147 is dispensable to cell growth in standard photo-autotrophic conditions, it plays
20 an important role in the resistance to heat and cold, and to *n-tert*butyl hydroperoxide (*n-t*BOOH) that
21 induces lipid peroxidation. These findings indicate that Sl1147 is important for membrane fluidity,
22 which is critical for photosynthesis. Attesting its sensitivity to these stresses, the Δ Sl1147 mutant
23 lacking Sl1147 challenged by heat, cold or *n-t*BOOH undergoes transient accumulation of
24 peroxidized lipids and then of reduced and oxidized glutathione. These results are welcome because
25 little is known concerning the signaling and/or protection mechanisms used by cyanobacteria to cope
26 with heat and cold, two inevitable environmental stresses that limit their growth and thus their
27 production of biomass for our food chain and of biotechnologically interesting chemicals. Also
28 interestingly, the decreased resistance to heat, cold and *n-t*BOOH of the Δ Sl1147 deleted mutant
29 could be rescued back to normal (wild-type) levels upon the expression of synthetic MAPEG2-
30 encoding human genes adapted to the cyanobacterial codon usage. These synthetic hmGST2 and
31 hmGST3 genes were also able to increase the *E. coli* tolerance to heat and *n-t*BOOH. Collectively,
32 these finding indicate that the activity of the MAPEG2 proteins have been conserved, at least in part,
33 during evolution from (cyano)bacteria to human.

34 **1 Introduction**

35 Glutathione, the highly abundant (1 – 10 mM) tripeptide L-glutamyl-L-cysteinyl- L-glycine [1],
36 plays an important role in the protection against oxidative and metabolic stresses in most organisms.
37 The reduced (major) form (GSH) of glutathione maintains reduced state of the intracellular
38 compartment(s) and donates electrons to various enzymes [1,2], such as the glutathione-S-
39 transferases (GST) that operate in the detoxification of reactive oxygen species (ROS), xenobiotics
40 and/or heavy metals [3,4]. The resulting oxidized form of glutathione, the dimeric disulfide form
41 (GSSG), is then reduced back to GSH by various factors, such as the NADPH-using enzyme
42 glutathione reductase (GR) that occurs in many [5], but not all organisms such as the presently-
43 studied model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [6,7]. The superfamily of GSTs enzymes
44 (EC 2.5.1.18) can be divided in three categories: the cytosolic GSTs, the mitochondrial GSTs and the
45 microsomal GSTs also designated as MAPEGs (membrane-associated proteins involved in ecosanoïd
46 and glutathione metabolism) [8].

47 Mammalian MAPEGs have different functions and low sequence similarities. They define six
48 types of proteins namely: (i) mGST1, (ii) mGST2 and (iii) mGST3, (iv) the 5-lipoxygenase-
49 activating protein (FLAP), (v) the prostaglandin E synthase (PGES) and (vi) the leukotriene C₄
50 (LTC₄) synthase, which can be grouped in two families: MAPEG1 (mGST1/PGES) and MAPEG2
51 (mGST2/mGST3/FLAP/LTC₄ synthase) (for reviews see [9–12]). MAPEG homologs identified in
52 insects (*Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*) can be placed in the MAPEG1 family [10],
53 while MAPEG homologs found in fungi (*Aspergillus nidulans*) and plants (*Arabidopsis thaliana*,
54 *Oryza sativa*, and *Ricinus communis*) belong to MAPEG2 [10]. MAPEG1 and MAPEG2 members
55 were found in prokaryotes but not in archae [10,11].

56 MAPEG proteins are not merely "membrane associated" proteins as proposed by their
57 acronym, but in fact integral membrane proteins [12]. They contain 4 transmembranes helices as was
58 suggested by their hydropathy plots [13,10] and verified in the X-ray crystallography of the

59 mammalian proteins: mGST1 [14,15], LTC₄ synthase [16] and PGES [17]. Furthermore, the trimeric
60 state was revealed by X-ray crystallography for mGST1 [18,19]. Each monomer were found to bind
61 on GSH molecule but only one subunit is catalytically active in both rat mGST1 and human mGST2
62 [19,20].

63 Mammalian MAPEGs use a GSH-dependent isomerase activity to operate in the biosynthesis
64 of leukotrienes (FLAP and LTC₄ synthase) or prostaglandin E (PGES) [21], (GPI) [12] that are
65 required for allergic [16] and inflammatory [17] responses. MAPEGs also play a role in
66 detoxification [22], using a GSH-transferase activity [12] as well as the GSH-dependent reduction of
67 organic fatty acid and lipid hydroperoxides through their peroxidase activity [23,12,22,24].

68 Unlike the human mGST1 (hmGST1), which operates in lipid peroxidation [22] and
69 tumorigenesis and drug resistance (for review see [21]), the precise *in vivo* role of (human) hmGST2
70 and hmGST3 is not well described though they could be interesting targets for drug development.
71 Very interestingly, hmGST2 and hmGST3 share amino-acids sequence homology with MAPEG-like
72 proteins from simple and fast growing prokaryotes, such as *Escherichia coli* and the model
73 cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. These *E. coli* and *Synechocystis* PCC 6803 MAPEG-like
74 genes were cloned in an *E. coli* expression vector, and the MAPEG-like proteins were purified
75 (partially in the case of the *Synechocystis* PCC 6803 protein) and appeared to catalyze the
76 conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) with GSH, thereby showing that GST activity
77 can be regarded as a common denominator for a majority of MAPEG members throughout the
78 kingdoms of life [10]. Prolonging and extending this study we have thoroughly analyzed, for the first
79 time (to our knowledge), the *in vivo* role of *Synechocystis* PCC 6803 MAPEG protein. Cyanobacteria
80 are attractive organisms to study the role of GSTs and their selectivity/redundancy. Indeed,
81 cyanobacteria are regarded as the inventor of the oxygenic photosynthesis [25,26] and of the GSH
82 synthesis and dependent enzymes to protect themselves against the reactive oxygen species (ROS)

83 they (often) produce when their active photosynthesis is altered by stresses (light, temperature,
84 metals) [26].

85 In the frame of our long-term interest in stress responses in cyanobacteria (for a review see
86 [27]) we carried out the first (to our knowledge) *in vivo* analysis, of the MAPEG protein of
87 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (hereafter *Synechocystis*). We report that the *Synechocystis* MAPEG
88 protein (designated Sll1147 in CyanoBase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>)) plays a
89 prominent role in the cell tolerance to heat- and cold-temperatures and the protection against lipid
90 peroxidation. The $\Delta sll1147$ deletion mutant lacking Sll1147 undergoes a transient sequential
91 accumulation of peroxidized lipids and then of GSH and GSSG. We also demonstrate that the stress-
92 tolerance of the $\Delta sll1147$ mutant can be restored following the production of hmGST2 and hmGST3
93 the human MAPEG counterparts of Sll1147. This finding shows that (at least some) MAPEG
94 functions have been conserved throughout evolution and can be (easily) studied in *Synechocystis*.

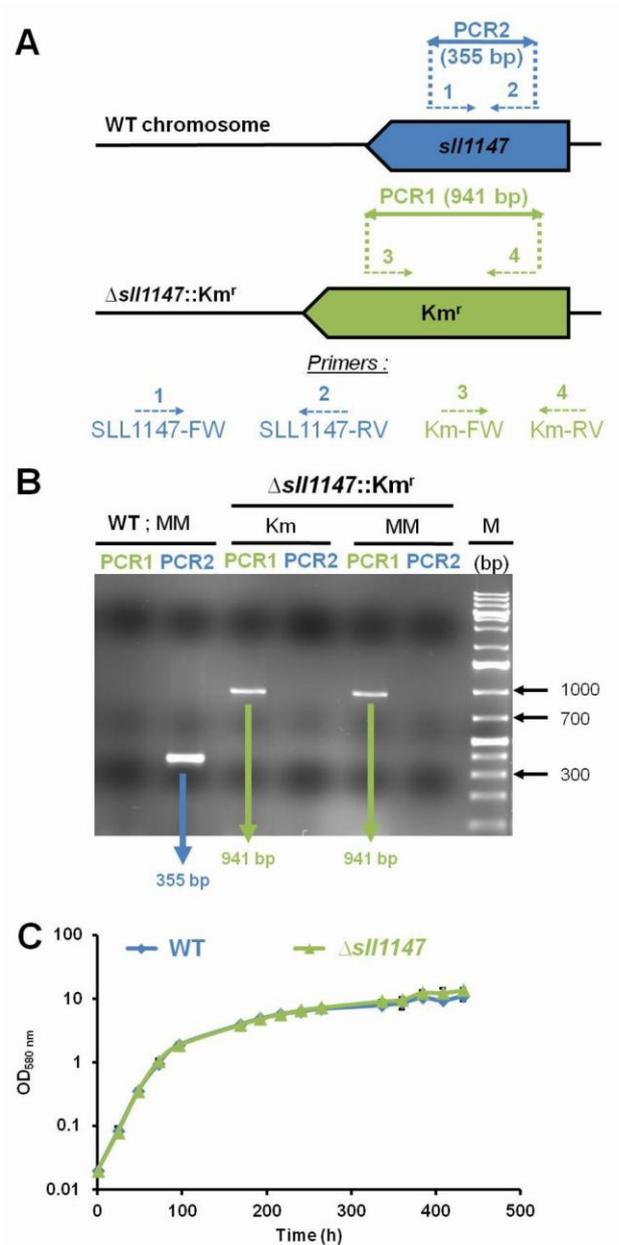
95 **2 Results**

96 **2.1 The Sll1147 MAPEG-like GST is dispensable for the photoautotrophic growth of**
97 ***Synechocystis***

98 To analyze *in vivo* the role of the Sll1147 GST, we constructed the $\Delta sll1147::Km^r$ deletion
99 mutant, using the standard gene replacement procedure that comprises three main steps. First, the
100 DNA region containing *sll1147* surrounded by its 300 bp flanking DNA regions was amplified by
101 PCR using specific oligonucleotides primers (S1 Table). Second, the *sll1147* protein-coding
102 sequence was replaced by a transcription-terminator-less kanamycin resistance (Km^r) gene for
103 selection, while preserving the 300 bp of *sll1147* flanking DNA regions for homologous
104 recombination that mediate targeted gene replacement upon transformation to *Synechocystis* [28].
105 Third, the resulting deletion cassette (S2 Table) was introduced in *Synechocystis* by transformation
106 [28]. A few Km^r transformants were selected and analyzed by PCR with specific oligonucleotide
107 primers (S1 Table, Fig 1A and 1B) to verify that the Km^r marker gene had properly replaced *sll1147*
108 in the *Synechocystis* chromosome, thanks to homologous DNA recombination occurring in the 300-
109 bp *sll1147*-flanking DNA region shared by the $\Delta sll1147::Km^r$ incoming DNA and the *Synechocystis*
110 recipient chromosome which is polyploid (it occurs at about ten copies per cell [28]).

111 All $\Delta sll1147::Km^r$ transformants growing in standard photoautotrophic conditions in the
112 presence of kanamycin possessed only $\Delta sll1147::Km^r$ chromosomes (Fig 1B, see the presence of the
113 941 bp PCR product characteristic of $\Delta sll1147::Km^r$ chromosomes) but no WT chromosomes (Fig
114 1B, see the absence of a 355 bp PCR band typical of WT (*sll1147*⁺) chromosomes). The absence of
115 WT chromosome copies (*sll1147*⁺, i.e. Km^S) in the $\Delta sll1147::Km^r$ mutant was confirmed by growing
116 it for multiple generations in absence of Km to stop counter-selecting possible WT (*sll1147*⁺, Km^S)
117 chromosome copies, which could have escape detection, prior to the PCR assays. Again the

118 $\Delta sll1147::Km^r$ mutant possessed only $\Delta sll1147::Km^r$ chromosomes (Fig 1B, see the presence of the
119 941 bp PCR product and the absence of a 355 bp PCR band). Together, these data demonstrate that
120 *sll1147* is non-essential for the standard photoautotrophic growth of *Synechocystis*.

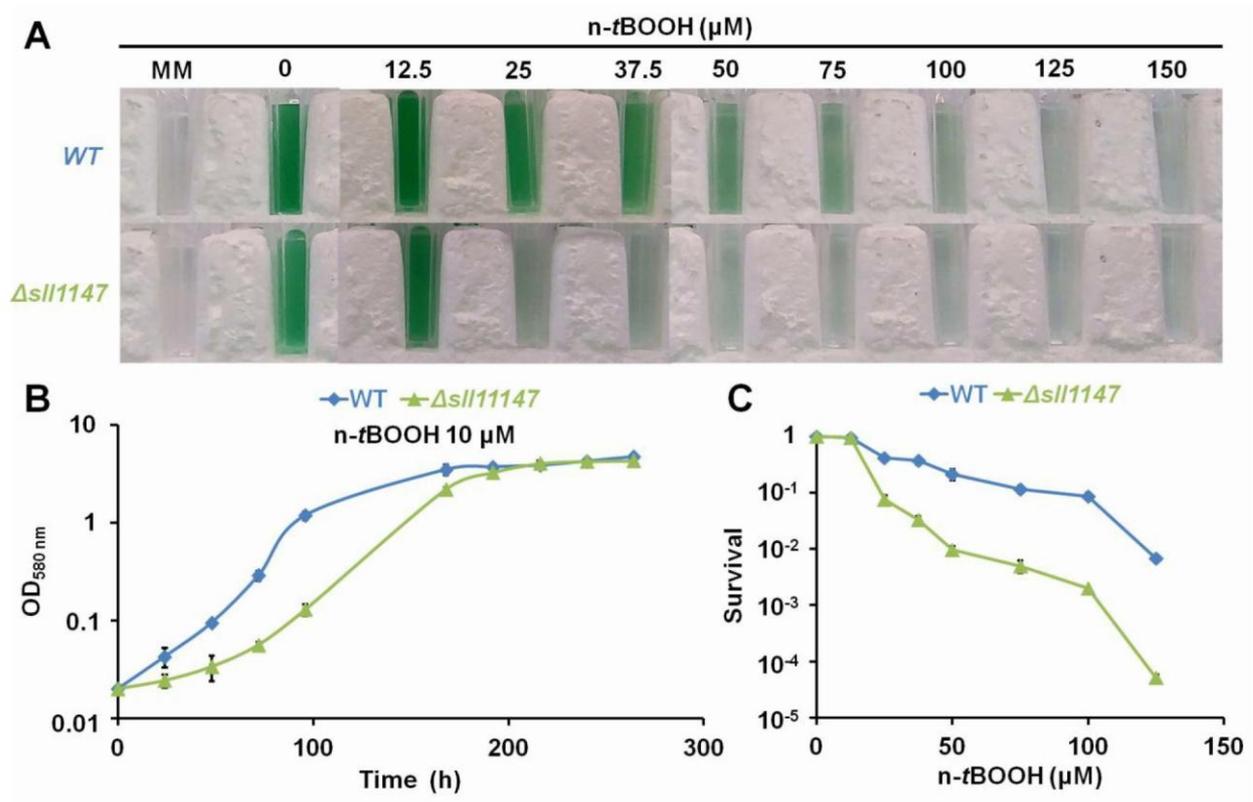


121
122 **Fig 1. The *sll1147* gene is dispensable for the photoautotrophic growth of *Synechocystis*.**

123 (A) PCR analysis of the *sll1147* chromosome locus in *Synechocystis* WT strain and the
124 $\Delta sll1147::Km^r$ mutant constructed in this study. The genes are represented by colored arrows
125 (*sll1147*⁺: blue; *Km*^r: green) pointing into the direction of their transcription. The same color code is
126 used to represent the PCR oligonucleotides primers (dotted arrows, see S1 Table for their sequence)
127 and the corresponding PCR products (double arrows) typical of the presence of WT (*sll1147*⁺, *Km*^S)
128 or mutant ($\Delta sll1147::Km^r$) chromosome copies. (B) Typical UV-light image of the agarose gel
129 showing the PCR products corresponding to the genes *sll1147*⁺ (PCR2: blue) or *Km*^r (PCR1: green)
130 generated from WT and $\Delta sll1147::Km^r$ cells grown in absence (MM) or presence (Km) of the
131 selective antibiotic. M (marker DNA) stands for the GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo
132 Scientific). Note that WT cells harbor only WT chromosomes while $\Delta sll1147::Km^r$ mutant cells
133 possess only $\Delta sll1147::Km^r$ chromosomes.

134 **2.2 The Sll1147 MAPEG-like GST operates in the tolerance of *Synechocystis* to n-tertbutyl**
135 **hydroperoxide**

136 Recently, we showed that the Sll1545 and Slr0236 GSTs, distantly related to the presently
137 studied MAPEG-like GST Sll1147, operate (negatively) in the tolerance to hydrogen peroxide [29] a
138 reactive oxygen species frequently generated by the cell metabolism [30]. Consequently, having a
139 strong interest in the selectivity/redundancy of the role of GSH-dependent enzymes [31,32,6,33], we
140 have tested the influence of hydrogen peroxide (H₂O₂) and n-tertbutyl hydroperoxide (n-tBOOH),
141 which induces lipid peroxidation [34], on the fitness of the *Synechocystis* WT strain and the
142 $\Delta sll1147::Km^f$ mutant. Both the growth and survival of the $\Delta sll1147::Km^f$ mutant (hereafter
143 $\Delta sll1147$) were decreased by n-tBOOH (Fig 2B and 2C) and H₂O₂ (S1 Fig), as compared to the WT
144 strain. Collectively, these data suggest that Sll1147 operates in the protection against the two
145 peroxides H₂O₂ and n-tBOOH.



146

147

Fig 2. The $\Delta sll1147$ mutant is sensitive to *n-tertbutyl* hydroperoxide.

148

(A) Ten milliliters of mid-log-phase cultures (initial $OD_{580\text{ nm}} = 0.1$) were incubated for 72h in liquid mineral medium (MM) under standard photoautotrophic conditions with or without the indicated concentrations of *n-tBOOH*, prior to transfer in spectrophotometric cuvette and photography. (B)

151

Typical growth curve of the WT strain and $\Delta sll1147$ mutant incubated in liquid MM containing 10 μM *n-tBOOH*. (C) Typical survival of WT and $\Delta sll1147$ cells exposed for 72h to various *n-tBOOH*

152

concentrations. Data shown in (B) and (C) are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of

153

three experiments.

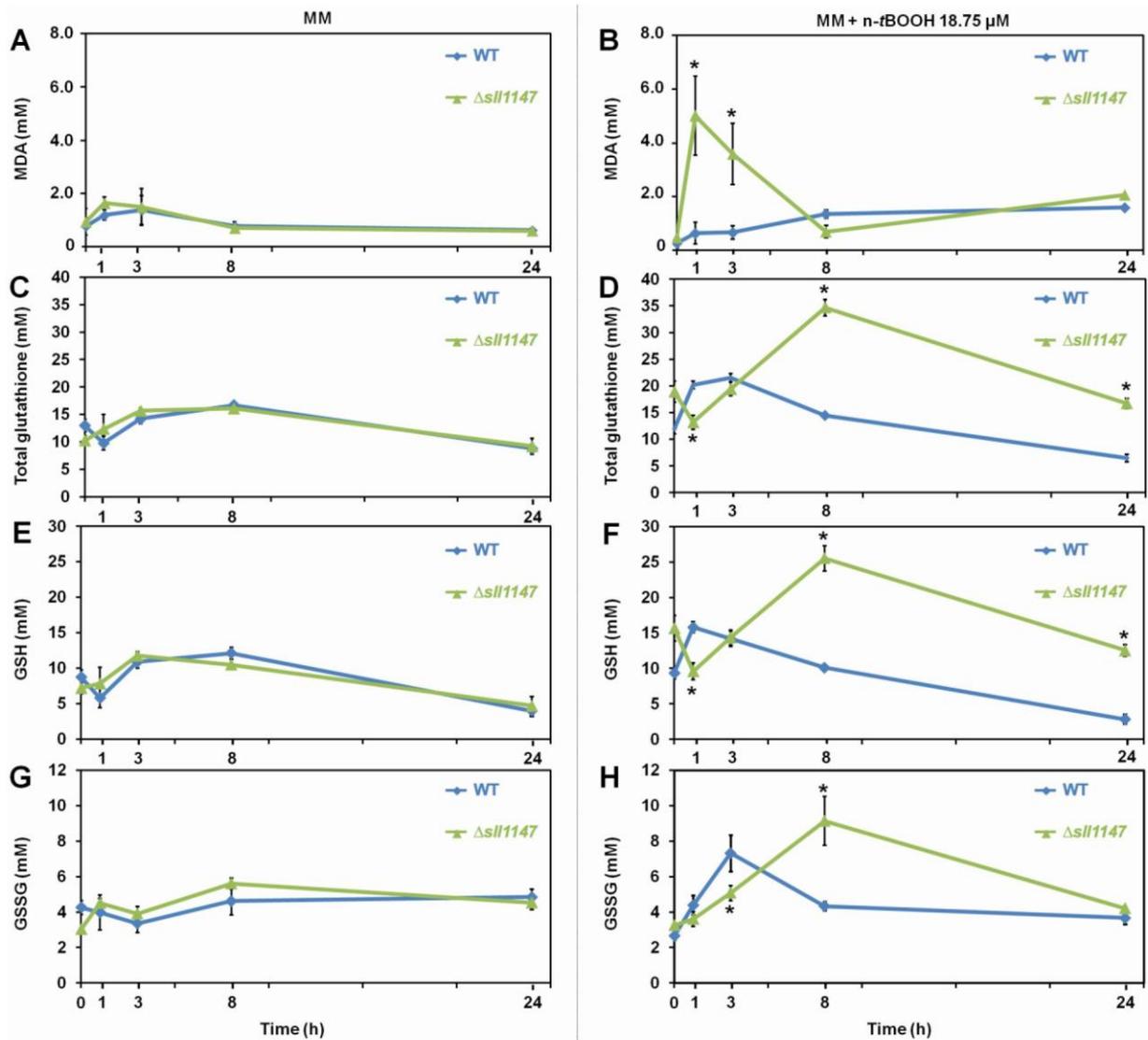
154

155 **2.3 In response to *n-tert*butyl hydroperoxide (*n-t*BOOH), the $\Delta sll1147$ sensitive mutant**
156 **transiently accumulates peroxidized lipids and then glutathione**

157 To analyze the influence of *n-t*BOOH on the $\Delta sll1147$ sensitive mutant and the WT control
158 strain, we measured the malondialdehyde (MDA) content as a marker of lipid peroxidation, using the
159 standard thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay [35]. As GSTs are generally
160 involved in glutathione-dependent reactions, we also measured the levels of the reduced, oxidized
161 and total glutathione (GSH, GSSG and $GS_{total} = GSH + GSSG$) using the relevant standard assay [36]
162 as we previously described [29].

163 In the WT strain, the level of MDA was almost unaffected by (18.75 μ M) *n-t*BOOH (Fig 3B)
164 while GSH and GSSG were weakly (about two-fold) and transiently increased at 1h (GSH) and 3h
165 (GSSG), before returning to their normal levels at 24h (Fig 3F and 3H). These data are consistent
166 with the WT strain being little affected by *n-t*BOOH (it was resistant up to 25 μ M; (Fig 2)). By
167 contrast, the $\Delta sll1147$ mutant challenged by *n-t*BOOH highly and rapidly accumulated MDA (in 1h),
168 the level of which decreased down to the unstressed level (at 8 h, Fig 3B). Concomitantly to the
169 MDA decline (between 1 and 3h), the mutant $\Delta sll1147$ strongly accumulated both GSH and GSSG
170 (up to 25 mM and 10 mM, respectively), that subsequently returned to the unstressed level (at 24h,
171 Fig 3B, 3F and 3H). The strong and sequential accumulation of the stress indicator MDA (at 1h) and
172 then (at 8h) of GSH (detoxification) and GSSG (generated upon the GSH-mediated detoxification)
173 are consistent with the high sensitivity of the $\Delta sll1147$ mutant to *n-t*BOOH (Fig 2). Altogether, these
174 findings indicate that *Sll1147* normally operates in the protection against peroxidized lipids elicited
175 by *n-t*BOOH, using a process that transiently accelerates the synthesis of reduced glutathione (GSH)
176 which is subsequently oxidized in glutathione disulfide (GSSG). In contrast, $\Delta sll1147$ cells
177 challenged by H_2O_2 did not significantly modify their level of GSH and GSSG as compared to WT

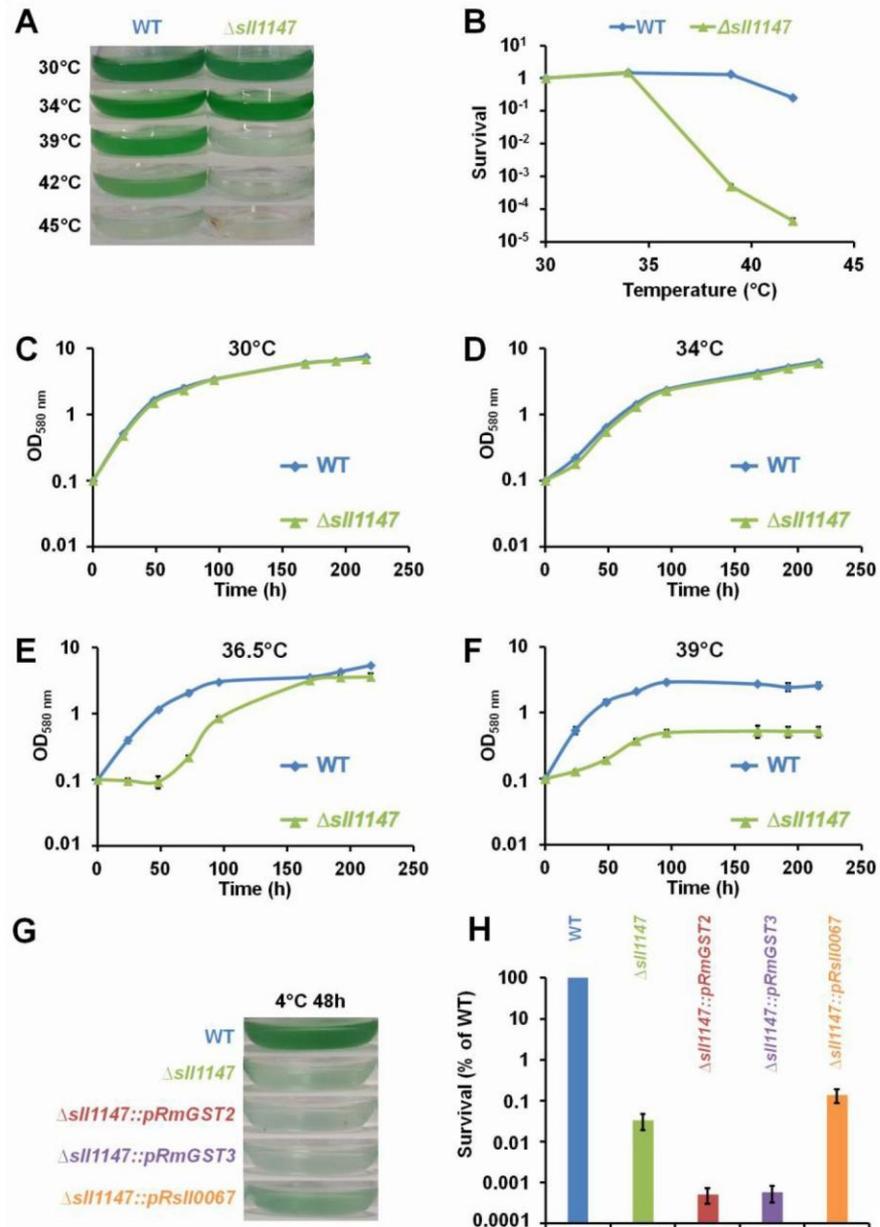
178 cells (S2 Fig), indicating that the Sll1147 and glutathione-dependent response is somehow more
 179 "specific" to peroxidized lipids than to other kind of ROS, as observed with mGST1 substrates [23].



180
 181 **Fig 3. The $\Delta sll1147$ sensitive mutant challenged by *n-t*BOOH, transiently accumulates**
 182 **peroxidized lipids and then glutathione**
 183 Kinetic analysis of the influence of *n-tert*butyl hydroperoxide (*n-t*BOOH) on the abundance of
 184 peroxidized lipids, measured as the MDA content (A-B), total glutathione (C-D), GSH (E-F) and
 185 GSSG (G-H) in *Synechocystis* WT and $\Delta sll1147$ cells. The data are expressed as the mean +/- SD of
 186 three assays and * indicates significant difference between mutant and WT (*t*-test, $P < 0.05$).

187 **2.4 The Sll1147 MAPEG-like GST operates in the tolerance of *Synechocystis* to both heat and**
188 **cold stresses**

189 Several lines of evidence prompted us to test the influence of the presence (WT) and absence of
190 Sll1147 ($\Delta sll1147$ mutant) on the tolerance of *Synechocystis* to high and low temperatures. Like other
191 photosynthetic organisms, cyanobacteria are frequently exposed to fluctuations in temperatures
192 triggered by the alternation of seasons, the day-night cycles and the passages of clouds that filter
193 sunlight. Furthermore, it is known that (i) temperature stress can trigger lipid peroxidation; (ii)
194 mutant impaired in the defense against lipid peroxidation are temperature sensitive and (iii)
195 glutathione operates in the resistance to temperature stress and lipid peroxidation [37]. Consequently,
196 we have tested and compared the influence of high (39°C) and low (4°C) temperatures on the growth
197 and/or survival of the WT and $\Delta sll1147$ strains of *Synechocystis*. The fitness of the two strains was
198 similar at 30°C (the standard growth temperature of *Synechocystis*) and 34°C (Fig 4C and 4D). The
199 growth and survival of the $\Delta sll1147$ were more decreased by increasing temperatures than those of
200 the WT strain (Fig 4E and 4F), showing that Sll1147 is required for the tolerance to heat. We also
201 found showed that the survival of the $\Delta sll1147$ mutant was strongly decreased (Fig 4G and 4H) after
202 an exposure to 48h at 4°C as compared to the WT, showing that Sll1147 is also involved in the
203 tolerance to low temperatures. To our knowledge this is the first evidence that a cyanobacterial GST
204 (the MAPEG-like Sll1147 protein) operates in the protection against heat and cold stresses.



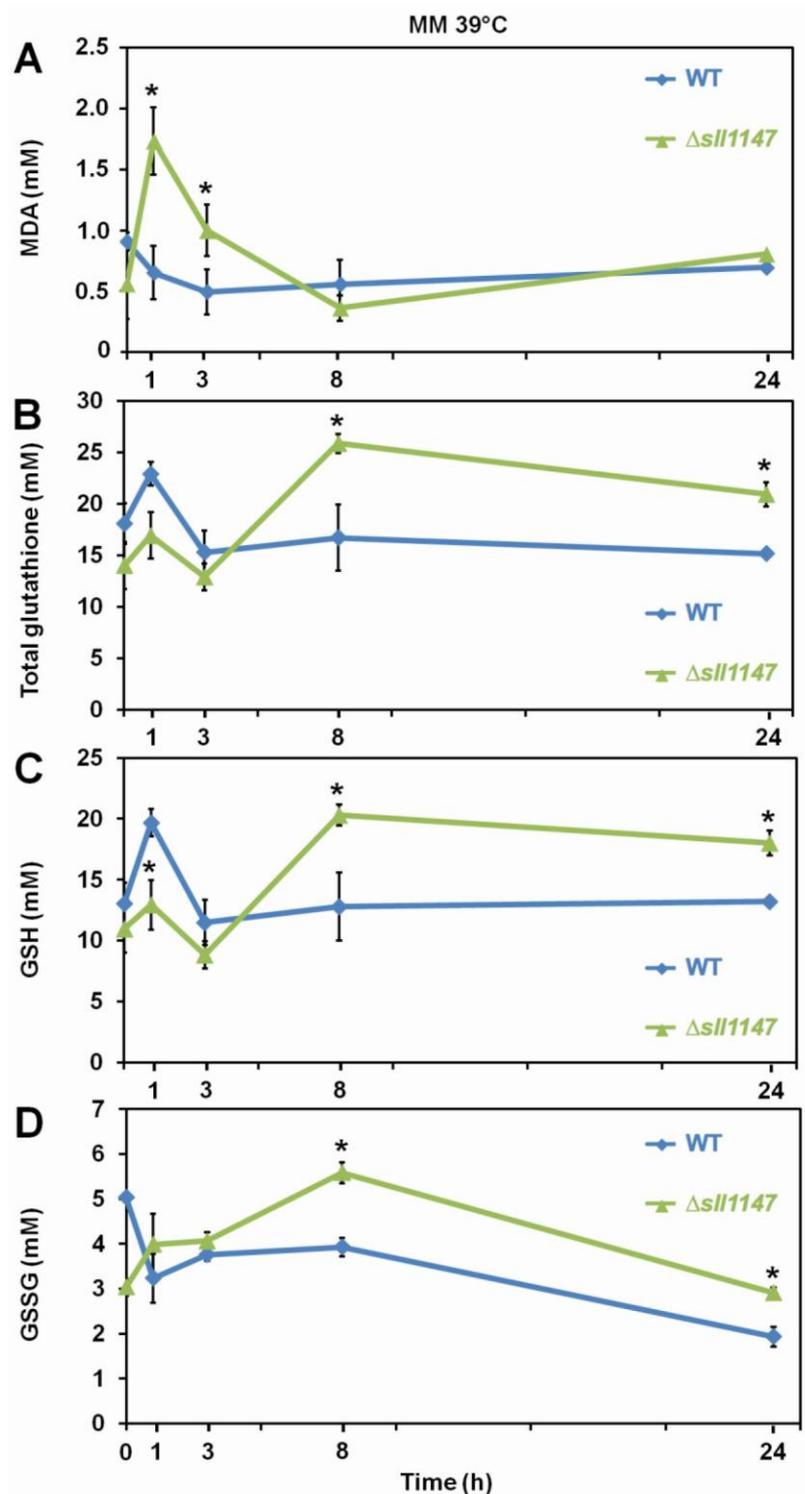
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216

Fig 4. The Sll1147 MAPEG-like GST is involved in the *Synechocystis* tolerance to high and low temperatures.

Ten milliliters of mid-log-phase cultures (initial $OD_{580\text{ nm}} = 0.1$) were incubated in liquid MM for 24h under standard light (2500 lux) at the indicated temperatures, prior to photographing the culture flasks (A) and survival analysis (B). (C to F) Growth curves of WT and Δ sll1147 strains incubated in liquid MM under standard light (2500 lux) at various temperatures: 30°C (C), 34°C (D), 36.5°C (E) and 39°C (F). (G) Ten milliliters of mid-log-phase cultures (initial $OD_{580\text{ nm}} = 0.1$) were incubated in liquid MM for 48h under standard light (2500 lux) at 4°C and then 24h at 30°C for recovery, before photographing the culture flasks. (H) Survival of WT strain and Δ sll1147, Δ sll1147::pRmGST2, Δ sll1147::pRmGST3 and Δ sll1147::pRsll0067 mutants exposed for 48h to 4°C. Data shown in (B-F) and (H) are expressed as the mean \pm SD of three experiments.

217 **2.5 The heat-sensitive mutant $\Delta sll1147$ exposed to a high temperature transiently**
218 **accumulates peroxidized lipids and then glutathione**

219 Heat is an important environmental stress known to elicit lipid peroxidation in photosynthetic
220 organisms where it leads to the formation of the secondary product, malondialdehyde (MDA) that
221 can be detected by TBARS assay (for example see, [38] and references therein). Thus, to analyze the
222 influence of heat in *Synechocystis* WT strain and $\Delta sll1147$ mutant we measured in each strain the
223 MDA content and the levels of the reduced and oxidized glutathione (GSH, GSSG and total
224 glutathione). In accordance with its heat sensitivity the $\Delta sll1147$ mutant incubated at 39°C rapidly (in
225 1h) accumulated MDA, which decreased down to the unstressed level (at 8 h, Fig 5A).
226 Concomitantly to the MDA decline (particularly between 3 and 8 h), the $\Delta sll1147$ mutant
227 accumulated both GSH and GSSG (up to about 20 mM and 5 mM, respectively), which remained
228 high (GSH, Fig 5C) or decreased down to the unstressed level (at 24h, GSSG, Fig 5D). Collectively,
229 these data indicate that $\Delta sll1147$ normally operates in the detoxification of peroxidized lipids elicited
230 by heat, using a redox process that transforms reduced glutathione (GSH) in oxidized glutathione
231 (GSSG).

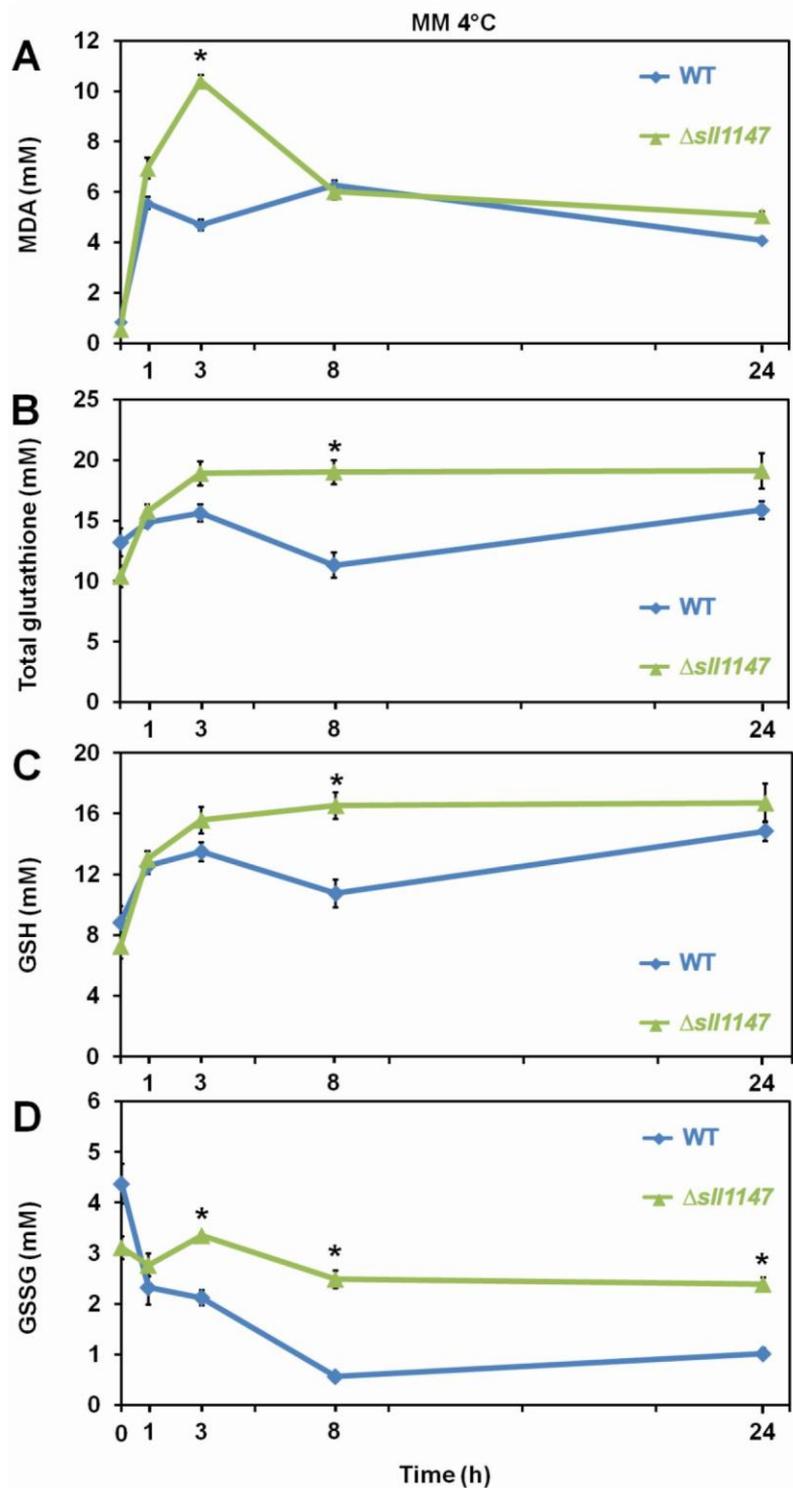


232
 233 **Fig 5. The $\Delta sll1147$ heat sensitive mutant challenged by heat transiently accumulates**
 234 **peroxidized lipids, GSH and GSSG.**
 235 Kinetic analysis of the influence of high temperature exposure (39°C) on the abundance of
 236 peroxidized lipids measured as MDA content (A); total glutathione (B); GSH (C) and GSSG (D) in
 237 *Synechocystis* WT and mutant $\Delta sll1147$. Data are expressed as the mean \pm SD of three assays and *
 238 indicates significant difference between mutant and WT (t -test, $P < 0.05$).

239 **2.6 The cold-sensitive mutant $\Delta sll1147$ exposed to a low temperature transiently accumulates**
240 **peroxidized lipids and then glutathione**

241 We also analyze the influence of cold in *Synechocystis* WT strain and $\Delta sll1147$ mutant on the
242 level of reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG) and on the MDA content, because cold
243 treatment modifies the content of total glutathione and increases ROS (H_2O_2 and $O_2\bullet^-$) and
244 malondialdehyde levels (MDA) [37]. In agreement with its cold sensitivity the $\Delta sll1147$ mutant
245 incubated at 4°C rapidly (in 1h) accumulated MDA which peaked at 3h (up to 10 mM) and
246 subsequently decreased down to the WT level (at 8h, Fig 6A). The $\Delta sll1147$ mutant accumulated
247 both GSH and GSSG (up to about 16 mM and 3 mM, respectively), which remained high (for both
248 GSH and GSSG, Fig 6C and 6D) compared to the WT levels. Collectively, these data indicate that
249 $Sll1147$ normally operates in the detoxification of peroxidized lipids elicited by heat, using a redox
250 process that transforms reduced glutathione (GSH) in oxidized glutathione (GSSG).

251



252
 253 **Fig 6. In response to cold, the $\Delta sll1147$ sensitive mutant transiently accumulates peroxidized**
 254 **lipids, GSH and GSSG.**
 255 Kinetic analysis of the influence of cold temperature exposure (4°C) on the abundance of peroxidized
 256 lipids measured as MDA content (A); total glutathione (B); GSH (C) and GSSG (D) in *Synechocystis*
 257 WT and mutant $\Delta sll1147$. Data are expressed as the mean \pm SD of three assays and * indicates
 258 significant difference between mutant and WT (*t*-test, $P < 0.05$).

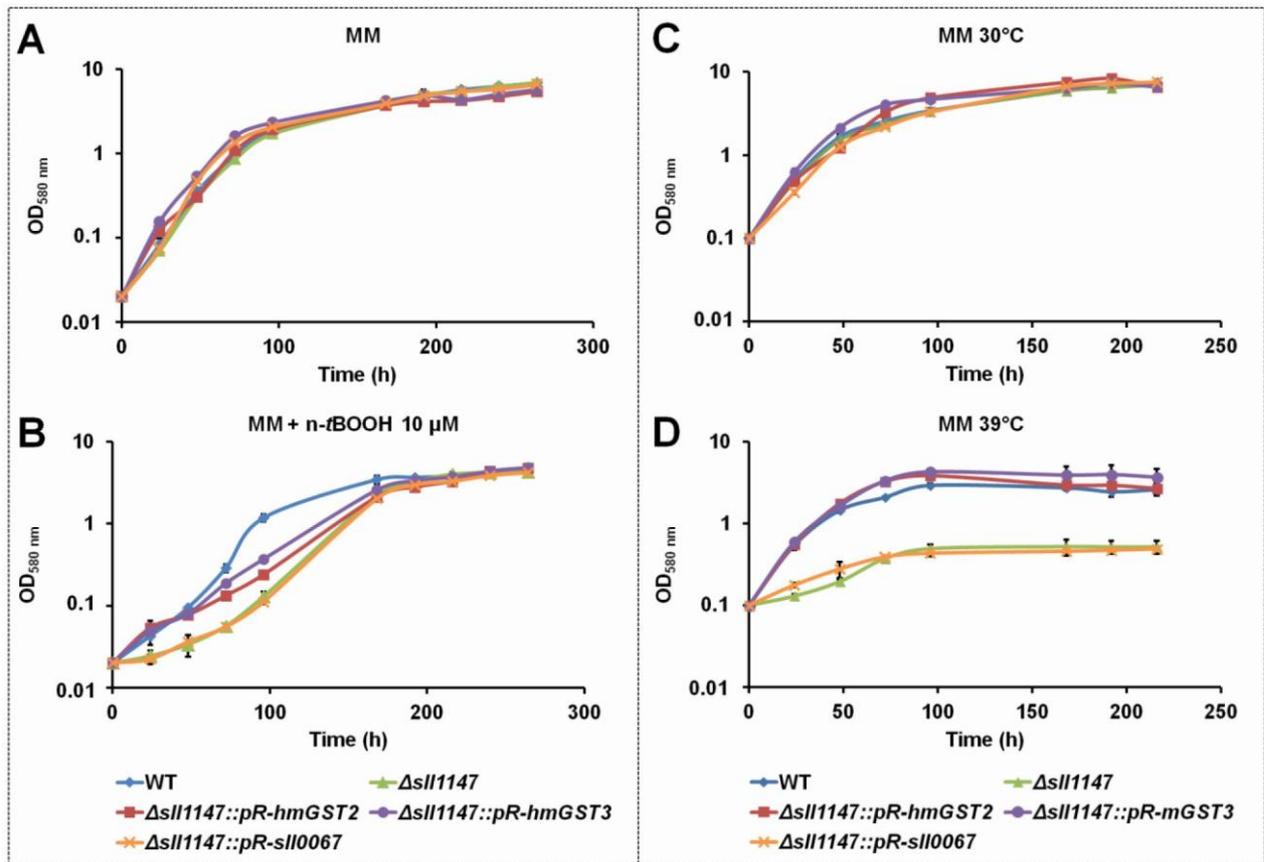
259 **2.7 The human hmGST2 and hmGST3 MAPEG proteins, but not the unrelated Sll0067**
260 ***Synechocystis* GST protein, can restore the cell tolerance to n-tBOOH and heat of the**
261 ***Synechocystis* mutant lacking the Sll1147 MAPEG-like protein.**

262 Previous bioinformatic studies showed that the cyanobacterial Sll1147 protein shares common
263 features (amino-acid sequences, hydropathy plots) with the human mGST2 and mGST3 MAPEGs
264 (hereafter hmGST2 and hmGST3) [13]. As the role of these hmGST2 and hmGST3 proteins in cell
265 physiology is poorly understood, we tested whether they can operate in the tolerance to temperature
266 and lipid peroxidation stresses, like their "(cyano)bacterial ancestor" Sll1147. Practically, we tested
267 whether the hmGST2 and/or hmGST3 proteins can restore the tolerance to heat, cold and n-*tert*butyl
268 hydroperoxide (n-tBOOH) in the *Synechocystis* Δ sll1147 mutant lacking Sll1147. Therefore, we
269 constructed the gene-complementation DNA cassettes that contain the following parts (S2 Table and
270 S3 Fig). A synthetic version of the *hmGST2* or *hmGST3* genes adapted to the cyanobacterial codon
271 usage and expressed from the efficient pR promoter [39]. Downstream of these recombinant genes,
272 *pR*-hmGST2 and *pR*-hmGST3, we placed an antibiotic-resistance marker gene (Sm^r/Sp^r) for
273 selection. Finally, these cassettes were flanked by *sll1147*-surrounding *Synechocystis* DNA regions to
274 serve as platform of homology for genetic recombination mediating the integration of each DNA
275 cassettes (Δ sll1147::*pR*-*hmGST2*- Sm^r/Sp^r and Δ sll1147::*pR*-*hmGST3*- Sm^r/Sp^r) at the *sll1147* locus
276 upon transformation in *Synechocystis*. Similarly, the Δ sll1147::*pR*-*sll0067*- Km^r control DNA cassette
277 was constructed (S3 Fig and S2 Table) to test the influence of the Sll0067 GST unrelated to Sll1147
278 (they share a small amino-acids sequence identity percentage (14.4 %)) on the presently studied
279 stresses.

280 The Δ sll1147::*pR*-*hmGST2*- Sm^r/Sp^r and Δ sll1147::*pR*-*hmGST3*- Sm^r/Sp^r cassettes were
281 transformed in the Δ sll1147:: Km^r selecting for the Sm^r/Sp^r (Km^s) phenotype. In each case several
282 transformant clones were analyzed by PCR and DNA sequencing (S3 Fig) to verify that they

283 contained the complementation DNA-cassette $\Delta sll1147::pR-hmGST2-Sm^r/Sp^r$ or $\Delta sll1147::pR-$
284 $hmGST3-Sm^r/Sp^r$ integrated in place of the $\Delta sll1147::Km^r$ locus in all *Synechocystis* chromosome
285 copies, as expected.

286 The $\Delta sll1147::pR-hmGST2-Sm^r/Sp^r$ and $\Delta sll1147::pR-hmGST3-Sm^r/Sp^r$ reporter strains grew as
287 healthy as the *Synechocystis* WT strain and the $\Delta sll1147::Km^r$ mutant under standard conditions
288 (30°C, Fig 7A and 7C). Interestingly, the growth of these reporter strains was less affected by the
289 heat (39°C) and *n-t*BOOH (10 μM) stresses than those the $\Delta sll1147::Km^r$ mutant (Fig 7A and 7B).
290 These data indicate that the hmGST2 and hmGST3 human proteins can rescue the tolerance to heat
291 and *n-t*BOOH that are low in the $\Delta sll1147::Km^r$ mutant due to its lack of Sll1147 (Fig 7D). To
292 confirm that the higher resistance to *n-t*BOOH and heat of the $\Delta sll1147::pR-hmGST3-Sm^r/Sp^r$
293 reporter strain was due to the expression of the *pR-hmGST3* gene, not an adventitious selection of a
294 suppressor mutation somewhere in the *Synechocystis* genome, we transformed the $\Delta sll1147::pR-$
295 $hmGST3-Sm^r/Sp^r$ cells with the $\Delta sll1147::pR-sll0067-Km^r$ cassette to substitute the *pR-hmGST3* gene
296 by the *pR-sll0067* gene encoding the Sll0067 GST unrelated to the MAPEG proteins hmGST3,
297 hmGST2 and Sll1147). We verified by PCR and DNA sequencing (S3 Fig) that the resulting
298 $\Delta sll1147::pR-sll0067-Km^r$ reporter cells harbored the *pR-sll0067* gene in place of the *pR-hmGST3*
299 gene in every chromosome copy, and that these cells remained as sensitive to *n-t*BOOH and heat as
300 the $\Delta sll1147$ mutant (Fig 7B), as expected. These data confirmed that the absence of the MAPEG-
301 like Sll1147 protein decreases the tolerance to *n-t*BOOH and heat, which can be rescued by the
302 human orthologs hmGST2 and hmGST3, but not the unrelated cyanobacterial GST Sll0067.
303 Collectively, these finding indicate that MAPEG enzymes play an important role in the cellular
304 resistance to heat and lipid peroxidation, which has been conserved during evolution. In turn, these
305 findings rule out that any GST can operate in cell tolerance to membrane fluidity affected by *n-*
306 *t*BOOH and heat.



307
 308 **Fig 7. The human hmGST2 and hmGST3 proteins can restore the $\Delta sll1147$ tolerance to heat**
 309 **and *n-tBOOH*.**

310 (A and B) Growth curve of *Synechocystis* WT and relevant reporter strains (initial $OD_{580\text{ nm}} = 0.02$)
 311 incubated in liquid MM under standard light (2500 lux) and temperature (30°C), without (A) or with
 312 *n-tBOOH* $10\ \mu\text{M}$ (B). (C and D) Growth curve of WT and relevant reporter strains (initial $OD_{580\text{ nm}} =$
 313 0.1) incubated in liquid MM under standard light (2500 lux) at 30°C (C) or 39°C (D). Data shown in
 314 all panels are expressed as the mean \pm SD of three experiments.

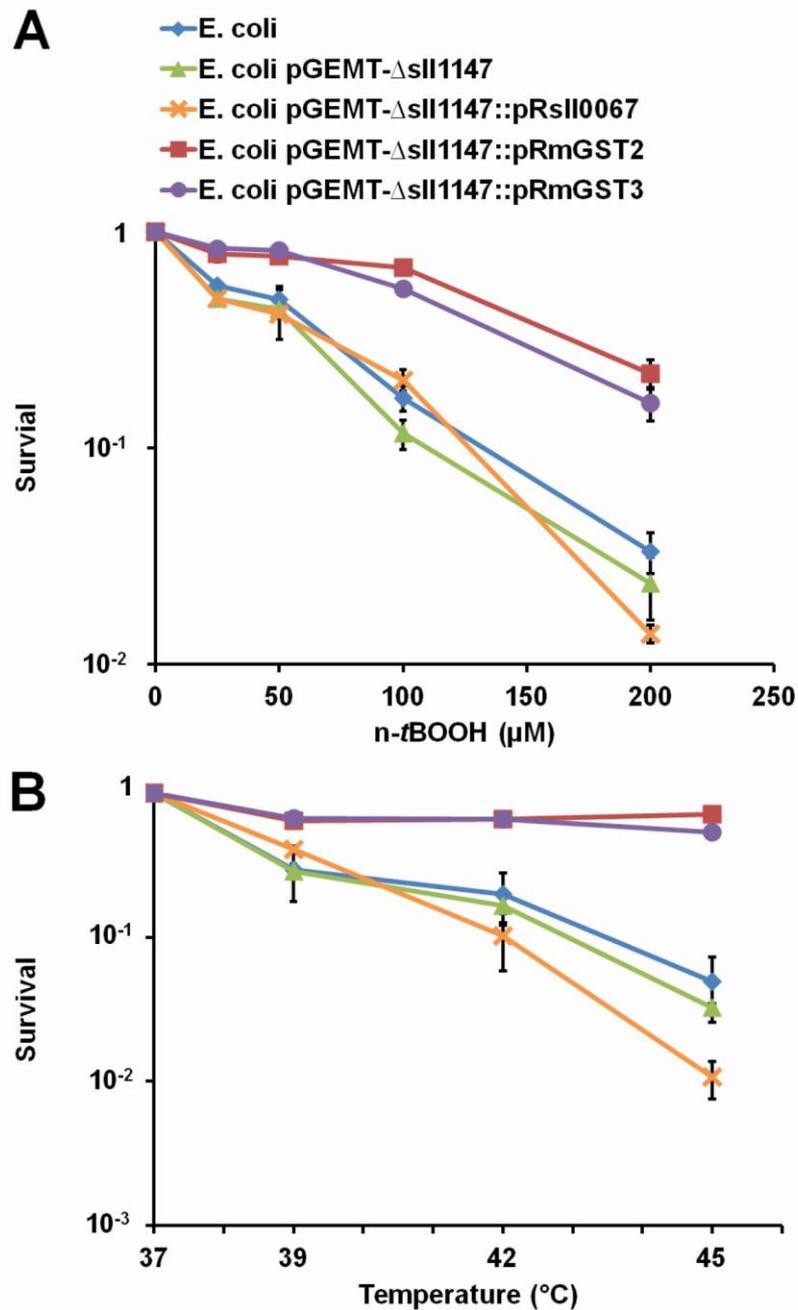
315 **2.8 The human hmGST2 and hmGST3 MAPEG proteins cannot rescue the cell tolerance to**
316 **cold, in the *Synechocystis* mutant lacking the Sll1147 MAPEG-like protein**

317 The same genetic complementation strategy was used to test whether the human hmGST2 and
318 hmGST3 proteins, and the other *Synechocystis* GST protein Sll0067, are able to rescue the cold
319 tolerance of the *Synechocystis* $\Delta sll1147::Km^r$ mutant. The survival of the reporter strains
320 $\Delta sll1147::pR-sll0067$ strain was similarly as the $\Delta sll1147::Km^r$ deletion mutant suggesting that
321 Sll0067 does not play a role in cold tolerance. The survival of the reporter strains $\Delta sll1147::pR-$
322 *hmGST2* and $\Delta sll1147::pR-hmGST3$ were even lower (10-fold) than that of the deletion mutant
323 $\Delta sll1147::Km^r$ (Fig 4H) suggesting that both hmGST2 and hmGST3 might play a negative influence
324 on resistance to cold.

325 **2.9 The human hmGST2 and hmGST3 MAPEG proteins, but not the unrelated Sll0067**
326 ***Synechocystis* GST protein, can increase the *E. coli* tolerance to n-*t*BOOH and heat.**

327 We also evaluated the survival of *E. coli* TOP 10 propagating the presently-constructed DNA
328 cassettes $\Delta sll1147$ (no production of the Sll1147 protein), $\Delta sll1147::pR-hmGST2$ (production of the
329 hmGST2 protein), $\Delta sll1147::pR-hmGST3$ (production of hmGST3) or $\Delta sll1147::pR-sll0067$
330 (production of Sll0067) cloned into the autonomously replicating pGEMt plasmid (Promega) (S2
331 Table) after an exposure to n-*t*BOOH or high temperatures (Fig 8). As observed in *Synechocystis*, the
332 MAPEG proteins hmGST2, hmGST3 and Sll1147 could increase the *E. coli* resistance to lipid
333 peroxidation (n-*t*BOOH) and heat that affect the fluidity of cell membranes. Together the findings in
334 *Synechocystis* and *E. coli* indicate that the MAPEG GSTs play an important role in membrane
335 fluidity that has been conserved, at least in part (tolerance to heat and n-*t*BOOH, but not cold) during
336 evolution.

337



338
 339 **Fig 8. The production of hmGST2 and hmGST3 increase the *E. coli* survival to n-tBOOH and**
 340 **heat.**
 341 Survival of *E. coli* TOP 10 strains harboring, or not (WT control strain) one of the studied GST-
 342 producing plasmid challenged for 2 hours (initial OD_{600 nm} = 0.1) by the indicated temperatures (A) or
 343 n-tBOOH concentration (B). Data shown in all panels are expressed as the mean +/- SD of three
 344 experiments.

345 3 Discussion

346 We presently report the first *in vivo* analysis of a MAPEG2-type GST protein, i.e. the protein
347 designated as Sll147 in CyanoBase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>) of the well-studied
348 unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 (*Synechocystis*). The motivations for this study
349 are as follows. First, the MAPEG2 sub-family of "Membrane-Associated Proteins Involvement in
350 Ecosanoïd and Glutathione metabolism" proteins has been poorly studied *in vivo*, even though (i) the
351 human MAPEG2 proteins hmGST2 and hmGST3 are regarded as biomarker for tumorigenesis, and
352 (ii) MAPEG2 proteins are also present in basic easily manipulable organisms like bacteria. Second,
353 only two glutathione transferases (GSTs) have so far been studied *in vivo* in cyanobacteria [29], even
354 though these environmentally-crucial prokaryotes are regarded as having developed glutathione
355 (GSH) and GSH-dependent enzymes, such GSTs, to protect themselves against the toxic reactive
356 oxygen species (ROS) often produced by their powerful photosynthesis [26]. These *Synechocystis*
357 Sll1145 and Slr0236 GSTs, unrelated to Sll1147, were shown *in vivo* to play a prominent role in the
358 resistance to photo-oxidative stress [29]. Third, Sll1147 and other prokaryotic and eukaryotic
359 MAPEG enzymes produced from recombinant *E. coli* strains were only shown to have the classical
360 *in vitro* GST activity, which is the conjugation of GSH with the standard 1-chloro-2,4-dinitrobenzene
361 (CDNB) exogenous agent [10]. Fourth, the analysis of the selectivity/redundancy of GSTs is bound
362 to be easier in a well-studied basic organism such as *Synechocystis* than in higher eukaryotes that
363 possess (i) various tissues [21], (ii) complex developmental processes [40] and (iii) large enzyme
364 families. For example, 27 GST encoding genes were identified in human and classified into 7 classes
365 (Alpha, Mu, Pi, Theta, Omega, Zeta, Kappa and MAPEG) [41] whereas *Synechocystis* possesses only
366 six GSTs including Sll1147.

367 We presently report that the MAPEG-2 type Sll1147 protein is dispensable to the growth of
368 *Synechocystis* in standard photo-autotrophic conditions (Fig 1), whereas it is an important player in
369 cell tolerance heat (Fig 4A-F) and cold (Fig 4G-H), two inevitable environmental stresses for

370 cyanobacteria elicited by the alternation of seasons, the day-night cycles and the passages of clouds
371 filtering sunlight, which limit their production of biomass that is crucial for our food chain. Using
372 relevant assays, we showed that Sll1147 operates in the protection against peroxidized lipids elicited
373 by heat and cold stresses, using a redox process that transforms reduced glutathione (GSH) in
374 oxidized glutathione (GSSG) (Fig 5 and 6), likely to restore membrane fluidity. These findings are
375 welcome for the following reason. Though it is known that cold generates a decrease in the
376 membrane fluidity, which can be compensated by the desaturation of membrane lipids by fatty acid
377 desaturases, whereas heat causes fluidization of the membranes, which can be compensated by the
378 replacement of unsaturated fatty acids in membrane lipids by newly synthesized saturated fatty acids,
379 these processes are poorly described in cyanobacteria [42,43]. Indeed, to our knowledge, no GST has
380 been proposed to operate in protection against temperature stress in cyanobacteria, yet. Furthermore,
381 cyanobacteria have valuable biotechnological potentials (ecological production of chemicals) that are
382 often hampered by our limited knowledge of their responses to stresses [44,45]. Most cyanobacterial
383 species that are being used for chemical production grow optimally between 25 and 35 °C, while
384 temperatures in outdoor photobioreactors can be greater than 40 °C in subtropical zones.
385 Furthermore, culturing in elevated temperatures can be beneficial in reducing the potential for
386 microbial contamination [46]. Thus, it is important to get a good understanding of heat tolerance in
387 cyanobacteria in the future view order to select or generate strains capable to flourish under high
388 temperatures.

389 We also show that Sll1147 is involved in the tolerance to *n-tert*butyl hydroperoxide (*n-t*BOOH),
390 which elicits peroxidized lipids, [22], using a redox process that transforms GSH in GSSG (Fig 2 and
391 Fig 3), again likely to restore membrane fluidity. These data are consistent with previous
392 observations that (i) the human hmGST1 protein is active (*in vitro*) on various oxidized lipids [23];
393 (ii) cancer cells overproducing hmGST1 are more resistant to *n-t*BOOH than their control counterpart

394 (no overproduction of mGST1) [22]; and (iii) the sea cucumber mGST1 is also involved in the
395 tolerance to lipid peroxidation [24].

396 We also showed that Sll1147 is required for the tolerance to hydrogen peroxide (H₂O₂) (S1 Fig)
397 similarly to what found for the Sll1145 GST [29], unrelated to Sll1147. However, the H₂O₂
398 protection process involving Sll1147 is not accompanied by change in glutathione status (S2 Fig),
399 unlike what found in the case of Sll1145 [29]. Together, these findings emphasize on the selectivity
400 of cyanobacteria GSTs, a poorly investigated field so far.

401 Finally, as a previous phylogenetic analysis has shown that Sll1147 resembles the human
402 MAPEG hmGST2 and hmGST3 [10], we tested whether the expression of synthetic hmGST2 and
403 hmGST3 genes, adapted to the cyanobacterial codon usage, could restore the tolerance to n-7BOOH
404 and heat in the *Synechocystis* mutant lacking Sll1147 (Δ sll1147). Indeed, these complementation tests
405 were positive, whereas the control test performed with the other *Synechocystis* GST Sll0067,
406 unrelated to Sll1147, was negative, as expected (Fig 7). Similar findings were observed when these
407 cyanobacterial and human genes were expressed in *E. coli* (Fig 8). Collectively, these findings
408 indicate that the activity of the MAPEG2 proteins have been conserved, at least in part, during
409 evolution from (cyano)bacteria to human. In this context it is important to note that human MAPEG
410 proteins play a role in inflammation and fever [17,47] that should be fully investigated.

411 **4 Materials and Methods**

412 **4.1 Bacterial Strains, Growth and Stress assays**

413 *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) used for gene manipulation was grown on LB at 37°C.
414 Antibiotic selections were performed with ampicillin (Amp) 100 µg.mL⁻¹, kanamycine (Km) 50
415 µg.mL⁻¹ or both streptomycin (Sm) 25 µg.mL⁻¹ and spectinomycin (Sp) 75 µg.mL⁻¹.

416 *Synechocystis* PCC 6803 (*Synechocystis*) was grown at 30°C in liquid mineral medium (MM),
417 *i.e.* BG11 medium [48] enriched with 3.78 mM Na₂CO₃ [49], under continuous agitation (140 rpm)
418 and white light (2500 lux; 31.25 μE.m⁻².s⁻¹) at 30°C unless stated otherwise. Antibiotic selections
419 were performed with Km 50 μg.mL⁻¹ or both Sm 5 μg.mL⁻¹ and Sp 5 μg.mL⁻¹. For growth analysis
420 mid-exponential phase cultures (OD_{580nm} = 0.3 to 0.8) were adjusted to OD_{580nm} = 0.02 (5.10⁵
421 cells.mL⁻¹) and subsequently incubated in liquid MM containing (or not) the indicated agents, under
422 the indicated temperatures, prior to measuring OD₅₈₀ or photographing the flasks culture. For growth
423 analysis, or OD_{580nm} = 0.1 (2.5x10⁶ cells.mL⁻¹) for survival analysis, For survival analysis mid-
424 exponential phase cultures were adjusted to OD_{580nm} = 0.1 (2.5x10⁶ cells.mL⁻¹) before the indicated
425 challenges. Then cells were serially diluted in MM, spread on MM solidified with 1% agar (Difco)
426 and incubated during 5-7 days under standard conditions (2500 lux; 30°C) before counting.

427 **4.2 Construction of the DNA cassette for targeted deletion of the *sll1147* gene, and its** 428 **substitution by recombinant genes encoding other GSTs**

429 The two *Synechocystis* DNA regions (about 300 bp in length each) flanking the *sll1147*
430 protein coding sequence (CS) were independently amplified by PCR, using specific oligonucleotides
431 primers (S1 Table). Then, these two DNA regions were joined by standard PCR-driven overlap
432 extension [50] in a single DNA segment harboring a *Sma*I restriction site in place of the *sll1147* CS.
433 After cloning in pGEMt (Promega), the resulting plasmid pGEMT-ABsll1147 (S2 Table) was opened
434 at the unique *Sma*I site where we cloned the Km^r cassette (a *Hinc*II fragment of the commercial
435 pUC4K plasmid, Pharmacia) in the same orientation as the *sll1147* CS it replaced. The
436 Δ*sll1147*::Km^r cassette was transformed [28] to *Synechocystis* wild-type (WT) strain, generating the
437 Δ*sll1147*::Km^r deletion mutant. The Δ*sll1147*::Km^r deletion cassette was verified by PCR and
438 nucleotide sequencing (Mix2Seq Kit, Eurofins Genomics) before and after propagation in
439 *Synechocystis*.

440 We also cloned in the *SmaI* site of pGEMT-ABsll1147 various DNA cassettes that were
441 assembled using NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England BioLabs) from relevant
442 DNA sequences. These DNA cassette comprises (from 5' terminus to 3' end) the very active lambda
443 phage pR promoter and *cro* ribosome binding site [39] we routinely used for high-level gene
444 expression (see [51] and references therein). These pR promoter and *cro* RBS direct the expression of
445 the synthetic genes (adapted to the *Synechocystis* codon usage for efficient translation) encoding
446 either the human hmGST2 or hmGST3 proteins (Uniprot-ID: Q99735; O14880) or the *Synechocystis*
447 Sll0067 (Uniprot-ID: Q55139) protein. Each recombinant gene was followed by an antibiotic
448 resistant marker gene Km^r (originating from pUC4K, Pharmacia) or Sm^r/Sp^r (originating from our
449 pFC1 plasmid [39]). All DNA cassettes were verified by PCR and nucleotide sequencing (Mix2Seq
450 Kit, Eurofins Genomics) before and after propagation in *Synechocystis*. The $\Delta sll1147::Km^r$ deletion
451 mutant was used as the recipient strain for the transformation by the DNA cassettes required to test
452 the heterologous complementation by the human proteins hmGST2 and hmGST3. The $\Delta sll1147::pR-$
453 *sll0067-Km^r* cassette used to test the possible complementation by Sll0067 was transformed into the
454 $\Delta sll1147::pR-hmGST3-Sm^r/Sp^r$ mutant.

455 4.3 Cell culture and assay of the reduced (GSH) and oxidized (GSSG) forms of glutathione

456 All reagents were purchased from Sigma-Aldrich. Fifty milliliters of exponentially-growing
457 cultures were diluted two-fold down to OD₅₈₀ = 0.4, and incubated for various durations under white
458 light (2500 lux; ; 31.25 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) in the presence of the indicated agents. Cells were rapidly
459 collected by filtration on a 0.45 μm cellulose membrane (Millipore) under light; re-suspended in 1
460 mL of acidic extraction phosphate buffer (100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄; 1 mM EDTA; 5% (w/v) 5-
461 sulfosalicylic acid (SSA)); disrupted by a three freezing-thawing cycles in liquid nitrogen and hot
462 water bath, and strong mixing (Vibrax VXR, Ika) for 10 minutes at 4°C; prior to centrifugation
463 (14,000 rpm, 4°C, 5 min) to eliminate unbroken cells and membranes. Cell extracts were purified by

464 a 20 min centrifugation at 14,000 rpm at 4°C through a filter (Amicon Ultra – 0.5 mL 30K;
465 Millipore) to eliminate proteins larger than 30 kDa, and stored at -80°C until use. Before GSSG
466 assay, 100 µL of filtrate were treated with 2 µL of neat 2-vinylpyridine for 1 hour on ice to block
467 reduced glutathione (GSH) and then with 2 µL of four-fold diluted triethanolamine solution. For
468 assays, 10 µL untreated filtrate samples (total glutathione assay) and 20 µL treated samples (oxidized
469 GSSG assay) were loaded on a UV-compatible 96-well plate (Greiner bio-one). A first reaction
470 mixture containing yeast glutathione reductase (GR) at final concentration 1.25 U/mL in phosphate
471 buffer (100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer and 1 mM EDTA, pH 7.5) was prepared and distributed to
472 each well. A second reaction mixture containing 0.2 mM DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid))
473 and 0.3 mM NADPH in phosphate buffer was automatically added in each well by a microplate
474 reader (ClarioStar; BMG Labtech). The reaction was immediately followed by measuring for 1 min
475 at 30°C the absorption at 412 nm of the yellow TNB (5'-thio-2-nitrobenzoic acid) product [36].
476 Standard curves prepared with various concentrations of GSH or GSSG were used to calculate the
477 GSSG (oxidized) and total glutathione (GSSG + reduced GSH) using the *Synechocystis* cell volume
478 value of 1.2.10⁻¹¹ mL [52]. The GSH content was calculated by subtracting the GSSG content from
479 the total glutathione content.

480 **4.4 Estimation of the peroxidized lipids by TBARS assay**

481 The determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as a marker of lipid
482 peroxidation is based on the reaction of malondialdehyde (MDA) and thiobarbituric acid (TBA) in
483 acidic medium at high temperature [35]. All chemicals (butylated hydroxytoluene BHT,
484 malondialdehyde MDA and thiobarbituric acid TBA) were purchased from Sigma-Aldrich. 100 mL
485 of exponentially-growing cultures were diluted two-fold down to OD₅₈₀ = 0.5, and incubated under
486 white light (2500 lux) in the indicated conditions. Cells were rapidly collected by filtration as
487 described above and re-suspended in 1 mL of glacial acetic acid supplemented with 0.5 mM BHT

488 (butylated hydroxytoluene BHT) to prevent any further oxidation. MDA extraction was performed as
489 described above for the glutathione assay thanks to: (i) freeze-thaw cycle (liquid nitrogen-hot water),
490 (ii) strong mixing for 10 minutes at 4°C (Vibrax VXR, Ika) and (iii) centrifugation (14,000 rpm, 4°C,
491 5 min) to eliminate unbroken cells and membranes. Cells extracts containing MDA were then
492 purified by a 20 min centrifugation at 14,000 rpm at 4°C through a filter (Amicon Ultra – 0.5 mL
493 30K; Millipore) to eliminate proteins and avoid cross reaction. Filtrates were stored at -80°C until
494 assays in the presence of 100 µL of 4 mM TBA. The absorbance of this mixture was measured at 532
495 nm using the above-mentioned microplate reader prior to the formation of the MDA-TBA adducts
496 that begins at high temperature ($A_{532 \text{ nm before}}$). Then, the reaction mixture was heated at 50°C for 3
497 hours and subsequently cooled at room temperature. The absorbance at 532 nm was measured after
498 the reaction ($A_{532 \text{ nm after}}$) to determine $\Delta A_{532 \text{ nm}} = A_{532 \text{ nm after}} - A_{532 \text{ nm before}}$ as the absorbance only due
499 to MDA absorption at 532 nm. In parallel, MDA standard curve was prepared and used to calculate
500 the MDA content using the above-mentioned *Synechocystis* cell volume.

501 **5 Acknowledgments**

502 We thank Mathias Raguin for help in performing some glutathione assays.

503 **6 References**

- 504 1. Lu SC. GLUTATHIONE SYNTHESIS. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830: 3143–3153.
505 doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.008
- 506 2. Fahey RC. Glutathione analogs in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830: 3182–3198.
507 doi:10.1016/j.bbagen.2012.10.006
- 508 3. Yadav SK. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and
509 phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South Afr J Bot*. 2010;76: 167–179.
510 doi:10.1016/j.sajb.2009.10.007
- 511 4. Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, et al. Glutathione
512 in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ*. 2012;35: 454–484. doi:10.1111/j.1365-
513 3040.2011.02400.x

- 514 5. Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular
515 redox homoeostasis network. *Free Radic Biol Med.* 2016;95: 27–42.
516 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028
- 517 6. Marteyn B, Domain F, Legrain P, Chauvat F, Cassier-Chauvat C. The thioredoxin reductase-
518 glutaredoxins-ferredoxin crossroad pathway for selenate tolerance in *Synechocystis* PCC6803.
519 *Mol Microbiol.* 2009;71: 520–532. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06550.x
- 520 7. Naraimsamy K, Marteyn B, Sakr S, Cassier-Chauvat C, Chauvat F. Genomics of the Pleiotropic
521 Glutathione System in Cyanobacteria. *Advances in Botanical Research.* 2013. pp. 157–188.
522 doi:10.1016/B978-0-12-394313-2.00005-6
- 523 8. Oakley A. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab Rev.* 2011;43: 138–
524 151. doi:10.3109/03602532.2011.558093
- 525 9. Jakobsson PJ, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hutchinson A, Persson B. Membrane-associated
526 proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein
527 superfamily. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161: S20-24.
528 doi:10.1164/ajrccm.161.supplement_1.lta-5
- 529 10. Bresell A, Weinander R, Lundqvist G, Raza H, Shimoji M, Sun T-H, et al. Bioinformatic and
530 enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *FEBS J.* 2005;272: 1688–1703.
531 doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04596.x
- 532 11. Pearson WR. Phylogenies of Glutathione Transferase Families. In: Sies H, Packer L, editors.
533 *Methods in Enzymology.* Academic Press; 2005. pp. 186–204. doi:10.1016/S0076-
534 6879(05)01012-8
- 535 12. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent
536 enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830: 3217–3266. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.018
- 537 13. Jakobsson PJ, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hutchinson A, Persson B. Common structural
538 features of MAPEG -- a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly
539 divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci Publ Protein Soc.*
540 1999;8: 689–692. doi:10.1110/ps.8.3.689
- 541 14. Holm PJ, Morgenstern R, Hebert H. The 3-D structure of microsomal glutathione transferase 1
542 at 6 Å resolution as determined by electron crystallography of p22(1)2(1) crystals. *Biochim*
543 *Biophys Acta.* 2002;1594: 276–285.
- 544 15. Holm PJ, Bhakat P, Jegerschöld C, Gyobu N, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y, et al. Structural Basis
545 for Detoxification and Oxidative Stress Protection in Membranes. *J Mol Biol.* 2006;360: 934–
546 945. doi:10.1016/j.jmb.2006.05.056
- 547 16. Ago H, Kanaoka Y, Irikura D, Lam BK, Shimamura T, Austen KF, et al. Crystal structure of a
548 human membrane protein involved in cysteinyl leukotriene biosynthesis. *Nature.* 2007;448:
549 609–612. doi:10.1038/nature05936

- 550 17. Sjögren T, Nord J, Ek M, Johansson P, Liu G, Geschwindner S. Crystal structure of microsomal
551 prostaglandin E2 synthase provides insight into diversity in the MAPEG superfamily. *Proc Natl*
552 *Acad Sci U S A*. 2013;110: 3806–3811. doi:10.1073/pnas.1218504110
- 553 18. Hebert H, Schmidt-Krey I, Morgenstern R. The projection structure of microsomal glutathione
554 transferase. *EMBO J*. 1995;14: 3864–3869.
- 555 19. Ålander J, Lengqvist J, Holm PJ, Svensson R, Gerbaux P, van den Heuvel RHH, et al.
556 Microsomal glutathione transferase 1 exhibits one-third-of-the-sites-reactivity towards
557 glutathione. *Arch Biochem Biophys*. 2009;487: 42–48. doi:10.1016/j.abb.2009.04.009
- 558 20. Ahmad S, Thulasingham M, Palombo I, Daley DO, Johnson KA, Morgenstern R, et al. Trimeric
559 microsomal glutathione transferase 2 displays one third of the sites reactivity. *Biochim Biophys*
560 *Acta BBA - Proteins Proteomics*. 2015;1854: 1365–1371. doi:10.1016/j.bbapap.2015.06.003
- 561 21. Morgenstern R, Zhang J, Johansson K. Microsomal glutathione transferase 1: mechanism and
562 functional roles. *Drug Metab Rev*. 2011;43: 300–306. doi:10.3109/03602532.2011.558511
- 563 22. Johansson K, Järvliden J, Gogvadze V, Morgenstern R. Multiple roles of microsomal
564 glutathione transferase 1 in cellular protection: a mechanistic study. *Free Radic Biol Med*.
565 2010;49: 1638–1645. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.013
- 566 23. Mosialou E, Piemonte F, Andersson C, Vos RM, van Bladeren PJ, Morgenstern R. Microsomal
567 glutathione transferase: lipid-derived substrates and lipid dependence. *Arch Biochem Biophys*.
568 1995;320: 210–216.
- 569 24. Zhang Z, Lv Z, Shao Y, Qiu Q, Zhang W, Duan X, et al. Microsomal glutathione transferase 1
570 attenuated ROS-induced lipid peroxidation in *Apostichopus japonicus*. *Dev Comp Immunol*.
571 2017;73: 79–87. doi:10.1016/j.dci.2017.03.011
- 572 25. Archibald JM. The puzzle of plastid evolution. *Curr Biol CB*. 2009;19: R81-88.
573 doi:10.1016/j.cub.2008.11.067
- 574 26. William Schopf J. The paleobiological record of photosynthesis. *Photosynth Res*. 2011;107: 87–
575 101. doi:10.1007/s11120-010-9577-1
- 576 27. Cassier-Chauvat C, Chauvat F. Responses to Oxidative and Heavy Metal Stresses in
577 Cyanobacteria: Recent Advances. *Int J Mol Sci*. 2014;16: 871–886. doi:10.3390/ijms16010871
- 578 28. Labarre J, Chauvat F, Thuriaux P. Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic
579 resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J*
580 *Bacteriol*. 1989;171: 3449–3457.
- 581 29. Kammerscheit X, Chauvat F, Cassier-Chauvat C. First in vivo evidences that glutathione-S-
582 transferase operates in photo-oxidative stress in cyanobacteria. *Front Microbiol*. 2019;10.
583 doi:10.3389/fmicb.2019.01899
- 584 30. Imlay JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress:
585 lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11: 443–454.
586 doi:10.1038/nrmicro3032

- 587 31. Picciocchi A, Saguez C, Boussac A, Cassier-Chauvat C, Chauvat F. CGFS-type monothiol
588 glutaredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 and other evolutionary distant
589 model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry*. 2007;46: 15018–
590 15026. doi:10.1021/bi7013272
- 591 32. Michaut M, Kerrien S, Montecchi-Palazzi L, Chauvat F, Cassier-Chauvat C, Aude J-C, et al.
592 InteroPORC: automated inference of highly conserved protein interaction networks. *Bioinforma*
593 *Oxf Engl*. 2008;24: 1625–1631. doi:10.1093/bioinformatics/btn249
- 594 33. Marteyn B, Sakr S, Farci S, Bedhomme M, Chardonnet S, Decottignies P, et al. The
595 *Synechocystis* PCC6803 MerA-like enzyme operates in the reduction of both mercury and
596 uranium under the control of the glutaredoxin 1 enzyme. *J Bacteriol*. 2013;195: 4138–4145.
597 doi:10.1128/JB.00272-13
- 598 34. Andrade N, Silva C, Martel F. The effect of oxidative stress upon intestinal sugar transport: an
599 in vitro study using human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Toxicol Res*. 2018;7: 1236–1246.
600 doi:10.1039/C8TX00183A
- 601 35. Zeb A, Ullah F. A Simple Spectrophotometric Method for the Determination of Thiobarbituric
602 Acid Reactive Substances in Fried Fast Foods. *J Anal Methods Chem*. 2016;2016: 9412767.
603 doi:10.1155/2016/9412767
- 604 36. Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed
605 disulfides in biological samples. *Methods Enzymol*. 1981;77: 373–382.
- 606 37. Hasanuzzaman M, Nahar K, Anee TI, Fujita M. Glutathione in plants: biosynthesis and
607 physiological role in environmental stress tolerance. *Physiol Mol Biol Plants Int J Funct Plant*
608 *Biol*. 2017;23: 249–268. doi:10.1007/s12298-017-0422-2
- 609 38. Prasad A, Ferretti U, Sedlářová M, Pospíšil P. Singlet oxygen production in *Chlamydomonas*
610 *reinhardtii* under heat stress. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep20094
- 611 39. Mermet-Bouvier P, Chauvat F. A conditional expression vector for the cyanobacteria
612 *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942 and
613 PCC6301. *Curr Microbiol*. 1994;28: 145–148.
- 614 40. Björkhem-Bergman L, Johansson M, Morgenstern R, Rane A, Ekström L. Prenatal expression
615 of thioredoxin reductase 1 (TRXR1) and microsomal glutathione transferase 1 (MGST1) in
616 humans. *FEBS Open Bio*. 2014;4: 886–891. doi:10.1016/j.fob.2014.10.005
- 617 41. Nebert DW, Vasiliou V. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Hum*
618 *Genomics*. 2004;1: 460–464. doi:10.1186/1479-7364-1-6-460
- 619 42. Maksimov EG, Mironov KS, Trofimova MS, Nechaeva NL, Todorenko DA, Klementiev KE, et
620 al. Membrane fluidity controls redox-regulated cold stress responses in cyanobacteria.
621 *Photosynth Res*. 2017;133: 215–223. doi:10.1007/s11120-017-0337-3
- 622 43. Pittera J, Jouhet J, Breton S, Garczarek L, Partensky F, Maréchal É, et al. Thermoacclimation
623 and genome adaptation of the membrane lipidome in marine *Synechococcus*. *Environ*
624 *Microbiol*. 2018;20: 612–631. doi:10.1111/1462-2920.13985

- 625 44. Jones PR. Genetic Instability in Cyanobacteria – An Elephant in the Room? *Front Bioeng*
626 *Biotechnol.* 2014;2. doi:10.3389/fbioe.2014.00012
- 627 45. Cassier-Chauvat C, Veaudor T, Chauvat F. Comparative Genomics of DNA Recombination and
628 Repair in Cyanobacteria: Biotechnological Implications. *Front Microbiol.* 2016;7: 1809.
629 doi:10.3389/fmicb.2016.01809
- 630 46. Kitchener RL, Grunden AM. Methods for enhancing cyanobacterial stress tolerance to enable
631 improved production of biofuels and industrially relevant chemicals. *Appl Microbiol*
632 *Biotechnol.* 2018;102: 1617–1628. doi:10.1007/s00253-018-8755-5
- 633 47. Bankova LG, Lai J, Yoshimoto E, Boyce JA, Austen KF, Kanaoka Y, et al. Leukotriene E4
634 elicits respiratory epithelial cell mucin release through the G-protein–coupled receptor, GPR99.
635 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113: 6242–6247. doi:10.1073/pnas.1605957113
- 636 48. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. Generic Assignments, Strain
637 Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology.* 1979;111: 1–61.
638 doi:10.1099/00221287-111-1-1
- 639 49. Jittawuttipoka T, Planchon M, Spalla O, Benzerara K, Guyot F, Cassier-Chauvat C, et al.
640 Multidisciplinary evidences that *Synechocystis* PCC6803 exopolysaccharides operate in cell
641 sedimentation and protection against salt and metal stresses. *PloS One.* 2013;8: e55564.
642 doi:10.1371/journal.pone.0055564
- 643 50. Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat*
644 *Protoc.* 2007;2: 924–932. doi:10.1038/nprot.2007.132
- 645 51. Ortega-Ramos M, Jittawuttipoka T, Saenkham P, Czarnecka-Kwasiborski A, Bottin H, Cassier-
646 Chauvat C, et al. Engineering *Synechocystis* PCC6803 for hydrogen production: influence on
647 the tolerance to oxidative and sugar stresses. *PloS One.* 2014;9: e89372.
648 doi:10.1371/journal.pone.0089372
- 649 52. Mazouni K, Domain F, Cassier-Chauvat C, Chauvat F. Molecular analysis of the key
650 cytokinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE. *Mol Microbiol.* 2004;52:
651 1145–1158. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04042.x

652 **7 Supporting Information**

S1 Table. List of the PCR primers used in this study.

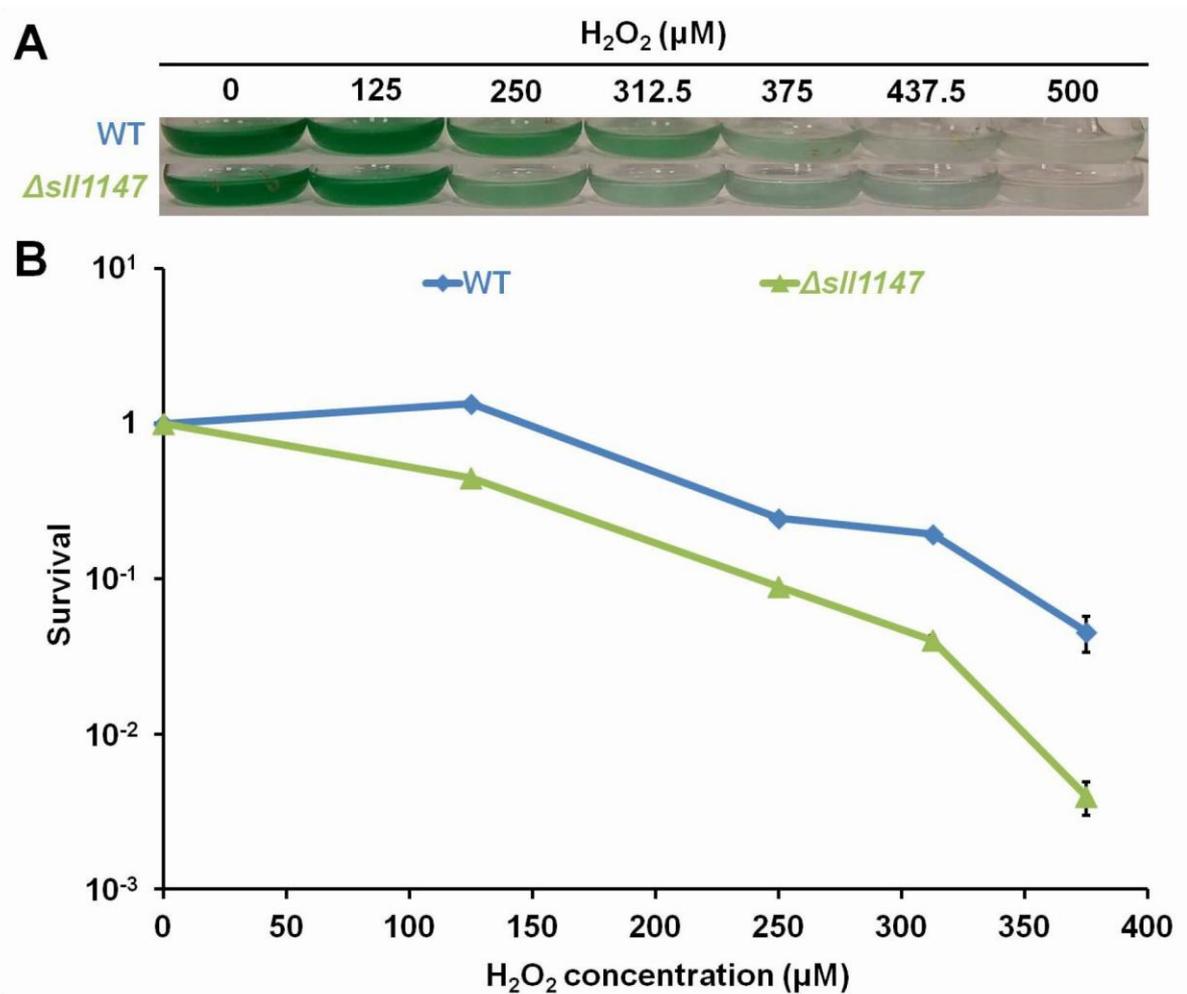
Amplification of the Km^r cassette		
KmHincII-FW	GGCGCTGAGGTCGACCTCGTGAAGAAG	Amplification of Km ^r cassette to be cloned as a <i>HincII</i> fragment
KmHincII-RV	ACCTGCAGGGGGTCGACGAAAGCCAC	
Amplification of the Km^r cassette		
KmFW	GGTGTATGAGCCATATTCAACGGG	Amplification of Km ^r cassette to check the chromosome segregation
KmRV	GGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTC	
Amplification of the Sm^r/Sp^r cassette		
Sm/Sp-FW	ATCTCGAACCGACGTTGCTG	Amplification of Sm ^r /Sp ^r cassette to check the chromosome segregation
Sm/Sp-RV	CCGACTACCTTGGTGATCTC	
Inactivation of <i>sll1147</i>		
L1147-FWa	CAGGATAGCGGCGGAAAT	Amplification of the <i>sll1147</i> downstream region and simultaneous introduction of a <i>SmaI</i> site
L1147-RVa	ACAGTTCCCGGGACTTTTTGTCATCGGTCATGGT	
L1147-FWb	AGTCCCGGGAAGTGTCCAGTTTTGAACA	Amplification of the <i>sll1147</i> upstream region and simultaneous introduction of a <i>SmaI</i> site
L1147-RVb	GTACAAAGGCATTTTGATGTG	
SLL1147-FW	GCAACTGCCAAAGGATGGACAGCAG	Amplification of a fragment of <i>sll1147</i> gene to check <i>sll1147</i> segregation
SLL1147-RV	GCTTTGGCGACGATGCTTACCTGG	
Construction of complementation cassette		
pR-A1147-FW	ACCATGACCGATGACAAAAAGTCCCACACCGTGCGTGTGAC	Amplification of the synthetic over-expressed <i>hmGST2</i> and <i>hmGST3</i> gene with DNA platform for DNA assembly
pR-hmGST2-Sm/Sp-RV	GGTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCTTAAAATTGCCGCCGCA	
pR-hmGST3-Sm/Sp-RV	GGTCTGGACCAGTTGCGTGAGCGCTTAATGACAACATTTGG	
Sm/Sp-FW	GCGCTCACGCAACTGGTCCA	Amplification of Sm ^r /Sp ^r cassette from pFC1 plasmid with DNA platform for DNA assembly
Sm/Sp-B1147-RV	TTTGTTCAAACTGGGACAGTTCCCCTCCCAATTTGTGTAGGGCT	
SLL0067-FW	ATGATCAAACCTATACGGTGC	Amplification of the <i>sll0067</i> gene
SLL0067-RV	TCAGCGGGCACCGATGGAAGC	
A1147-pR-pGEMt-FW	TCCCGGCCGCATGGCCGCGGGATTGAGGATAGCGGCGGAAATATAGGCC	Amplification of the upstream region of the <i>sll1147</i> gene with DNA platform for DNA assembly
A1147-pR-sll0067-RV	GGGGGACACCGTATAGTTTGATCATATGACCTCCTTAGTACATGCAACC	
Km-sll0067-FW	GCTTCCATCGGTGCCCGCTGAGGAAAGCCACGTTGTGTCTC	Amplification of Km ^r cassette with DNA platform for DNA assembly
Km-B1147-FW	CACAAAGTTTGTTCAAAACCTGGGACAGTTCCCAGCGCTGAGGTCTGCCTCG	
B1147-FW	GGGAAGTGTCCAGTTTTG	Amplification of the downstream region of the <i>sll1147</i> gene with DNA platform for DNA assembly
B1147-pGEMt-RV	CAGGCGGCCGCACTAGTGATTGTACAAAGGCATTTTGGATGTG	

Abbreviations: FW: forward; RV: reverse

S2 Table. Characteristics of the plasmids constructed in this study.

Plasmid	Relevant features	Reference
pGEMT	Amp ^r AT overhang cloning vector	Promega
pUC4K	Source of the Km ^r marker gene	Pharmacia
pFC1	Source of the Sm ^r /Sp ^r marker gene	*
pGEMT-ABs <i>sl1147</i>	pGEMT with the downstream and upstream flanking sequences of <i>sl1147</i> gene, where the most of the <i>sl1147</i> coding sequences (from the 24 th bp downstream of the ATG codon down to the 26 th bp upstream of the stop codon up) was replaced by a <i>Sma</i> I restriction site	This study
pGEMT-Δ <i>sl1147</i> ::Km ^r	pGEMT-ABs <i>sl1147</i> with the Km ^r marker inserted in the unique <i>Sma</i> I site	This study
pEX-p <i>RhmGST2</i>	pEX-A128 plasmid (Eurofins genomics) which contains the synthetic gene p <i>R-hmGST2</i> : acaccgtgcggtgTTGACTattttacctctggcgggtGATAATggttgcAtgtactaaggaggTCATATGGCCGGCA ATTCCATTTTGTGGCCGCCGTGCCATTTTGTCCGCCTGTCAACAATCCTATTTGCCTTGAAGTGGGCAAAG CCCGGTTGAAATATAAAGTGACCCCCCGCCGTACCGGCTCCCGCAATTTGAACGGGTGTTTCGGGCCAAC AAAATTGTGTGGAATTTTATCCCATTTTATTATTACCTTGTGGATGGCCGGCTGGTATTTAATCAAGTGTG CCACCTGTTGGGCTTGGTGTATATTTATGGCCGGCATTTGTATTTTGGGGCTATTCCGAAGCCGCAAAAAAC GGATTACCGGCTTTTCGGTTGTCTTGGGCATTTTGGCCTTGTGACCTTGTGGGCGCCTTGGGCATTGCCAATT CCTTTTGGATGAATATTTGGATTGAATATTGCCAAAAAATGCGGCGCAATTTTAA Corresponding protein sequence (Uniprot ID = Q99735): >MGST2_HUMAN Microsomal glutathione S-transferase 2 OS=Homo sapiens MAGNSILAAVSIILSACQQSYFALQVVKARLKYKVTTPAVTGSPEFERVFRQQNCVEFY PIFITLWMAGWYFNQVFATCLGLVYIYGRHLYFWGYSEAAKKRITGFRLSLGILALLTL LGALGIANSFLDEYLDLNIKKLRQF	This study
pEX-p <i>RhmGST3</i>	pEX-A128 plasmid (Eurofins genomics) which contains the synthetic gene p <i>R-hmGST3</i> : acaccgtgcggtgTTGACTattttacctctggcgggtGATAATggttgcAtgtactaaggaggTCATATGGCCGTGT TGTCAAAGAATATGGCTTTGTGTTGTGACCGGCGCCGCTCCTTTATATGGTGGCCCATTTGGCCATTAATG TGTCAAAGCCCGGAAAAAATAAAGTGGAATATCCCATATGATATCCACCGATCCCGAAAATGGCCATATTT TTAATTGTATTCAACGGGCCCATCAAATACCTTGAAGTGTATCCCCCTTTTTGTTTTTTTTGGCCGTGGGCG GCGTGTATCATCCCCGATTGCCCTCCGGCTTGGGCTTGGCTGGATTGTGGCCGGGTGTTGTATGCCATGGCT ATTATACCGGCGAACCTCCAAACGGTCCCGGGCGCCTTGGGCTCCATTGCCTTGTTGGGCTTGGTGGGCACCA CCGTGTGTTCCGCCTTTCAACATTTGGGCTGGGTGAAATCCGGCTTGGGCTCCGGCCCCAAATGTTGTCAATTA	This study
	Corresponding protein sequence (Uniprot ID = O14880): >MGST3_HUMAN Microsomal glutathione S-transferase 3 OS=Homo sapiens MAVLSKEYGFVLLTGAASFIMVAHLAINVSKARKKYKVEYPIMYSTDPENGHIFNCIQRA HQNTLEVYPPFLFLLAVGGVYHPRIASGLGLAWIVGRVLYAYGYTGEPSKRSRGALGSI ALLGLVGTTCVCSAFQHLGWKSGLGSGPKCCH	
	p <i>R</i> promoter showing the -35 box (TTGACT), the -10 box (GATAAT) and the transcription start site (A) and the Shine d'Algaro (ribosome bind site; aaggagg) sequence originating from the <i>cro</i> gene of lambda phage is fused at the <i>Nde</i> I restriction site (CATATG) with the coding sequence of mGST2 or mGST3 adapted to <i>Synechocystis</i> codon usage.	
pGEMT-Δ <i>sl1147</i> ::p <i>R-sl10067</i> -Km ^r	pGEMT-ABs <i>sl1147</i> with the synthetic gene p <i>Rsl10067</i> and the Km ^r marker	This study
pGEMT-Δ <i>sl1147</i> ::p <i>R-mGST2</i> -Sm ^r /Sp ^r	pGEMT-ABs <i>sl1147</i> with the synthetic gene p <i>RmGST2</i> and the Sm ^r /Sp ^r marker	This study
pGEMT-Δ <i>sl1147</i> ::p <i>R-mGST3</i> -Sm ^r /Sp ^r	pGEMT-ABs <i>sl1147</i> with the synthetic gene p <i>RmGST3</i> and the Sm ^r /Sp ^r marker	This study

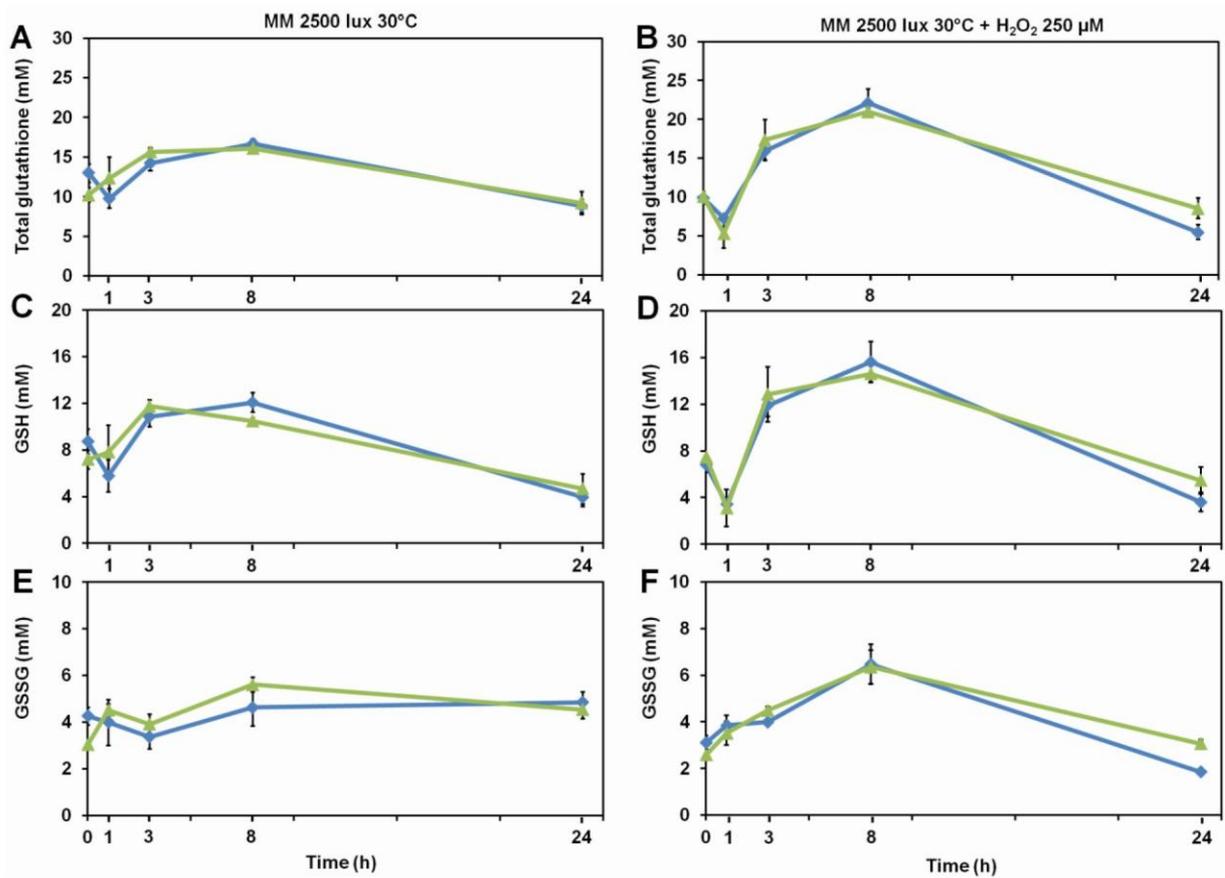
*(Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994)



656

S1 Figure. The $\Delta sll1147$ mutant is slightly sensitive to hydrogen peroxide.

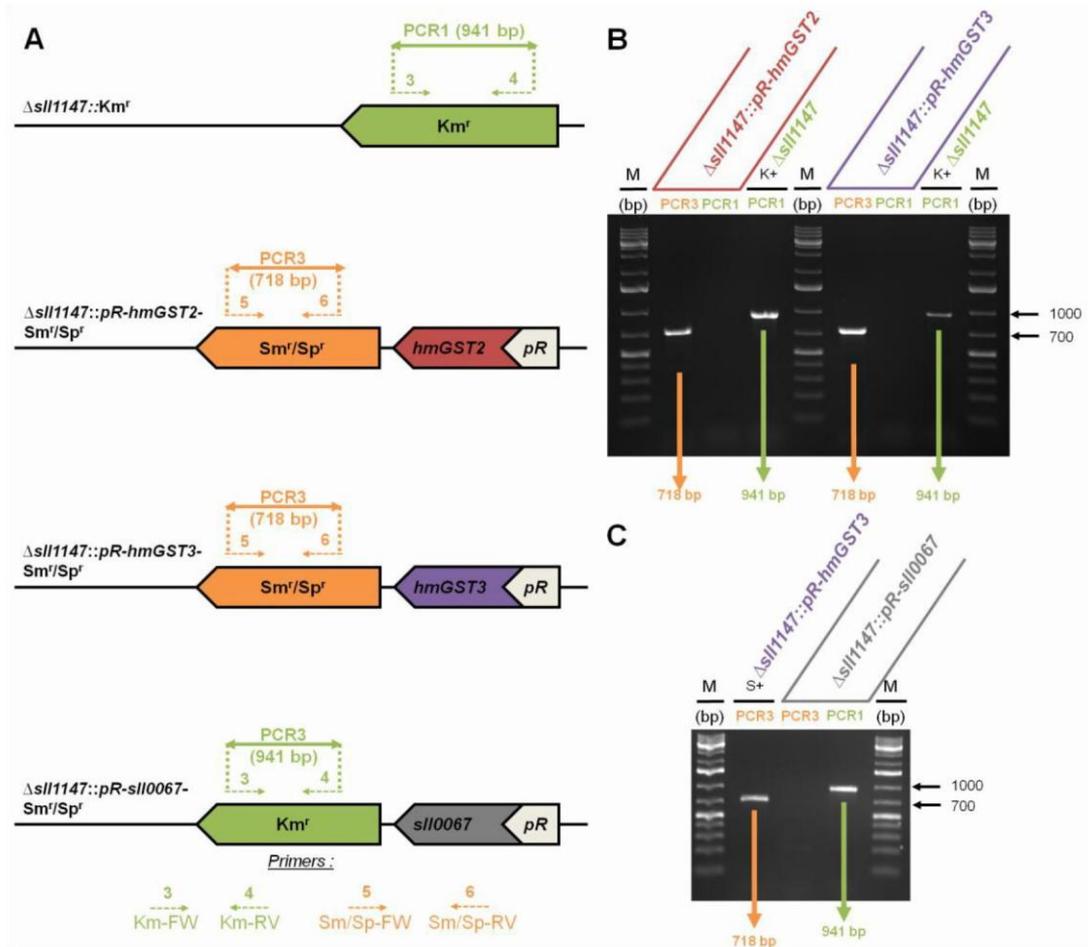
657
 658 (A) Ten milliliters of mid-log-phase cultures (initial $OD_{580\text{ nm}} = 0.1$) were incubated in liquid MM
 659 with or without the indicated concentrations of H_2O_2 for 72h under 2500 lux at 30°C prior to
 660 photography culture flasks. (B) Typical survival of the WT and mutant exposed for 72h to various
 661 H_2O_2 concentrations. Data shown in (B) are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) (n=3).



662

663 **S2 Figure. In response to H₂O₂, $\Delta sl1147$ and wild-type cells displayed very similar changes of**
 664 **glutathione abundance.**

665 Kinetic analysis of the influence of H₂O₂ on the abundance of total glutathione (A-B), GSH (C-D)
 666 and GSSG (E-F) in *Synechocystis* WT and mutant $\Delta sl1147$. Data are expressed as the mean +/- SD
 667 (n=3) and * indicates significant difference between mutant and WT (*t*-test, *P*< 0.05).



668

669 **S3 Figure. Verification that the *sll1147*-complementation DNA cassette are properly integrated**
 670 **in the $\Delta sll1147::Km^r$ chromosome locus.**

671 (A) Schematic representation of the *sll1147* chromosome loci in the $\Delta sll1147::Km^r$ mutant before or
 672 after transformation with the gene complementation DNA cassettes $\Delta sll1147::pR-hmGST2-Sm^r/Sp^r$
 673 or $\Delta sll1147::pR-hmGST3-Sm^r/Sp^r$ or $\Delta sll1147::pR-sll0067-Km^r$ required to test the ability of the
 674 recombinant genes $pR-hmGST2-Sm^r/Sp^r$, $pR-hmGST3-Sm^r/Sp^r$ and $pR-sll0067-Km^r$ expressed from the
 675 strong *pR* promoter [39] to restore the stress tolerance of the $\Delta sll1147::Km^r$ mutant back to the
 676 WT level. The $pR-hmGST2-Sm^r/Sp^r$, $pR-hmGST3-Sm^r/Sp^r$ cassettes were introduced directly in the
 677 $\Delta sll1147::Km^r$ mutant, whereas the $pR-sll0067-Km^r$ cassette was introduced in the $pR-hmGST3-$
 678 Sm^r/Sp^r mutant. The genes are represented by colored arrows (Km^r : green; Sm^r/Sp^r : orange;
 679 *hmGST2*: red; *hmGST3*: purple; *sll0067*: grey) that point into the direction of their transcription. The
 680 same color code is used to represent the PCR primers (dotted arrows, See S1 Table for their
 681 sequence) and the corresponding PCR products (double arrows) typical of the chromosome of the
 682 mutants generated in this study $\Delta sll1147::Km^r$ or $\Delta sll1147::pR-hmGST2-Sm^r/Sp^r$ or $\Delta sll1147::pR-$
 683 $hmGST3-Sm^r/Sp^r$ or $\Delta sll1147::pR-sll0067-Km^r$. (B and C) Typical UV-light image of the agarose gel
 684 showing the PCR products corresponding to the antibiotic resistant markers Km^r (PCR1: green),
 685 Sm^r/Sp^r (PCR3: orange) generated, or not (negative controls), from the mutants $\Delta sll1147::Km^r$,
 686 $\Delta sll1147::pR-hmGST2-Sm^r/Sp^r$, $\Delta sll1147::pR-hmGST3-Sm^r/Sp^r$ and $\Delta sll1147::pR-sll0067-Sm^r/Sp^r$
 687 cells. M (marker DNA) indicates the GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Note
 688 that all mutants are fully segregated and harbor only one type of chromosome copies.

39

III – La GST SII0067 : un nouvel acteur de la détoxification du méthylglyoxal

A. Résumé de l'article

Bien que présenté en 3^{ème} position, l'étude du rôle de la GST SII0067 est très intéressante et aussi aboutie que celle que nous avons réalisée pour SII1545/Slr0236 et SII1147. En effet, le phénotype le plus frappant que nous avons pu observer est la sensibilité du mutant $\Delta sII0067$ au méthylglyoxal (MG). Cette observation nous a grandement stimulé et ce pour plusieurs raisons.

La première répond parfaitement à notre objectif d'étudier la sélectivité des GST, puisque parmi tous les mutants de délétion construits, seul le mutant $\Delta sII0067$ présente ce phénotype de sensibilité au MG.

La seconde est qu'à notre connaissance, il s'agissait là de la première démonstration expérimentale indiquant un lien entre une GST et le MG. Pour le comprendre, il faut revenir quelques instants sur le MG.

C'est un oxoaldéhyde (mettre une petite figure de sa formule et de tous ses petits noms) donc une molécule très réactive et toxique issue majoritairement du catabolisme des sucres mais également du métabolisme des acides aminés (comme la thréonine) et des lipides. Ce métabolite est considéré comme source de stress métabolique et oxydant car il provoque la glycation et la carbonylation des protéines (en réagissant avec les résidus lysines, arginines et cystéines des protéines) provoquant leurs agrégations engendrant inévitablement des pertes de fonction pouvant conduire à la mort cellulaire. Le MG est d'ailleurs trouvé dans de nombreuses pathologies humaines (diabète, maladie d'Alzheimer, cancer...) et chez tous les organismes vivants (mammifères, plantes, cyanobactéries...). Sa détoxification est donc cruciale et repose sur plusieurs voies dont la principale est celle des glyoxalases dans laquelle : (i) le MG est tout d'abord conjugué de façon spontanée au glutathion (GSH) sans recours à une enzyme, (ii) le conjugué formé est ensuite converti en S-D-lactoylglutathion par la glyoxalase I et (iii) converti de nouveau en D-lactate par la glyoxalase II.

Puisque les GST sont connues et définies comme étant des enzymes capables de conjuguer le GSH sur un électrophile. Nous avons émis l'hypothèse que la GST SII0067 de *Synechocystis* puisse conjuguer le GSH sur le MG. De plus cela semblait plus cohérent qu'une étape uniquement non enzymatique pour un processus de détoxification décrit comme si crucial dans le règne du vivant.

Le manuscrit que je présente ici, expose donc la double stratégie d'analyse *in vivo* de la sensibilité et de la réponse au MG du mutant de délétion $\Delta sII0067$ et avec celle menée *in vitro* sur l'activité catalytique de conjugaison de la protéine recombinante SII0067 sur le MG en présence de GSH, grâce à la collaboration avec l'équipe de Nicolas Rouhier et Arnaud Hecker (Interactions Arbres – Microorganismes, INRA, Université de Lorraine, UMR1136, Vandoeuvre-lès-Nancy, France). Cette stratégie nous a permis de montrer que la sensibilité au MG du mutant $\Delta sII0067$ était corrélée à une forte accumulation en MG intracellulaire. Nous avons également montré que cette accumulation s'accompagne d'une augmentation transitoire particulièrement importante et élevée (jusqu'à 40 mM) en glutathion réduit (GSH). Aucune différence entre la souche WT et le mutant $\Delta sII0067$ n'a été observée pour le glutathion oxydé (GSSG). Ces résultats sont donc compatibles avec l'hypothèse du rôle de SII0067 dans la

conjugaison du MG au GSH, son absence entraînant de ce fait une accumulation en MG et en GSH (mais pas en GSSG, cette molécule n'intervenant pas dans la détoxification du MG par le voie des glyoxalases).

Pour démontrer l'accumulation du MG dans les cellules, nous avons mis en place, pour la première fois dans des extraits acellulaires, un dosage du MG par une méthode fluorimétrique basée sur de précédents travaux. Nous avons choisi d'utiliser un mutant dépourvu de GSH (le mutant $\Delta gshB$, dépourvu de la glutathion synthase) et un mutant de la methylglyoxal synthase (Δmgs) ne synthétisant plus de MG à partir du dihydroxyacétone phosphate (DHAP) (voir le schéma de la figure 1 du manuscrit en cours de rédaction) pour valider sur le plan biologique notre technique de dosage. Nous avons, comme attendu, observé une très forte accumulation en MG chez le mutant $\Delta gshB$ et une très faible chez les mutant Δmgs .

Cette validation nous a semblé plus que nécessaire puisque l'analyse *in vitro* de l'activité catalytique de conjugaison de la protéine recombinante SII0067 sur le MG en présence de GSH a également nécessité l'utilisation de ce dosage. Par une analyse cinétique à 2 substrats, nous avons pu montrer la consommation concomitante du GSH et du MG par la GST recombinante SII0067 (produite par le laboratoire de Nancy). L'activité de conjugaison au CDNB de la GST recombinante SII0067 semble inhibée compétitivement par le MG, indiquant que le MG est potentiellement lui aussi conjugué au GSH. Nous avons confirmé cette hypothèse en déterminant les paramètres cinétiques de l'enzyme et établissant le comportement michalien de l'enzyme pour le GSH et allostérique pour le MG. Ainsi, nos résultats indiquent que la fixation du MG est coopérative et augmente l'affinité de l'enzyme pour le GSH dans un mécanisme catalytique séquentiel Bi Uni. Enfin, le produit supposé de la réaction étant l'hémithioacétal, un composé non disponible sur le marché et difficilement isolable, nous avons étudié l'influence du S-D-lactoylglutathion (un intermédiaire de la voie de détoxification du MG) sur la catalyse enzymatique de SII0067. De cette façon, nous avons démontré que le S-D-lactoylglutathion est un activateur de l'enzyme.

Collectivement ces données indiquent clairement que la GST SII0067 provenant de la cyanobactérie *Synechocystis* est un nouvel acteur de la détoxification du MG en catalysant la conjugaison du GSH au MG, étape pourtant décrite comme étant non-enzymatique.

B. *Format de l'article*

Nature/Etat de manuscrit : **Manuscrit en cours de rédaction** (Draft manuscript)

Version/Format : **Document de travail**

Journal/Revue cible : **Indéterminé**

C. *Manuscrit n°3*

Methylglyoxal detoxification revisited: role of a cyanobacterial glutathione-S-transferase

Xavier Kammerscheit¹, Arnaud Hecker^{2,3}, Nicolas Rouhier^{2,3}, Franck Chauvat¹, Corinne Cassier-Chauvat¹

¹Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

²Interactions Arbres – Microorganismes, Université de Lorraine, UMR1136, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

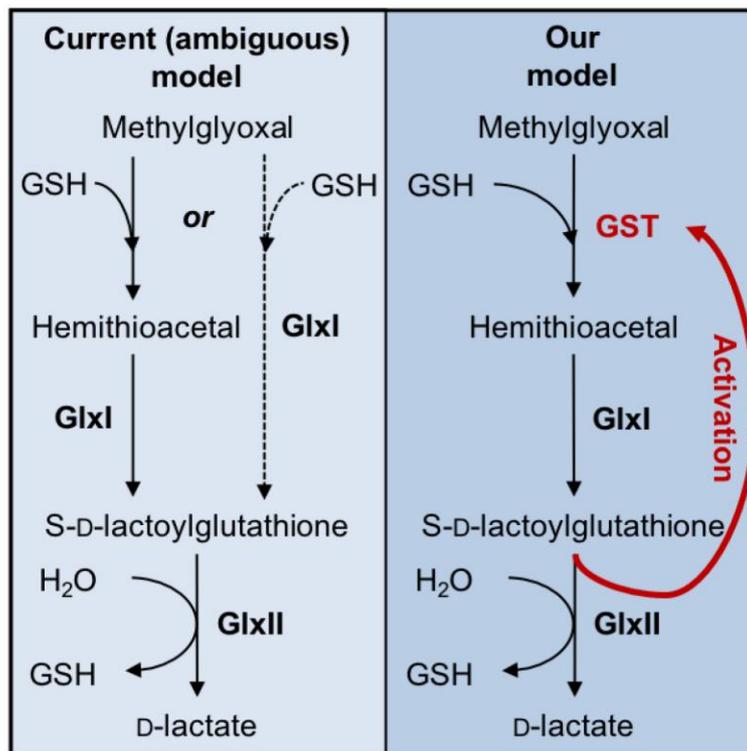
³INRA, Interactions Arbres – Microorganismes, UMR1136, Champenoux, France

* **Correspondence:**

Corinne Cassier-Chauvat

corinne.cassier-chauvat@cea.fr

Graphical abstract



12

13 1 Introduction

14 MG is considered as the most dangerous dicarbonyl compound due to its high rate of
15 endogenous flux inside our human body. The strong interaction of MG with active functional
16 arginine groups in the proteins (whereas glucose reacts with lysine groups) influences its highly
17 reactive nature during the glycolysis process. MG, which is much more reactive than glucose, is a
18 predominant precursor of advanced glycation end products (AGEs) (Naraimsamy et al., 2013), which
19 result in protein dysfunction, glycation of vascular tissues and aging (Xue et al., 2011), metabolic
20 disorders like oxidative stress, cancer, particularly colon cancer, cardiovascular disorders, diabetes-
21 related retinopathy, nephropathy, neuropathy, angiopathy, Parkinson's (Naraimsamy et al., 2013;
22 Allaman et al., 2015; Lee and Park, 2017) and Alzheimer's disease (Naraimsamy et al., 2013;
23 Allaman et al., 2015) and hypertension. Glucose is considered as the most iconic biomarker for
24 diabetes detection, and fluctuations in its levels are related to different stages of DM (Diabetes
25 Mellitus). In fact, MG has dual nature depending on its concentrations in cells; provoking detrimental
26 effects at high concentrations, while acting in signaling at low concentrations (Mostofa et al., 2018;
27 Ramachandra Bhat et al., 2019).

28 MG is increasingly regarded as a diabetes marker since it plays a significant role in biological
29 processes. In plants, it has recently been demonstrated that MG could play signaling roles *via* Ca^{2+} ,
30 reactive oxygen species (ROS), K^+ and abscisic acid (Mostofa et al., 2018). A deeper understanding
31 of the role of MG (and other signaling compounds, including reactive oxygen species (ROS) in signal
32 transduction mechanisms under stress may provide the foundation in developing stress-resilient
33 plants for coping with rapidly changing environments (Mostofa et al., 2018). MG can be measured
34 directly through the reaction with derivatization agents. Derivatization process is mostly performed
35 under acidic conditions to avoid spontaneous production of MG from G3P and DHAP (Mostofa et
36 al., 2018).

37 The major route of MG production involves non-enzymatic (spontaneous) breakdown of
38 triose phosphate isomers dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and glyceraldehyde-3- phosphate
39 (GAP) (Lee and Park, 2017), which are prone to rapid loss of α -carbonyl protons (at physiological
40 pH), resulting in the formation of enediolate phosphates. These unstable enediolate intermediates
41 undergo β - elimination of the phosphate groups, leading to the formation of MG. The auto-oxidation
42 of ketone bodies and sugars, the Maillard reaction between reducing sugars and amino acids, and
43 lipid peroxidation also contribute to non-enzymatic formation of MG. MG is also produced through
44 enzymatic pathways involving three enzymes, namely monoamine oxidase (MAO), cytochrome P450
45 (CP450) and MG synthase (MGS), which act on substrates derived from amino acids, fatty acids and
46 glucose metabolism, respectively. MAO catalyzes the formation of MG from aminoacetone, a
47 product obtained from the metabolism of either glycine or threonine. CP450 converts fatty acid-
48 derived acetone to MG via acetol using NADPH as cofactor. The MG synthase protein (MGS)
49 catalyzes the elimination of an inorganic phosphate from the glycolytic intermediate DHAP to release
50 MG (Mostofa et al., 2018).

51 MG is mainly degraded by the GSH-dependent glyoxalase pathway, which has two
52 consecutive reactions catalyzed by glyoxalase I (*S*-D-lactoylglutathione lyase; EC 4.4.1.5) and
53 glyoxalase II (*S*-2-hydroxyacylglutathione hydrolase; EC 3.1.2.6). The first step of MG
54 detoxification involves a spontaneous (non-enzymatic) reaction between MG and GSH to form hemi-

55 thioacetal (HTA), which is then isomerized to S- D-lactoylglutathione (SLG) by glyoxalase I. In the
56 second step, glyoxalase II hydrolyzes SLG to release D-lactate by recycling one GSH molecule into
57 the system. Another enzymatic reaction is oxidation of MG to pyruvate through methylglyoxal
58 dehydrogenase with NAD^+ as a cofactor and aldehyde dehydrogenases. These enzymes
59 independently oxidize MG irrespective of the GLO system. The reductase like α -dicarbonyl/L-
60 xylulose reductase and MG reductase reduces MG to lactaldehyde (Ramachandra Bhat et al., 2019).

61 A wealth of studies on MG metabolism and glyoxalase I-II system (hereafter Glx) have been
62 carried out in animal system (Ramachandra Bhat et al., 2019), whereas not much attention has been
63 paid so far on these aspects in the plant system (Mostofa et al., 2018). In photosynthetic organisms,
64 MG is also inevitably produced by the photosynthetic assimilation of atmospheric CO_2 , especially
65 under high light. Hence, phototrophs are exposed to higher levels of sugar-toxicity than heterotrophs
66 (Shimakawa et al., 2013, 2014; Mostofa et al., 2018). This may explain why plant genomes possess
67 multiple *glxI* and *glxII* genes (10 *glxI* and 5 *glxII* in *Arabidopsis thaliana*; 11 *glxI* and 3 *glxII* in
68 *Oryza sativa* (Mostofa et al., 2018) while human and *Escherichia coli* possess only one *glxI* and one
69 *glxII* genes (Kaur et al., 2017).

70 In cyanobacteria, the photosynthetic prokaryotes that colonize our planet and produce a large
71 part of the biomass for the food chain (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2018), MG-production and
72 signaling/detoxification systems may be even more vital because the two important sources of ROS
73 photosynthesis (fixation of CO_2 and gluconeogenesis) and respiration (glucose catabolism) occur in
74 the same compartment (i.e. the cytosol) (Shimakawa et al., 2014). Furthermore, cyanobacteria are
75 regarded as the inventor of the oxygenic photosynthesis (Archibald, 2009; William Schopf, 2011)
76 and of GSH and GSH-dependent enzymes, such as the glutathione-S-transferases to protect
77 themselves against the reactive oxygen species (ROS) they (often) produce when their active
78 photosynthesis is altered by stresses (light, temperature, etc) (William Schopf, 2011). In the frame of
79 our long-term interest in stress responses in cyanobacteria (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014) we
80 have undertaken the first (to our knowledge) *in vivo* analysis of the role (redundancy/selectivity) of
81 six the GST proteins of the well-studied model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803
82 (hereafter *Synechocystis*) (Kammerscheit et al., 2019). We presently report that the *Synechocystis*
83 GST designated as SII0067 in CyanoBase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>) plays a
84 prominent role in the protection against MG in catalyzing the reaction between MG and GSH that
85 likely generate the hemi-thioacetal intermediate IN MG detoxification, a reaction usually described
86 as spontaneous (non-enzymatic). This finding will undoubtedly stimulate research on MG signaling
87 and detoxification in higher eukaryotes as animals and human (with probable influence on
88 identification of biomarkers and drugs); plants (with probable influence on agriculture) and
89 cyanobacteria (with probable influence on the production of lactate (Hirokawa et al., 2017) and other
90 carbon-based chemicals).

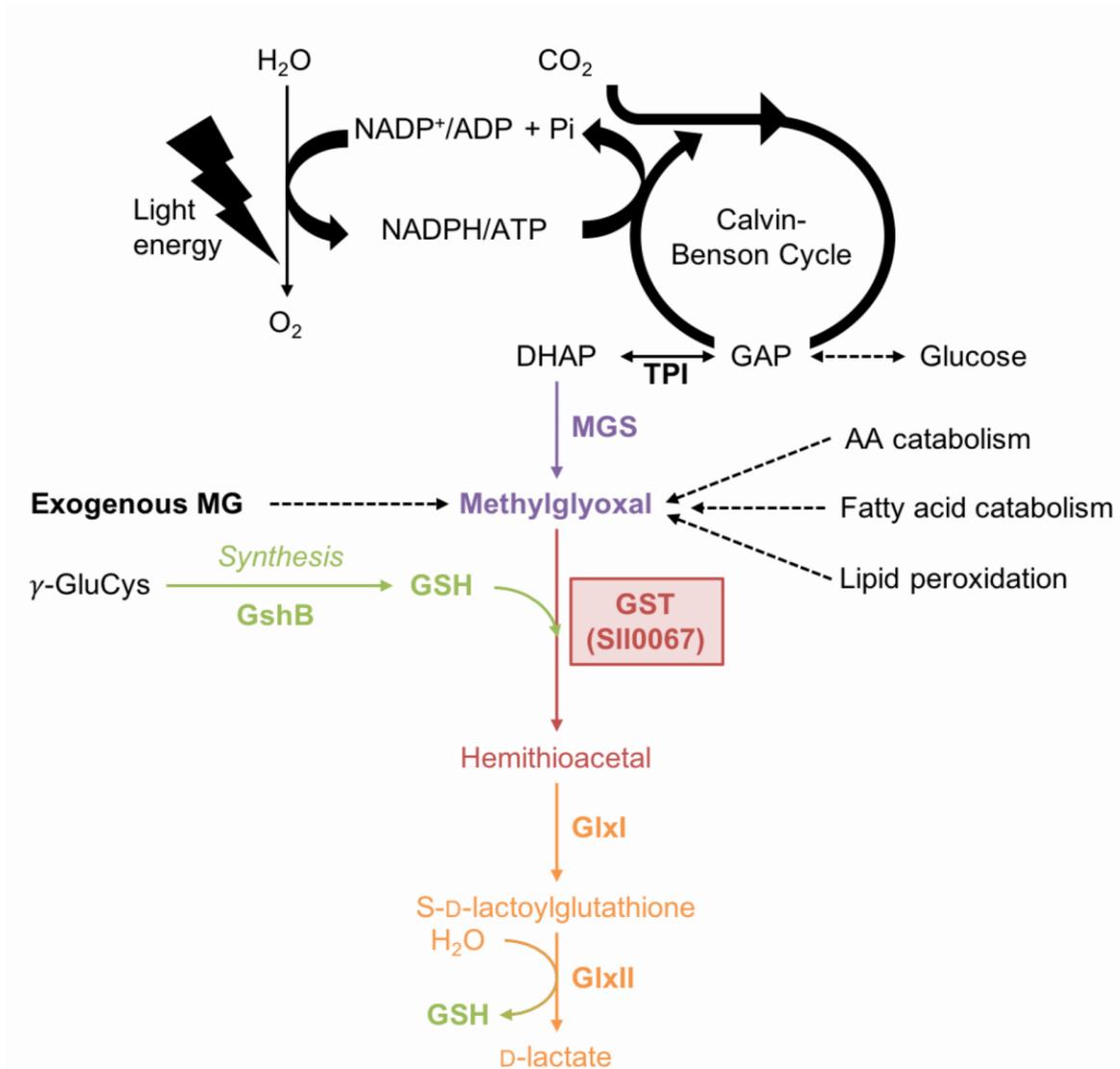


Figure 1. Schematic representation of the synthesis and GSH-dependent detoxification of methylglyoxal.

91
 92
 93
 94 In photosynthetic organisms, MG is inevitably produced from the photosynthetic assimilation of CO₂
 95 and glycolysis that both generate the triose phosphate isomers glyceraldehyde-3- phosphate (GAP)
 96 and dihydroxyacetone phosphate (DHAP), which generates MG spontaneously or through the MG
 97 synthase (MGS) enzyme. MG is also produced by the auto-oxidation of ketone bodies and sugars, the
 98 Maillard reaction between reducing sugars and amino acids, and by lipid peroxidation, as well as by
 99 the enzymes, namely monoamine oxidase (MAO) and cytochrome P450 (CP450). MAO catalyzes
 100 the formation of MG from aminoacetone, a product obtained from the metabolism of either glycine
 101 or threonine, while CP450 converts fatty acid-derived acetone to MG via acetol using NADPH as
 102 cofactor (Amino-acids (AA), fatty acid catabolism and lipid peroxidation). MG can be detoxified by
 103 the GSH-dependent glyoxalase pathway catalyzed by glyoxalase I and glyoxalase II. The first step,
 104 always presented as spontaneous, involves the reaction between MG and GSH to form the hemi-
 105 thioacetal (HTA) isomers. Then, both HTA isomers are isomerized to S-D-lactoylglutathione (SLG)
 106 by glyoxalase I, and SDL is hydrolyzed by glyoxalase II to release GSH and D-lactate.

107 2 Results

108 2.1 The *sll0067* gene is dispensable for the photoautotrophic growth of *Synechocystis*.

109 To analyze *in vivo* the role of the Sll0067 (protein ID in CyanoBase;
110 <http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>), we constructed the corresponding single deletion mutant of
111 the *sll0067* gene, using the standard gene replacement procedure. The full protein-coding sequence of
112 *sll0067* was replaced with a transcription-terminator-less kanamycin resistance gene (Km^r) for
113 selection, while preserving the 300 bp of *sll0067* flanking DNA regions for homologous
114 recombination that mediate targeted gene replacement upon transformation to *Synechocystis* (Labarre
115 et al., 1989). The resulting deletion cassette propagated on an *E. coli* plasmid (Table S1) was
116 introduced in *Synechocystis* by transformation (Labarre et al., 1989). A few Km^r transformants were
117 selected and analyzed by PCR with specific oligonucleotide primers (Table S2, Figure S1) to check
118 that the Km^r marker gene had properly replaced *sll0067* in the *Synechocystis* chromosome, which is
119 polyploid (it occurs at about ten copies per cell (Labarre et al., 1989)). Then, we assayed whether the
120 segregation of WT and mutant (Km^r) chromosome copies was complete (the gene is dispensable to
121 cell growth) or not (the gene is essential to cell viability).

122 All $\Delta sll0067::Km^r$ transformants possessed only $\Delta sll0067::Km^r$ chromosomes (Figure S1B, see
123 the presence of a 941 bp PCR product characteristic of $\Delta sll0067::Km^r$ chromosomes and the absence
124 of a 187 bp PCR band typical of WT (*sll0067*⁺) chromosomes). The absence of WT chromosomes in
125 the $\Delta sll0067::Km^r$ mutant was confirmed by growing it for multiple generations in absence of Km to
126 stop counter-selecting WT chromosomes (*sll0067*⁺, i.e. Km^s). Again, these $\Delta sll0067::Km^r$ cells
127 possessed only $\Delta sll0067::Km^r$ chromosomes, showing that *sll0067* is dispensable for the standard
128 photoautotrophic growth of *Synechocystis*. For the sake of simplicity, the $\Delta sll0067::Km^r$ mutant is
129 designated as $\Delta sll0067$.

130 2.2 The lack of Sll0067 GST confers a MG-sensitive phenotype

131 We have analyzed the influence of various stresses on the growth (Figure 2A and C) and
132 survival (Figure 2B) of the $\Delta sll0067$ mutant, and found that it grows as healthy as the WT strain in
133 standard photoautotrophic conditions (Figure 2) whereas it is more sensitive to exogenous
134 methylglyoxal (MG) than the WT strain (Figure 3). The fitness of the $\Delta sll0067$ mutant was also
135 impaired by exogenous glycerol (Figure S2), in agreement with a previous report showing that the
136 intracellular MG concentration of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7002 increases (from 0.1
137 to 0.6 μ M) in response to glycerol (Xu et al., 2006).

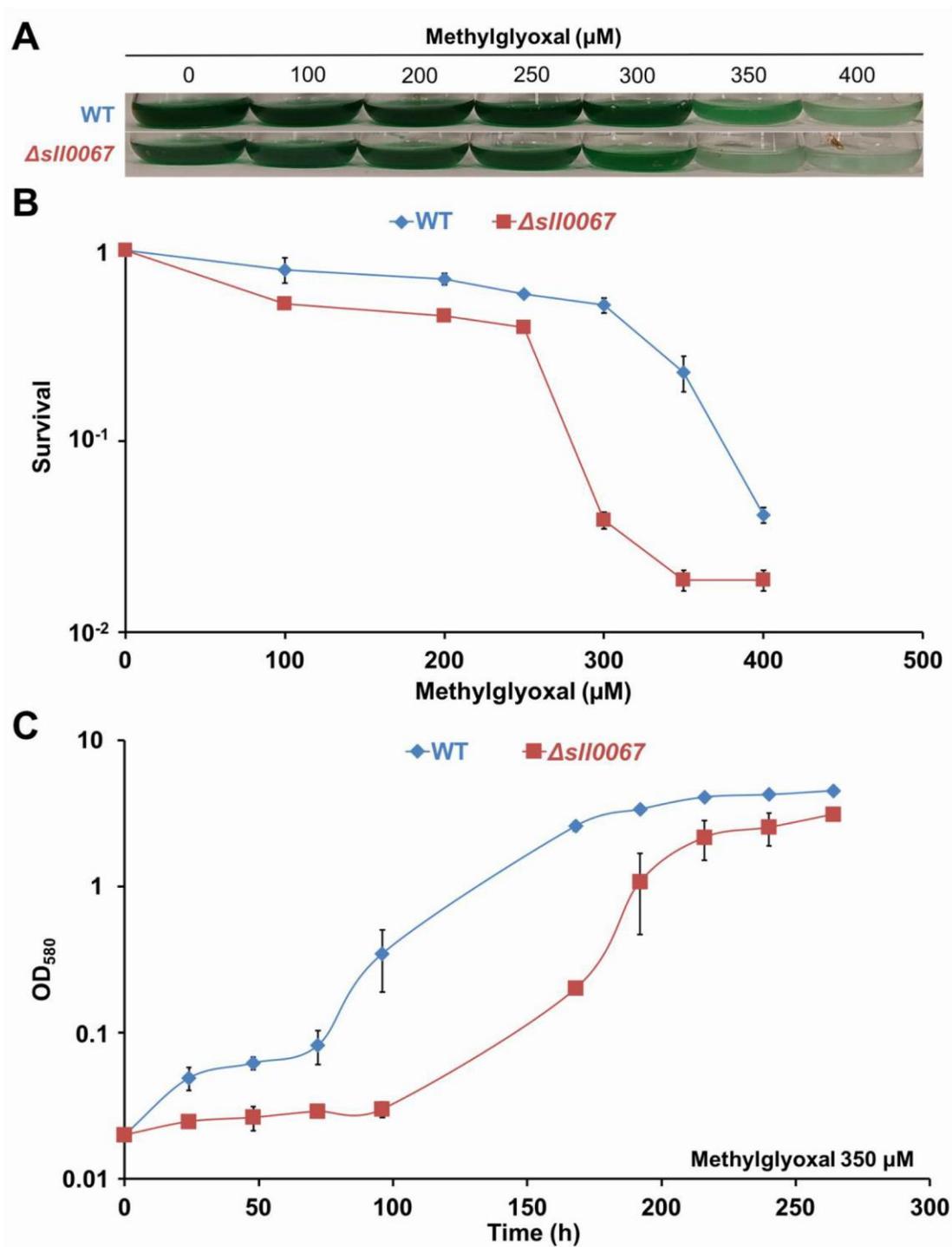


Figure 2. The $\Delta\text{sll0067}$ mutant is sensitive to methylglyoxal.

138
139

140 (A) Ten milliliters of mid-log-phase cultures (initial $\text{OD}_{580 \text{ nm}} = 0.1$) were incubated for 72h in liquid
 141 MM in standard photoautotrophic conditions with or without the indicated concentrations of MG,
 142 priori to photography. (B) Typical survival of the WT and $\Delta\text{sll0067}$ mutant exposed for 72h to
 143 various MG concentrations. (C) Typical growth curve of the WT and $\Delta\text{sll0067}$ mutant incubated in
 144 liquid MM containing 350 μM MG. Data shown in (B) and (C) are expressed as the mean \pm
 145 standard deviation (SD) of three experiments ($n=3$).

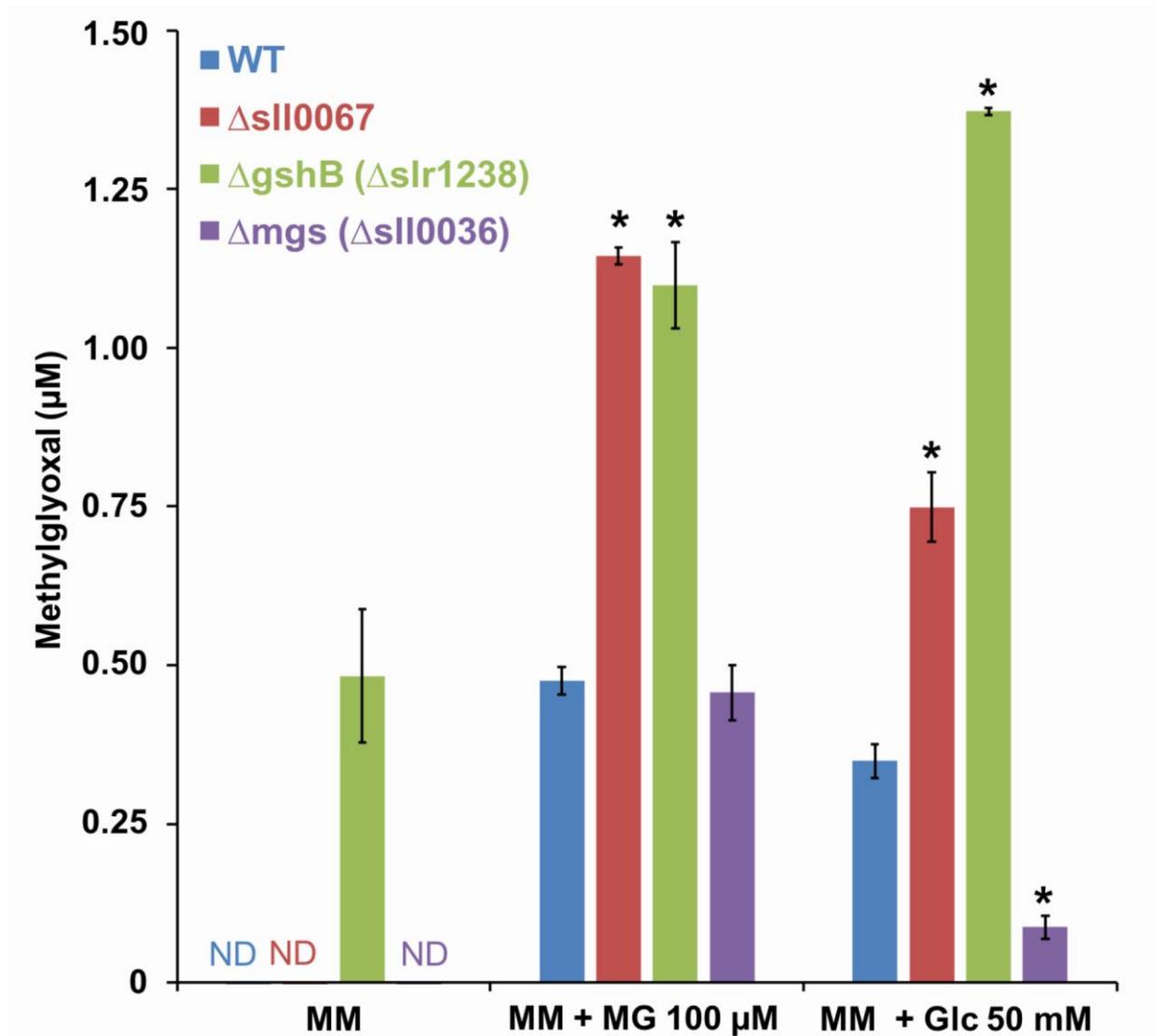
146 2.3 The MG-sensitive mutant accumulates MG

147 To study the role of *Sll0067* in the resistance to MG, we have measured the intracellular MG
148 content, using a standard assay based on the condensation reaction between MG and the 5,6-diamino-
149 2,4-dihydropyrimidine sulfate dihydrate (DDP) substrates that produces the 2-methylumazine
150 fluorescent product (Espinosa-Mansilla et al., 2007; Wichaphon et al., 2014). To verify that this
151 assay is working well in our hands we used it to measure the intracellular abundance of MG in
152 relevant control strains (production and elimination of MG) cultivated in absence or presence of 100
153 μM MG. In addition to the WT strain, one first logical control strain (MG production) is the mutant
154 deleted of the MG synthase-encoding gene designated as *sll0036* in CyanoBase
155 (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>). This $\Delta sll0036::\text{Km}^r$ mutant was constructed using the
156 standard gene replacement procedure described above for *sll0067*. Similarly to *sll0067*, *sll0036*
157 appeared to be dispensable for *Synechocystis* growing in standard photoautotrophic conditions
158 (Figure S3). The other logical control strain (MG elimination) is our previously described MG-
159 sensitive mutant that is depleted of the essential glutathione synthase gene *gshB* ($\Delta gshB::\text{Km}^r/gshB^+$;
160 hereafter $\Delta gshB$) and, consistently, of glutathione (Narainsamy et al., 2016).

161 The intracellular level of MG was measured in all four studied strains (WT, Δmgs , $\Delta gshB$ and
162 $\Delta sll0067$) growing in various conditions. In standard photoautotrophic conditions (absence of MG), no
163 MG was detected in WT, Δmgs and $\Delta sll0067$ cells, logically indicating that little MG is produced in
164 healthy growing cells (Figure S1). In contrast, the glutathione-depleted $\Delta gshB$ mutant accumulated
165 MG up to 0.5 μM (Figure 3) consistent with the requirement of glutathione for the glyoxalase-
166 dependent elimination of MG.

167 As expected all four strains incubated in the presence of exogenous MG (100 μM) possessed a
168 much higher intracellular content of MG (Figure 3). That the levels of MG were very similar in MG-
169 exposed WT and Δmgs cells is consistent with the MG synthase enzyme operating in MG synthesis
170 not MG uptake. In comparison to WT and Δmgs strains, the MG-induced accumulation of MG was
171 higher in the MG-sensitive strains $\Delta gshB$ and $\Delta sll0067$ cells, indicating that similarly to
172 glutathione, the *Sll0067* GST is required for eliminating MG.

173 We also measured the MG content in all four strains incubated under mixotrophic conditions
174 (2500 lux + exogenous glucose 50 mM) where both CO_2 assimilation through photosynthesis and
175 catabolism of the exogenous glucose can increase the synthesis of MG. Consistently, all strains
176 incubated in mixotrophic conditions displayed a higher MG content than what observed under
177 standard photoautotrophic conditions (Figure 3). The glucose-elicited increase in MG was lower in
178 the Δmgs strain lacking the MG synthase than in the other strains, thereby validating the Δmgs
179 control strain. A greater glucose-mediated increase in MG was observed in the $\Delta sll0067$ and $\Delta gshB$
180 strains than in the other strains, as observed in cells exposed to exogenous MG. Collectively, these
181 findings indicate that, similarly to glutathione, the *Sll0067* GST operates in the elimination of MG.



182

183

184

185

186

187

188

189

190

Figure 3. Influence of exogenous methylglyoxal or glucose on the methylglyoxal cellular content in various *Synechocystis* strains.

100 milliliters of mid-log phase cultures (initial $OD_{580\text{ nm}} = 0.5$) incubated during 18h under standard light (2500 lux) in liquid MM without or with 100 μM MG or 50 mM glucose (Glc) were used to measure the intracellular concentration of MG in the WT strain or the mutants lacking either SII0067 ($\Delta sII0067$) or the MG synthase (Δmgs), or depleted in the glutathione synthase gene ($\Delta gshB$). ND: Not detected. Data expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of three experiments ($n=3$) and * indicates significant difference between mutant and wild-type (t -test, $P < 0.05$).

191 **2.4 In response to MG, the MG-sensitive $\Delta sll0067$ mutant transiently accumulates MG and**
192 **(reduced) glutathione, indicating that Sll0067 is involved in MG elimination**

193 To analyze the influence of exogenous MG in the MG sensitive mutant $\Delta sll0067$ and the WT
194 strain, we measured the time-course response of the intracellular concentration of MG. We also
195 measured the changes in abundance of glutathione (GSH and GSSG) because it is known that MG
196 detoxification by Glx enzymes requires GSH and GST enzymes mediates glutathione-dependent
197 reactions that can transform GSH into GSSG (Deponce, 2013), including in *Synechocystis*
198 (Kammerscheit et al., 2019). Exogenously added MG (200 μ M) did not modify the intracellular
199 content of MG of the WT strain, whereas it accumulated in the $\Delta sll0067$ mutant (Figure 4A). These
200 observations indicate that its MG sensitivity of the $\Delta sll0067$ mutant is due to its decreased ability to
201 eliminate MG. Similarly, MG elicited a faster (in 3h) and higher increase in intracellular glutathione
202 (GSH) content in the $\Delta sll0067$ mutant (up to 40 mM) than in the WT strain (Figure 4C). These data
203 suggest that the $\Delta sll0067$ mutant is less efficient than the WT strain to somehow use GSH to
204 eliminate MG. Unlike what observed for MG and GSH, the intracellular level of GSSG was similarly
205 affected (increased) in WT and $\Delta sll0067$ cells (Figure 4D). Collectively these data show that in
206 response to MG, the MG-sensitive $\Delta sll0067$ mutant transiently accumulates more glutathione
207 (particularly in its reduced form) and MG than the WT strain. These data also indicate that the
208 Sll0067 GST normally operates in a MG elimination process that requires GSH but does not oxidize
209 it. In turn, these findings suggest, among other hypotheses, that the Sll0067 GST is somehow
210 involved in the glyoxalase-dependent detoxification of MG that requires GSH as a non-reducing co-
211 factor.

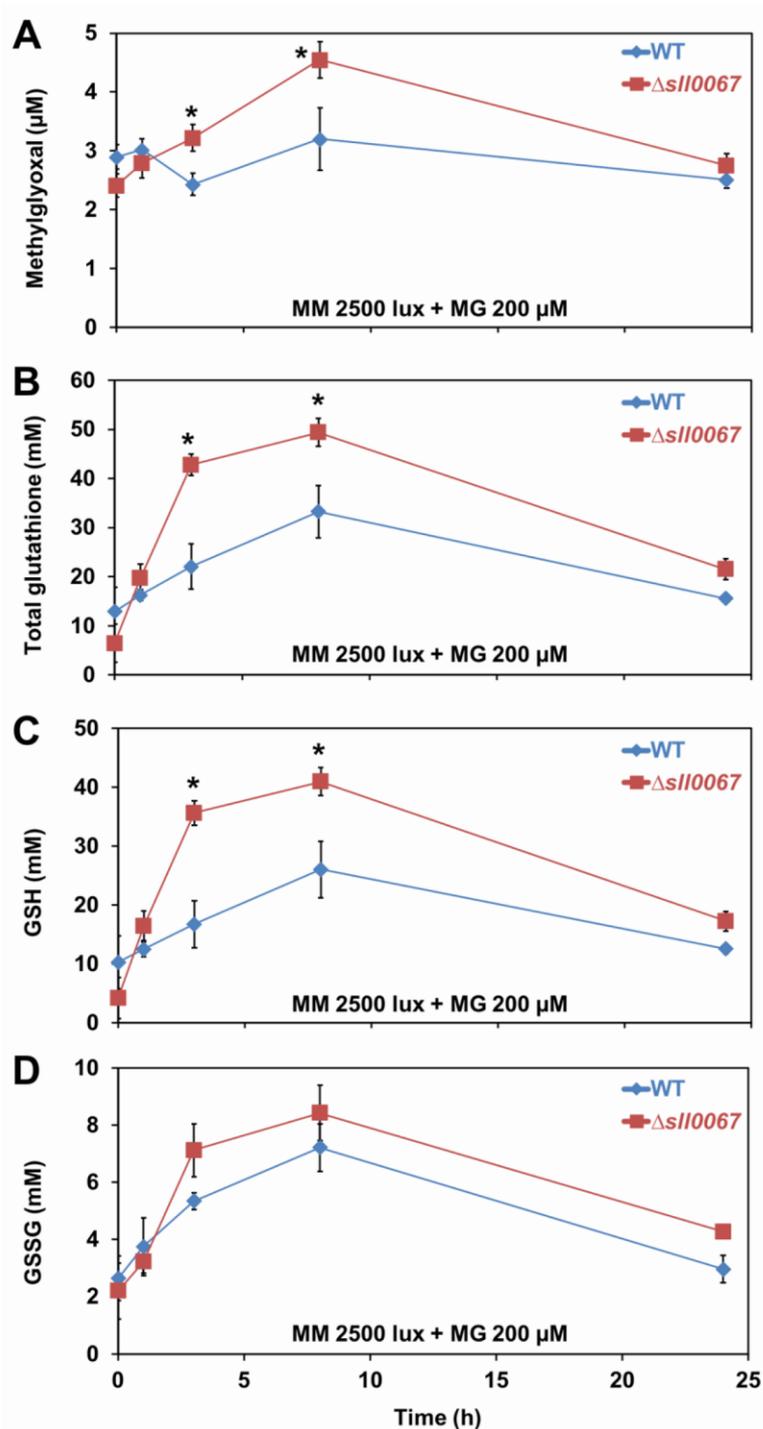


Figure 4. The accumulation of MG in the MG-sensitive $\Delta sl10067$ mutant is correlated with a high increase in reduced glutathione (GSH).

(A) Kinetic accumulation of MG in wild-type (WT) and mutant $\Delta sl10067$ exposed to exogenous MG 200 μM . (B to D) Kinetic analysis of the influence of exogenous MG on the abundance of total glutathione (B) and its reduced (GSH, C) and oxidized (GSSG, D) forms in wild-type (WT) and $\Delta sl10067$ cells. Data expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of three experiments ($n=3$) and * indicates significant difference between WT and mutant cells (t -test, $P < 0.05$).

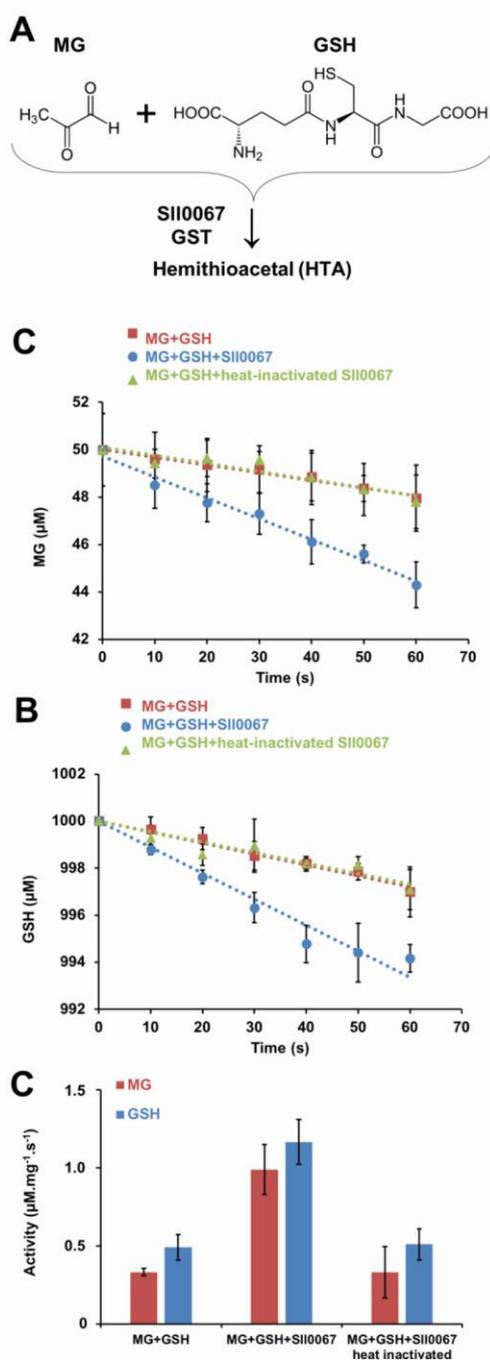
220 **2.5 The conjugation of glutathione with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene catalyzed by Sll0067 can**
221 **be inhibited by methylglyoxal MG**

222 To investigate the biochemical properties of Sll0067, we purchased its protein coding DNA
223 sequence (Table S1), which we cloned into the pET-26b expression vector, before introducing the
224 resulting plasmid in the *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS strain. The His-tagged recombinant Sll0067
225 protein was purified by nickel affinity chromatography and size exclusion chromatography, from
226 where Sll0067 eluted as a single peak with a molecular mass (43 kDa) consistent with a dimeric form
227 in agreement with a previous report (Pandey et al., 2015) (Figure S4). Then, the *in vitro* GST activity
228 of Sll0067 was assayed using the standard assay of the conjugation of GSH with the 1-chloro-2,4-
229 dinitrobenzene (CDNB) exogenous agent (Pégeot et al., 2014).

230 *To be completed by data from Nicolas Rouhier and Arnaud Hecker coworkers.*

231 **2.6 *In vitro* evidence that the activity of SII0067 consumes both glutathione and methyglyoxal,**
232 **suggesting that SII0067 may operate in the conjugation of these two metabolites**

233 The above-mentioned findings that SII0067 operates in the tolerance to, and elimination of MG
234 (concomitant with GSH consumption) (Figures 2, 3 and 4), strengthened by the evidence of a direct
235 interaction between SII0067 and MG (MG inhibits the SII0067-driven conjugation of GSH and
236 CDNB) (Figure S5), prompted us to test the possible interaction of SII0067 with both MG and GSH
237 (Figure 5A). Consequently, the influence of SII0067 on the consumption of both GSH and MG was
238 tested as follows (Figure 5B, 5C and 5D). GSH and MG were mixed, in the presence or absence of
239 the recombinant SII0067 protein, and their spontaneous (absence of SII0067) or enzymatic (presence
240 of SII0067) conjugation were assayed by measuring their remaining levels at time intervals. A control
241 experiment containing the same quantity of heat-inactivated SII0067 enzyme was also performed.
242 The results showed that SII0067 accelerates the disappearance of both MG and GSH over the
243 spontaneous (non-enzymatic) speed values observed either in absence of SII067 or after heat-
244 inactivation of SII0067 (Figure 5B, 5C and 5D). Together these data show that SII0067 catalyzes the
245 decline of both GSH and MG (conjugation GSH with MG) to form a product, possibly the
246 hemithioacetal compound (the substrate of MG-detoxifying glyoxalases), the formation of which is
247 generally regarded as being spontaneous (non-enzymatic).



248
249

Figure 5. Influence of SII0067 on the simultaneous depletion of GSH and MG

250 (A) Schematic representation of the spontaneous GSH conjugation with MG yielding hemithioacetal
 251 (HTA), which could be accelerated by SII0067. (B) Influence of SII0067, before or after heat-
 252 inactivation, on the kinetics of MG disappearance measured at 30°C in phosphate buffer containing
 253 50 µM MG, 1000 µM GSH and 2 µM SII0067 GST. (C) Influence of SII0067, before or after heat-
 254 inactivation, on the kinetics of GSH disappearance measured at 30°C in the above-indicated buffer.
 255 (D) Specific GSH and MG-disappearance activity expressed as µM.mg⁻¹ of protein.s⁻¹ in presence or
 256 absence of SII0067. Data expressed as the mean +/- standard deviation (SD) of three experiments
 257 (n=3).

258 **2.7 Two-substrates kinetic analysis confirms that Sll0067 catalyzes the conjugation of GSH**
259 **with MG, likely through a steady-state sequential mechanism**

260 To get a deeper insight into the influence of Sll0067 on the interaction (likely conjugation) of
261 GSH with MG, we performed a two-substrate steady-state kinetic analysis, using the following
262 classical strategy (Purich, 2010). First, the initial-velocity of substrate 1 (S1) is measured at different
263 fixed S1 concentrations for various concentrations of the substrate 2 (S2) and vice-versa. The primary
264 plots obtained at this step are represented as $v_i^{[S1]x} = f([S2])$ and $v_i^{[S2]x} = f([S1])$ and their
265 corresponding double-reciprocal pattern as $1/v_i^{[S1]x} = f(1/[S2])$ and $1/v_i^{[S2]x} = f(1/[S1])$. Then, a
266 secondary plot is constructed from the y-axis intercept known as $1/V_{\max}^{\text{app}}[S1]$ values of each curve
267 (i.e, each fixed [S1] concentrations) from the primary double-reciprocal pattern and vice versa for S2.
268 At last, the $V_{\max}^{\text{app}}[S1] = f([S1])$ and $V_{\max}^{\text{app}}[S2] = f([S2])$ plots are represented and used to
269 determine the kinetic parameters of the enzyme for S1 and S2 substrates.

270 By this analysis, we obtained the primary plots $1/v_i^{[MG]x} = f(1/[GSH])$ and $1/v_i^{[GSH]x} =$
271 $f(1/[MG])$ shown in Figure 6B and 6C. When GSH was used as the variable substrate ($1/[GSH]$) and
272 MG as the fixed-concentration substrate, the resulting representative lines intersected the x-axis
273 (Figure 6B). This observation suggests that the fixation of GSH does not modify the affinity of
274 Sll0067 for MG. When MG was used as the variable-concentration substrate ($1/[MG]$) with different
275 fixed concentrations of GSH, the resulting Lineweaver-Burk plots intersected above the x-axis
276 (Figure 6C). This finding suggests that the fixation of the MG substrate increase the affinity of the
277 Sll0067 for GSH.

278 Using the y-axis intercept as $1/V_{\max}^{\text{app}}[S]x$ values of each line (i.e, each fixed [S]x
279 concentrations) from the primary plots (Figure 6B and 6C), we drew the secondary plots shown in
280 Figure 6D and 6E. The analysis of $V_{\max}^{\text{app}}[MG]x = f([MG])$ pattern revealed the allosteric behavior
281 of Sll0067 toward MG substrate (Figure 6D) and suggests a positive K-type cooperativity. Then, we
282 determined the Hill number n_h , the value of which (1.873 ± 0.261 , Table 1) appeared to be consistent
283 with the dimeric nature of Sll0067 (Pandey et al., 2015) and to validate the cooperative fixation of
284 MG ($n_h > 1$). Concerning GSH, the corresponding $V_{\max}^{\text{app}}[GSH]x = f([GSH])$ pattern revealed the
285 Michaelian behavior of Sll0067 toward GSH (Figure 6E). These secondary plots were also used to
286 calculate the Sll0067 kinetic parameters (V_{\max} , apparent K_m and k_{cat}) for GSH, as well as the V_{\max} ,
287 Hill number n_h and $K_{0.5}$ for MG (Table 1). Sll0067 was found to transform $95.28 \pm 5.58 \mu\text{M}$ of MG
288 and $19.94 \pm 2.61 \mu\text{M}$ of GSH by min. A reasonably good catalytic efficiency ($3.5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) was
289 obtained with GSH in spite of the apparently high K_m value ($421.7 \pm 170.5 \mu\text{M}$) (Table 1). The low
290 affinity of Sll0067 for GSH, indicated by its "high" K_m value, is compensated by the great cellular
291 content of GSH (5-10 mM, (Kammerscheit et al., 2019)). Furthermore, the kinetic data represented in
292 Figure 6D, suggests that the (allosteric) fixation of MG increases the affinity of Sll0067 for GSH.

293 The $K_{0.5}$ value (Table 1, 221.7 ± 26.3) was relatively high for MG. This data indicates that the
294 positive (K+) cooperative fixation of one MG molecule on the first Sll0067 subunit, which stimulates
295 the fixation of a second MG molecule on the second Sll0067 subunit, is essential for the catalysis.
296 That the catalytic activity of Sll0067 toward MG ($3.5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) (Table 1) was 2-fold higher than
297 the activity toward CDNB ($1.12 \times 10^2 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) (Table 1), the standard GST substrate, comforts the
298 notion that Sll0067 can truly act on MG.

299 The presently-reported two-substrate kinetic analysis of SII0067 (Figure 6B, 6C, 6D and 6E)
 300 is consistent with a steady-state sequential kinetic mechanism that was previously described for other
 301 GSTs (Tang and Chang, 1996). The finding that the fixation of MG enhances the affinity of SII0067
 302 for GSH suggests a possible ordered-sequential enzymatic mechanism. To distinguish between
 303 "steady-state ordered" and "steady-state random" mechanisms, a product-inhibition study would be
 304 required (Tang and Chang, 1996; Gao and Harris, 2006). This is far from being easy because the
 305 probable hemithioacetal product generated by the SII0067-driven condensation of GSH with MG, is
 306 unstable, in rapidly dissociating into thiol and aldehyde. Other (isolable) hemithioacetals are
 307 generally cyclic and often stabilized by the presence of acids (Barnett and Jencks, 1969; Cox and
 308 Owen, 1967) that are incompatible with enzymatic assays.

309 **Table 1. Kinetic parameters of SII0067 GST**

	CDNB	CDNB + MG	MG	GSH
V_{\max} ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$)	<i>To be completed with data from Nicolas Rouhier and Arnaud Hecker coworkers.</i>		95.28 ± 5.58	19.94 ± 2.61
K_m (μM)			N/A	421.7 ± 170.5
k_{cat} (s^{-1})			N/A	0.1504 ± 0.0197
k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)			N/A	355.60 ± 0.12
$K_{0.5}$ (μM)	N/A	N/A	221.7 ± 26.3	N/A
n_h	N/A	N/A	1.873 ± 0.261	N/A

The apparent V_{\max} , K_m and k_{cat} values for GSH were calculated by non-linear regression using the Michaelis-Menten equation. The apparent V_{\max} , $K_{0.5}$ and n_h values for MG were calculated by allosteric sigmoidal regression. Data expressed as the mean +/- standard deviation (SD) of three experiments (n=3). MG, Methylglyoxal; GSH, Glutathione; n_h , Hill number; N/A, Not Applicable; Nd, Not Determined

311

312 **2.8 SII0067 activity is stimulated by the S-D-lactoylglutathione intermediate in MG** 313 **detoxification**

314 As a Phi-class GST had been crystallized in the presence of the S-D-lactoylglutathione
 315 intermediate in MG detoxification (Neuefeind et al., 1997), we analyzed the influence of S-D-
 316 lactoylglutathione on SII0067 activity. Practically, we monitored the influence of increased
 317 concentrations of S-D-lactoylglutathione on the initial velocity of the SII0067-catalyzed condensation
 318 of GSH with MG in the presence (Figure 6F and 6G). For both MG (Figure 6F) and GSH (Figure
 319 6G), the measured initial velocities were higher in presence than in absence of S-D-
 320 lactoylglutathione. These data suggest that the S-D-lactoylglutathione intermediate stimulates the
 321 GSH-conjugation activity onto MG of the enzyme SII0067 in order to improve the detoxification of
 322 MG through the glyoxalase pathway.

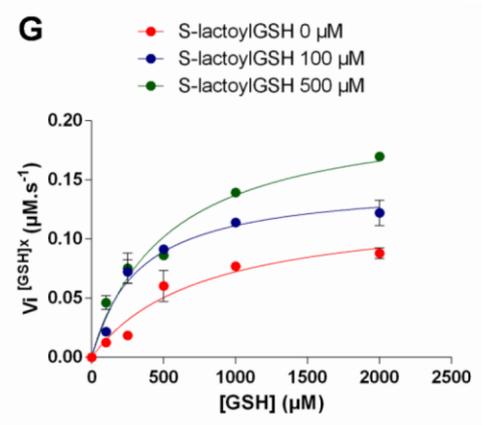
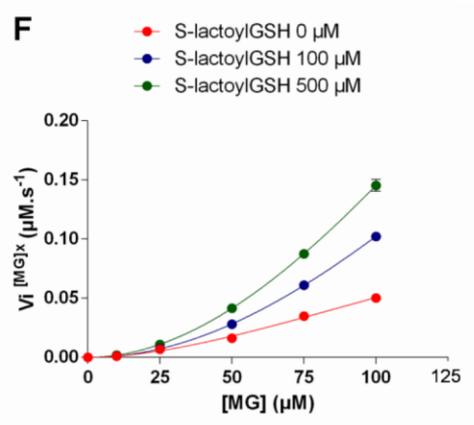
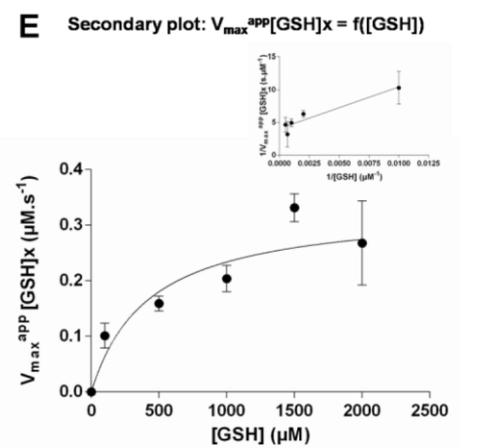
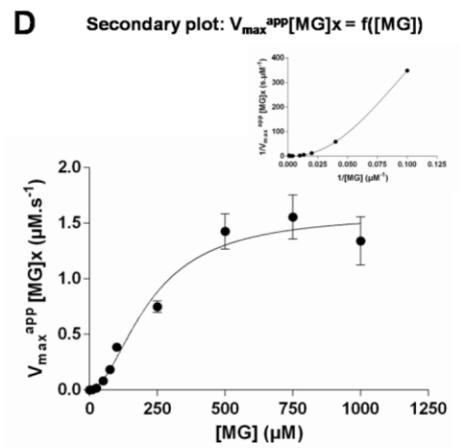
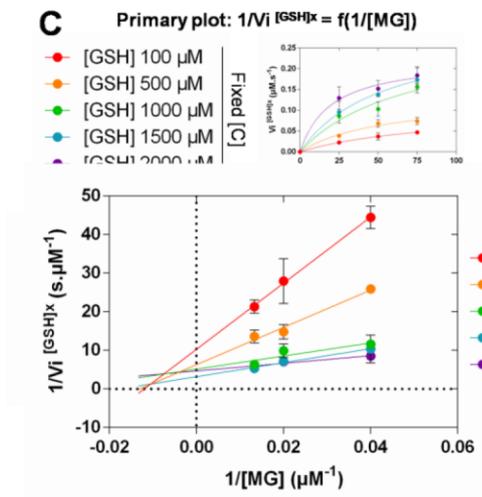
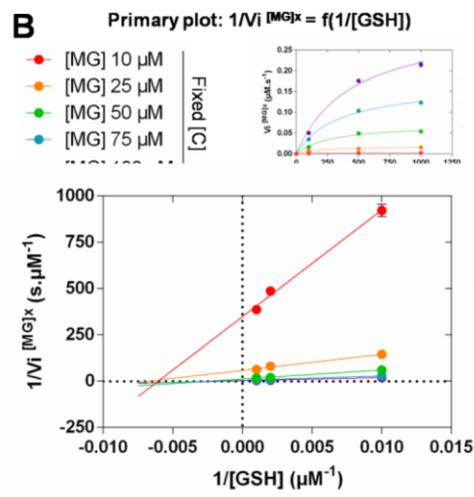
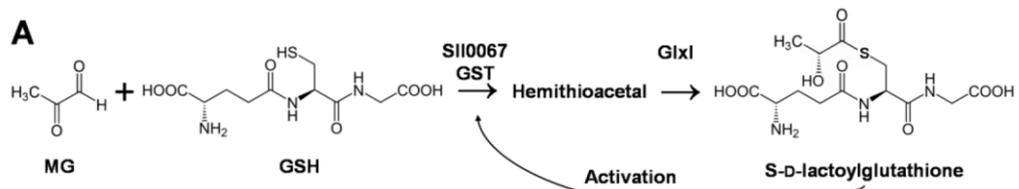


Figure 6. The SII0067 GST catalyzes the GSH-conjugation on MG with a steady-state sequential mechanism

323

324
325
326

327 **Figure 6. The Sll0067 GST catalyzes the GSH-conjugation on MG with a steady-state**
328 **sequential mechanism**

329 (A) Schematic representation of the conjugation of GSH with MG that produce hemithioacetal (we
330 view this reaction as being not only spontaneous, as always proposed, but also catalyzed by Sll0067).
331 Then, hemithioacetal is transformed into S-d-lactoylglutathione by the GlxI enzyme. (B) Initial
332 velocity primary plot of Sll0067 GST with double reciprocal plots of $1/V_i$ [MG]_x versus $1/[GSH]$
333 with GSH as the variable substrate (100; 500 and 1000 μ M) for several fixed MG concentrations as
334 indicated and the corresponding V_i [MG]_x = f([GSH]) as insert on the right corner. (C) Initial
335 velocity primary plot of Sll0067 GST with double-reciprocal plots of $1/V_i$ [GSH]_x versus $1/[MG]$
336 with MG as the variable substrate (25; 50 and 75 μ M) for several fixed GSH concentrations as
337 indicated and the corresponding V_i [GSH]_x = f([MG]) as insert on the right corner. (D) Initial
338 velocity secondary plot of Sll0067 GST in function of the concentration of MG (0; 10; 25; 50; 75;
339 100; 250; 500; 750 and 1000 μ M). (E) Initial velocity secondary plot of Sll0067 GST in function of
340 the concentration of GSH (0; 100; 500; 1000; 1500 and 2000 μ M). (F) Initial velocity graph of
341 Sll0067 activity in the presence of a fixed GSH concentration (1000 μ M) and the indicated
342 concentrations of MG and S-d-lactoylglutathione (noted as S-lactoylGSH). (G) Initial velocity graph
343 of Sll0067 activity with a fixed MG concentration (50 μ M) and the indicated concentrations of GSH
344 and S-lactoylGSH. Data expressed as the mean +/- standard deviation (SD) of three experiments
345 (n=3).

346 **STAR Methods**

347 **CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING**

348 Further information and requests for reagents may be directed to, and will be fulfilled by the
349 corresponding author Corinne Cassier-Chauvat (corinne.cassier-chauvat@cea.fr).

350 **EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**

351 **Escherichia coli TOP 10 (Invitrogen)**

352 *Escherichia coli* (*E. coli*) TOP10 (Invitrogen) used for gene manipulation was grown on LB
353 at 37°C in absence or presence of the selective antibiotics: ampicillin (Amp) 100 µg.mL⁻¹ and
354 kanamycin (Km) 50 µg.mL⁻¹.

355 **Escherichia coli Rosetta2 BL21 (DE3) strain (Novagen)**

356 *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS strain (Novagen) propagating the pET-26b-derived plasmid
357 producing the Sll0067 GST was grown in LB medium containing Km (50 µg.mL⁻¹) and
358 chloramphenicol (34 µg.mL⁻¹).

359 **Synechocystis PCC 6803**

360 *Synechocystis* PCC 6803 (*Synechocystis*) was routinely grown at 30°C in liquid mineral
361 medium (MM), *i.e.* BG11 medium (Rippka et al., 1979) containing 3.78 mM Na₂CO₃ (Domain et al.,
362 2004), under continuous agitation (140 rpm) and white light (2500 lux; 31.25 µE.m⁻².s⁻¹). The
363 Δ sll0067 mutant lacking Sll0067 was grown in the presence of Km 50 µg.mL⁻¹. For growth analysis,
364 mid-exponential phase cultures (OD_{580nm} = 0.3 to 0.8) were adjusted to OD₅₈₀ = 0.02 (5.10⁵ cells.mL⁻¹)
365 and subsequently incubated for various durations in liquid media containing the indicated noxious
366 agents prior to measuring OD₅₈₀ or photographing the culture flasks. For survival analysis, cells from
367 mid-exponential phase cultures were adjusted to OD₅₈₀ = 0.1 (2.5x10⁶ cells.mL⁻¹), challenged as
368 described, serially diluted in MM, spread on MM solidified with 1% agar (Difco) and incubated
369 during 5-7 days under standard conditions before counting the colonies.

370 **METHOD DETAILS**

371 **Molecular Biology**

372 **Targeted deletion of sll0067 GST coding gene**

373 *Synechocystis* DNA regions (about 300 bp in length) flanking the studied protein coding
374 sequence (CS) were independently amplified by PCR, using specific oligonucleotides primers (Table
375 S2). These two DNA regions were joined by standard PCR-driven overlap extension (Heckman and
376 Pease, 2007) in a single DNA segment harbouring a *Sma*I restriction site in place of the studied CS.
377 After cloning in pGEMT (Promega) the resulting plasmids (Table S1) were opened at the unique
378 *Sma*I site where we cloned the Km^r cassette (a *Hinc*II fragment of the commercial pUC4K plasmid)
379 in the same orientation as the sll0067 coding sequence that it replaced. The resulting deletion cassette
380 Δ sll0067::Km^r was verified by PCR and nucleotide sequencing (Mix2Seq Kit, Eurofins Genomics)
381 before and after transformation (Labarre et al., 1989) to *Synechocystis*.

382 **Construction of expression vector of Sll0067**

383 The *sll0067* protein-coding sequence flanked by *NdeI* and *NcoI* restriction sites (Table S1)
384 purchased from Twist Bioscience was double-digested with the *NdeI* and *NcoI* enzymes and cloned,
385 using a DNA assembly strategy (NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix, New England
386 BioLabs), into the commercial pET-26b plasmid opened with *NdeI* and *NcoI*. The resulting plasmid
387 encoding the C-terminal His-tagged Sll0067 protein was verified by PCR and nucleotide sequencing
388 (Mix2Seq Kit, Eurofins Genomics).

389 **Assays**

390 **Glutathione assay**

391 All reagents were purchased from Sigma-Aldrich. 50-mL exponentially-growing cultures were
392 diluted two-fold down to $OD_{580} = 0.4$, and incubated for various durations under white light (2500
393 lux; $31.25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) in the presence of the indicated agents. Cells were rapidly collected by
394 filtration (0.45 μm cellulose membrane, Millipore) under light; re-suspended in 1 mL of acidic
395 phosphate buffer (100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$; 1 mM EDTA; 5% (w/v) 5-sulfosalicylic acid);
396 disrupted by a three freezing-thawing cycles in liquid nitrogen and hot water bath, 10 minutes strong
397 mixing (Vibrax VXR, Ika) at 4°C; prior to centrifugation (14,000 rpm, 4°C, 5 min) to eliminate
398 unbroken cells and membranes. Cell extracts were purified by centrifugation (14,000 rpm, 4°C, 20
399 min) through a filter (Amicon Ultra – 0.5 mL 30K; Millipore) to eliminate proteins larger than 30
400 kDa, and stored at -80°C until use. Before GSSG assay, 100 μL of filtrate were treated with 2 μL of
401 neat 2-vinylpyridine for 1 hour on ice to block reduced glutathione (GSH) and then with 2 μL of
402 four-fold diluted triethanolamine solution. 10 μL untreated samples (total glutathione assay) and 20
403 μL treated samples (oxidized GSSG assay) were loaded on a UV-compatible 96-well plate (Greiner
404 bio-one). A reaction mixture containing yeast glutathione reductase (GR) at final concentration 1.25
405 U/mL in phosphate buffer (100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ buffer and 1 mM EDTA, pH 7.5) was
406 distributed to each well. A reaction mixture containing 0.2 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
407 and 0.3 mM NADPH in phosphate buffer was automatically added in each well with a microplate
408 reader (ClarioStar; BMG Labtech). The reaction was immediately followed by measuring the
409 absorption at 412 nm of the yellow 5'-thio-2-nitrobenzoic acid product (Akerboom and Sies, 1981)
410 for 1 min at 30°C. Standard curves prepared with various concentrations of GSH or GSSG were used
411 to calculate the cell content in GSSG, total glutathione (GSSG + GSH) and GSH (total glutathione
412 minus GSSG) using the *Synechocystis* cell volume value of $1.2\cdot 10^{-11}$ mL (Mazouni et al., 2004).

413 **Methylglyoxal assay**

414 All reagents were of analytical grade: methylglyoxal (40% aqueous solution, Sigma-Aldrich),
415 ammonium chloride/ammonia buffer solution (Merck), and 5,6-diamino-2,4-dihydroxypyrimidine
416 sulfate dihydrate (DDP, Combi-Blocks). 100 mL of exponentially-growing cultures were diluted to
417 $OD_{580} = 0.6$, incubated for various durations under white light (2500 lux) in presence of
418 methylglyoxal (MG, 200 μ M). MG was extracted as described above for glutathione. In accordance
419 with previous studies (Espinosa-Mansilla et al., 2007; Wichaphon et al., 2014) MG assays were
420 conducted with aqueous samples and standards. The reaction mixture was adjusted to pH 10.0 with
421 ammonium chloride/ammonium buffer and the DDP/MG ratio was fixed at (20:1). For assays, 1 mL
422 aqueous samples were mixed with 0.5 mL of alkaline ammonium buffer (1.0 M NH_4Cl/NH_3 , pH
423 10.0, Merck) and 2 mL of derivatizing agent (1 mM DDP aqueous solution), heated at 60°C for 120
424 min, cooled and then loaded on a microplate. The signal fluorescence of the MG-DDP derivative
425 ($\lambda_{exc} = 362$ nm and $\lambda_{em} = 445$ nm) was measured with a microplate spectrofluorimeter (ClarioStar;
426 BMG Labtech). In parallel, standards prepared with various MG concentrations (1 to 7.5 μ M, in
427 ultra-pure water) were used to calculate the intracellular MG content using the above-mentioned
428 *Synechocystis* cell volume.

429 **Biochemistry and enzymology**

430 **Production of the Sll0067 recombinant protein**

431 The recombinant *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS strain (Novagen) propagating the pET-26b
432 derivative plasmid for Sll0067 production was grown at 37°C in LB+Km+Cm (see above) up to
433 $OD_{600nm} = 0.7-0.8$. At this stage Sll0067 production was induced with 0.1 mM isopropyl- β -D-1-
434 thiogalactopyranoside (IPTG) during 4 h. Cells were harvested by centrifugation, resuspended in
435 lysis buffer (30 mM Tris-HCl pH 8.0; 200 mM NaCl), stored at -20°C and lysed by sonication. The
436 lysate was centrifuged at 35 000 g for 25 min at 4 °C to collect the supernatant. The His-tagged
437 Sll0067 protein was purified in a 2-steps procedure comprising a gravity-flow chromatography on a
438 nickel nitrilotriacetate (Ni-NTA) agarose resin (Qiagen) and an size-exclusion chromatography on a
439 Superdex200 column connected to an ÄKTA PurifierTM (GE Healthcare) according to the
440 manufacturer's instructions. The Sll0067-containing protein fractions were pooled, concentrated, and
441 stored at -20°C until use. Protein concentration was determined by measuring the absorbance at 280
442 nm, using a specific extinction coefficient of 28420 $M^{-1}.cm^{-1}$.

443 **Oligomerization state characterization**

444 The oligomerization state of Sll0067 was analyzed by size-exclusion chromatography
445 (injection of 300 μ g in 300 μ L of lysis buffer at a flow rate of 0.5 mL/min) on an analytical Superdex
446 200 10/300 column (equilibrated in 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl) connected to a multi-
447 angle light scattering detector (miniDAWN TREOS, Wyatt technology) and a refractometer (T-rEX,
448 Wyatt Technology). The column was calibrated using the molecular weight standards (6500–700,000
449 Da) from Sigma and data accumulated during the analysis were processed using Astra 7 software
450 (Wyatt Technology).

451 **Enzymatic activity of SII0067 GST**

452 The GSH-conjugating activity with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) was assayed by
453 measuring the absorbance at 340 nm. Reactions were carried out at 30°C in 500 µL of 30 mM Tris-
454 HCl pH 8.0, 1 mM EDTA. Various concentrations of CDNB were tested at a fixed GSH
455 concentration of 1 mM. Reactions were started by the addition of the enzyme, using protein
456 concentrations within the linear response range. The measured velocities were corrected by
457 subtracting the rate of spontaneous (non-enzymatic) reaction. Three independent experiments were
458 performed at each substrate concentration. The kinetic parameters (k_{cat} and apparent K_m) were
459 obtained by fitting the data to the non-linear regression Michaelis-Menten model in Prism 6 software
460 (GraphPad). The k_{cat} values are expressed as µmol of substrate oxidized per sec per µmol of enzyme
461 (*i.e.* the turnover number in s^{-1}), using specific molar absorption coefficients of $9600 M^{-1}.cm^{-1}$ for
462 CDNB.

463 **Enzymatic GSH and MG depletion measurements**

464 The analysis of the disappearance of MG (50 µM) and GSH (1000 µM catalyzed by SII0067
465 (2.21 µM) was performed at 30°C in potassium phosphate buffer (100 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 ; 1 mM
466 EDTA; pH 7.5). Three independent experiments were performed for each duration of reactions,
467 which were started by the addition of both MG and SII0067, and stopped as follows. MG-consuming
468 reactions were stopped by the addition of ice-cold 0.5 mL of alkaline ammonium buffer (1.0 M
469 NH_4Cl/NH_3 , pH 10.0, Merck) and storage on ice, prior to measuring remaining MG as described
470 above. GSH-consuming reactions were stopped by the addition of 1 mL of acidic extraction
471 phosphate buffer (100 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 ; 1 mM EDTA; 1.2% (w/v) 5-sulfosalicylic acid). Then,
472 5 µL of the stopped reaction mixture was loaded on a microplate, and the remaining concentration of
473 GSH was performed as described above. Initial velocity of SII0067 reaction was expressed as $\mu M.s^{-1}$
474 $.mg^{-1}$ of enzyme.

475 **Two-substrate kinetic analysis of SII0067 GST**

476 Steady-state kinetic measurements for GSH- and MG-consuming SII0067 activities were
477 performed at 30°C in potassium phosphate buffer (100 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 ; 1 mM EDTA; pH 7.5)
478 in 1 mL aliquots of final reaction mixture. Initial velocity analysis for MG and GSH substrates were
479 determined by assaying the indicated variable MG concentrations at the indicated fixed GSH
480 concentrations, and vice-versa. The reactions were started by adding both MG and SII0067 (2.21 µM)
481 and three independent experiments were performed at each substrate concentration. The measured
482 velocities were corrected by subtracting the rate of spontaneous (non-enzymatic) reactions performed
483 in absence of SII0067. The kinetic parameters (V_{max} , apparent K_m and k_{cat}) and allosteric parameters
484 (V_{max} , Hill number n_h and $K_{0.5}$) were obtained by fitting the data to the non-linear regression
485 Michaelis-Menten model and to the allosteric sigmoidal model in GraphPad Prism 6 software,
486 respectively.

487 **3 References**

- 488 Akerboom, T. P., and Sies, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione
489 mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373–382.
- 490 Allaman, I., Bélanger, M., and Magistretti, P. J. (2015). Methylglyoxal, the dark side of glycolysis.
491 *Front. Neurosci.* 9. doi:10.3389/fnins.2015.00023.
- 492 Archibald, J. M. (2009). The puzzle of plastid evolution. *Curr. Biol. CB* 19, R81–88.
493 doi:10.1016/j.cub.2008.11.067.
- 494 Barnett, R. E., and Jencks, W. P. (1969). Diffusion-controlled and concerted base catalysis in the
495 decomposition of hemithioacetals. *J. Am. Chem. Soc.* 91, 6758–6765.
496 doi:10.1021/ja01052a038.
- 497 Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2014). Responses to Oxidative and Heavy Metal Stresses in
498 Cyanobacteria: Recent Advances. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 871–886. doi:10.3390/ijms16010871.
- 499 Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2018). “Cyanobacteria: Wonderful Microorganisms for Basic
500 and Applied Research,” in *eLS* (American Cancer Society), 1–11.
501 doi:10.1002/9780470015902.a0027884.
- 502 Cox, J. M., and Owen, L. N. (1967). Cyclic hemithioacetals: analogues of thiosugars with sulphur in
503 the ring. *J. Chem. Soc. C Org.*, 1130–1134. doi:10.1039/J39670001130.
- 504 Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent
505 enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3217–3266. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.018.
- 506 Domain, F., Houot, L., Chauvat, F., and Cassier-Chauvat, C. (2004). Function and regulation of the
507 cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: *LexA* is critical to the survival of cells facing
508 inorganic carbon starvation. *Mol. Microbiol.* 53, 65–80. doi:10.1111/j.1365-
509 2958.2004.04100.x.
- 510 Espinosa-Mansilla, A., Durán-Merás, I., Cañada, F. C., and Márquez, M. P. (2007). High-
511 performance liquid chromatographic determination of glyoxal and methylglyoxal in urine by
512 prederivatization to lumazinic rings using in serial fast scan fluorimetric and diode array
513 detectors. *Anal. Biochem.* 371, 82–91. doi:10.1016/j.ab.2007.07.028.
- 514 Gao, X., and Harris, T. K. (2006). Steady-state Kinetic Mechanism of PDK1. *J. Biol. Chem.* 281,
515 21670–21681. doi:10.1074/jbc.M602448200.
- 516 Heckman, K. L., and Pease, L. R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap
517 extension. *Nat. Protoc.* 2, 924–932. doi:10.1038/nprot.2007.132.
- 518 Hirokawa, Y., Goto, R., Umetani, Y., and Hanai, T. (2017). Construction of a novel d-lactate
519 producing pathway from dihydroxyacetone phosphate of the Calvin cycle in cyanobacterium,

- 520 Synechococcus elongatus PCC 7942. *J. Biosci. Bioeng.* 124, 54–61.
521 doi:10.1016/j.jbiosc.2017.02.016.
- 522 Kammerscheit, X., Chauvat, F., and Cassier-Chauvat, C. (2019). First in vivo evidences that
523 glutathione-S-transferase operates in photo-oxidative stress in cyanobacteria. *Front.*
524 *Microbiol.* 10. doi:10.3389/fmicb.2019.01899.
- 525 Kaur, C., Sharma, S., Hasan, M. R., Pareek, A., Singla-Pareek, S. L., and Sopory, S. K. (2017).
526 Characteristic Variations and Similarities in Biochemical, Molecular, and Functional
527 Properties of Glyoxalases across Prokaryotes and Eukaryotes. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
528 doi:10.3390/ijms18040250.
- 529 Labarre, J., Chauvat, F., and Thuriaux, P. (1989). Insertional mutagenesis by random cloning of
530 antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC
531 6803. *J. Bacteriol.* 171, 3449–3457.
- 532 Lee, C., and Park, C. (2017). Bacterial Responses to Glyoxal and Methylglyoxal: Reactive
533 Electrophilic Species. *Int. J. Mol. Sci.* 18. doi:10.3390/ijms18010169.
- 534 Mazouni, K., Domain, F., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2004). Molecular analysis of the key
535 cytokinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE. *Mol. Microbiol.* 52,
536 1145–1158. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04042.x.
- 537 Mermet-Bouvier, P., and Chauvat, F. (1994). A conditional expression vector for the cyanobacteria
538 *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942 and
539 PCC6301. *Curr. Microbiol.* 28, 145–148.
- 540 Mostofa, M. G., Ghosh, A., Li, Z.-G., Siddiqui, M. N., Fujita, M., and Tran, L.-S. P. (2018).
541 Methylglyoxal - a signaling molecule in plant abiotic stress responses. *Free Radic. Biol. Med.*
542 122, 96–109. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.009.
- 543 Naraimsamy, K., Marteyn, B., Sakr, S., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2013). “Genomics of
544 the Pleiotropic Glutathione System in Cyanobacteria,” in *Advances in Botanical Research*,
545 157–188. doi:10.1016/B978-0-12-394313-2.00005-6.
- 546 Narainsamy, K., Farci, S., Braun, E., Junot, C., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2016).
547 Oxidative-stress detoxification and signalling in cyanobacteria: the crucial glutathione
548 synthesis pathway supports the production of ergothioneine and ophthalmate. *Mol. Microbiol.*
549 100, 15–24. doi:10.1111/mmi.13296.
- 550 Neufeind, T., Huber, R., Dasenbrock, H., Prade, L., and Bieseler, B. (1997). Crystal structure of
551 herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione:
552 evidence for an induced-fit mechanism. *J. Mol. Biol.* 274, 446–453.

- 553 Pandey, T., Singh, S. K., Chhetri, G., Tripathi, T., and Singh, A. K. (2015). Characterization of a
554 Highly pH Stable Chi-Class Glutathione S-Transferase from *Synechocystis* PCC 6803. *PLoS*
555 *One* 10, e0126811. doi:10.1371/journal.pone.0126811.
- 556 Pégeot, H., Koh, C. S., Petre, B., Mathiot, S., Duplessis, S., Hecker, A., et al. (2014). The poplar Phi
557 class glutathione transferase: expression, activity and structure of GSTF1. *Front. Plant Sci.* 5.
558 doi:10.3389/fpls.2014.00712.
- 559 Purich, D. L. (2010). "Chapter 6 - Initial-Rate Kinetics of Multi-Substrate Enzyme-Catalyzed
560 Reactions," in *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control*, ed. D. L. Purich (Boston: Elsevier),
561 335–378. doi:10.1016/B978-0-12-380924-7.10006-7.
- 562 Ramachandra Bhat, L., Vedantham, S., Krishnan, U. M., and Rayappan, J. B. B. (2019).
563 Methylglyoxal – An emerging biomarker for diabetes mellitus diagnosis and its detection
564 methods. *Biosens. Bioelectron.* 133, 107–124. doi:10.1016/j.bios.2019.03.010.
- 565 Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., and Stanier, R. Y. (1979). Generic
566 Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria.
567 *Microbiology* 111, 1–61. doi:10.1099/00221287-111-1-1.
- 568 Shimakawa, G., Suzuki, M., Yamamoto, E., Nishi, A., Saito, R., Sakamoto, K., et al. (2013).
569 Scavenging systems for reactive carbonyls in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC
570 6803. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 2441–2448. doi:10.1271/bbb.130554.
- 571 Shimakawa, G., Suzuki, M., Yamamoto, E., Saito, R., Iwamoto, T., Nishi, A., et al. (2014). Why
572 don't plants have diabetes? Systems for scavenging reactive carbonyls in photosynthetic
573 organisms. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 543–547. doi:10.1042/BST20130273.
- 574 Tang, S. S., and Chang, G. G. (1996). Kinetic mechanism of octopus hepatopancreatic glutathione
575 transferase in reverse micelles. *Biochem. J.* 315, 599–606.
- 576 Wichaphon, J., Giri, A., Ohshima, T., and Lertsiri, S. (2014). Determination of glyoxal and
577 methylglyoxal in Thai fish sauce and their changes during storage test. *J. Food Meas.*
578 *Charact.* 8, 241–248. doi:10.1007/s11694-014-9197-0.
- 579 William Schopf, J. (2011). The paleobiological record of photosynthesis. *Photosynth. Res.* 107, 87–
580 101. doi:10.1007/s11120-010-9577-1.
- 581 Xu, D., Liu, X., Guo, C., and Zhao, J. (2006). Methylglyoxal detoxification by an aldo-keto reductase
582 in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Microbiol. Read. Engl.* 152, 2013–
583 2021. doi:10.1099/mic.0.28870-0.
- 584 Xue, M., Rabbani, N., and Thornalley, P. J. (2011). Glyoxalase in ageing. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22,
585 293–301. doi:10.1016/j.semcdb.2011.02.013.

586 **4 Supplemental Information**

587 **Figure S1. The *sll0067* gene is dispensable for the photoautotrophic growth of *Synechocystis*.**

588

589 **Figure S2. The lack of the Sll0067 GST confers a glycerol-sensitive phenotype.**

590

591 **Figure S3. The *mgs* gene is dispensable for the photoautotrophic growth of *Synechocystis*.**

592

593 **Figure S4. The purification and the SEC-MALS analysis of Sll0067 GST.**

594

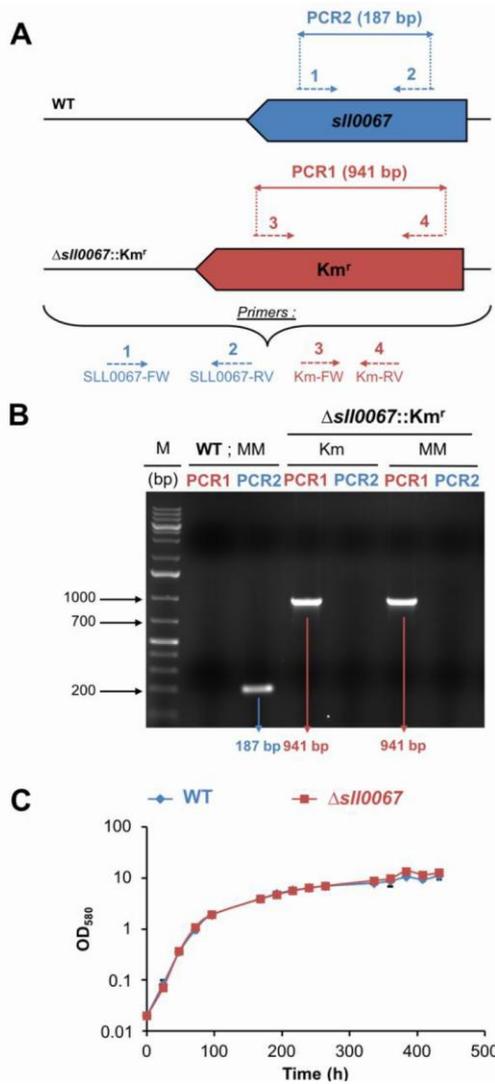
595 **Figure S5. Methylglyoxal inhibits the Sll0067-catalyzed conjugation of CDNB with GSH**

596

597 **Table S1. List and characteristics of the plasmids and synthetic construction used in this study.**

598

599 **Table S2. List and characteristics of the PCR primers used in this study.**



600

601

Figure S1. The *sll0067* gene is dispensable for the photoautotrophic growth of *Synechocystis*.

602

(A) PCR analysis of the *sll0067* chromosome locus in *Synechocystis* WT strain and the

603

$\Delta sll0067::Km^r$ mutant constructed in this study. The genes are represented by colored arrows

604

(*sll0067*⁺: blue; *Km*^r: red) pointing into the direction of their transcription. The same color code is

605

used to represent the PCR primers (dotted arrows, see S1 Table for their sequence) and the

606

corresponding PCR products (double arrows) typical of the presence of WT or $\Delta sll0067::Km^r$

607

chromosome copies. (B) Typical UV-light image of the agarose gel showing the PCR products

608

corresponding to the genes *sll0067*⁺ (PCR2: blue) or *Km*^r (PCR1: red) generated from WT and

609

$\Delta sll0067::Km^r$ cells grown in absence (MM) or presence of the selective *Km* antibiotic. M (marker

610

DNA) indicates the GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Note that WT cells

611

harbor only WT chromosomes while $\Delta sll0067::Km^r$ mutant cells possess only $\Delta sll0067::Km^r$

612

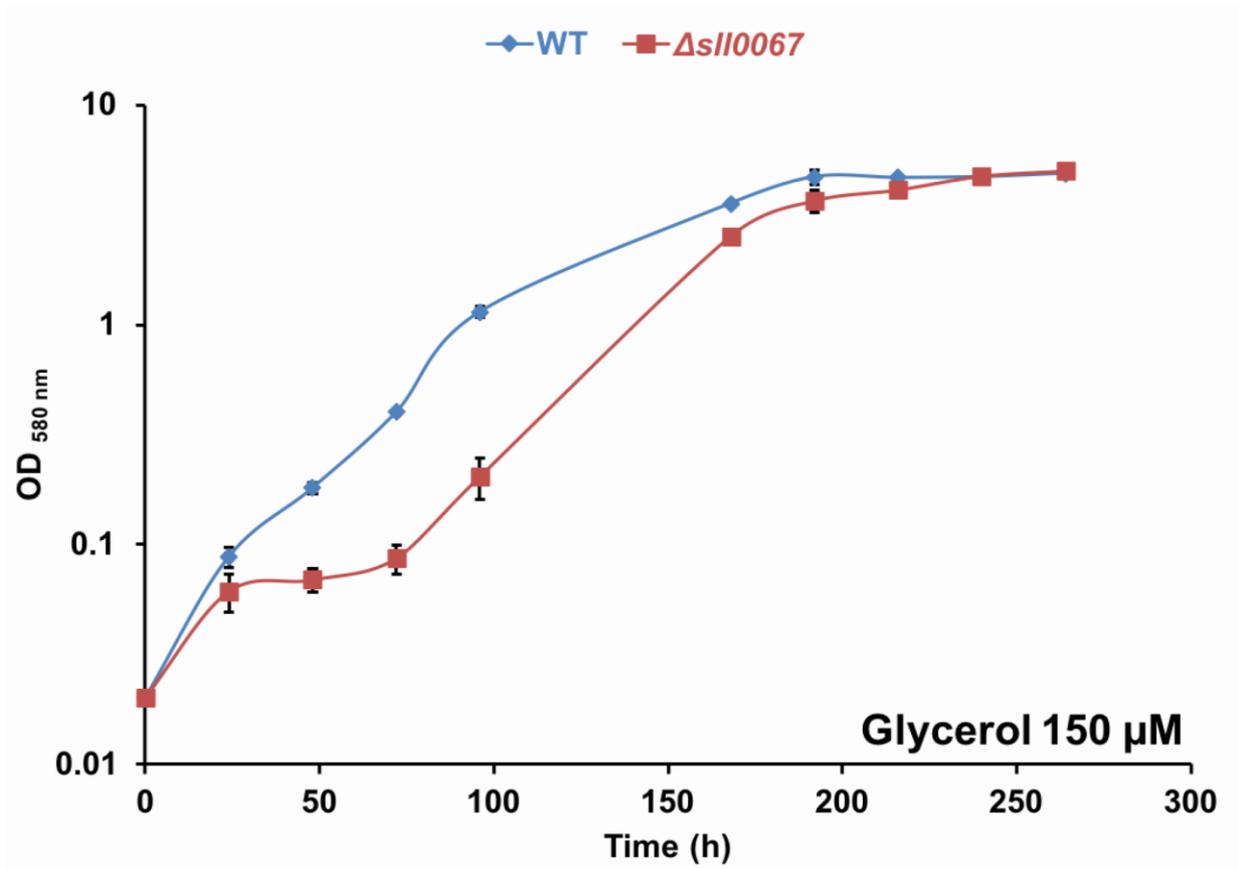
chromosomes. (C) Typical growth curve (initial OD 580 nm = 0.02) of WT and mutant strains

613

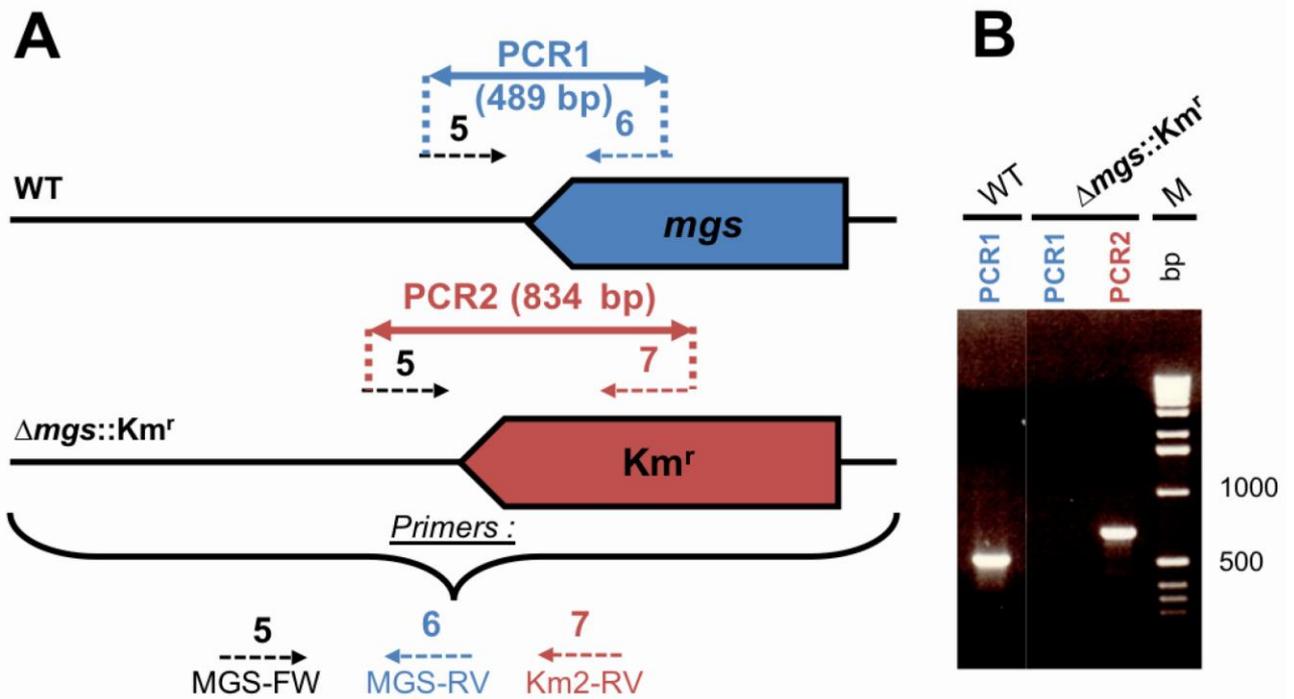
incubated in liquid mineral medium (MM) under standard photoautotrophic condition. Data

614

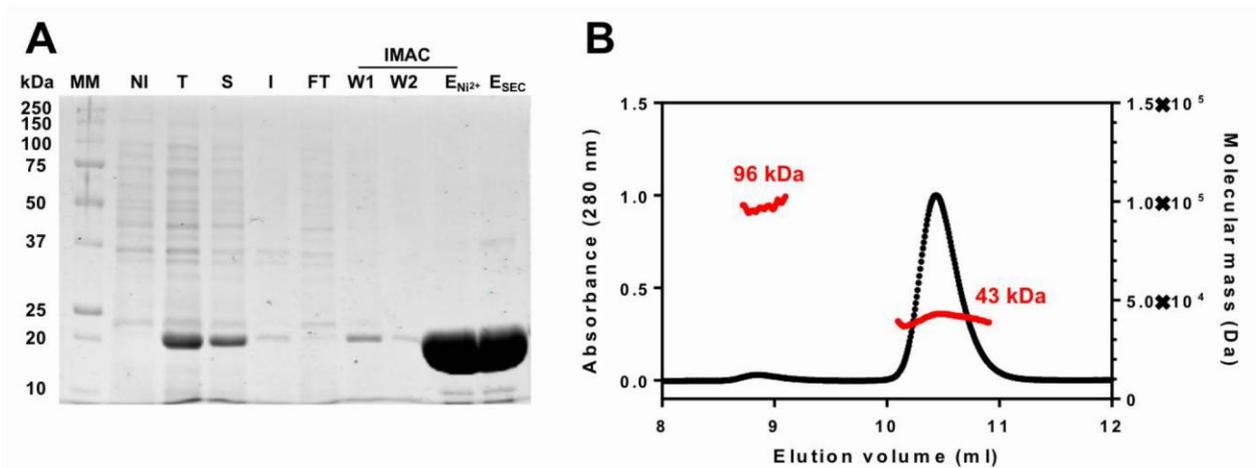
expressed as the mean +/- standard deviation (SD) of three experiments (n=3).



615
 616 **Figure S2. The lack of the SII0067 GST confers a glycerol-sensitive phenotype.**
 617 Typical growth curve (initial OD 580 nm = 0.02) of WT and mutant strains incubated in liquid MM
 618 under standard photoautotrophic conditions. Data are expressed as the mean +/- standard deviation
 619 (SD) of three experiments (n=3).



620
 621 **Figure S3. The *mgs* gene is dispensable for the photoautotrophic growth of *Synechocystis*.**
 622 (A) PCR analysis of the studied chromosome loci in *Synechocystis* WT strain and the mutant
 623 constructed in this study, which were grown in absence (MM) or presence of the selective antibiotic
 624 (Km). The genes are represented by colored arrows (*mgs*: blue; Km^r: red) which point into the
 625 direction of their transcription. The same color code is used to represent the PCR primers (dotted
 626 arrows see Table S2 for their sequence) and the corresponding PCR products (double arrows) typical
 627 of the presence of the WT or Km^r chromosome copies. (B) Typical UV-light image of the agarose gel
 628 showing the PCR products corresponding to the genes *mgs* (PCR1: blue) and Km^r (PCR2: red)
 629 respectively for the WT strain and the mutant $\Delta mgs::Km^r$ grown in absence of the selective antibiotic
 630 (Km) to validate the complete absence of *mgs* gene in the $\Delta mgs::Km^r$ mutant. M indicates the 1 kb
 631 DNA Extension Ladder (Invitrogen). Note that the $\Delta mgs::Km^r$ mutant possesses only $\Delta mgs::Km^r$
 632 chromosomes.



633
634 **Figure S4. The purification and the SEC-MALS analysis of Sll0067 GST.**

635 (A) Purification of Sll0067 GST. Coomassie blue-stained sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel
636 electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of non induced (NI), total (T), soluble (S), insoluble (I) protein
637 fractions of *E. coli* Rosetta2 pLysS expression strain grown in presence (+) of 0.1 mM IPTG.
638 Fractions collected during immobilised metal affinity chromatography (IMAC) and size exclusion
639 chromatography (SEC) were also analysed (W1 and W2: washing steps, E: elution). MM: molecular
640 mass marker. (B) SEC-MALS analysis of Sll0067 GST. Purified Sll0067 GST (300 µg in 300 µl of
641 lysis buffer) was separated by exclusion chromatography on an analytical Superdex200 10/300
642 column connected to a multi-angle light scattering detector (miniDAWN TREOS, Wyatt technology)
643 and a refractometer (T-rEX, Wyatt Technology). Data accumulated during the analysis were
644 processed using Astra 7 software (Wyatt Technology).

645 **Figure S5. Methylglyoxal inhibits the Sll0067-catalyzed conjugation of CDNB with GSH**
646 (A) Michaelis-Menten plot of Sll0067 enzymatic activity using CDNB and (a 1000 μ M fixed
647 concentration of) GSH as substrates, in absence or presence of MG. (B) Corresponding initial
648 velocity lines of Sll0067 activity with double-reciprocal plots in absence or presence of MG. See also
649 Table 1 for kinetic parameters. Data expressed as the mean +/- standard deviation (SD) of three
650 experiments (n=3).

651
652 *Figure S5 to be completed with data from Nicolas Rouhier and Arnaud Hecker coworkers.*

653 **Table S1. List and characteristics of the plasmids and synthetic construction used in this study.**

Plasmid	Relevant features	Reference
pGEMT	Amp ^r AT overhang cloning vector	Promega
pUC4K	Source of the Km ^r marker gene	Pharmacia
pFC1	Source of the Sm ^r /Sp ^r marker gene	(1)
pGEMT-AB<i>sll0067</i>	pGEMT with the downstream and upstream flanking sequences of <i>sll0067</i> gene, where the most of the <i>sll0067</i> coding sequences (from the 3 rd bp downstream of the ATG codon down to the stop codon) was replaced by a <i>Sma</i> I restriction site	This study
pGEMT-Δ<i>sll0067</i>::Km^r	pGEMT-AB <i>sll0067</i> with the Km ^r marker inserted in the unique <i>Sma</i> I site	This study
<i>Nde</i>I-<i>sll0067</i>-<i>Xho</i>I (synthetic)	Double strand DNA synthetic fragment (Eurofins Genomics) containing the coding sequence of the <i>sll0067</i> gene fused to His-tag with DNA flanking regions homologous to both extremities of a double digest <i>Nde</i> I <i>Xho</i> I pET-26b(+)	This study
pET-26b(+)-<i>sll0067</i>	pET-26b(+) containing the <i>sll0067</i> -His tag coding sequence under the control of the T7 promoter	This study

(1) (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994)

654

Table S2. List and characteristics of the PCR primers used in this study.

Amplification of the Km^r cassette		
KmHincII-FW	GGCGCTGAGGTCGACCTCGTGAAGAAG	Amplification of Km ^r cassette to be cloned as a <i>HincII</i> fragment
KmHincII-RV	ACCTGCAGGGGGTCGACGGAAAGCCAC	
Amplification of a fragment of the Km^r cassette		
KmFW (3)	GGTGTATGAGCCATATTCAACGGG	Amplification of Km ^r cassette to check the <i>gst</i> segregation
KmRV (4)	GGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTC	
Amplification of a fragment of the Sm^r/Sp^r cassette		
Sm/Sp-FW (7)	ATCTCGAACCGACGTTGCTG	Amplification of Sm ^r /Sp ^r cassette to check the <i>gst</i> segregation
Sm/Sp-RV (8)	CCGACTACCTTGGTGATCTC	
Inactivation of <i>sll0067</i>		
L0067-FW _a	GGAGCGCATCGAACCAAA	Amplification of the downstream flanking regions of the <i>sll0067</i> coding sequence
L0067-RV _a	TIGTTCCCGGGTACTACATGATTTTTTCTCCGATT	Amplification of the downstream flanking region of the <i>sll0067</i> coding sequence and simultaneous introduction of a <i>SmaI</i> site and a reverse-complement sequence to L0067-FW_b
L0067-FW _b	TAGTACCCGGGAACAACCAGTGACCAGATCAACCT	Amplification of the upstream flanking region of the <i>sll0067</i> coding sequence and simultaneous introduction of a <i>SmaI</i> site and a reverse-complement sequence to L0067-RV_a
L0067-RV _b	TTCTTGACCGTGGTGATTGTTTC	Amplification of the upstream flanking region of the <i>sll0067</i> coding sequence
SLL0067-FW (1)	CGTTAACCTCAAGGAAGGGG	Amplification of a fragment of <i>sll0067</i> gene to check <i>sll0067</i> segregation
SLL0067-RV (2)	CCACTGGTTAACTAGAGCTC	
Segregation of <i>sll0036</i>		
MGS-FW (5)		Amplification of a fragment corresponding to the WT chromosome or to the Km ^r mutant chromosome
MGS-RV (6)		
Km2-RV (7)		
Amplification on the insert in pET-26b(+)		
T7-FW	TAATACGACTCACTATAGGG	Amplification of the insert in pET-26b(+)
T7-RV	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
Abbreviations : FW : forward ; RV : reverse ; The numbers in brackets correspond to the one written in figures and in supplemental figures.		

IV – Les GST Sll1902 et Slr0605 ont un effet sur l'assimilation du carbone

Nous nous sommes intéressés plus tardivement aux GST Sll1902 et Slr0605 lorsque la collaboration avec l'équipe de Nicolas Rouhier et Arnaud Hecker (Interactions Arbres – Microorganismes, INRA, Université de Lorraine, UMR1136, Vandoeuvre-lès-Nancy, France) a débuté. En effet, au cours de nos échanges, ils nous ont informé avoir identifié les gènes *sll1902* et *slr0605* comme codant possiblement pour des GST proches de celles qu'ils étudient dans leur laboratoire. Par une stratégie analogue à celle utilisée pour les autres GST, nous avons donc construit et analysé le phénotype des mutants de délétion $\Delta sll1902$ et $\Delta slr0605$. Les résultats que nous avons obtenus sont prometteurs mais ne suffisent pas à proposer une « histoire » suffisamment complète et étayée pour soumettre à l'heure actuelle un manuscrit. C'est pourquoi, je fais ici le choix de présenter les résultats sous une forme plus classique et qui seront grandement discutés dans la « POSTFACE ».

A. Les gènes *sll1902* et *sll0605* ne sont pas essentiels à la croissance en photoautotrophie standard

Pour analyser *in vivo* le rôle de Sll1902 et Slr0605, j'ai construit les mutants de délétion de chacun des gènes *sll1902* et *slr0605* en utilisant la procédure standard décrite dans la section « Matériels et Méthodes ». Techniquement, la séquence codante de chaque gène a été indépendamment remplacée par une cassette de résistance à la streptomycine (Sm) et à la spectinomycine (Sp) ou à la kanamycine (Km) tout en conservant les régions amont et aval du gène *sll1902* ou du gène *slr0605* nécessaires à la recombinaison homologue assurant la délétion ciblée des gènes *sll1902* et *slr0605* (Figure 123). Les plasmides contenant ces constructions ont été introduites par transformation naturelle chez *Synechocystis* (Labarre et al. 1989). Dans chaque cas, quelques transformants ont été sélectionnés et analysés par PCR (Figure 123) pour vérifier que le marqueur de sélection Sm^r/Sp^r ou Km^r a correctement remplacé les gènes *sll1902* ou *slr0605* dans le chromosome polyploïde (10 copies par cellules, Labarre et al. 1989) de *Synechocystis*. Puis, j'ai vérifié si la ségrégation des chromosomes WT et mutants (Sm^r/Sp^r ou Km^r) était complète (le gène est alors considéré comme indispensable à la croissance) ou incomplète (le gène est dit essentiel à la viabilité).

Tous les transformants $\Delta sll1902::Sm^r/Sp^r$ et $\Delta slr0605::Sm^r/Sp^r$ possèdent uniquement des chromosomes mutants (Sm^r/Sp^r) (Figure 123, voir la présence de la bande spécifique du produit PCR de 718 pb caractéristique du chromosome $\Delta sll1902::Sm^r/Sp^r$ et $\Delta slr0605::Sm^r/Sp^r$ et constater l'absence de la bande spécifique du produit PCR de 351 ou de 354 pb typique du chromosome sauvage (respectivement *sll1902*⁺ ou *slr0605*⁺). L'absence de copies sauvages a été confirmée après de multiples repiquages sur milieu MM dépourvu d'antibiotique (pas de contre-sélection des copies sauvages *sll1902*⁺ ou *slr0605*⁺). Là encore, j'ai constaté l'absence des bandes typiques des copies sauvages. Ces résultats montrent que les gènes *sll1902* et *slr0605* ne sont pas essentiels à la croissance en photoautotrophie standard. J'ai également construit le double mutant $\Delta sll1902::Km^r \Delta slr0605::Sm^r/Sp^r$. L'analyse par PCR (voir figure 123) montre qu'il y a une ségrégation complète du gène *sll1902*, totalement remplacée par la cassette Km^r , dans un fond génétique $\Delta slr0605::Sm^r/Sp^r$.

Par souci de clarté, les simples mutants $\Delta sll1902::Sm^r/Sp^r$ et $\Delta slr0605::Sm^r/Sp^r$ et le double mutant $\Delta sll1902::Km^r \Delta slr0605::Sm^r/Sp^r$ seront respectivement nommés par la suite : $\Delta sll1902$, $\Delta slr0605$ et $\Delta sll1902-slr0605$.

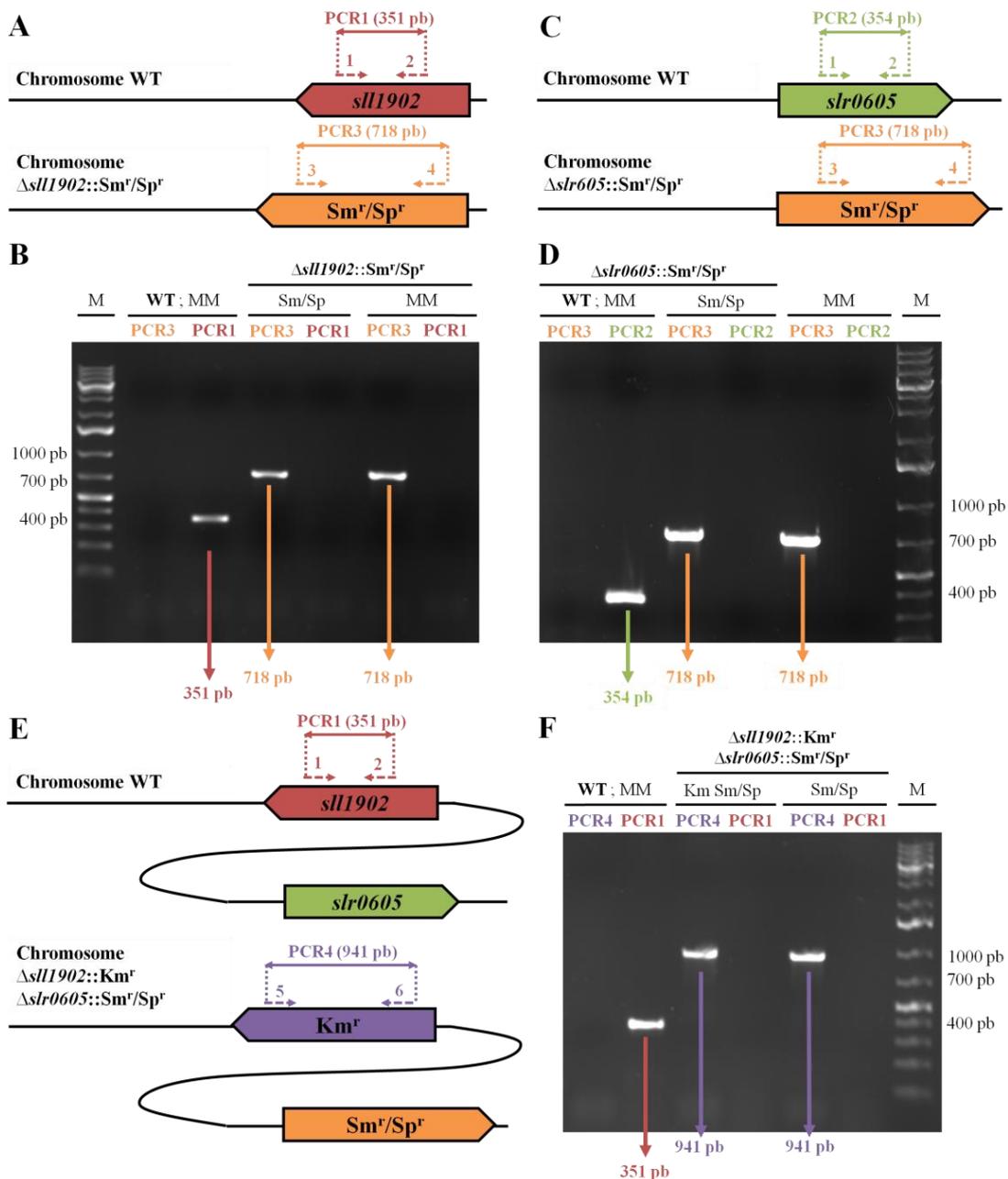


Figure 123 – Analyse des loci du chromosome de la souche WT et des mutants par PCR
 Analyse par PCR des loci du chromosome de la souche WT et des mutants cultivés en absence (MM) ou en présence d'antibiotique (Km ou Sm/Sp). (A, C et E) Les gènes sont représentés par des flèches colorées (*sll1902* : bleu ; *slr0605* : vert ; Sm^r/Sp^r : orange et Km^r : violet) orientées en direction de leur transcription. Les mêmes couleurs sont utilisées pour représenter les amorces (flèches en pointillé) et leurs produits PCR correspondants (double flèches) typiques de la présence des copies chromosomiques WT, Sm^r/Sp^r ou Km^r . (B, D et F) Photographie des gels d'agarose montrant les produits PCR correspondant aux gènes *sll1902* (PCR1 : rouge), *slr0605* (PCR2 : vert), Sm^r/Sp^r (PCR3 : orange) et Km^r (PCR4 : violet). Le puit « M » indique le marqueur de poids moléculaire (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)). Il faut noter que (1) les cellules WT ne possèdent que des copies de chromosomes WT ; (2) les mutants ne possèdent que des copies mutantes Sm^r/Sp^r et/ou Km^r .

B. La croissance du double mutant *Δsll1902-slr0605* est ralentie en absence de carbone dissous dans le milieu

Par souci de clarté dans la suite du mémoire, le milieu MM + HCO₃⁻ a une composition identique à celle du milieu MM et contient donc du carbonate de sodium (Na₂CO₃). En revanche, le milieu MM - HCO₃⁻ ne contient pas de carbonate de sodium.

La croissance des 2 simples mutants de délétion *Δsll1902* et *Δslr0605* et du double mutant *Δslr0605-sll1902* est similaire à celle de la souche WT dans le milieu MM supplémenté en ion HCO₃⁻ (figure 124, **panel A, B et C** « MM + HCO₃⁻ »), confirmant ainsi le caractère non essentiel de ces 2 gènes dans ces conditions de culture en photoautotrophie. A l'inverse, en absence d'une source de carbone inorganique dans le milieu (figure 124, **panel D, E, F et G** « MM - HCO₃⁻ »), la croissance se faisant uniquement aux dépends du CO₂ de l'air dissous dans le milieu, le double mutant *Δslr0605-sll1902* présente une croissance ralentie par rapport à la souche sauvage et aux 2 simples mutants de délétion correspondant *Δsll1902* et *Δslr0605*. De plus, au bout de 250 heures de culture, la biomasse obtenue (reflétée par la DO) est bien inférieure à celle de la souche sauvage et des 2 simples mutants.

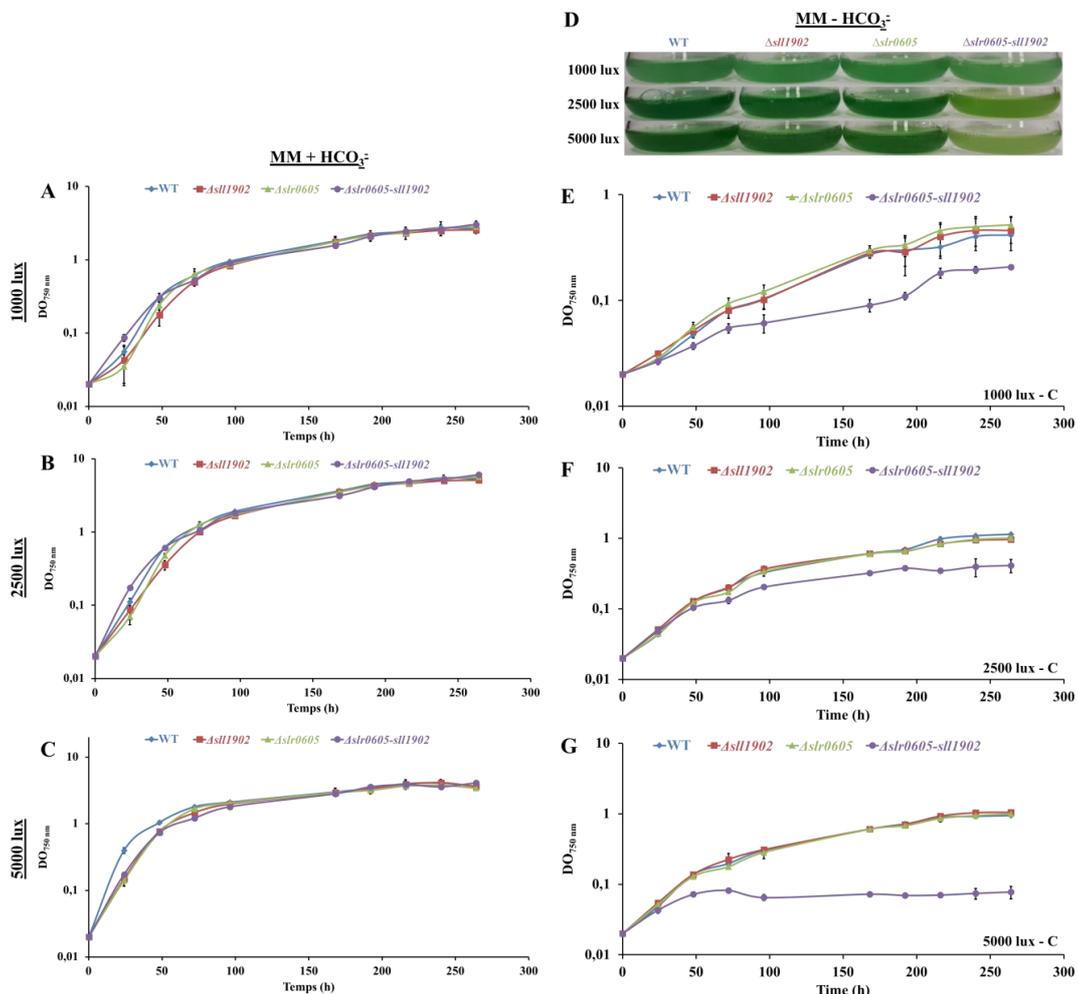


Figure 124 – La croissance du double mutant *Δslr0605-sll1902* est ralentie en absence de carbone inorganique ajouté dans le milieu

(A – C) Courbe de croissance de la souche WT et des mutants cultivés sous un éclairement de 1000 lux (A E), 2500 lux (B,F) et 5000 lux (C, G) en photoautotrophie en présence d'ion HCO₃⁻ (mettre la concentration dans le milieu) (ABC) ou absence (E,F,G). (D) Photographie de l'aspect des cultures obtenues après 48h de culture.

En plus de ce défaut de croissance, les 2 simples mutants de délétion $\Delta sll1902$ et $\Delta slr0605$ et du double mutant $\Delta slr0605-sll1902$ présentent une coloration verte-jaune lorsqu'ils sont cultivés dans le milieu MM + HCO_3^- . Cette coloration a été également observée de façon exacerbée après culture dans le milieu MM - HCO_3^- (Figure 124). J'ai donc analysé ce défaut de pigmentation par spectre d'absorption sur cellules entières et par dosage (Figure 81).

C. La composition en pigments est modifiée chez les mutants $\Delta sll1902$ et $\Delta slr0605$ et le double mutant $\Delta slr0605-sll1902$ par rapport à la souche WT

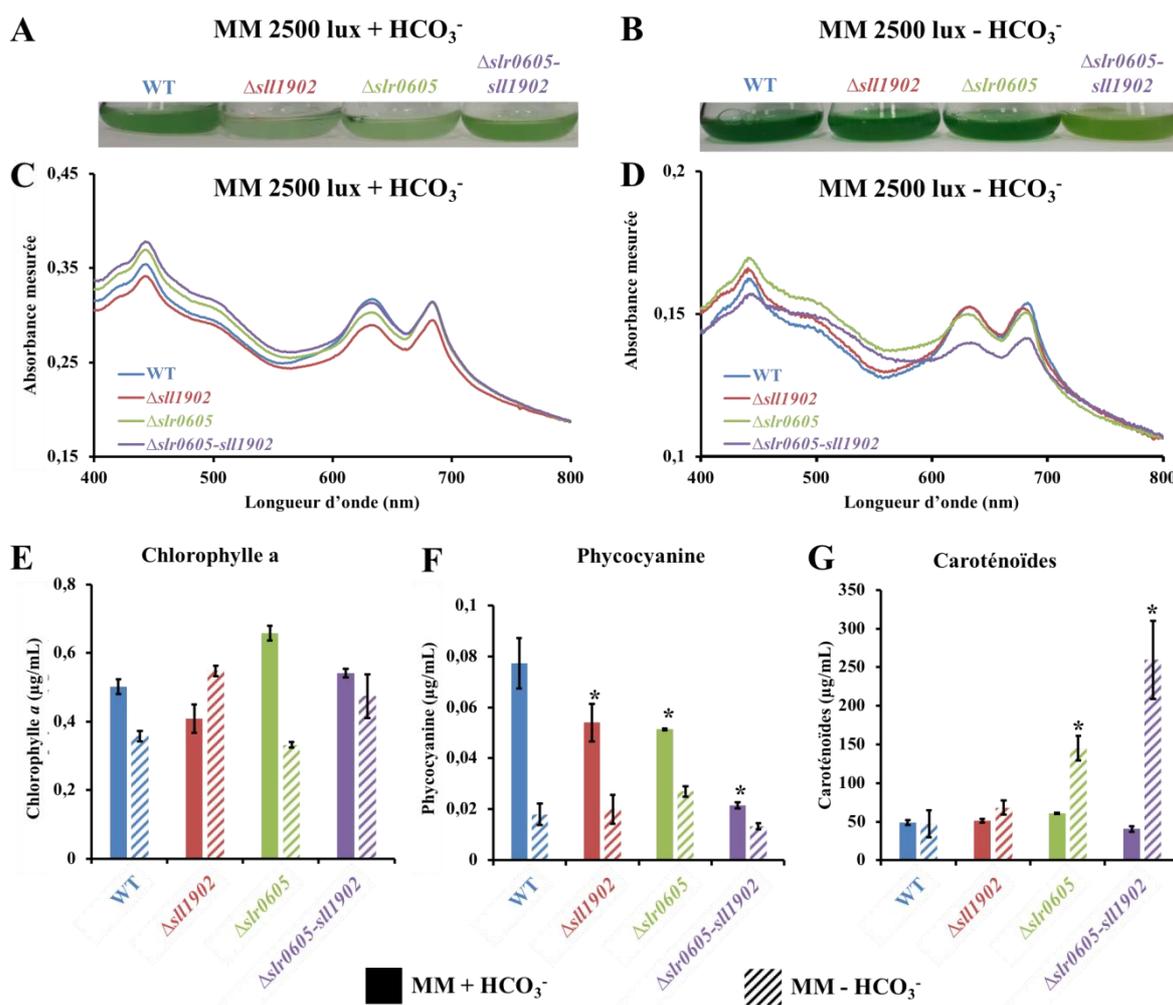


Figure 125 – Les mutants $\Delta sll1902$ et $\Delta slr0605$ ont un niveau en phycocyanine plus faible que la souche sauvage en présence de HCO_3^- alors qu'ils accumulent plus des caroténoïdes en absence d' HCO_3^-

(A et B) Photographies de cultures de la souche WT et des mutants cultivés pendant 18h en présence d'ion HCO_3^- (A) ou en absence d'ion HCO_3^- (B). (C et D) Spectre d'absorption des cultures de la souche WT et des mutants incubés pendant 18h en présence d'ion HCO_3^- (C) ou en absence d'ion HCO_3^- (D). (E à G) Contenu en chlorophylle a (E), phycocyanine (F) ou caroténoïdes (G) mesuré après culture de la souche WT et des mutants en présence d'ion HCO_3^- (histogramme plein) ou en absence d'ion HCO_3^- (histogramme hachuré).

1) *En condition de photoautotrophie en présence d'ion HCO_3^- , la coloration jaune des mutants est causée par un niveau plus faible en phycocyanine qui correspond au pigment composant l'antenne collectrice de lumière du photosystème II.*

Les 2 simples mutants de délétion $\Delta sll1902$ et $\Delta slr0605$ et le double mutant $\Delta slr0605-sll1902$ présentent une coloration verte jaune (Figure 125), compatible avec la baisse du pic correspondant aux phycobilliprotéines (620 nm). L'analyse du contenu en pigments a également confirmé une diminution du niveau de phycocyanine chez les 2 simples mutants $\Delta sll1902$ et $\Delta slr0605$. Cette diminution est exacerbée chez le double mutant $\Delta slr0605-sll1902$ (Figure 125) suggérant que la perte des gènes $sll1902$ et $slr0605$ a une influence négative sur le niveau de phycocyanine.

2) *En condition de photoautotrophie en absence d'ion HCO_3^- , la coloration jaune des mutants est dûe à une augmentation massive des caroténoïdes*

A l'inverse, lorsque le milieu est dépourvu d'ion HCO_3^- , les mutants accumulent des caroténoïdes (Figure 125) ce qui est compatible avec leur spectre d'absorption respectif (Figure 125) et explique leur coloration verte jaune (Figure 125) la quantité de phycocyanine étant similaire à celle observée dans la souche sauvage dans les mêmes conditions. La perte des gènes $sll1902$ et $slr0605$ induit de manière directe ou indirecte, dans ces conditions, une augmentation de la synthèse des caroténoïdes ou modifie leur « turnover ».

Malgré une coloration verte-jaune similaire dans les deux conditions de cultures (avec et sans HCO_3^-), ce phénotype semble causé par 2 mécanismes différents. (i) D'une part, dans le milieu MM + HCO_3^- , le phénotype semble être la conséquence d'une diminution du contenu en phycocyanine. (ii) D'autre part, dans le milieu MM dépourvu d' HCO_3^- , la coloration jaune-verte est causée par une augmentation massive des caroténoïdes. Cette différence suggère que les gènes $sll1902$ et $slr0605$ ont une influence différente et un rôle dans la gestion des pigments photosynthétiques et la réponse au stress oxydant.

Pour confirmer cette hypothèse et en considérant que le passage des cultures depuis la pièce de préparation (environ 500 lux sous la hotte à flux laminaire) jusqu'à l'incubateur (2500 lux) induit un léger stress photo-oxydant, j'ai donc caractérisé les réponses à une exposition à la lumière en présence (MM + HCO_3^- = conditions standard de photoautotrophie du laboratoire) et en absence (MM - HCO_3^-) de carbone dissous dans le milieu, chez la souche WT et les souches mutantes en analysant les variations en caroténoïdes, en ROS et en glutathion (GSH et GSSG).

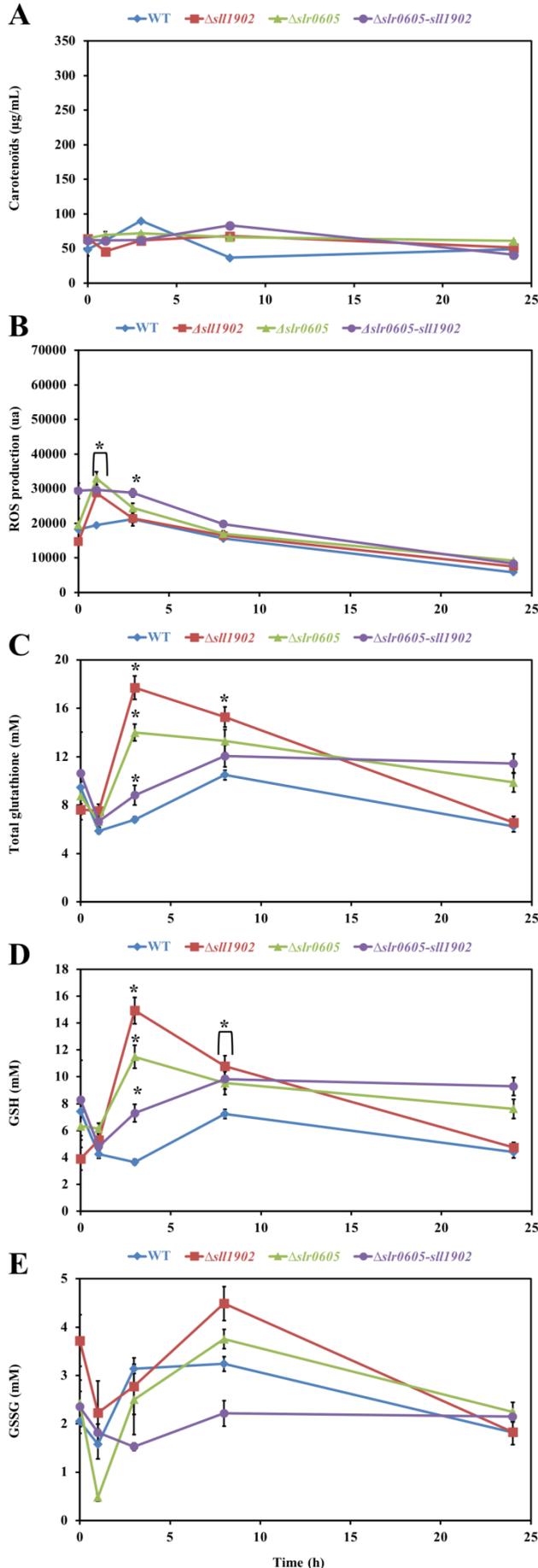


Figure 126 – Analyse cinétique de l’influence de la croissance en milieu MM + HCO₃⁻ sur l’abondance en caroténoïdes (A), en ROS (B), en glutathion total (C), en glutathion réduit GSH (D) et oxydé GSSG (E) chez la souche sauvage WT de *Synechocystis* et les mutants $\Delta sll1902$, $\Delta slr0605$ et $\Delta slr0605-sll1902$.

Les données sont expérimentées comme la moyenne ± l’écart-type de 3 essais et * indique une différence significative entre le mutant et la souche WT (*t*-test, *P* < 0,05) et pour clarté, le symbole ⊂ indique que la différence significative s’applique aux points qui sont regroupés.

D. Les 2 simples mutants $\Delta sll1902$ et $\Delta slr0605$ présentent une accumulation transitoire et séquentielle de ROS, puis de glutathion réduit (GSH) et enfin de glutathion oxydé (GSSG) alors que le double mutant $\Delta slr0605-sll1902$ ne subit pas ces variations dans les conditions standard de photoautotrophie

En présence d’ion HCO₃⁻ dans le milieu MM, j’ai observé un niveau intracellulaire de ROS plus important chez les 2 simples mutants de délétion $\Delta sll1902$ et $\Delta slr0605$ en comparaison avec la souche WT à 1h. Puis, le niveau de ROS diminue à 3h pour atteindre un niveau similaire à celui de la souche WT chez les mutants $\Delta sll1902$ et $\Delta slr0605$ (Figure 126B). Cette diminution est concomitante à l’augmentation du glutathion réduit (GSH) à 3h (Figure 126D), qui diminue entre 3 et 8h, justement lorsque le niveau de GSSG augmente (Figure 126). Enfn, les variations du niveau de caroténoïdes sont très faibles (Figure 126A) si on les compare avec celles observés en absence d’ion HCO₃⁻ dans le milieu (Figure 127).

A l'inverse chez le double mutant, le niveau de ROS n'augmente pas à 1h, puisque son niveau basal apparaît d'ores et déjà plus élevé que chez la souche WT et les 2 simples mutants $\Delta sll1902$ et $\Delta slr0605$ (Figure 126B). Le double mutant présente des variations de concentration intracellulaire en GSH très similaires à celles de la souche WT, en dépit d'un niveau légèrement plus élevé (Figure 126D). Enfin, concernant le GSSG, son niveau reste relativement stable et sa concentration intracellulaire est plus faible entre 3 et 8h en comparaison avec la souche WT et les 2 simples mutants de délétion $\Delta sll1902$ et $\Delta slr0605$ (Figure 126E). Ce résultat est difficile à expliquer en comparaison avec ceux obtenus pour les simples mutants de délétion $\Delta sll1902$ et $\Delta slr0605$.

Finalement, en présence d'ion HCO_3^- , lorsque les cellules sont exposées à la lumière (passage de la pièce de préparation des cultures (environ 500 lux) à l'incubateur (2500 lux)), un stress oxydant est induit. Ce dernier est rapidement pris en charge par un mécanisme rédox qui transforme le GSH en GSSG pour détoxifier les ROS et suggère que les GST Sll1902 et Slr0605 agissent dans la protection contre les ROS.

E. Les mutants $\Delta sll1902$, $\Delta slr0605$ et $\Delta slr0605-sll1902$ accumulent transitoirement et de façon séquentielle des ROS et des caroténoïdes et présentent un niveau plus élevé de glutathion réduit (GSH) en réponse à une exposition à la lumière dans un milieu dépourvu de carbone dissous

En absence d'ion HCO_3^- , on observe une forte accumulation de ROS chez les mutants dès 1h et qui se prolonge à 3 et 8 heures (Figure 127B). La diminution du niveau de ROS intracellulaire n'intervient qu'entre 8 et 24h de façon concomitante à l'augmentation importante des caroténoïdes chez le mutant $\Delta slr0605$ et le double $\Delta slr0605-sll1902$ (Figure 127A). Ces observations suggèrent que la perte des gènes $sll1902$ et $slr0605$ induit un stress oxydant en absence d'ion HCO_3^- dans le milieu et que la gestion de ce stress est cette fois-ci médiée par les caroténoïdes et non plus par un mécanisme GSH-dépendant.

Cette conclusion est en accord avec l'absence de variations séquentielles dans les concentrations intracellulaires en GSH (Figure 127D) et en GSSG (Figure 127E). En effet, on constate plutôt que la concentration en GSH reste relativement stable sans fluctuation chez la souche WT et les mutants (Figure 126D). La seule différence réside dans le niveau atteint en GSH qui apparaît systématiquement plus élevé chez les mutants (respectivement 8 mM et 12 mM pour les simples mutants et pour le double mutant) que chez la souche WT (4 mM) (Figure 126D). On observe également que le niveau de GSSG diminue très fortement entre 1h et 3h chez l'ensemble des souches mais restent ensuite constant autour d'une valeur de 1 mM. Ces observations semblent montrer que Sll1902 et Slr0605 agissent au niveau du métabolisme du glutathion puisque le niveau, en particulier, de GSH semble atteindre une valeur de consigne supérieure dans les mutants. Cela indique une possible dérégulation de l'équilibre rédox GSH/GSSG, qui reste à élucider.

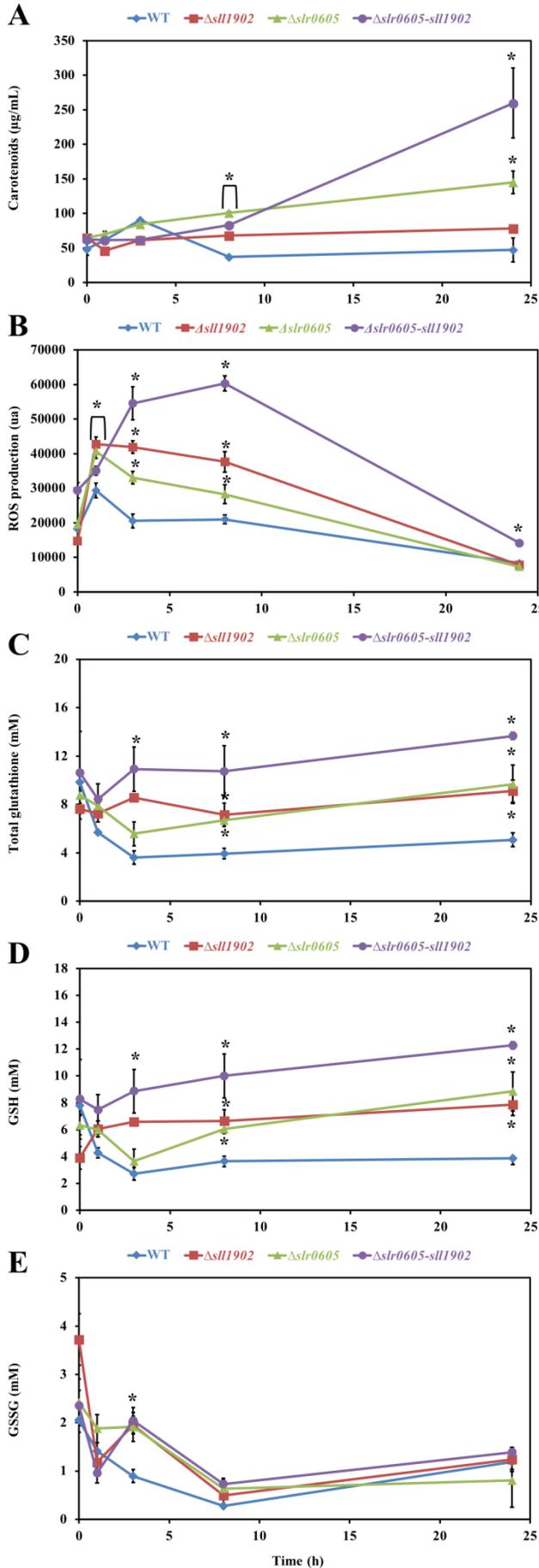


Figure 127 – Analyse cinétique de l'influence de la croissance en milieu MM - HCO₃⁻ sur l'abondance en caroténoïdes (A), en ROS (B), en glutathion total (C), en glutathion réduit GSH (D) et oxydé GSSG (E) chez la souche sauvage WT de *Synechocystis* et les mutants $\Delta slr1902$, $\Delta slr0605$ et $\Delta slr0605-slr1902$.

Les données sont expérimentées comme la moyenne \pm l'écart-type de 3 essais et * indique une différence significative entre le mutant et la souche WT (*t*-test, $P < 0,05$) et pour clarté, le symbole \sqsubset indique que la différence significative s'applique aux points qui sont regroupés.

MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE I – SOUCHES, MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE

I. Culture des cyanobactéries

A. Souche modèle de cyanobactérie utilisée

La souche sauvage de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) est issue de la collection de l'Institut Pasteur (Pasteur Culture collection of Cyanobacteria : PCC), dont les caractéristiques ont été présentées précédemment.

B. Milieux et conditions de culture des cyanobactéries

On définit ici les **conditions standard du laboratoire de croissance en photoautotrophie** pour la souche modèle *Synechocystis* comme étant une culture : sous une lumière blanche d'intensité lumineuse égale à 2500 lux ($30 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), à 30°C, sous agitation modérée (140 rpm), dans le milieu minéral BG11 (Rippka et al., 1979) supplémenté par 3,78 mM de Na_2CO_3 (Rippka et al., 1979), tamponné à pH 7 avec 6 mM d'HEPES (acide N-2-hydroxyéthylepipérazine-N'-éthane-sulfonique) et dont la composition finale en minéraux et en ETM est donnée ci-dessous :

Composé	Quantité pour 1 L de milieu	Concentration finale dans le milieu
Nitrate de sodium (NaNO_3)	3g	17,65 mM
Hydrogénophosphate de dipotassium (K_2HPO_4)	80 mg	0,18 mM
Sulfate de magnésium, heptahydraté ($\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$)	150 mg	0,30 mM
Chlorure de calcium, dihydraté ($\text{CaCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$)	72 mg	0,25 mM
Acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	12 mg	0,029 mM
Citrate d'ammonium ferrique ($(\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_7)$)	12 mg	0,016 mM
Acide éthylène-diamine-tétra-acétique de sodium ou EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$)	2 mg	0,003 mM
Carbonate de sodium (NaCO_3)	400 mg	3,78 mM
Solution AS	2 mL	/
(composition détaillée ci-dessous)	Quantité pour 1 L de solution AS	Concentration finale dans le milieu
(H_3BO_3)	2,86 g	46 μM
Chlorure de manganèse, tétrahydraté ($\text{MnCl}_2, 4 \text{H}_2\text{O}$)	1,81 g	9,2 μM
Sulfate de zinc, heptahydraté ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)	0,222 g	0,77 μM
Mobdylate de sodium, dihydraté ($\text{Na}_2\text{Mo}_4, 2 \text{H}_2\text{O}$)	0,390 g	1,60 μM
Sulfate de cuivre, pentahydraté ($\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$)	0,079 g	0,32 μM
Nitrate de cobalt, hexahydraté ($\text{Co}(\text{NO}_3), 6 \text{H}_2\text{O}$)	0,049 g	0,17 μM

Tableau 20 – Composition finale en minéraux et en éléments traces métalliques du milieu de culture BG11 modifié d'après (Rippka et al., 1979)

La culture sur milieu solide (milieu BG1 modifié supplémenté avec 10 g d'agar (Difco) pour 1L de milieu a été réalisée dans la même condition de croissance décrite ci-avant. Le cas échéant, les milieux liquides et solides ont été supplémentés avec les antibiotiques adéquats suivants : kanamycine (Km) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, streptomycine-spectinomycine (Sm/Sp) 25-75 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

II. Culture de *Escherichia coli*

A. Souches modèles d'*Escherichia coli* utilisées

Les souches d'*Escherichia coli* (*E. coli*) (dont les caractéristiques génétiques sont décrites dans le tableau ci-après) ont été utilisées comme souche receveuse des différentes constructions génétiques réalisées au cours de mes travaux.

Souche	Origine	Génotype	Intérêt
<i>Escherichia coli</i> TOP 10	Invitrogen	F <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i> λ-	Déficiencen en endonucléase (<i>endA1</i>) d'où l'amélioration de la qualité des préparations d'ADN Déficiencen en recombinaison (<i>recA1</i>) d'où l'amélioration de la stabilité des inserts La mutation <i>hsdR17</i> empêche le clivage de l'ADN cloné par le système endonucléase <i>EcoK</i> .
<i>Escherichia coli</i> C43 DE3	Pasteur (Miroux and Walker, 1996)	F <i>ompT</i> <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) (DE3) La souche C43(DE3) dérive de la souche C41(DE3) dérivant elle-même de la souche BL21(DE3)	Cette souche a été optimisée pour la surproduction de protéine membranaire ou toxique.

B. Milieux et conditions de culture des souches de *Escherichia coli*

Ces souches ont été cultivées en milieu liquide Luria-Bertani (LB) et solide correctement supplémenté avec les antibiotiques adéquats : ampicilline (Amp) 100 µg/mL, kanamycine (Km) 50 µg/mL, streptomycine-spectinomycine (Sm/Sp) 25-75 µg/mL.

III. Conservation des souches

A. Congélation des souches de cyanobactéries

L'ensemble des souches présentées dans mon étude ont été conservés dans l'azote liquide après ajout de 90 µL de DMSO à 1710 µL de cultures de cyanobactéries (qui doit être bien verte, au moins 1 semaine et demie de culture).

B. Congélation des souches de *Escherichia coli*

L'ensemble des transformants validés ont été conservés à -80°C après ajout de 450 µL de glycérol à 80 % à 1350 µL de culture poussée sur la nuit.

CHAPITRE II - CONSTRUCTION ET OBTENTION DES MUTANTS DE L'ETUDE

I. Méthodes classiques de biologie moléculaire

A. Méthodes d'extraction, de purification et de dosage d'ADN

1) Extraction-purification d'ADN génomique de *Synechocystis*

L'extraction-purification de l'ADN génomique de *Synechocystis* selon le protocole classiquement utilisé par le laboratoire décrit ci-après et nécessite le matériel suivant :

Matériels :	
-Tampon TENS (10 mM Tris HCl pH8, 1 mM EDTA, SDS 2%) - Mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (Sigma-Aldrich) - Chloroforme (Merck)	- Tampon EB (Qiagen) - Acétate de sodium 3 M - Ethanol 100% - Ethanol 70% - RNase A (Roche)
Protocole :	
1- Centrifuger 30 mL de culture $DO_{580\text{ nm}} = 0,6$	
2- Resuspendre le culot dans 400 μL de TENS et placer dans un microtube contenant 100 μL de billes de verre et ajouter 400 μL de phénol – chloroforme	
3- Vortexer 1 min (à l'aide d'un vibrax) et incuber à 60°C pendant 1 min	
4- Vortexer 3 fois une minute (avec un vibrax) et centrifuger à 12500 rpm pendant 5 min à 4°C	
5- Récupérer la phase aqueuse (celle du dessus)	
6- Centrifuger 5 min à 13000 rpm et récupérer le surnageant (éliminations des débris)	
7- Réaliser plusieurs extraction phénol-chloroforme (en agitant raisonnablement) sur le surnageant afin de le nettoyer et toujours récupérer la phase aqueuse	
8- Réaliser une extraction chloroforme	
9- Précipiter en présence de 10% d'acétate de sodium 3M et 2 volumes d'éthanol 100% (-20°C) et incuber 15 min à -20°C	
10- Centrifuger 10 min à 12500 rpm et rincer le culot avec de l'éthanol 70%	
11- Passer au speedvac pour éliminer les traces d'éthanol	
12- Resuspendre le culot dans 30 à 50 μL de tampon EB	
13- Ajouter 1 μL de RNase A (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) et incuber à température ambiante pendant 10 min	

2) *Extraction-purification d'ADN plasmidique*

L'extraction-purification d'ADN plasmidique a été réalisée au moyen du kit *NucleoSpin® Plasmid EasyPure* en suivant les instructions du fournisseur (Macherey-Nagel) dont le protocole et le principe est présenté ci-dessous :

1) Culture des cellules bactériennes :

A partir d'une culture de *Escherichia coli* sur la nuit à 37°C sous agitation (200 rpm) correctement supplémenté en antibiotique, réaliser le protocole suivant :

2) Récupération et lavage des bactéries :

- Centrifuger 4 mL de culture pendant 5 minutes à 13 000 rpm
- Eliminer soigneusement le surnageant
- Resuspendre le culot bactérien dans 150 µL de tampon de resuspension A1 par aspiration-refoulement

Le tampon de resuspension A1 contient de l'EDTA qui fragilise la membrane bactérienne et de la RNase A qui va lyser les ARN simples brins lors de l'étape suivante.

3) Lyse des bactéries :

- Ajouter 250 µL de tampon de lyse A2 et homogénéiser par retournement
- Incuber pendant 2 à 5 min

Le tampon de lyse A2 contient de la soude, il s'agit donc d'une lyse alcaline des bactéries. Elle est associée au SDS, un détergent qui déstabilise les composants lipidiques de la membrane. La lyse libère les protéines, l'ADN chromosomique et plasmidique.

- *A cette étape, le lysat cellulaire est bleu grâce au système « LyseControl » du kit. Pour contrôler la lyse à la fin de l'incubation, ouvrir le microtube et observe la présence de filament visqueux entre le haut du microtube et le bouchon. Cette observation indique que la lyse a eu lieu.*

4) Neutralisation et précipitation des protéines et de l'ADN chromosomique :

- Ajouter 350 µL de tampon de neutralisation A3 et homogénéiser par retournement jusqu'à disparation complète de la coloration bleue
- Centrifuger pendant 5 min à 13 000 rpm

Le tampon de neutralisation A3 contient de l'acétate de sodium qui précipite l'ADN chromosomique et les protéines déjà en partie dénaturées par le SDS. La centrifugation permet de séparer ce précipité blanc et les débris cellulaires du surnageant qui contient l'ADN plasmidique.

5) Adsorption de l'ADN plasmidique sur membrane de silice :

- Déposer le surnageant dans la colonne contenant la membrane de silice
- Centrifuger pendant 1 min à 13 000 rpm

La membrane de silice présente une forte affinité pour l'ADN.

6) Lavage de la colonne :

- Laver la colonne avec 450 µL de tampon de lavage AQ
- Centrifuger pendant 1 min à 13 000 rpm

Le tampon de lavage AQ contient de l'éthanol qui va éluer la majorité des molécules adsorbées

sur la membrane de silice à l'exception de l'ADN qui est insoluble dans l'éthanol.

- Centrifuger de nouveau à vide la colonne pendant 1 min à 13 000 rpm

La centrifugation permet d'éliminer les traces restantes d'éthanol puisqu'il inhibe les enzymes couramment utilisées en biologie moléculaire.

7) Elution de l'ADN plasmidique :

- Laver la colonne avec 50 µL de tampon d'élution AE
- Incuber pendant 1 min à température ambiante
- Centrifuger pendant 1 min à 13 000 rpm

La composition aqueuse du tampon d'élution AE permet l'élution de l'ADN.

3) *Extraction purification de produits PCR*

L'extraction-purification d'ADN sur gel d'agarose a été réalisée au moyen du kit *QIAquick PCR Purification Kit* en suivant les instructions du fournisseur (Qiagen) dont le protocole et le principe est présenté ci-dessous :

1) Ajustement des conditions d'adsorption de l'ADN sur la membrane de silice :

- Ajouter 5 volumes de tampon d'ajustement PB pour 1 volume de mélange réactionnel de PCR et homogénéiser par aspiration-refoulement

Cette étape permet d'ajuster les conditions pour favoriser l'adsorption de l'ADN sur la membrane de silice lors de l'étape suivante.

- *Si l'indicateur de pH a été ajouté au tampon PB, le mélange doit être de couleur jaune. Si ce mélange présente une coloration orange ou violette, ajouter 10 µL d'acétate de sodium 3 M pH 5,0 et homogénéiser, le mélange doit devenir jaune.*

2) Adsorption de l'ADN sur membrane de silice :

- Déposer le mélange d'ajustement dans la colonne contenant la membrane de silice
- Centrifuger pendant 1 min à 13 000 rpm

Cette étape permet l'adsorption de l'ADN sur la membrane de silice grâce à la forte affinité entre ADN et silice.

3) Lavage de la colonne :

- Laver la colonne avec 750 µL de tampon de lavage PE
- Centrifuger pendant 1 min à 13 000 rpm

Le tampon PE contient de l'éthanol qui élue la majorité des composants issu d'un mélange réactionnel de PCR hormis l'ADN issu de l'amplification qui reste insoluble dans l'éthanol.

- Centrifuger de nouveau à vide pendant 1 min à 13 000 rpm

La centrifugation permet d'éliminer les traces restantes d'éthanol puisqu'il inhibe les enzymes couramment utilisées en biologie moléculaire.

4) Elution de l'ADN :

- Laver la colonne avec 50 µL de tampon d'élution EB
- Incuber pendant 1 min à température ambiante
- Centrifuger pendant 1 min à 13 000 rpm

La composition aqueuse du tampon d'élution EB permet l'élution de l'ADN.

4) Méthodes de dosage d'ADN

L'ensemble des solutions d'ADN purifié (ADN plasmidique et produits PCR) ont systématiquement été validé par quantification et validation de la pureté au NanoDrop (ThermoFischer Scientific) qui repose sur l'enregistrement d'un spectre d'absorption de 220 nm à 340 nm dont une représentation est proposée dans la figure X. C'est à partir de ce spectre qu'il est possible :

- d'estimer la concentration en acides nucléiques en se basant sur une équation modifiée de la Loi de Beer-Lambert, dans laquelle on remplace $\epsilon \times l$ par un facteur f (en ng/ μ L) dont la valeur dépend de l'acide nucléique considéré : ADNdb : 50 ng/ μ L ; ADNsdb : 33 ng/ μ L et ARN : 40 ng/ μ L :

$$c = \frac{A}{\epsilon \times l}$$

c : concentration de l'analyte (en ng/ μ L)

A : Absorbance (en unités d'absorbance)

E : coefficient d'extinction molaire dépendant de la longueur d'onde (en μ L/ng/cm)

l : longueur du trajet optique (en cm)

- d'estimer la pureté de l'échantillon grâce aux rapports de pureté :
 - $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$: pour lequel une valeur égale à 1,8 correspond normalement à un échantillon d'ADN « pur » (environ 2,0 pour une solution d'ARN pure). Les solutions acides peuvent sous-représenter la valeur de 0,2 et 0,3 tout comme pour les solutions basiques,
 - $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$: pour lequel on admet qu'une solution d'ADN ou d'ARN est pure pour de valeurs comprises entre 1,8 et 2,2.

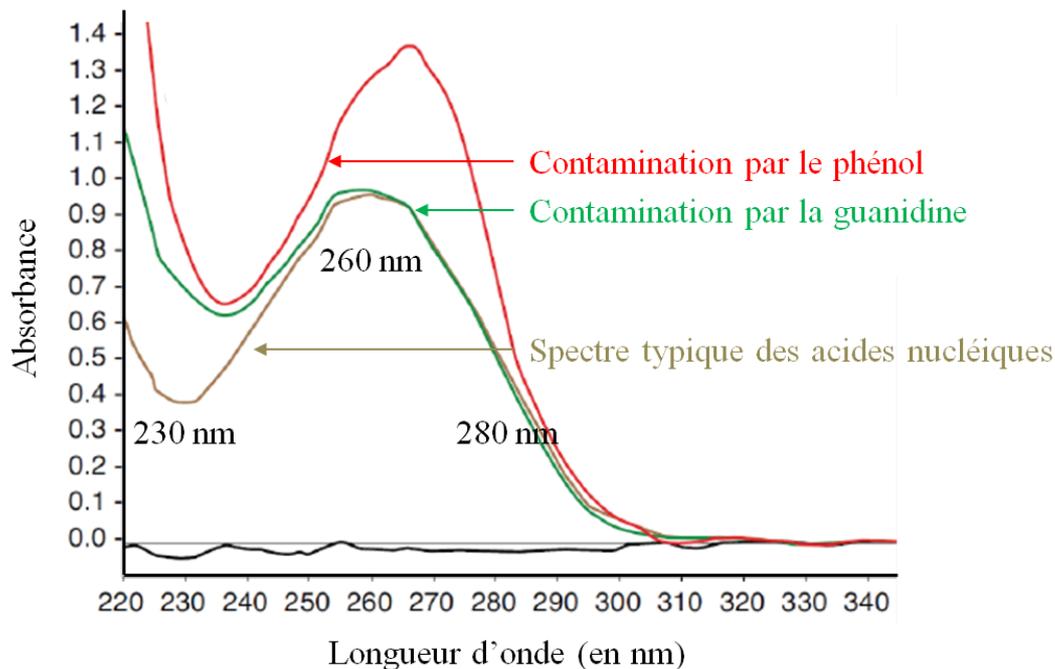


Figure 128 – Spectre typique des acides nucléiques et des principales contaminations

B. Méthodes de génération de fragments d'ADN par PCR et par digestion

1) Méthodes d'amplification par PCR

a. Taq polymérase

Les amplifications par PCR réalisées avec la Taq ADN polymérase (EP0402 ; ThermoScientific) ont été menées pour la validation de différentes étapes de clonage et en respectant les instructions du fournisseur, à savoir :

Pour la préparation du milieu réactionnel :

		Pour une réaction (50 µL) :
Tampon 10X Taq		5 µL (1X)
Mélange de dNTP à 10 mM		1 µL (1 mM)
MgCl ₂ à 25 mM		1,5 µL (0,75 mM)
Amorce à 10 µM	FW : forward ou sens	2,5 µL (0,5 µM)
	RV : reverse ou anti-sens	2,5 µL (0,5 µM)
ADN matrice		2 µL (10 pg à 1 µg)
Eau ultra-pure q.s.p 50 µL		31,75 µL
Taq ADN polymérase à 5U/µL		0,25 µL (1,25 U)

Pour le programme de PCR :

Etape	Température	Temps	Nombre de cycles
<i>Dénaturation initiale</i>	94°C	3 min	1
<i>Dénaturation</i>	94°C	30 s	25 à 40
<i>Hybridation</i>	Tm-5°C	30 s	
<i>Elongation</i>	72°C	1min/kb	
<i>Elongation finale</i>	72°C	5 à 15 min	1

b. Phusion polymérase

Les amplifications par PCR réalisées avec la Phusion ADN polymérase (F530S ; ThermoScientific) ont été menées pour la synthèse des différents fragments d'intérêt pour les clonages et en respectant les instructions du fournisseur, à savoir :

Pour la préparation du milieu réactionnel :

		Pour une réaction (50 µL) :
Tampon 10X Phusion + MgCl ₂ 7,5 mM		5 µL (1X et MgCl ₂ 1,5 mM)
Mélange de dNTP à 10 mM		1 µL (1 mM)
Amorce à 10 µM	FW : forward ou sens	2,5 µL (0,5 µM)
	RV : reverse ou anti-sens	2,5 µL (0,5 µM)
ADN matrice		2 µL (10 pg à 1 µg)
Eau ultra-pure q.s.p 50 µL		31,75 µL
Taq ADN polymérase à 5U/µL		0,25 µL (1,25 U)

Pour le programme PCR :

Etape	Température	Temps	Nombre de cycles
<i>Dénaturation initiale</i>	98°C	30 s	1
<i>Dénaturation</i>	98°C	10 s	25 à 40
<i>Hybridation</i>	Tm-5°C	30 s	
<i>Elongation</i>	72°C	1min/kb	
<i>Elongation finale</i>	72°C	5 à 15 min	1

c. PCR sur colonies

i. PCR sur colonies de *E. coli*

Pour valider les transformants de *Escherichia coli*, des PCR sur colonies ont été réalisées selon la démarche suivante :

Extraction de l'ADN génomique (chromosome et plasmides) par choc thermique

A partir d'une colonie isolée d'intérêt (*transformant – conjuguant – autres*), récolter à l'aide d'une anse/oëse ou d'un cône stérile une colonie et ensemencer la dans 20 μL d'eau stérile dans un microtube de PCR en écrasant le « bon morceau » récolté contre la paroi du microtube de PCR de manière à obtenir un milieu trouble.

Homogénéiser par aspiration-refoulement.

NB : Pour vos premières expériences, réalisez toujours 2 conditions :

- *l'une dite « avec peu de biomasse » : comme par exemple avec 1 petite colonie dans 50 μL d'eau stérile*
- *l'autre dite « avec beaucoup de biomasse » : comme par exemple 1 grosse colonie dans 20 μL d'eau stérile*

Dans tous les cas, ajuster le volume d'eau en fonction de la taille de la colonie et du trouble obtenu et tester si besoin plusieurs conditions jusqu'à trouver la condition optimale.

Contrôler visuellement la suspension (*elle doit présenter un fort trouble*).

Placer le microtube de PCR dans un thermocycleur et réaliser le programme suivant :

96°C	5 min
50°C	1 min 30
96°C	1 min 30
45°C	1 min
96°C	1 min
40°C	1 min

Centrifuger immédiatement vos échantillons à l'aide d'une micro-centrifugeuse pour microtubes PCR, pendant au moins 30 secondes, afin de faire tomber au fond les débris cellulaires pouvant inhiber la réaction de polymérisation.

Contrôler visuellement le centrifugeat (*il doit avoir un culot au fond du microtube et surnageant translucide avec un léger trouble. Si ce n'est pas le cas ou pas suffisamment : centrifuger de nouveau votre échantillon pendant 15 secondes*).

Réaction de PCR

Réaliser la réaction de PCR en respectant le protocole du fabricant correspondant à l'enzyme polymérase que vous utilisez et en utilisant 2 μL du surnageant translucide à légèrement trouble.

ii. PCR sur colonies cyanobactériennes

Pour valider les transformants de *Synechocystis*, des PCR sur colonies ont été réalisées selon la démarche suivante :

Production de biomasse sur milieu sélectif

Production de biomasse en spot à partir des colonies d'intérêt

A partir d'une colonie isolée d'intérêt (*transformant – conjuguant – autres*), réaliser un spot de 10 μL sur milieu minéral correctement supplémenté en antibiotique.

Incuber dans les conditions adéquates jusqu'à apparition d'un spot bien vert.

Production de biomasse en isolement à partir des spots obtenus précédemment

A partir du spot, récolter à l'aide d'une anse/oëse ou d'un cône stérile un « bon morceau » du spot et ensemer 50 µL de milieu minéral stérile dans un microtube en écrasant le « bon morceau » récolté contre la paroi du microtube de manière à obtenir un milieu vert.

Homogénéiser par aspiration-refoulement.

Réaliser un isolement à l'aide de la totalité des 50 µL sur milieu minéral correctement supplémenté en antibiotique.

Incuber dans les conditions adéquates jusqu'à apparition des premières colonies isolées.

Extraction de l'ADN génomique (chromosome et plasmides) par choc thermique

A partir de l'isolement, récolter à l'aide d'une anse/oëse ou d'un cône stérile un « bon morceau » du spot obtenu (*l'échantillon provient dès le départ d'une seule colonie, le terme de PCR sur colonies reste approprié et permet donc de valider clone par clone à l'issu d'une transformation*) et ensemer 50 µL d'eau ultra-pure stérile dans un microtube de PCR en écrasant le « bon morceau » récolté contre la paroi du microtube de PCR de manière à obtenir un milieu vert.

Homogénéiser par aspiration-refoulement.

Contrôler visuellement la suspension (*elle doit avoir une belle et intense coloration verte*).

Placer le microtube de PCR dans un thermocycleur et réaliser le programme suivant :

96°C	5 min
50°C	1 min 30
96°C	1 min 30
45°C	1 min
96°C	1 min
40°C	1 min

Contrôler visuellement le lysat (*il doit avoir une coloration jaune-marron*).

Centrifuger immédiatement vos échantillons à l'aide d'une micro-centrifugeuse pour microtubes PCR, pendant au moins 30 secondes, afin de faire tomber au fond les débris cellulaires pouvant inhiber la réaction de polymérisation.

Contrôler visuellement le centrifugat (*il doit avoir un culot jaune-marron-vert et surnageant translucide avec un léger trouble jaune-marron ou une légère trainée jaune-marron. Si ce n'est pas le cas ou pas suffisamment : centrifuger de nouveau votre échantillon pendant 15 secondes*).

Réaction de PCR

Réaliser la réaction de PCR en respectant le protocole du fabricant correspondant à l'enzyme polymérase que vous utilisez et en utilisant 2 µL du surnageant translucide à légèrement trouble jaune-marron.

N.B : Ce protocole a été réalisé avec succès pour les 2 souches suivantes : Synechocystis sp. PCC 6803 et Synechococcus sp. PCC 7942 pour l'amplification :

- d'ADN plasmidique exogène,
- d'ADN génomique (chromosome et plasmide).

Ce protocole a également été réalisé avec succès à l'aide des enzymes suivantes : Taq polymérase (ThermoScientific) et Phusion polymérase (ThermoScientific).

2) Méthodes de digestion par restriction enzymatique

Les digestions d'ADN par restriction enzymatique (*NdeI*, *XhoI* et *SmaI*) ont été réalisées selon le protocole du fournisseur (New England BioLabs) suivant :

	<i>Pour 50 µL final</i>
Tampon adéquat 10X	5 µL
ADN	q.s.p pour 1 µg
Eau ultra-pure	q.s.p pour 50 µL
Enzyme de restriction	10 unités (en général 1 µL)
Incuber dans les conditions de temps et de température adéquates selon l'enzyme considérée.	

Condition d'incubation	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	<i>SmaI</i>
Tampon	CutSmart	CutSmart	CutSmart
Température	37°C	37°C	25°C

C. Méthodes de clonage et transformation

1) Méthode classique par ligation

Les clonages par ligation ont été réalisés avec le kit *Quick Ligation Kit* (New England BioLabs) selon les indications du fournisseur :

Réactif	Pour 20 µL final
Quick Ligase Buffer (2X)	10 µL
Vecteur (4 kb)	50 ng (0,020 pmol)
Insert (1 kb)	37,5 ng (0,060 pmol)
Eau ultra-pure	q.s.p 20 µL
Quick Ligase	1 µL
Le ratio vecteur:insert est de 1:3. Centrifuger brièvement et incuber à 25°C pendant 5 minutes. Conserver sur glace et procéder à la transformation.	

2) Méthodes par assemblage d'ADN

Les clonages par assemblage d'ADN ont été réalisés avec le kit *NEB HiFi DNA Assembly Cloning Kit* (New England BioLabs) selon le protocole du fournisseur :

	Pour 2-3 fragments*	Pour 4-6 fragments**
Ratio molaire d'ADN recommandé	vecteur:insert = 1:2	vecteur:insert = 1:1
Quantité totale de fragments	0,030 à 0,2 pmol* X µL	0,2 à 0,5 pmol** X µL
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	10 µL	10 µL
Eau ultra-pure	10 - X µL	10 - X µL
Volume total	20 µL***	20 µL***
*L'efficacité optimale de clonage est de 50-100 ng de vecteur avec 2 fois plus d'insert		
**Pour obtenir un assemblage efficace, utiliser des régions chevauchantes > 20 pb entra chaque fragment avec équimolarité (0,050 pmol de chaque)		
***Pour un nombre plus important de fragments à assembler, augmenter le volume de réaction et ajouter plus de NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix		
Incuber à 50°C pendant 15 min (2-3 fragments) ou 60 min (4-6 fragments) puis conserver sur glace pour une transformation immédiate ou à -20°C pour une transformation ultérieure		

3) Transformation par choc thermique de cellules chimiocompétentes

La préparation des cellules chimiocompétentes et la transformation par choc électrique ont été réalisées selon « V. Simanis in D. Hanahan. DNA cloning vol. I p121. Glover DM (ed) 1985, IRL Press, Oxford » et dont le détail est donné ci-après :

a. Fabrication des tampons dédiées à la préparation des cellules chimiocompétentes

<p><u>- Tampon RF1 (pour 1 L)</u> 12 g de chlorure de rubidium 9,9 g de chlorure de manganèse tétrahydraté 2,94 g d'acétate de potassium 1,5 g de chlorure de calcium dihydraté 150 g de glycérol Ajouter 500 mL d'eau distillée Ajuster le pH à 5,8 avec de l'acide acétique à 0,2 M ou à 100% (dans ce dernier cas 1-2 goutte(s) suffisent). Ne pas utiliser de soude sinon le tampon va précipiter Compléter à 1 L avec de l'eau distillée Filtrer sur 0,45-0,22 µm</p>	<p><u>- Tampon RF2 (pour 1 L).</u> 2,09 g de MOPS 1,2 g de chlorure de rubidium 11 g de chlorure de calcium dihydraté 150 g de glycérol. Ajouter 500 mL d'eau distillée Ajuster le pH à 6,8 avec NaOH. Compléter à 1 L avec de l'eau distillée Filtrer sur 0,45-0,22 µm</p>
<p>Avant de filtrer, rincer le filtre en filtrant 1 mL d'eau distillée stérile, afin d'éliminer certains composés potentiellement toxiques (présents dans le filtre).</p>	
<p><u>- Milieu SOB1 (pour 1 L)</u> 20 g Bactotryptone 5 g Yeast extract 10 mL de NaCl 1M (10 mM final) 2,5 mL de KCl 1M (2,5 mM final) H₂O q.s.p 1 L Autoclaver 30 min (120°C 1 bar).</p>	<p><u>- Milieu SOB2 (20 mL)</u> 4,07 g de MgCl₂, 6H₂O (1 M final) 4,93 g de MgSO₄, 7H₂O (1 M final) H₂O q.s.p 20mL Filtrer (0,45-0,22 µm), aliquoter en fraction de 1 ml dans des tubes Eppendorf et stocker au congélateur à -20°C.</p>
<p><u>- Milieu SOC2 (20 mL)</u> 7,2 g de glucose (2M final) Ajuster à 20 mL avec H₂O distillée. Filtrer (0,45-0,22 µm), aliquoter en fraction de 1 mL dans des microtubes et stocker au congélateur à -20°C.</p>	
<p>- 1 L de SOB=1 L de SOB1 + 10 mL de SOB2 - 1 mL de SOC= 1 mL de SOB + 10 µl de SOC2 <u>- 1 mL de SOC= 1 mL de SOB1 + 10 µL de SOB2 + 10 µL de SOC2</u> Cette recette doit produire un SOC à pH final = 7,00</p>	

b. Préparation des cellules chimiocompétentes

- La veille, inoculer avec 100 µL du stock de cellules à -70°C, une préculture de 5 mL SOB et incuber toute la nuit à 37°C
- Inoculer une culture de 80-100 mL de SOB (dans un erlen d'1 L) en mettant 1 mL de préculture et incuber à 37°C sous agitation rapide (300 rpm) jusqu'à $DO_{600\text{ nm}} = 0,4-0,5$. Cela prend de 2-4 heures
- Stopper brutalement la croissance en transférant le plus vite possible l'erlen de l'incubateur (37°C) dans un mélange eau plus glace (0°C). Utiliser un volume de bain marie glacé suffisamment grand pour que le niveau du mélange de refroidissement soit plus haut que celui du SOB dans l'erlen de culture.
- Attendre 10 min puis transvaser la suspension cellulaire dans des tubes à centrifuger préalablement refroidis dans la glace
- Laisser de nouveau 10 min, centrifuger pendant 1 min à 4°C à 10000 rpm puis éliminer soigneusement le surnageant
- Ajouter 5 mL de milieu RF1 dans chaque tube et vortexer pour resuspendre soigneusement le culot, puis mélanger les 2 culots dans 1 seul tube puis ajouter 20 mL de RF1. Laisser 15-30 minutes dans la glace
- Centrifuger 15 min à 3000 rpm à 4°C puis éliminer le surnageant et resuspendre avec 5 mL de RF1, compléter ensuite à 30 mL en ajoutant 25 mL de RF1 et laisser 15-30 min dans la glace
- Centrifuger 15 min à 3000 rpm à 4°C puis éliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 6,4 mL de RF2. Laisser les cellules 15 min dans la glace puis aliquoter en fractions de 200 µL, dans des microtubes prérefroidis dans la glace (environ 32 microtubes)
- Congeler les tubes 1 min dans l'azote liquide et conserver à -80°C

c. Transformation par choc thermique

- Pour 50 µL de cellules chimiocompétentes, ajouter 2 µL de la solution d'ADN à transformer (2 µL)
- Tapoter doucement le microtube et incuber 30 min sur glace
- Réaliser un choc thermique en transférant le microtube à 42°C pendant 45 sec puis de nouveau sur glace
- Ajouter 950 µL de milieu SOC ou LB et incuber à 37°C sous agitation pendant 1h
- Etaler sur milieu sélectif* (préalablement préchauffé à 37°C, 100 µL :
 - d'une dilution au 1/10
 - non dilué
 - de la totalité restante après centrifugation pendant 5 min à 5000 rpm
- Incuber à 37°C

4) Méthodes de validation des constructions plasmidiques obtenues par carte de restriction par digestion enzymatique, par PCR et par séquençage

La validation des constructions plasmidiques obtenues au cours de mes travaux de thèse a été réalisés de manière systématique et selon la stratégie suivante :

- Culture sur la nuit en présence des antibiotiques adéquats (*vérification de la présence des cassettes de sélection par résistance aux antibiotiques*)
- Purification de l'ADN plasmidique (*cf. protocole du kit NucleoSpin® Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel)*)
- Validation du plasmide par carte de restriction et/ou par PCR au moyen d'amorces standardisés pour l'amplification de l'insert (*vérification de la présence de l'insert*)
- Validation de l'insert par séquençage (*vérification de l'absence de mutation dans l'insert*) au moyen du kit *Mix2Seq Kit (Eurofins Genomics)* selon le protocole suivant de préparation des échantillons :

- Préparer 15 μL d'ADN purifié aux concentrations suivantes :
 - Pour un plasmide (jusqu'à 15 kb) : 50-100 $\text{ng}/\mu\text{L}$
 - Pour un produit PCR :
 - 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (150-300 pb)
 - 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (300-1000 bp)
 - 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (>1000 bp)
- Ajouter 2 μL de l'amorce souhaitée à 10 μM

Pour la suite du mémoire et par simplicité, les caractéristiques des amorces, des constructions synthétiques et des plasmides présentés dans ce mémoire sont décrites respectivement dans les annexes n°2, 3 et 4.

II. Construction des mutants de délétion des gènes *gst*

A. Principe général de construction et d'obtention de mutants de délétion chez *Synechocystis*

La stratégie de clonage, tel que représentée dans la figure ci-dessous, repose sur : **(i) la construction d'une cassette de délétion** (portée par un vecteur plasmidique) comportant une cassette de résistance à un antibiotique (Atb^R) encadré par une région a et un région b respectivement homologue des régions amont et aval de la séquence codante du gène à déléter. *Synechocystis* étant naturellement compétente, **(ii) une étape de transformation** permet d'introduire de la cassette de délétion chez *Synechocystis*. La présence des plateformes d'homologie et la présence d'une machinerie de recombinaison homologue chez *Synechocystis* permet **(iii) l'intégration de la cassette de délétion en lieu et place du gène à déléter par un évènement de recombinaison homologue** qui survient dans l'une des 10 copies du génome de *Synechocystis* (Labarre et al., 1989). Enfin, *Synechocystis* a la particularité de ne conserver que des copies identiques de son génome. Tirant profit de cette propriété, **(iv) l'étape de ségrégation** permet de favoriser la dissémination des copies mutantes (notées Atb^R) dans l'ensemble des copies du génome en incubant les transformants en présence de concentration en antibiotique élevée (par rapport à la concentration usuelle). Néanmoins, il existe 2 cas. Le premier correspond à l'obtention d'un mutant dit « ségrégré » c'est-à-dire que l'ensemble des copies du génome sont mutantes (Atb^R) et qu'il n'existe plus de copies du gène d'intérêt. Le gène est alors considéré comme non essentiel à la croissance dans les conditions du laboratoire d'obtention du transformant (le plus souvent en photoautotrophie standard). Le second correspond à un mutant « non ségrégré » pour lequel on constate encore la présence de copies du gène d'intérêt malgré plusieurs générations sur milieu sélectif. Le gène est alors qualifié d'essentiel à la croissance dans les conditions d'obtention du transformant.

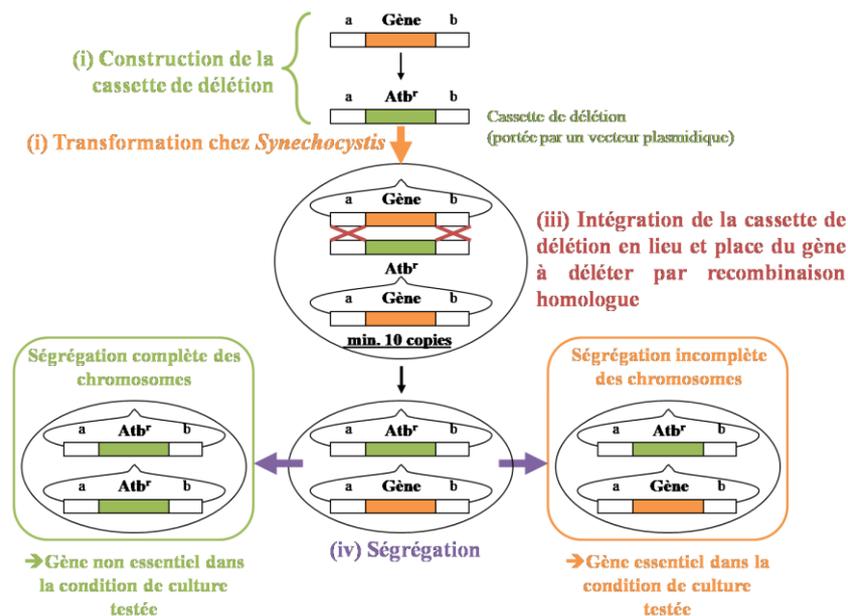


Figure 129 – Représentation schématique du principe de l'obtention de mutants de délétion chez *Synechocystis*

B. Construction des simples mutants de délétion

1) Principe des 2 stratégies de construction des simples mutants Δ_{gst} utilisées dans l'étude

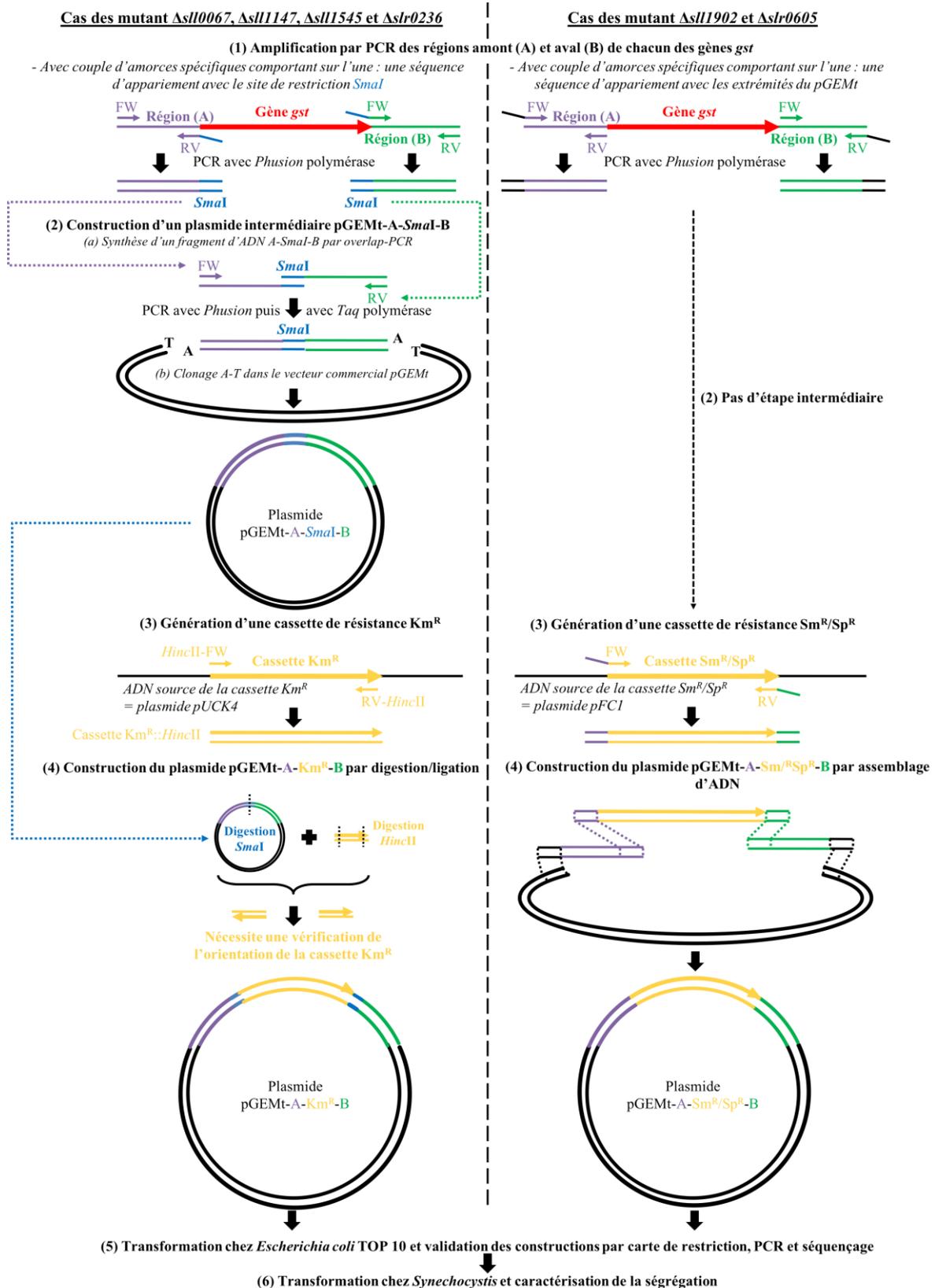


Figure 130 – Représentation schématique du principe des 2 stratégies de construction des mutants de délétion Δ_{gst}

2) Etape n°1 - Amplification par PCR des régions amont (A) et aval (B) des gènes *gst*

Les régions d'ADN amont (A) et aval (B) (d'environ 500 pb) encadrant la séquence codante de chacun des gènes *gst* (*sll0067*, *sll1147*, *sll1545*, *slr0236*, *sll1902* et *slr0605*) ont été indépendamment amplifiés par PCR (Phusion, Invitrogen) à l'aide des couples d'amorce spécifique.

Stratégie suivie pour l'obtention des mutants Δ *sll0067*, Δ *sll1147*, Δ *sll1545* et Δ *slr0236*

Les couples d'amorces utilisées dans ce cas présentent les caractéristiques suivantes :

- séquence permettant l'amplification des régions amont (A) et aval (B) cibles
- séquence permettant l'hybridation par complémentarité de base des fragments PCR des régions amont (A) et aval (B) via une séquence d'appariement contenant le site de restriction *SmaI* située :
 - en 5' de l'amorce (RV) amplifiant (A)
 - en 5' de l'amorce (FW) amplifiant (B)

3) Etape n°2 – Construction d'un plasmide intermédiaire pGEMt-A-*SmaI*-B

La stratégie suivie ici repose sur la construction d'un plasmide intermédiaire pGEMt-A-*SmaI*-B par les 2 étapes suivantes :

(1) Génération d'un fragment d'ADN A-*SmaI*-B par PCR d'assemblage

Ces 2 régions d'ADN ont ensuite été assemblées par PCR d'assemblage (Heckman and Pease, 2007) en un unique segment d'ADN comportant un site de restriction *SmaI* à la jonction des 2 régions amont et aval.

(2) Clonage A-T par ligation du fragment A-*SmaI*-B dans le vecteur pGEMt

Après clonage par ligation dans le vecteur plasmidique commercial pGEMt (Promega), les constructions plasmidiques obtenues annotées « pGEMt-A-*SmaI*-B » ont été validés par carte de restriction, par PCR et par séquençage (Mix2Seq Kit, Eurofins Genomics), en particulier pour vérifier l'absence de mutation dans les plateformes d'homologie A et B à l'issue d'une transformation chez *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen).

Stratégie suivie pour l'obtention des mutants Δ *sll1902* et Δ *slr0605*

Les régions amont (A) de chacun des gènes *gst* (*sll1902* et *slr0605*) ont été amplifiés par PCR au moyen de couple d'amorces spécifiques dont l'amorce sens (FW) présente à son extrémité 5' une séquence de 20 pb minimum dite « d'appariement » complémentaire de la séquence de l'extrémité 3' du plasmide linéarisé commercial pGEMt.

Les régions aval (B) de chacun des de chacun des gènes *gst* (*sll1902* et *slr0605*) ont été amplifiés par PCR au moyen de couple d'amorces spécifiques dont l'amorce anti-sens (RV) présente en 5' une séquence de 20 pb minimum complémentaire de la séquence de l'extrémité 5' du plasmide commercial pGEMt.

Une stratégie de clonage par assemblage d'ADN permettrait ainsi d'obtenir un assemblage dans l'ordre suivant :

- pGEMt-A-Sm^R/Sp^R-B-pGEMt

4) Etape n°3 - Génération d'une cassette de résistance *Atb^R*

Stratégie suivie pour l'obtention des mutants *Δsll0067*, *Δsll1147*, *Δsll1545* et *Δslr0236*

Génération d'une cassette de résistance à la kanamycine (Km^R) par amplification par PCR et par digestion

La cassette Km^R a été obtenue par amplification par PCR à partir du plasmide pUCK4 comme ADN matrice et au moyen d'un couple d'amorces spécifiques comportant le site de restriction *HincII* générant ainsi un fragment d'ADN $Km^R::HincII$.

Stratégie suivie pour l'obtention des mutants *Δsll1902* et *Δslr0605*

Génération d'une cassette de résistance à la streptomycine-spectinomycine (Sp^R/Sm^R) par amplification par PCR

La cassette Sp^R/Sm^R a été obtenue par amplification par PCR à partir du plasmide pFC1 (Marraccini et al., 1993) comme ADN matrice et au moyen d'un couple d'amorces spécifiques générant la cassette Sp^R/Sm^R dont les extrémités 5' et 3' sont respectivement identique à :

- l'extrémité 3' de la région (A),
- l'extrémité 5' de la région (B).

5) Etape n°4 – Clonage

Clonage par digestion-ligation

Les plasmides pGEMt-*ABgst* correctement validés ont ensuite été digérés par l'enzyme de restriction *SmaI* (New England BioLabs ; NEB) pendant 1h à 25°C dans le tampon adéquat (NEB) afin d'y insérer la cassette Km^R . Le fragment $Km^R::HincII$ a également été digéré par l'enzyme de restriction *HincII* (NEB) pendant 1h à 37°C dans le tampon X (NEB).

Ces 2 fragments ont ensuite été clonés par ligation en respectant les instructions du fournisseur (Quick Ligation Kit, NEB).

Clonage par assemblage d'ADN

Le clonage par assemblage d'ADN a été réalisé conformément aux instructions du fournisseur (NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix, New England BioLabs)

6) Etape n°5 - Transformation chez *Escherichia coli* et validation des transformants

Les différentes transformations ont été réalisées avec la souche chimio-compétentes de *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) conformément au protocole décrit précédemment et à partir de 2 μ L du mélange réactionnel de ligation ou d'assemblage. Les transformants obtenus sur milieu solide ont été repiqués en milieu liquide correctement supplémenté en antibiotique (5 à 10 clones par transformation) puis incubés sur la nuit. A partir des clones positifs en culture liquide, une extraction-purification des plasmides a été réalisée à l'aide d'un kit afin d'en réaliser la validation par carte de restriction par digestion enzymatique, par PCR (à l'aide du couple d'amorce SP6/T7) et par séquençage pour vérifier en particulier la séquence des plateformes d'homologie A et B. Les clones validés à chaque étape ont été congelés et conservés à -80°C en présence de glycérol à 80 % comme cryoprotecteur.

7) Etape n°6 - Transformation chez *Synechocystis* et caractérisation de la ségrégation

a. Transformation

Bien que *Synechocystis* soit naturellement compétente, sa compétence est maximale (et donc l'efficacité de transformation qui en découle sera meilleure) pour une culture repiquée à plusieurs reprises en milieu de phase exponentielle.

En conséquence, chacune des transformations a été réalisée à partir d'une culture repiquée au moins 2 fois en milieu de phase exponentielle puis transformée selon le protocole suivant :

A partir d'une culture à 30°C, sous agitation 140 rpm, sous une lumière standard de 2500 lux :

- 1) Préparation de la suspension cellulaire de *Synechocystis* à transformer
 - Centrifuger 40 mL pendant 20 min à 5000 rpm à température ambiante
 - Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 5 mL de milieu MM
 - Vortexer pleine puissance et ajouter de nouveau 5 mL de milieu MM
 - Centrifuger à nouveau pendant 20 min à 5000 rpm à température ambiante
 - Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 5 à 10 mL de milieu MM (selon le nombre de transformation réalisée)
 - Aliquoter en fraction de 1 mL la suspension cellulaire de *Synechocystis* dans des tubes en verre stérile prévu à cet effet

- 2) Préparation de la solution d'ADN à transformer
 - Diluer 1 à 2 µg d'ADN dans 100 µL de tampon Tris-EDTA 100X
 - Mélanger par aspiration-refoulement

- 3) Transformation
 - Ajouter, au 1 mL de suspension cellulaire de *Synechocystis*, la solution d'ADN à transformer préalablement préparée
 - Homogénéiser par aspiration-refoulement
 - Incuber les suspensions cellulaires de *Synechocystis* (témoin négatif compris) en déposant les tubes en verre stérile à l'horizontale sur une étagère de la pièce lumineuse à 30°C avec une intensité lumineuse de 3500 lux pendant 1h30
 - Etaler $n \times 100$ µL sur milieu solide MM (sans antibiotique, avec les boîtes spécifiques à la transformation (NUNC)) et incuber à différentes intensités lumineuses à 30°C pendant une nuit

b. Caractérisation de la ségrégation

Le protocole de ségrégation a 2 rôles : (i) sélectionner les transformants ayant intégré au moins une copie de l'ADN souhaité par recombinaison homologue, en constatant leur résistance à l'antibiotique adéquat (l'antibiotique est donc ajouté lors de la ségrégation) et (ii) disséminer la cassette dans l'ensemble des copies du génome (pour rappel *Synechocystis* possède 10 copies de génome par cellule). La figure ci-après donne un exemple de protocole de ségrégation.

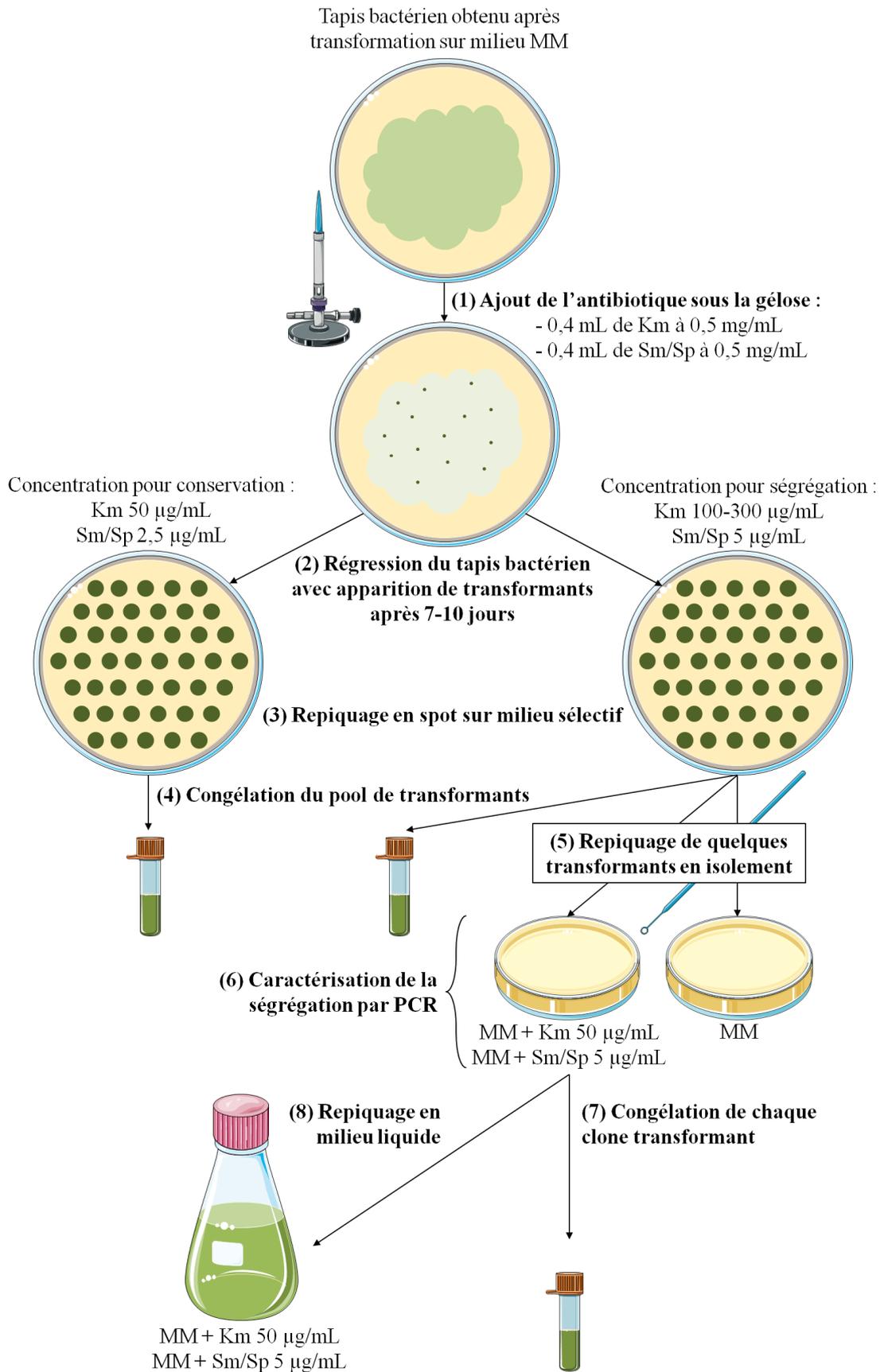


Figure 131 – Représentation schématique d'un exemple de protocole de ségrégation

C. Construction des doubles mutants de délétion $\Delta sll1545-slr0236$ et $\Delta sll1902-slr0605$

1) Construction du double mutant $\Delta sll1545-slr0236$

Succinctement, le double mutant $\Delta sll1545-slr0236$ (formellement $\Delta sll1545::Sm^R/Sp^R-sll1545^+\Delta slr0236::Km^R$) a été obtenu par transformation du plasmide pGEMt-AB $sll1545-Sm^R/Sp^R$ chez le simple mutant de délétion $\Delta slr0236::Km^R$ de *Synechocystis*. Ce plasmide a été obtenu par une stratégie de clonage par assemblage d'ADN (NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix, NEB) entre le vecteur pGEMt-AB $sll1545$ préalablement digéré par l'enzyme de restriction *Sma*I et une cassette Sm^R/Sp^R obtenue par amplification par PCR à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques portant à leur extrémité 5' des séquences de chevauchement d'assemblage identique à l'extrémités 3' du plasmide pGEMt-AB $sll1545$ pour l'amorce sens et à l'extrémité 5' de ce même plasmide pour l'amorce anti-sens. La transformation et la caractérisation de la ségrégation chez ce double mutant a été réalisée comme précédemment décrite.

2) Construction du double mutant $\Delta sll1902-slr0605$

Le double mutant $\Delta sll1902-slr0605$ (formellement $\Delta sll1902::Km^R\Delta slr0605::Sm^R/Sp^R$) a été obtenu par transformation du plasmide pGEMt-AB $sll1902-Km^R$ chez le simple mutant de délétion $\Delta slr0606::Sm^R/Sp^R$ de *Synechocystis*. La caractérisation de la ségrégation chez ce double mutant a également été réalisée comme précédemment décrite.

III. Construction de mutants de complémentation fonctionnelle hétérologue chez *Synechocystis* et construction de plasmides de surexpression des GST cytosoliques de *Synechocystis*

A. Construction de mutants de complémentation fonctionnelle hétérologue $\Delta sll1147::pR-hmGST2/3-Sm^R/Sp^R$

La stratégie d'obtention des mutants de complémentation fonctionnelle hétérologue repose sur le remplacement de la cassette de délétion Km^R chez le mutant $\Delta sll1147$ par les constructions synthétiques présentées dans la figure ci-après.

1) Caractéristiques des constructions synthétiques pR-hmGST2 et pR-hmGST3

Les constructions synthétiques pR-hmGST2 et pR-hmGST3 ont été pensées *in silico* en combinant le promoteur fort pR (contenant sa boîte -35 (TTGACT), sa boîte -10 (GATAAT), son site d'initiation de la transcription (site +1 : A) et la séquence de Shine Dalgarno ou Ribosome Binding Site (RBS) (AAGGAGG)) en phase avec la séquence codante respective des gènes humains adaptés au biais de codon cyanobactérien codant la protéine hmGST2 ou hmGST3. La société Eurofins Genomics a ensuite été mandatée pour la synthèse de ces 2 constructions dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 21 – Caractéristiques des constructions synthétiques réalisées par Eurofins Genomics

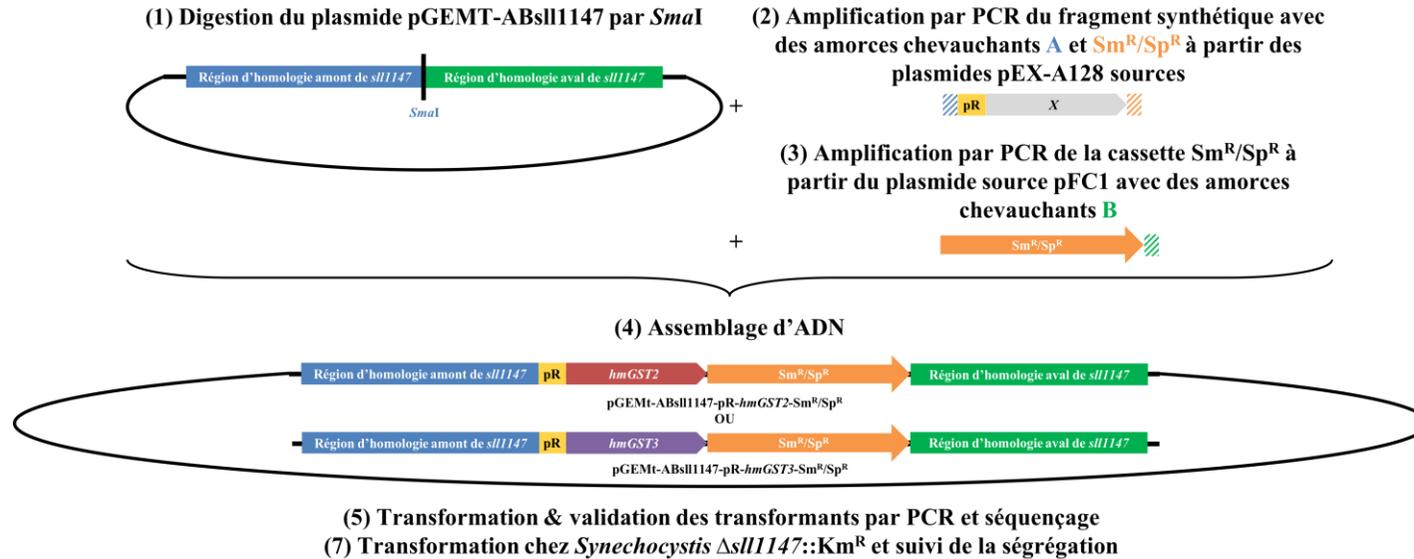
Fragment synthétique	Nature et caractéristiques		Taille	Résistance	Quantité
pR-hmGST2	Lyophilisat	Plasmide pEX-A128 contenant le fragment pR-hmGST2	2959 pb	Amp ^R	3 µg
pR-hmGST3		Plasmide pEX-A128 contenant le fragment pR-hmGST3	2974 pb	Amp ^R	4,3 µg

Ces 4 lyophilisats ont été dissous dans du tampon TE pour obtenir une concentration finale de 100 ng/µL.

2) Stratégie expérimentale

La stratégie d'obtention des mutants de complémentation fonctionnelle hétérologue repose sur le remplacement de la cassette de délétion Km^R chez le mutant $\Delta sll1147$ par la construction des plasmides pGEMt-ABsll1147-pR-hmGST2/3- Sm^R/Sp^R par assemblage d'ADN entre :

- le plasmide pGEMt-ABsll1147 précédemment obtenu lors de la démarche de construction du simple mutant $\Delta sll1147$ et qui comporte les régions amont et aval du gène *sll1147* qui seront nécessaires à l'évènement de recombinaison homologue remplaçant la cassette Km^R par de nouvelles constructions,
- les fragments d'ADN synthétique composé du promoteur fort pR en phase avec la séquence codante de :
 - o la MAPEG humaine hmGST2 (dont la séquence est présentée dans la figure ci-après),
 - o la MAPEG humaine hmGST3 (dont la séquence est présentée dans la figure ci-après),
- et la cassette de résistance Sm^R/Sp^R .



pEX-pR-
hmGST2

Plasmide pEX-A128 (Eurofins genomics) contient la construction synthétique pR-*hmGST2* :

```
acaccgtgctgTTGACTattttacctctggcgetGATAATggttgcAgtactaacgaagTCATATGGCCGGCAATTCATTTTGTGGCCGCCGTGCCATTTGTCCGCCTGTCAACAATCCTATT
TTGCCTTGCAAGTGGCAAAGCCCGGTTGAAATATAAAGTGACCCCCCGCCGTGACCGGCTCCCCGAATTTGAACGGGTGTTTCGGGCCAACAAAATTGTGTG
GAATTTTATCCCATTTTATTATTACCTTGTGGATGGCCGGCTGGTATTTTAATCAAGTGTGGCCACCTGTTGGGCTTGGTGATAATTTATGGCCGCATTTGTATTTTG
GGCTATCCGAAGCCGCCAAAAACGGATTACCGCTTTCGGTTGTCTTGGGCATTTGGCCTTGTGTACCTTGTGGCCGCTTGGGCATTGCCAATTCCTTTTTG
GATGAATATTTGGATTGAAATTTGCCAAAAAATTGCGCGGCAATTTTAA
```

Séquence protéique correspondante (Uniprot ID = Q99735):

```
>MGST2_HUMAN Microsomal glutathione S-transferase 2 OS=Homo sapiens
MAGNSILLAAVSILSACQSYFALQVGKARLKYKVTTPAVTGSPEFERVFRAQQNCVEFYPIFIITLWMAGWYFNQVFATCLGLVYIYGRHLYFWGYSEAARKRITGFRLSL
GILALLLTGALGIANSFLDEYLDLNIARKLRRQF
```

pEX-pR-
hmGST3

Plasmide pEX-A128 (Eurofins genomics) contenant la construction synthétique pR-*hmGST3* :

```
acaccgtgctgTTGACTattttacctctggcgetGATAATggttgcAgtactaacgaagTCATATGGCCGTGTTGCCAAAGAATATGGCTTGTGTTGTTGACCGCGCCGCTCCTTTATTATGG
TGGCCATTTGGCCATTAATGTGTCCAAAGCCCGGAAAAATATAAAGTGAATATCCCATATGATCCCGATCCCGAAAATGGCCATTTTTAAATGTATTCAAC
GGGCCATCAAATACCTTGAAGTGTATCCCCCTTTTGTTTTTTTGGCCGTGGCGCGGTATCATCCCCGATTGCCTCCGGCTTGGGCTTGGCCTGGATTGTG
GGCCGGGTGTTGTATGCCTATGGCTATATACCGGCGAACCCCTCCAAACGGTCCCGGGGCGCCTTGGGCTCCATATGCCTTGTGGGCTTGGTGGGCACACCGTGTGT
CCGCTTCAACATTTGGGCTGGGTGAAATCCGGCTTGGGCTCCGCCCCAAATGTTGTCATTA
```

Séquence protéique correspondante (Uniprot ID = O14880):

```
>MGST3_HUMAN Microsomal glutathione S-transferase 3 OS=Homo
sapiensMAVLSKEYGFVLLTGAASFIMVAHLAINVSKARKKYKVEYPIMYSTDPENGHIFNCIQRHQNTLEVPFPLFFLAVGGVYHPRIASGLGLAWIVGRVLYAYGYTGTG
EPSKRSRGAALGSIALLGLVGTTCVSAFQHLGWVKSGLGSPKCCCH
```

Le promoteur pR est composé d'une boîte -35 (TTGACT), d'une boîte -10 (GATAAT), du site +1 d'initiation de la transcription (A) et de la séquence de Shine d'Algaro (ribosome bind site; aacgaag) provenant du gène *cro* du phage lambda fusionné au site de restriction *NdeI* (CATATG) en phase avec la séquence codante de *hmGST2* et *hmGST3* adaptée au biais de codon cyanobactérien.

Figure 132 – Représentation schématique de la stratégie de construction des cassettes de complémentation fonctionnelle

a. *Etape n°1 – Validation des plasmides pEX-A128 et pEX-A258 contenant les constructions synthétiques pRmGST2, pRmGST3 et pRsl1147GFP*

Le plasmide pGEMt-ABsl1147 précédemment obtenu pour l'obtention du mutant $\Delta sl1147a$ été digéré par l'enzyme *SmaI* (New England Biolabs) conformément aux spécifications du fournisseur.

b. *Etape n°2 – Amplification des fragments synthétiques*

Les fragments d'ADN synthétiques pR-*hmGST2* et pR-*hmGST3* ont été amplifiés par PCR (Phusion Polymérase) à l'aide d'amorces spécifiques comportant des séquences de chevauchement nécessaire au clonage par assemblage d'ADN et conformément aux instructions du fournisseur.

c. *Etape n°3 – Amplification de la cassette Sm^R/Sp^R*

La cassette Sm^R/Sp^R a été amplifiée par PCR (Phusion Polymérase) à l'aide d'amorces spécifiques comportant des séquences de chevauchement nécessaire au clonage par assemblage d'ADN et conformément aux instructions du fournisseur.

d. *Etape n°4 – Clonage par assemblage d'ADN*

Le clonage par assemblage d'ADN a été réalisé à l'ai du kit *NEB HiFi DNA Assembly Cloning Kit* (New England BioLabs) en respectant scrupuleusement les instructions du fournisseur. Ensuite, 2 μ L du mélange d'assemblage ont été transformés chez *Escherichia coli* TOP10. Parmi les transformants obtenus, quelques-uns ont été caractérisés et validés par PCR et séquençage. Une fois validé, le plasmide final obtenu pGEMt-ABsl1147-pR-*hmGST2*- Sm^R/Sp^R ou pGEMt-ABsl1147-pR-*hmGST3*- Sm^R/Sp^R ont été transformés chez la souche mutante $\Delta sl1147$ de *Synechocystis*. Un protocole classique de suivi de la ségrégation a été mis en place pour démontrer le remplacement de la cassette de délétion $\Delta sl1147::Km^R$ par les cassettes de complémentation $\Delta sl1147::pR-hmGST2/3-Sm^R/Sp^R$.

B. *Stratégie de construction du mutant $\Delta sl1147::pR-sll0067-Km^R$*

En guise de contrôle négatif pour les expériences de complémentation, j'ai choisi de remplacer la cassette de complémentation $\Delta sl1147::pR-hmGST3-Sm^R/Sp^R$ par une cassette $\Delta sl1147::pR-sll0067-Km^R$, afin de vérifier (i) d'une part, que les phénotypes de complémentation observés en présence du gène *hmGST3* ne sont pas dû à une mutation secondaire suppresseur ailleurs dans le génome de *Synechocystis* et (ii) d'autre part, que ces phénotypes sont spécifiques au MAPEG et non pas une propriété commune à toutes les GST.

Cette cassette de « non-complémentation » a été construite par une stratégie d'assemblage d'ADN analogue dans le pGEMt par ordre d'assemblage entre : (i) la région amont du gène *sll1147* fusionné au promoteur pR en 3', (ii) le gène *sll0067*, (iii) la cassette Km^R et (iv) la région aval du gène *sll1147*.

C. Construction des plasmides de surexpression des gènes *gst* pour l'analyse biochimique et catalytique des GST de *Synechocystis*

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Nicolas Rouhier et Arnaud Hecker (Interactions Arbres – Microorganismes, INRA, Université de Lorraine, UMR1136, Vandoeuvre-lès-Nancy, France), j'ai été amené à construire les plasmides pET-26b(+) contenant et surexprimant les protéines SII0067, SII1545, SIIr0236, SII1902 et SIIr0605 étiquetées en C-terminal par un tag 6-His.

La stratégie expérimentale, représentée dans la figure ci-dessous, repose sur la construction *in silico* de fragments d'ADN double brin synthétique composé de la séquence codante de chacune des GST d'intérêt fusionné respectivement en 5' et en 3' avec la séquence identique à (i) l'extrémité 3' et (ii) l'extrémité 5' du plasmide pET-26b(+) double digéré par *NdeI* et *XhoI*. Ainsi, un assemblage d'ADN assure directement le clonage en phase de la séquence codante de chaque GST avec le promoteur T7 et l'opérateur LacO d'une part et avec l'étiquette 6-His d'autre part, tout en conservant les sites *NdeI* et *XhoI*.

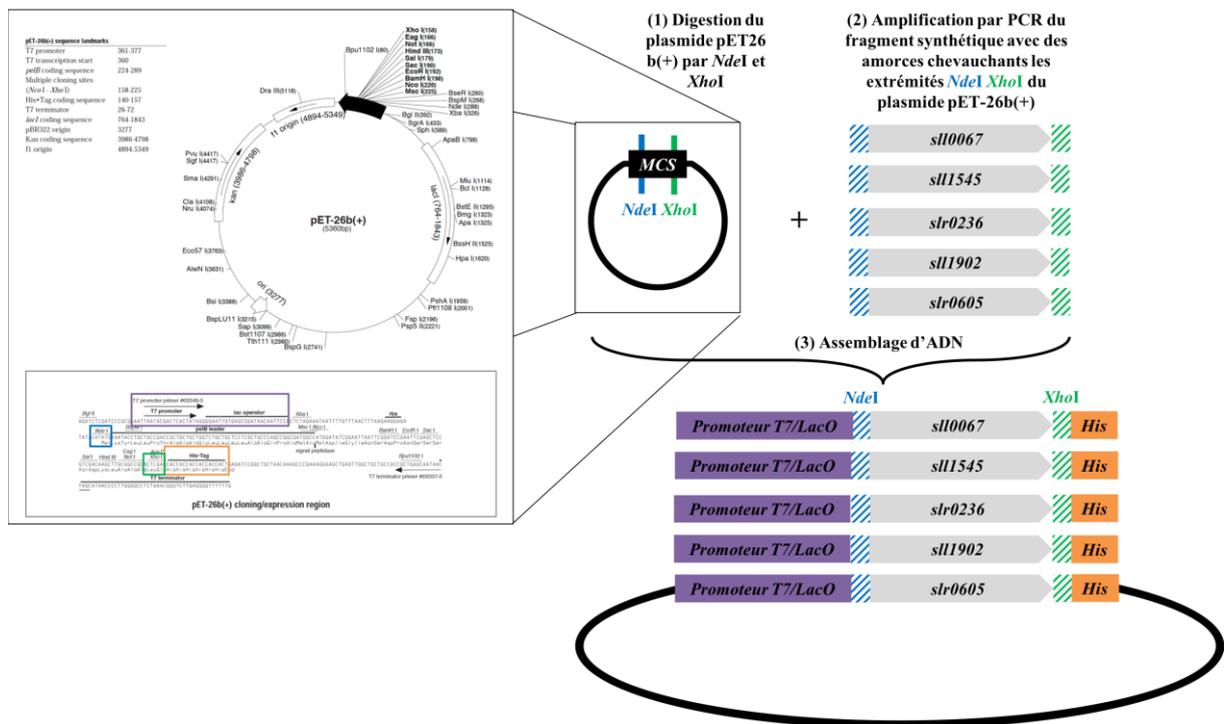


Figure 133 – Représentation schématique de la stratégie expérimentale de construction des plasmides de surexpression des GST cytosoliques de *Synechocystis*

CHAPITRE III - ANALYSE DES MUTANTS DE L'ETUDE

I. Analyse phénotypique de tolérance-sensibilité aux stress chez les mutants Δgst

A. Objectifs, stratégie générale et stress étudiés

1) Stratégie générale d'identification de phénotypes de tolérance-sensibilité

L'analyse phénotypique des mutants Δgst a été conçue pour identifier rapidement et de façon systématique les stress pour lesquels un ou plusieurs mutants présentent un phénotype de tolérance-sensibilité par rapport à la souche WT. Elle repose sur 3 stratégies :

- la première repose sur une **analyse comparative en milieu liquide (ACML)** avec :
 - o une détermination préalable de la CMI en agent toxique sur la souche WT,
 - o une comparaison de la CMI, de l'aspect macroscopique des cultures (coloration, présence d'agrégats/floculats...) et de la croissance ($DO_{580\text{ nm}/750\text{ nm}}$),
 - o une analyse de survie (AS),
- la deuxième se base sur une **analyse comparative en milieu solide (ACMS)** via la comparaison la croissance en spot,
- et la dernière a été réalisée par **courbe de croissance (CC)**.

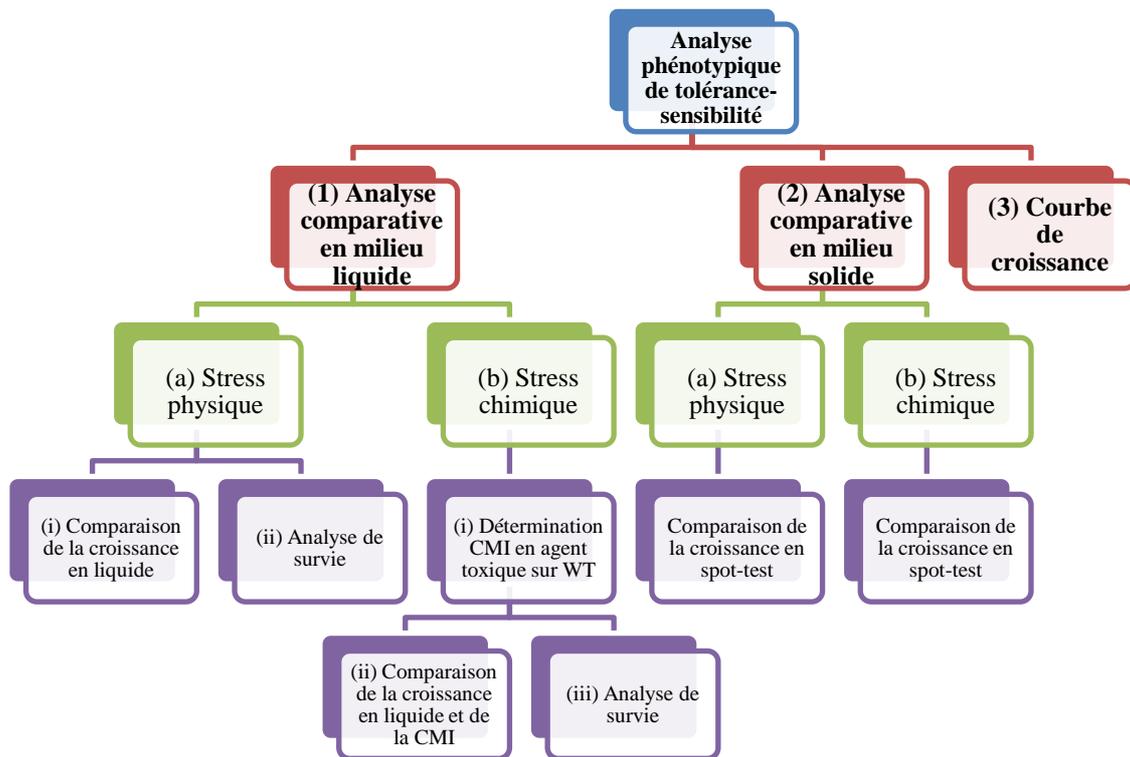


Figure 134 – Organigramme de la stratégie globale de recherche de phénotypes de tolérance-sensibilité aux stress

2) Stress étudiés

Les stress étudiés au cours de mes travaux sont listés dans le tableau ci-après.

Stress étudiés	Tests réalisés	Référence	Stress étudiés	Tests réalisés	Référence
Stress photo-oxydant			Terpènes acycliques (suite)		
Stress lumineux			<i>Monoterpènes (C10) monocycliques de type p-menthane</i>		
500 lux	ACML/ACMS	/	(-)-β-citronellol (C10)	CMI	27483
1750 / 2500 / 5000 / 7500 lux	ACML/ACMS/CC	/	(+/-)-linalool (C10)	CMI	51782
10000 lux	ACML/ACMS/CC	/	(-)-linalool (C10)	CMI	62139
Stress oxydant			Géranol (C10)	CMI	48798
Bleu de méthylène	ACML/AS/CC		Nérol (C10)	CMI	50949
Menadione	ACML/AS/CC		Citral (C10)	CMI	C83007
Peroxyde d'hydrogène	ACML/AS/CC		Farnesol (C15)	CMI	43348
n-tertbutyl-hydroperoxyde	ACML/AS/CC		Nerolidol (C15)	CMI	00459
Stress métabolique			Squalène (C30)	CMI	442785
Glycérol	ACML/ACMS/AS/CC		Terpènes cycliques		
Méthylglyoxal	ACML/AS/CC		<i>Monoterpènes (C10) bicycliques de type camphane-bornane</i>		
Glucose 50 mM + 500 lux	CC		(R)-(+)-limonène	CMI/ACML	
Glucose 50 mM + 2500 lux	CC		(S)-(-)-limonène	CMI/ACML	
Glucose 50 mM + 5000 lux	CC		α-terpinène	CMI	86473
Stress thermique			γ-terpinène	CMI	86476
30 / 34 / 39 / 42 / 45°C	ACML/AS /CC		Terpinolène	CMI	86485
Stress xénobiotique			p-cymène	CMI	C121452
Test réalisés			Terpinéol	CMI	77663
Alcools & solvants			Menthone	CMI	95401
Ethanol (CH ₂ -CH ₂ -OH)	ACML		(+)-carvone	CMI	22070
Butan-1-ol (CH ₃ -(CH ₂) ₃ -OH)	ACML		(-)-carvone	CMI	22060
Isobutanol (CH ₃) ₂ -CH-CH ₂ -OH)	ACML		<i>Monoterpènes (C10) bicycliques de type carane-thujane</i>		
Dodécane	ACML		Δ-3-carène	CMI	94415
Terpènes & terpénoïdes			<i>Monoterpènes (C10) bicycliques de type pinane</i>		
Terpènes acycliques			(+)-α-pinène	CMI/ACML	
Isoprène (C5)	CMI		(-)-α-pinène	CMI/ACML	
Alloocimène (C10)	CMI		(+)-β-pinène	CMI/ACML	
(+)-β-citronellène (C10)	CMI		(-)-β-pinène	CMI/ACML	
(+/-)-citronellal (C10)	CMI	27470			
(-)-β-citronellol (C10)	CMI	51381			

ACML : Analyse comparative en milieu liquide ; ACML : Analyse comparative en milieu solide ; AS : Analyse de survie ; CC : Courbe de croissance ; CMI : Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Tableau 22 – Liste des stress étudiés et des différents tests réalisés

B. Recherche systématique de phénotypes par analyse comparative

1) En milieu liquide : aspect macroscopique des cultures, CMI et croissance

La recherche systématique de phénotypes de tolérance-sensibilité en milieu liquide a été réalisé au moyen de 3 étapes : (i) par détermination préalable de la CMI en agent toxique sur la souche WT, (ii) par une analyse comparative de paramètres qualitatifs (aspect macroscopique des cultures : coloration verte, présence d'agrégats/floculats...) et de paramètres quantitatifs (CMI et croissance : valeur de la CMI pour chaque souche, valeur de la $DO_{580/750\text{ nm}}$), et (iii) par analyse de la survie.

a. Détermination préalable de la CMI en agent toxique sur la souche sauvage

Objectif et principe : La CMI ou Concentration Minimale Inhibitrice est la plus petite concentration en agent toxique pour laquelle on observe plus de croissance après 72h d'incubation dans les conditions standard de photo-autotrophie en milieu MM. Elle permet alors d'identifier les concentrations adéquates à tester comme représenté ci-dessous :

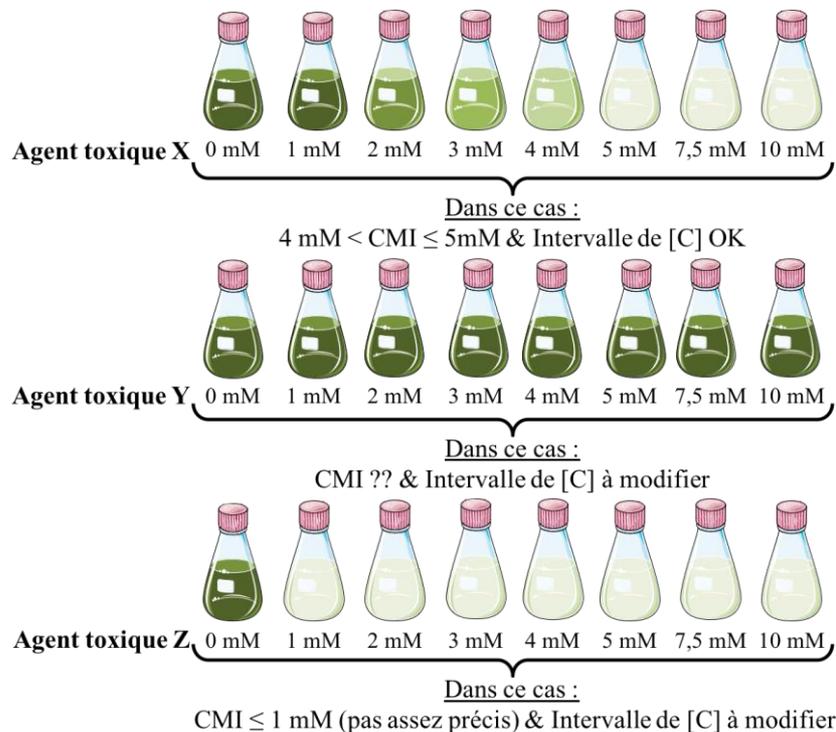


Figure 135 – Principe et intérêt de la détermination de la CMI en agent toxique sur la souche WT de *Synechocystis*

Dans le cas de l'agent toxique X, il est possible de déterminer la CMI et l'intervalle de concentration testé est judicieux car il permettra d'identifier à la fois des phénotypes de tolérance et de sensibilité. Pour l'agent Y, la CMI étant inconnue, il est impossible d'être certain dans ces conditions d'identifier un quelconque phénotype de tolérance-sensibilité. Enfin, pour l'agent Z, la CMI est connue mais elle peut être très inférieure à 1 mM (0,1 mM par exemple), il est nécessaire de trouver un intervalle de concentration plus précis.

Démarche expérimentale :

A partir de 50 mL de pré-culture en milieu de phase exponentielle de la souche WT de *Synechocystis* :

- (1) Préparer un volume suffisant de culture calibrée à $DO_{580\text{ nm}} = 0,1$, en milieu MM
- (2) Distribuer en n fractions de 10 mL
où n représente le nombre de conditions testées pour la souche WT et détermine alors le volume de culture à préparer (exemple : pour 10 conditions à tester, il faut distribuer 10×10 mL, soit un volume de culture d'au moins 100 mL)
- (3) Ajouter le volume adéquat de solution de toxique pour obtenir la concentration finale souhaitée en toxique dans le milieu de culture
- (4) Incuber pendant 72h dans les conditions de photo-autotrophie standard (2500 lux)
- (5) Après incubation, prendre en photo les cultures et analyser les résultats pour déterminer, d'après la CMI, l'intervalle de concentration à tester pour discriminer des phénotypes de tolérance-sensibilité entre la souche WT et les mutants Δgst

Cette démarche n'a pas été réalisée pour les stress physiques (température et lumière), puisque les optimums de croissance sont déjà connus. Cette analyse n'a donc été réalisée que pour les stress chimiques (stress oxydant et stress métabolique) et pour l'étude de la toxicité des terpènes sur la souche WT. Dans ce dernier cas, l'incubation a été réalisée sous une intensité lumineuse de 1750 lux.

b. Analyse comparative de la CMI, de l'aspect macroscopique des cultures et de la croissance en absence/présence de stress entre la souche WT et les souches mutantes Δgst

Objectif et principe : L'analyse repose sur la comparaison de l'aspect macroscopique (aspect, coloration, présence d'agrégats...), de la CMI et de la croissance ($DO_{580/750\text{ nm}}$) des cultures en milieu liquide, pour identifier la sensibilité ou la tolérance des mutants Δgst par rapport à la souche WT, tel que représenté ci-après.

Dans cet exemple, le mutant $\Delta gst1$ est plus sensible que la souche WT, puisque l'aspect macroscopique, en particulier, l'intensité de la coloration verte est plus faible pour une même dose (à 2 mM par exemple). La DO mesurée en sera également diminuée. Et, la CMI est clairement plus faible pour la souche $\Delta gst1$ que pour la souche WT. Par cette même interprétation, on en déduit ainsi que le mutant $\Delta gst2$ est plus tolérant que la souche WT, puisque l'intensité de la coloration est plus grande que celle de la souche WT pour des doses qui lui sont normalement toxiques. Enfin, le mutant $\Delta gst3$ présente un phénotype similaire à la souche sauvage (WT-like) car aucune différence n'est observable.

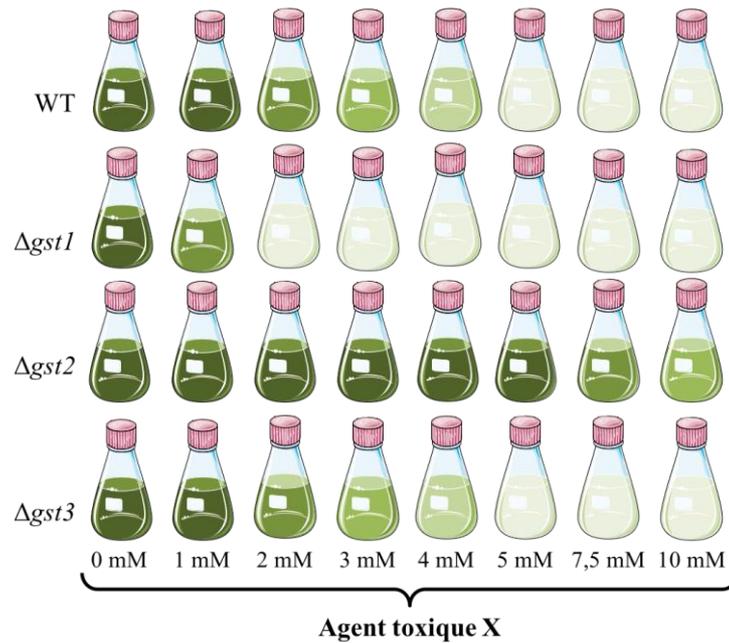


Figure 136 – Principe de l’analyse comparative en milieu liquide par comparaison de la croissance et de la CMI pour l’identification de phénotype de tolérance-sensibilité des mutants Δ gst en milieu liquide

Démarche expérimentale :

A partir de 50 mL de pré-culture en milieu de phase exponentielle de chacune des souches testées :

- (1) Préparer un volume suffisant (≈ 100 à 250 mL) de culture calibrée à $DO_{580\text{ nm}} = 0,1$ en milieu MM, supplémenté ou non en antibiotique, pour chacune des souches testées
- (2) Distribuer chaque culture en n fractions de 10 mL

où n représente le nombre de conditions testées par souche et détermine alors le volume de culture à préparer (exemple : pour 25 conditions à tester, il faut distribuer 25×10 mL, soit un volume de culture d’au moins 250 mL)

(3)

Cas des stress physiques :

- Incuber pendant 24h dans les conditions de lumière ou de température à tester

Cas des stress chimiques :

- Ajouter le volume adéquat de solution de toxique pour obtenir la concentration finale souhaitée en toxique dans le milieu de culture
- Incuber pendant 72h dans les conditions de photo-autotrophie standard (2500 lux)

- (4) Après incubation, prendre en photo les cultures et analyser les résultats pour déterminer, par comparaison, la tolérance-sensibilité des souches Δ gst vis-à-vis de la souche WT

L’analyse de survie a été systématiquement réalisée sur les mutants présentant un phénotype de tolérance-sensibilité mais également sur ceux apparaissant comme visuellement identique à la souche WT. En effet, la coloration verte d’une culture ne présume en rien de la viabilité des cellules. Et, ce d’autant plus que l’œil n’est pas capable de distinguer une culture présentant une $DO_{580/750\text{ nm}}$ égale à 1 d’une culture à $DO_{580/750\text{ nm}}$ égale à 2. En cela, l’analyse de la viabilité et des survivants est indispensable.

c. Analyse de la survie

Objectifs et principe : Confirmer les phénotypes identifiés par détermination et comparaison du pourcentage de survie entre la souche WT et les mutants Δgst après une exposition de 24 à 72h à un stress. Cette analyse repose donc sur une numération des survivants :

Pour la condition sans stress :

On calcul le nombre d'Unités Formant Colonies (UFC) selon la formule suivante :

$$N_{\text{UFC/mL sans stress}} = n_{\text{UFC comptées}} / (V_{\text{spot}} \times d)$$

On considère que le nombre d'Unités Formant Colonies (UFC) vaut 100 %.

Pour chaque condition avec stress :

On calcul le nombre d'UFC selon la formule suivante :

$$N_{\text{UFC/mL avec stress}} = n_{\text{UFC comptées}} / (V_{\text{spot}} \times d)$$

On détermine ensuite le pourcentage de survie en comparant $N_{\text{UFC/mL avec stress}}$ à $N_{\text{UFC/mL sans stress}}$ selon la formule suivante :

$$\% \text{ de survie} = (N_{\text{UFC/mL essai}} / N_{\text{UFC/mL témoin}}) \times 100$$

On peut alors comparer la survie entre les souches en traçant $N_{\text{UFC/ML}} = f(\% \text{ de survie})$.

Démarche expérimentale :

A partir des cultures obtenues en absence/présence de stress après 72h d'incubation (stress chimique) OU A partir des cultures obtenues après 24h d'incubation dans des conditions de température ou d'intensité lumineuse différents (stress physique) :

- (1) Déposer un aliquote de 100 μL de chaque souche/condition sur une microplaque 96 puits
- (2) Réaliser des dilutions sérielles au $1/10^{\text{ème}}$ de chaque aliquot
- (3) Déposer 10 μL des aliquotes non dilués et de chaque dilution à l'aide d'une pipette multicanaux sur un milieu MM gélosé non supplémenté en antibiotique
- (4) Laisser sécher puis incuber pendant 5 à 7 jours à 30°C à 2500 lux

La figure présentée ci-après propose une représentation schématique et illustrée de la stratégie complète de la recherche systématique de phénotypes par analyse comparative en milieu liquide suivie de l'analyse de survie.

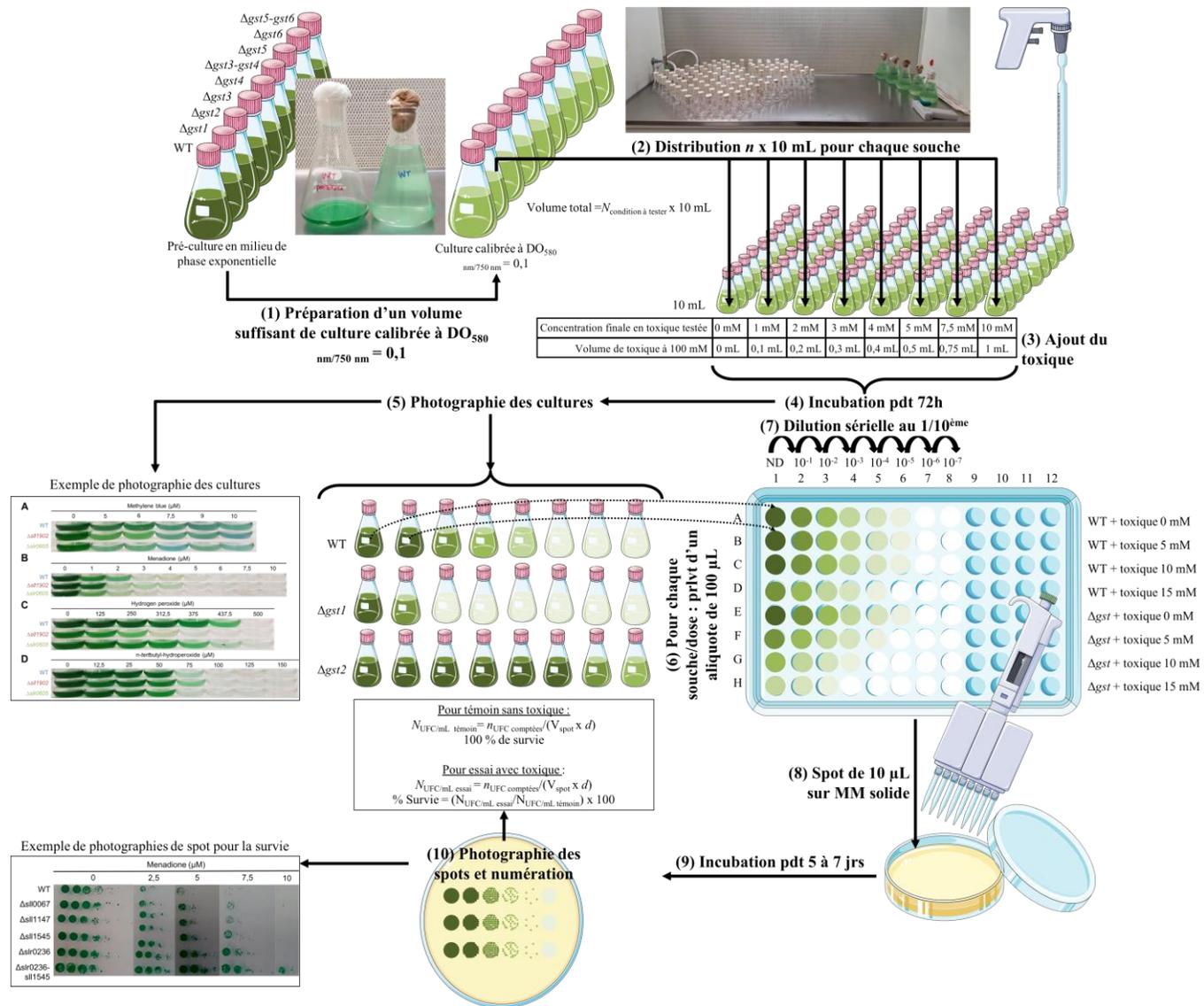


Figure 137 - Représentation schématique de la démarche expérimentale de l'analyse comparative en milieu liquide et de l'analyse de survie

2) En milieu solide

Objectif et principe : Identifier des phénotypes de tolérance-sensibilité chez des mutants par comparaison de la croissance en milieu solide par spot-test en présence de stress d'intensité croissante

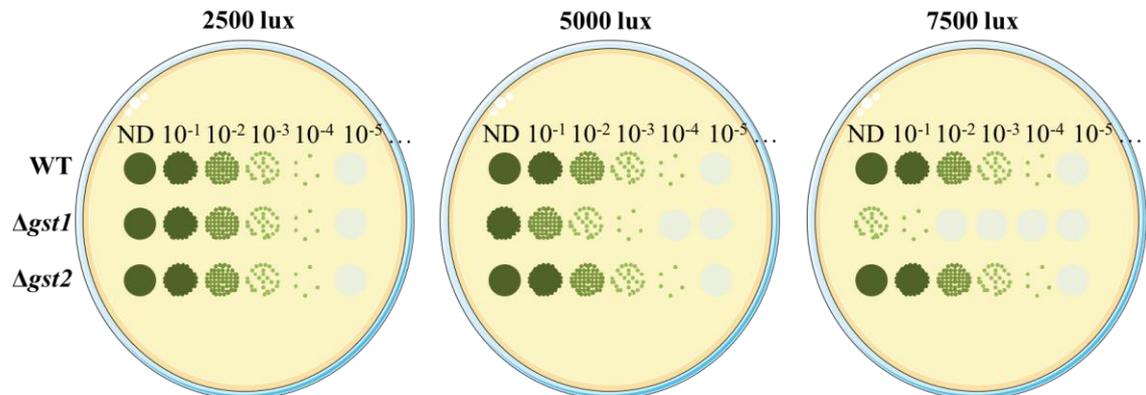


Figure 138 – Principe de l'Analyse comparative en milieu solide (ACMS) par spot-test pour l'Identification d'un phénotype de tolérance-sensibilité des mutants Δ gst en milieu solide

Dans cet exemple, le mutant Δ gst1 est plus sensible que la souche WT aux intensités lumineuses élevées. Le mutant Δ gst2 présente un phénotype similaire à la souche sauvage (WT-like).

Démarche expérimentale :

A partir d'une pré-culture en milieu de phase exponentielle :

- (1) Préparer un petit volume (≈ 10 mL) de culture pour chaque souche WT et mutants calibré à $DO_{580\text{ nm}} = 0,1$
- (2) Déposer un aliquote de 100 μ L sur une microplaque puis réaliser des dilutions en série au $1/10^{\text{ème}}$ (jusqu'à la dilution 10^{-7})
- (3) Déposer 10 μ L de la condition non-diluée (ND) et de chaque dilution sur milieu MM gélose à l'aide d'une pipette multicanaux.
- (4) Incuber à 30°C, à 2500 lux (ou à différentes intensités pour l'étude du stress lumineux), pendant 5 à 7 jours.
- (5) Après incubation, photographier les boîtes pour comparer visuellement la croissance en spot-test entre les différentes souches pour chaque condition testée

C. Courbe de croissance

La croissance en milieu liquide a été réalisée avec de cultures calibrées à $DO_{580/750\text{ nm}} = 0,02$ (pour suivre la croissance sur une durée plus longue) préparées à partir de pré-cultures en milieu de phase exponentielle. Les cultures obtenues ont été incubées dans les conditions adéquates (avec/sans stress, antibiotique ou non...), puis la $DO_{580/750\text{ nm}}$ a été mesurée toutes les 24h. Chaque souche/condition testée l'a été en triplicat.

II. Analyse métabolique et physiologique de la réponse au stress chez les mutants Δ gst

A. Analyse quantitative des marqueurs du stress oxydant et métabolique

1) Analyse semi-quantitative du contenu intracellulaire en ROS par la sonde fluorescente DCF

a. Principe

L'estimation de la quantité de ROS intracellulaire repose sur la sonde apolaire et non-fluorescente DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate). Elle pénètre naturellement dans la cellule puis est convertit en une sonde polaire non fluorescente DCFH par les estérases cellulaires. En présence de ROS (en particulier le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical hydroxyl $HO\cdot$ et les anions peroxydes radicalaires $ROO\cdot$) (Gomes et al., 2005), la molécule de DCFH est de nouveau convertie, par oxydation, en un dérivé hautement fluorescent, le DCF. Cette sonde est alors détectée par fluorescence avec les paramètres suivants : $\lambda_{exc} = 485 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$.

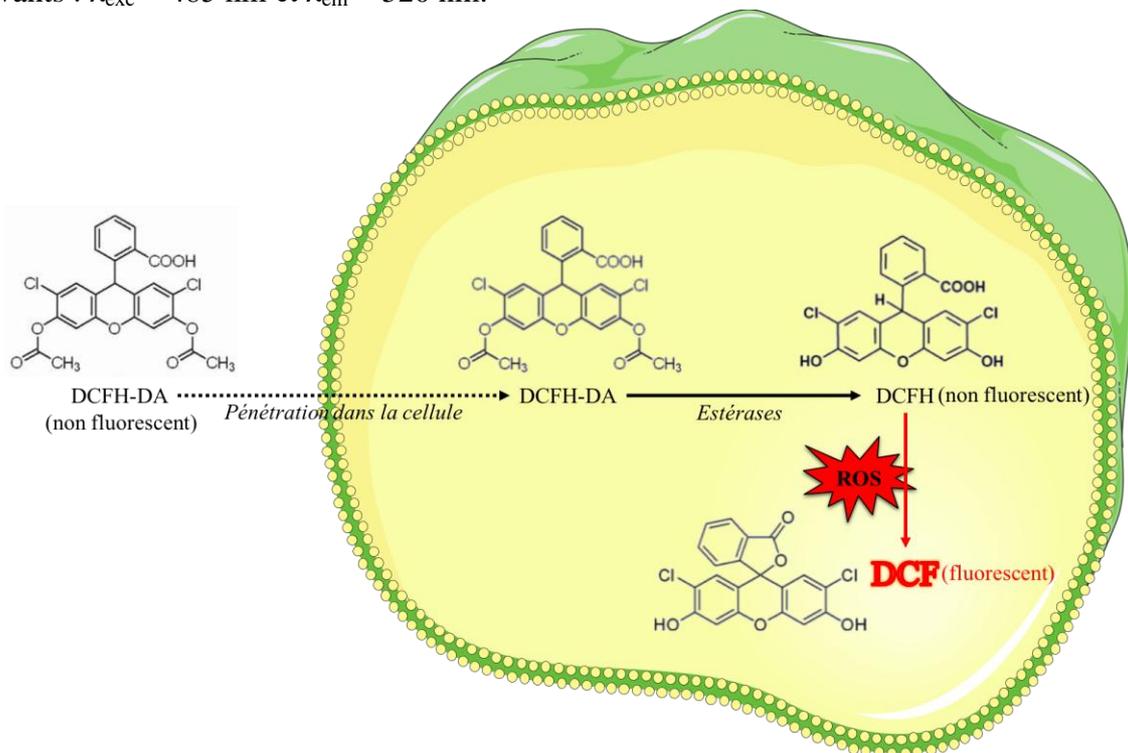


Figure 139 – Représentation schématique du principe du dosage des ROS par la sonde DCFH-DA

b. Démarche expérimentale

Matériels et réactifs :

Nom & Abréviation	Référence
DCFH-DA (2',7'- <u>d</u> ichloro <u>d</u> ihydrofluorescéine <u>d</u> iacétate)	Sigma : D6883
Microplaque 96 puits à fond noir	Greiner bio-one : 655096
<u>Protocole :</u>	
A partir d'une pré-culture en milieu de phase exponentielle :	

- (1) Préparer un volume suffisant (≈ 100 à 250 mL) de culture calibrée à $DO_{580\text{ nm}} = 0,3$ en milieu MM, supplémenté ou non en antibiotique, pour chacune des souches testées
- (2) Distribuer chaque culture en n fractions de 10 mL
où n représente le nombre de conditions testées par souche et détermine alors le volume de culture à préparer (exemple : pour 25 conditions à tester, il faut distribuer 25×10 mL, soit un volume de culture d'au moins 250 mL)
- (3) Incuber pendant $0h$ (condition témoin sans ajout du stress), $1h$, $3h$, $8h$ ou $24h$ dans les conditions adéquates

Préparation d'une solution de DCFH-DA à 5 mM dans l'éthanol absolu :

Dissoudre la totalité du flacon de poudre commerciale (50 mg) dans 20 mL d'éthanol absolu. La solution doit être conservée dans le noir à -20°C .

- (4) Après incubation, ajouter la sonde DCFH-DA préalablement préparée dans l'éthanol pour obtenir une concentration finale de $5\text{ }\mu\text{M}$ dans la culture
- (5) Incuber les cultures pendant $1h$ dans les conditions adéquates mais dans le noir (*pour prévenir l'auto-oxydation de la sonde*)
- (6) Mesurer la fluorescence à l'aide d'un lecteur de microplaque multimodal (ClarioStar ; BMG Labtech) avec les paramètres suivants :

$$\lambda_{\text{exc}} = 485\text{ nm et } \lambda_{\text{em}} = 520\text{ nm}$$

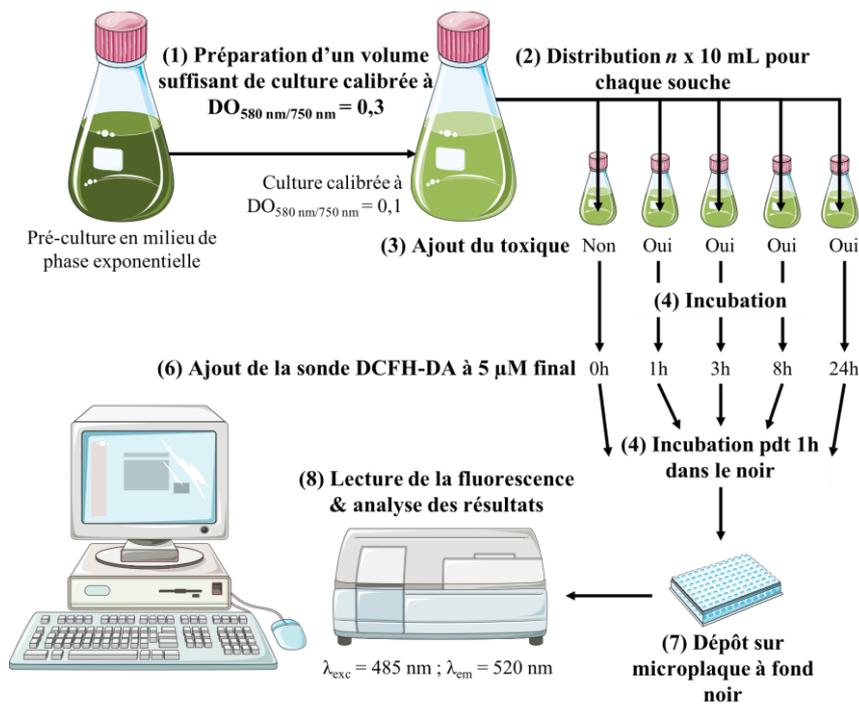


Figure 140 – Représentation schématique de la démarche expérimentale mise en œuvre pour le dosage des ROS par la sonde DCFH-DA

c. Analyse des résultats

L'estimation de la quantité de ROS intracellulaire correspond à la moyenne de 3 réplicats indépendants exprimé comme la fluorescence mesurée normalisée sur la DO à 580 nm (en unité arbitraire).

2) Analyse quantitative du contenu intracellulaire en lipides peroxydés par la méthode du TBARS

a. Principe

L'estimation du niveau de lipides peroxydés repose sur la quantification de l'un des produits secondaires synthétisés au cours du mécanisme de peroxydation lipidique, le malondialdéhyde (MDA). Cette estimation est basée sur le dosage du MDA par la méthode TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) au cours de laquelle le MDA réagit avec l'acide thiobarbiturique (TBA) à chaud et en milieu acide selon la réaction présentée dans la figure ci-dessous, et qui forme un produit coloré mesurable à 532 nm, l'adduit TBA-MDA.



Figure 141 – Principe de la réaction du dosage TBARS

b. Démarche expérimentale

i. Préparation des réactifs du dosage

Préparation du tampon de réaction acide acétique-BHT :

- Dissoudre 0,110175 g de BHT (butylated hydroxytoluène) dans 1L d'acide acétique glacial pour obtenir une concentration finale en BHT de 0,5 mM
(**BHT ; Sigma-Aldrich : B1378**)
(**Acide acétique glacial ; AnalR NORMALPUR : 20104.298**)

Le BHT ou hydroxytoluène butylé est un composé qui bloque la peroxydation artificielle des lipides au cours de l'extraction et du dosage pour éviter leur décomposition en MDA qui surestimerait la proportion en ce composé.

Préparation d'une solution stock de MDA à 4 mM et à 40 μ M dans l'acide acétique :

- Dissoudre 0,125408 g de MDA (malondialdéhyde) dans 100 mL d'acide acétique glacial pour obtenir une concentration finale en MDA de 4 mM
- Diluer au 1/100 la solution de MDA à 4 mM pour obtenir celle à 40 μ M
(**MDA ; Sigma-Aldrich : 36357**)

Préparation d'une solutions stock de TBA à 4 mM dans l'acide acétique :

- Dissoudre 0,05766 g de TBA dans 100 mL d'acide acétique glacial
(**TBA ; Sigma-Aldrich : T5500**)

Les solutions de MDA et de TBA ont été préparées juste avant le dosage et n'ont donc pas été conservées pour un quelconque dosage ultérieur, leur stabilité étant relativement faible.

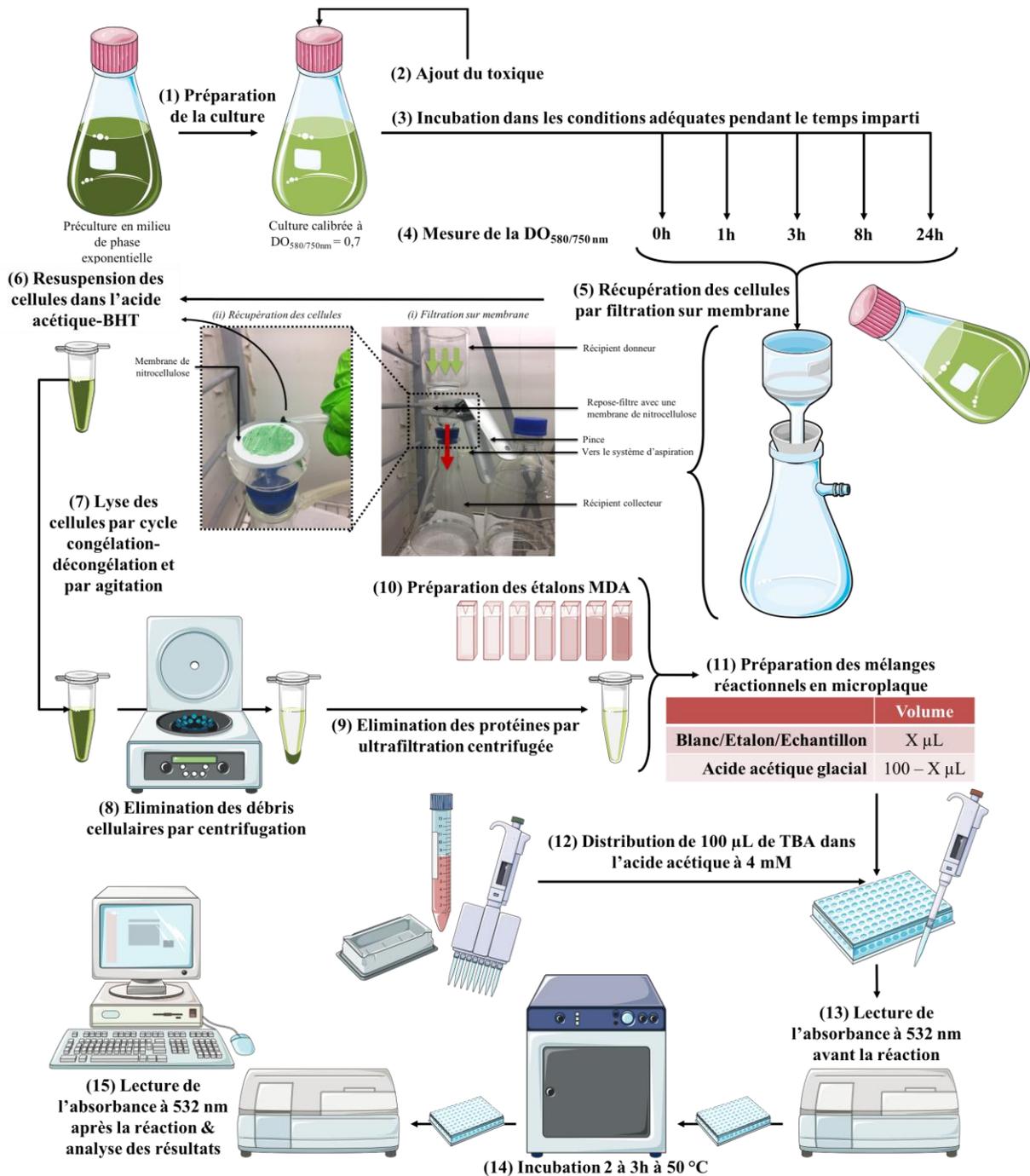


Figure 142– Représentation schématique de la démarche expérimentale du dosage TBARS

ii. *Culture des cyanobactéries, extraction et dosage du MDA*

La démarche expérimentale de la culture des cyanobactéries, de l'extraction et du dosage du MDA repose sur le schéma proposé en Figure 142 avec 15 étapes décrites ci-après.

Étape (1) : Préparation de la culture

A partir d'une pré-culture en milieu de phase exponentielle :
 - Préparer 50 ml d'une culture calibrée à $DO_{580\text{ nm}} = 0,7$

Étape (2) : Ajout du toxique :

- Ajouter le volume adéquat de solution de toxique à tester (stress chimique)
OU
- Incuber dans les conditions adéquates de lumière ou de température (stress physique)

Etape (3) : Incubation dans les conditions adéquates pendant le temps imparti :

- Incuber dans différentes les conditions souhaitées pendant 0, 1, 3, 8 ou 24h (1 erlen par condition de temps)

Etape (4) : Mesure de la DO_{580/750 nm} :

- Après incubation, mesure la DO_{580/750 nm}.

Etape (5) : Récupération des cellules par filtration sur membrane :

- Collecter rapidement les cellules par filtration tangentielle sur membrane de cellulose (seuil de coupure : 0,45 µm ; Supor® 0.45 µm 47 mm PES PALL : 69173) sous une lumière blanche d'intensité lumineuse égale à 2500 lux (ou 7500 lux, le cas échéant)

Etape (6) : Resuspension des cellules dans tampon d'extraction :

- Récupérer les cellules en grattant la surface du filtre à l'aide d'un cône de P1000
- Ecraser le « morceau » de cellules contre la paroi d'un microtube de 1,5 mL content 1 mL de tampon acide acétique-BHT et vortexer vigoureusement pour resuspendre les cellules
- Congeler immédiatement la suspension cellulaire dans la carboglace

Etape (7) : Lyse des cellules par cycle de congélation-décongélation et par agitation :

- Réaliser 3 cycles congélation-décongélation dans l'azote liquide et dans l'eau tiède
- Placer les lysats cellulaires sur une plaque agitante/vibrante (**Vibrax VXR, Ika**) à 200 rpm pendant 10 min à 4°C

Etape (8) : Elimination des débris cellulaire par centrifugation :

- Centrifuger le lysat cellulaire obtenu à 14 000 rpm pendant 5 min à 4°C pour éliminer les débris cellulaires qui seront culottés

Etape (9) : Elimination des protéines par ultrafiltration centrifugée :

- Déposer 0,5 mL de surnageant du lysat dans une colonne d'ultrafiltration (**Amicon Ultra – 0.5 mL 30K ; Millipore : UFC503096**), préalablement lavé avec 0,5 mL d'eau ultra-pure par centrifugation à 14000 rpm pendant 5 min
- Centrifuger les colonnes d'ultrafiltration à 14 000 rpm pendant 20 min à 4°C afin d'éliminer les protéines de poids moléculaires supérieur à 30 kDa (l'élimination des protéines est importante puisqu'elles peuvent réagir de façon croisées avec le MDA)

Etape (10) : Préparation des étalons MDA

- Préparer les étalons selon le protocole suivant :

MDA dans le MRde 200 µL final (en µM)	0	2,5	3,75	5	7,5	10	12,5	15
Solution de MDA dans l'acide acétique à 40 µM (en µL)	0	12,5	18,75	25	37,5	50	62,5	75
Acide acétique glacial (en µL)	100	87,5	81,25	75	62,5	50	37,5	25

Etape (11) : Préparation des mélanges réactionnels en microplaque :

- Voir tableau dans Figure 142
- Microplaque 96 puits de microtitration (Non stérile, fond plat, volume : 25 à 340 µL ; **Grenier bio-one : 655101**)

Etape (12) : Distribution de 100 µL de TBA dans l'acide acétique à 4 mM

Etape (13) : Lecture de l'absorbance à 532 nm avant la réaction :

Etape (14) : Incubation 2 à 3h à 50°C :

- Déposer un film adhésif en aluminium sur la microplaque (**Platemax® pierceable Aluminium Sealing Film – Axygen® (a Corning Brand)**)
- Incuber pendant 2 à 3h à 50°C

Etape (15) : Lecture de l'absorbance à 532 nm après la réaction :

c. Analyse des résultats

A partir des résultats bruts donnés à l'issue des 2 lectures de l'absorbance à 532 nm, il est nécessaire de calculer la variation d'absorbance lue à 532 nm uniquement due à la réaction de formation de l'adduit TBA-MDA selon le calcul suivant :

$$\Delta A_{lue\ 532\ nm\ réaction} = A_{lue\ à\ 532\ nm\ après\ réaction} - A_{lue\ à\ 532\ nm\ avant\ réaction}$$

Ensuite, à l'aide des étalons MDA, il est possible de tracer une courbe d'étalonnage qui corrèle $\Delta A_{lue\ 532\ nm\ réaction}$ à la concentration en MDA dans le mélange réactionnel (MR). On peut ainsi déterminer :

$$[MDA]_{dans\ V_{TOT\ MR}} = \frac{\Delta A_{lue\ 532\ nm\ réaction}}{Coefficient\ directeur} - Ordonnée\ à\ l'origine$$

A partir de $[MDA]_{dans\ V_{TOT\ MR}}$ et en tenant compte de données théoriques (volume interne d'une cellule de *Synechocystis* de $1,2 \cdot 10^{-11}$ mL (Mazouni et al., 2004)) et des données expérimentales (le nombre de cellules par mL correspond à 1 unité de DO à 580 nm, volume total de culture filtrée, volume total d'extrait...), on peut déterminer la concentration intracellulaire en MDA d'après la démonstration ci-dessous :

On sait que :

$$Quantité\ de\ MDA\ dans\ V_{TOT\ MR} = Quantité\ de\ MDA\ dans\ V_{PE\ extrait}$$

$$[MDA]_{dans\ V_{TOT\ MR}} \times V_{TOT\ MR} = [MDA]_{dans\ V_{PE\ extrait}} \times V_{PE\ extrait}$$

$$[MDA]_{dans\ V_{PE\ extrait}} = \frac{[MDA]_{dans\ V_{TOT\ MR}} \times V_{TOT\ MR}}{V_{PE\ extrait}}$$

On sait également que :

$$[MDA]_{par\ cellule} = \frac{Quantité\ de\ MDA\ dans\ V_{TOT\ extrait}}{N_{cellules}} \times \frac{1}{V_{cellule\ Synechocystis}}$$

et :

$$Quantité\ de\ MDA\ dans\ V_{TOT\ extrait} = [MDA]_{dans\ V_{PE\ extrait}} \times V_{TOT\ extrait}$$

J'en déduis donc que :

$$[MDA]_{par\ cellule} = \frac{[MDA]_{dans\ V_{PE\ extrait}} \times V_{TOT\ extrait}}{N_{cellules}} \times \frac{1}{V_{cellule\ Synechocystis}}$$

En remplaçant $[MDA]_{dans\ V_{PE\ extrait}}$, j'obtiens alors :

$$[MDA]_{par\ cellule} = \frac{[MDA]_{dans\ V_{TOT\ MR}} \times V_{TOT\ MR}}{V_{PE\ extrait}} \times \frac{V_{TOT\ extrait}}{N_{cellules}} \times \frac{1}{V_{cellule\ Synechocystis}}$$

$$[MDA]_{\text{par cellule}} = \frac{[MDA]_{\text{dans } V_{TOT MR}} \times V_{TOT MR}}{V_{PE \text{ extrait}}} \times \frac{V_{TOT \text{ extrait}}}{DO_{580 \text{ nm}} \times N_{\text{cellules pour 1 DO}} \times V_{TOT \text{ culture}}} \times \frac{1}{V_{\text{cellule Synechocystis}}}$$

En conclusion, les résultats ont été exprimés comme la valeur moyenne de 3 réplicats indépendants de la concentration intracellulaire en MDA.

3) Dosage de l'activité catalase-peroxydase

a. Principe

La catalase de *Synechocystis* est bifonctionnelle c'est-à-dire qu'elle possède 2 activités catalytiques : (i) une activité catalase dont le dosage repose sur la mesure de la détoxification du H₂O₂ à 240 nm (avec un coefficient d'extinction molaire du peroxyde d'hydrogène de 43,6 mol/L/cm (Aebi, 1984) et (ii) une activité peroxydase dont le dosage repose sur le suivi de l'oxydation du pyrogallol en présence de peroxyde d'hydrogène en un produit qui absorbe à 430 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 2,47.10⁻³ mol/L/cm (Moirangthem et al., 2014).

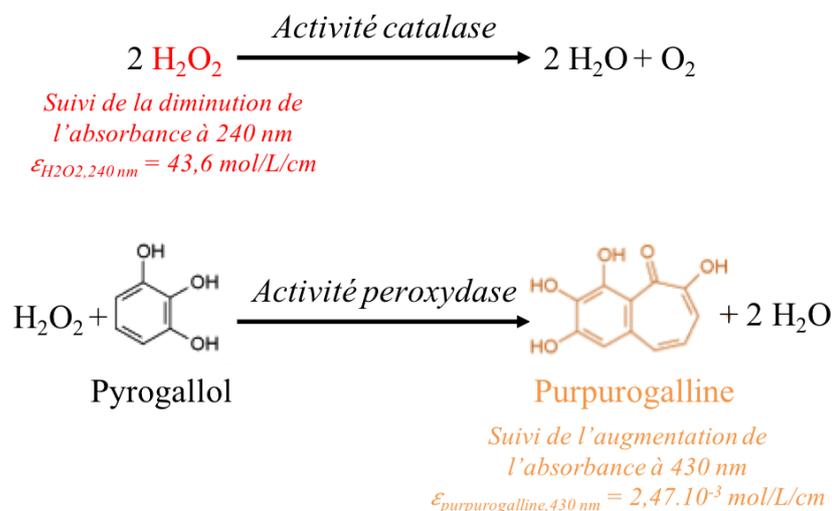


Figure 143 – Principe réactionnel du dosage des activités catalase et peroxydase de la catalase bifonctionnelle de *Synechocystis*

b. Démarche expérimentale

i. Préparation des réactifs du dosage

Préparation du tampon de réaction Tris HCl 10 mM pH7,5 PMSF 1 mM Glycérol 5% (v/v) :

- Préparer un tampon Tris HCl 10 mM pH 7,5 en diluant à 0,5 mL de la solution commerciale du tampon commercial Tris HCl 1 M pH 7,5 dans 50 mL final (Sigma-Aldrich : T2319)
- Dissoudre 0,0040 g de PMSF pour obtenir une concentration finale de 1 mM (Merck : 7349)
- Diluer 2,5 mL de glycérol pur pour obtenir une concentration finale de 5% (v/v) (AnalaR NORMALPUR : 24388.320)

- Ajouter une ½ pastille du cocktail anti-protéase ROCHE
(**Protease inhibitor cocktail tablets ROCHE : 11 873 580 001**)

Préparation d'une solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 30 mM et à 0,5 mM dans le tampon de réaction :

- Diluer 152 µL d'une solution commerciale de peroxyde d'hydrogène à 30% (9,82 mol/L) dans 50 mL final de tampon de réaction (*solution à 30 mM*)
- Diluer 0,25 mL de solution de peroxyde d'hydrogène à 30 mM dans 15 mL final de tampon de réaction (*solution à 0,5 mM*)
(**Sigma-Aldrich : 21676**)

Préparation d'une solution de pyrogallol à 100 mM dans le tampon de réaction :

- Dissoudre 0,12611 g de pyrogallol dans 10 mL de tampon de réaction
(**Sigma-Aldrich : 254002**)

ii. *Culture des cyanobactéries et extraction des protéines*

Dans le cadre du dosage des activités de la catalase, la culture des cyanobactéries et l'extraction des protéines ont été réalisés selon la démarche représentée en Figure 144 et dont le mode opératoire est décrit ci-après.

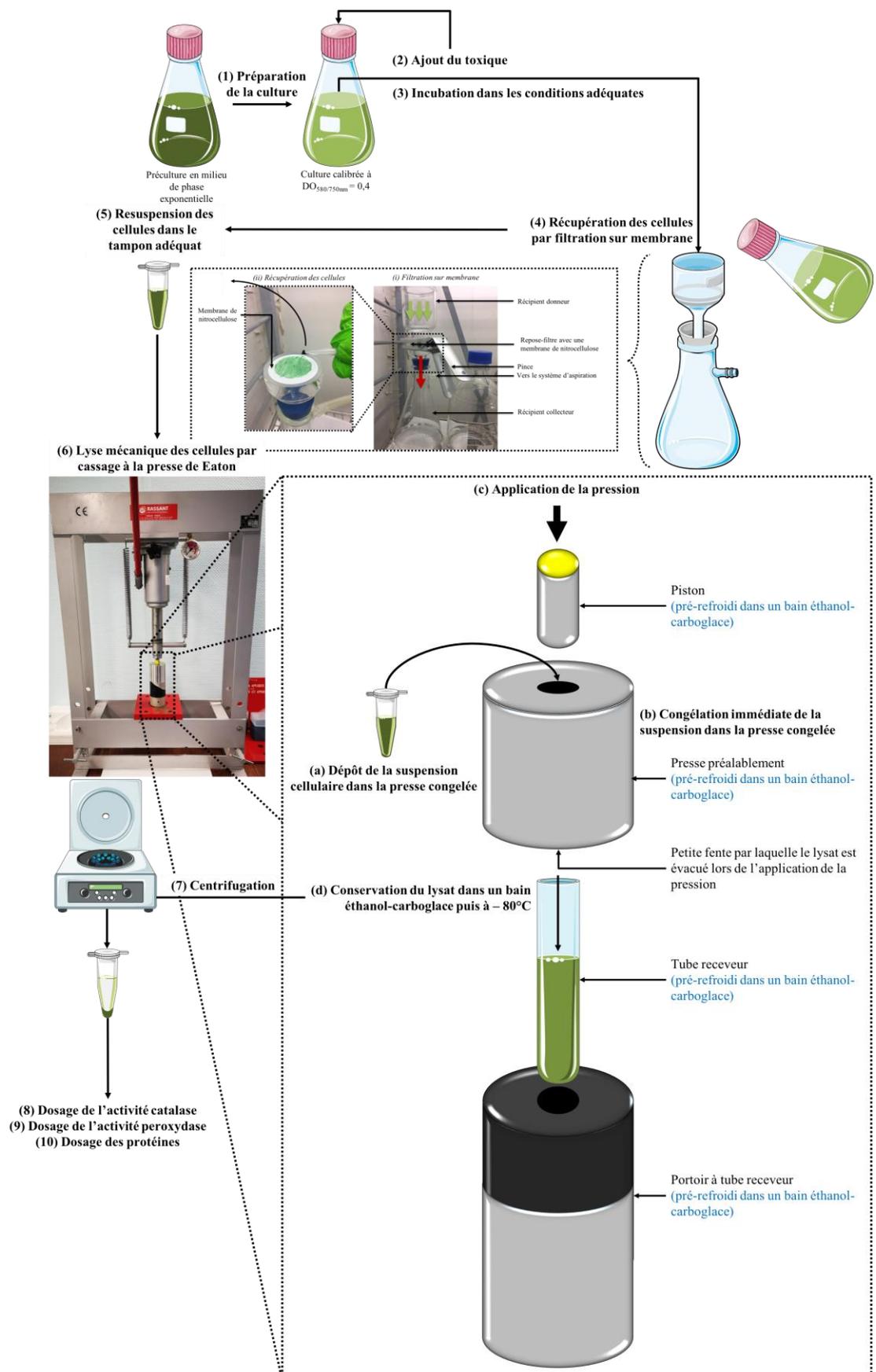


Figure 144 – Représentation schématique de la démarche expérimentale d'extraction des protéines par lyse mécanique des cellules pour le dosage des activités de la catalase

Etape (1) : Préparation de la culture :

A partir d'une préculture en milieu de phase exponentielle :

- Préparer 50 mL d'une culture calibrée à DO 580 m = 0,4

Etape (2) : Ajout du toxique :

- Ajouter le volume adéquat de solution de toxique à tester (stress chimique)

Etape (3) : Incubation dans les conditions adéquates :

- Incuber dans les conditions standard de photoautotrophie (2500 lux, 140 rpm, 30°C)

Etape (4) : Récupération des cellules par filtration sur membrane :

- Collecter rapidement les cellules par filtration tangentielle sur membrane de cellulose (seuil de coupure : 0,45 µm ; Supor® 0.45 µm 47 mm PES PALL : 69173) sous une lumière blanche d'intensité lumineuse égale à 2500 lux (*cette condition doit être respectée puisque l'activité de certaines protéines (tout come l'expression-stabilité de certains ARNm) est dépendante de la lumière*)

Etape (5) : Resuspension des cellules dans tampon d'extraction :

- Récupérer les cellules en grattant la surface du filtre à l'aide d'un cône de P1000
- Ecraser le « morceau » de cellules contre la paroi d'un microtube de 1,5 mL content 1 mL de tampon Tris HCl 10 mM pH 7,5 PMSF 1 mM Glycérol 5% (v/v) et vortexer vigoureusement pour resuspendre les cellules
- Congeler immédiatement la suspension cellulaire dans la carboglace pour cassage mécanique ultérieur des cellules

Etape (6) : Lyse mécanique des cellules par cassage à la presse de Eaton :

- (a) et (b) Déposer immédiatement la suspension cellulaire dans la presse préalablement refroidi dans un bain éthanol-carboglace afin de congeler rapidement la suspension et ainsi figer le métabolisme (ARN, protéines...)
- (c) Exercer une pression de 250 MPa à l'aide de la presse et du piston en respectant le montage représenter dans la Figure 144
- (d) Récupérer le tube collecteur et conserver-le dans un bain éthanol-carboglace ou à - 80°C jusqu'au jour du dosage

Etape (7) : Centrifugation :

- Centrifuger pendant 5 min à 140000 rom à 4°C
- Utiliser le surnageant pour les dosages aux étapes (8), (9) et (10) décrits ci-après

iii. Dosage de l'activité catalase

Le dosage de l'activité catalase a été réalisé selon la composition du mélange réactionnel et le protocole suivant :

- Préparer, en microcuve spectrophotométrique UV, les mélanges réactionnels suivants :

	Concentration finale	Blanc	Echantillon
Extrait soluble	/	/	50 µL
Tampon de réaction	/	500 µL	450 µL
Peroxyde d'hydrogène à 30 mM	10 mM	250µL	250 µL

- Après ajout du peroxyde d'hydrogène, suivre la diminution de l'absorbance à 240 nm pendant 1 min

iv. *Dosage de l'activité peroxydase*

Le dosage de l'activité peroxydase a été réalisé selon la composition du mélange réactionnel et le protocole suivant :

- Préparer, en microplaque 96 puits, les mélanges réactionnels suivants :

	Concentration finale	Blanc	Echantillon
Extrait soluble	/	/	50 µL
Tampon de réaction	/	150 µL	100 µL
Peroxyde d'hydrogène à 0,5 mM	0,1 mM	50 µL	50 µL
Pyrogallol à 100 mM	20 mM	50 µL	250 µL

- Programmer le lecteur de microplaque pour injecter automatiquement 50 µL de pyrogallol à 100 mM dans chacun des puits et suivre l'évolution de l'absorbance à 430 nm pendant 1 min

v. *Dosage des protéines par la méthode Bradford*

Pour normaliser les activités enzymatiques, un dosage des protéines par la méthode BRADFORD a été réalisé selon le protocole suivant :

	Blanc	Etalon					Echantillon
BSA à 1mg/mL	0 µL	1 µL	2 µL	3 µL	4 µL	5 µL	X µL
Tampon Tris HCl 10 mM pH 7,5	800 µL	799 µL	798 µL	797 µL	796 µL	795 µL	800 – X µL
Ajouter 200 µL de bleu de comassie (Protein Assay Dye Reagent Concentrate - BioRad : 500-0006)							
Laisser développer la coloration pendant 30 min à température ambiante à l'obscurité							
Mesurer l'absorbance à 595 nm contre un blanc approprié							
X µL : 2,5 à 5 µL d'extrait							

c. *Analyse des résultats*

Après extraction des résultats bruts, l'activité catalase a été calculée et normalisée sur la quantité de protéine soit exprimée en µmol/L/min/mg de protéine ou en U/mg de protéine, selon l'équation suivante :

$$A_{catalase} = \frac{1}{\varepsilon_{H2O2,240\text{ nm}} \times l} \times \frac{d(A_{240\text{ nm}})}{dt} \times \frac{1}{m_{protéine}}$$

où

$\varepsilon_{H2O2,240\text{ nm}}$: coefficient d'extinction molaire du peroxyde d'hydrogène à 240 nm valant : 43,6 mol/L/cm (Aebi, 1984)

$\frac{d(A_{240\text{ nm}})}{dt}$: variation de l'absorbance mesurée à 240 nm en fonction du temps ou vitesse initiale (en unité d'absorbance à 240 nm par min) ou pente

L'activité peroxydase a également été exprimée en $\mu\text{mol/L}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine ou en U/mg de protéine selon l'équation suivante :

$$A_{\text{peroxydase}} = \frac{1}{\varepsilon_{\text{pyrogallol}, 430 \text{ nm}} \times l} \times \frac{d(A_{430 \text{ nm}})}{dt} \times \frac{1}{m_{\text{protéine}}}$$

où

$\varepsilon_{\text{pyrogallol}, 430 \text{ nm}}$: coefficient d'extinction molaire du pyrogallol à 430 nm valant : 2,47mmol/L/cm (Moirangthem et al., 2014).

$\frac{d(A_{430 \text{ nm}})}{dt}$: variation de l'absorbance mesurée à 430 nm en fonction du temps ou vitesse initiale (en unité d'absorbance à 430 nm par min) ou pente

4) Dosage du méthylglyoxal

a. Principe

Le dosage du méthylglyoxal repose sur la mesure de la fluorescence émise par la 2-méthyllumazine, produit obtenu lors de la réaction de condensation entre le méthylglyoxal et le 5,6-diamino-2,4-hydroxypyrimidine (DDP) qui se produit à chaud et à pH alcalin (Espinosa-Mansilla et al., 2007; Wichaphon et al., 2014).

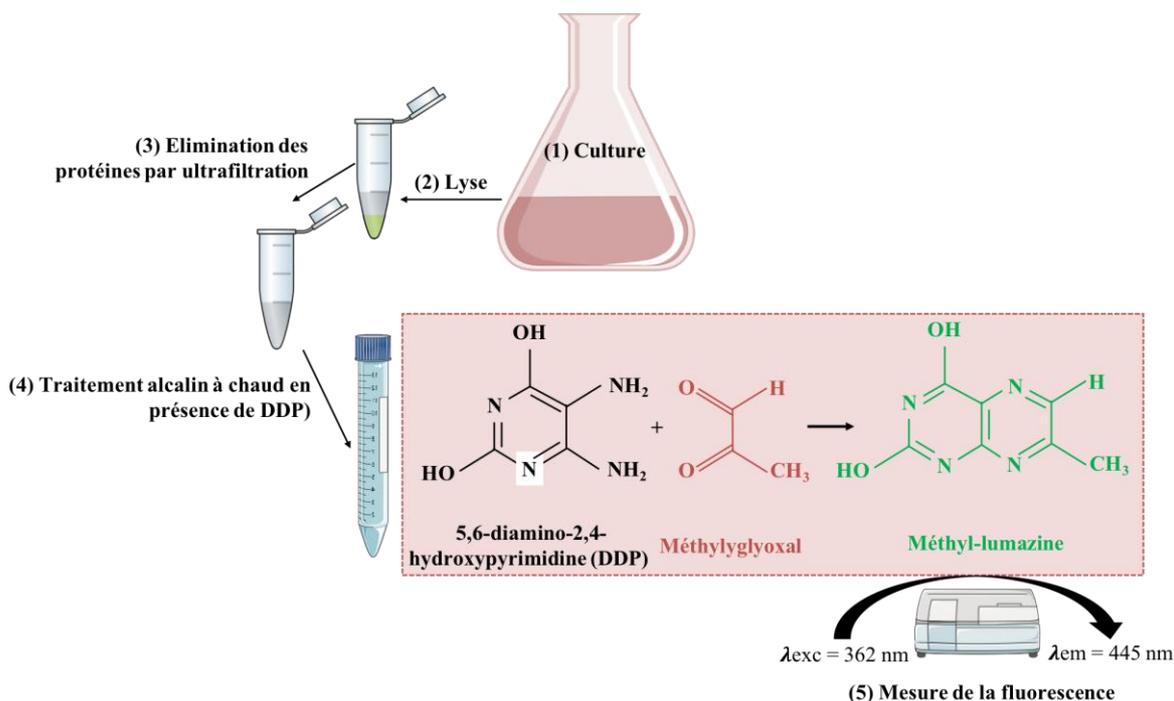


Figure 145 – Principe de la réaction de dosage du DDP et protocole simplifié

b. Protocole

Le protocole détaillé est présenté ci-dessous :

Étape (1) : Préparation de la culture

A partir d'une pré-culture en milieu de phase exponentielle :

- Préparer 100 ml d'une culture calibrée à $DO_{580\text{ nm}} = 0,7$

Étape (2) : Ajout du toxique :

- Ajouter le volume adéquat de solution de toxique à tester (stress chimique)
OU
- Incuber dans les conditions adéquates de lumière ou de température (stress physique)

Étape (3) : Incubation dans les conditions adéquates pendant le temps imparti :

- Incuber dans différentes les conditions souhaitées pendant 0, 1, 3, 8 ou 24h (1 erlen par condition de temps)

Étape (4) : Mesure de la $DO_{580/750\text{ nm}}$:

- Après incubation, mesure la $DO_{580/750\text{ nm}}$.

Étape (5) : Récupération des cellules par filtration sur membrane :

- Collecter rapidement les cellules par filtration tangentielle sur membrane de cellulose (seuil de coupure : $0,45\ \mu\text{m}$; Millipore) sous une lumière blanche d'intensité lumineuse égale à 2500 lux

Étape (6) : Resuspension des cellules dans tampon d'extraction :

- Récupérer les cellules en grattant la surface du filtre à l'aide d'un cône de P1000
- Ecraser le « morceau » de cellules contre la paroi d'un microtube de 1,5 mL content 1 mL d'eau ultra-pure et vortexer vigoureusement pour resuspendre les cellules
- Congeler immédiatement la suspension cellulaire dans la carboglace

Étape (7) : Lyse des cellules par cycle de congélation-décongélation et par agitation :

- Réaliser 3 cycles congélation-décongélation dans l'azote liquide et dans l'eau tiède
- Placer les lysats cellulaires sur une plaque agitante/vibrante à 200 rpm pendant 10 min à 4°C

Étape (8) : Élimination des débris cellulaire par centrifugation :

- Centrifuger le lysat cellulaire obtenu à 14 000 rpm pendant 5 min à 4°C pour éliminer les débris cellulaires qui seront culottés

Étape (9) : Élimination des protéines par ultrafiltration centrifugée :

- Déposer 2 x 0,5 mL de surnageant du lysat dans une colonne d'ultrafiltration, préalablement lavé avec 0,5 mL d'eau ultra-pure par centrifugation à 14000 rpm pendant 5 min
- Centrifuger les colonnes d'ultrafiltration à 14 000 rpm pendant 20 min à 4°C afin d'éliminer les protéines de poids moléculaires supérieur à 30 kDa

Étape (10) : Dosage fluorimétrique du méthylglyoxal :

- Préparation d'une gamme en méthylglyoxal dans l'eau (0,0001 à 0,002 g/L) :
 - A partir de la solution commerciale de méthylglyoxal à 476 g/L (Sigma-Aldrich), préparer une solution de méthylglyoxal à 100 g/L et diluer au 1/100 pour obtenir une solution à 1 g/L puis une nouvelle fois au 1/100 pour avoir une solution au 0,01 g/L dans de l'eau ultra-pure
 - Réaliser ensuite la gamme d'étalonnage ci-dessous avec la solution à 0,01 g/L :

Concentration étalon en méthylglyoxal (en 10⁻³ g/L)	0	0,1	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,75	0,8	0,9	1	2
Volume de solution de méthylglyoxal stock dilué (en µL)	0	10	20	25	30	40	50	60	70	75	80	90	100	200
Volume d'eau ultrapure (en µL)	1000	990	980	975	970	960	950	940	930	925	920	910	900	800

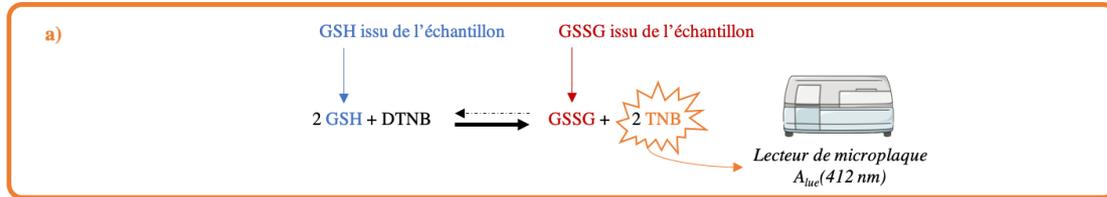
- Préparation d'une solution aqueuse de DDP à 2 mM (**QC-2794 ; Combi-Blocks**) :
 - Dissoudre 0,0248 g de DDP dans 90 mL d'eau (la solution est à usage immédiat)
- Préparation des mélanges réactionnels (MR) selon le tableau suivant :

	(C) finale dans le MR	Volumes
Echantillon/Etalon	Ratio DDP:MG = 20 :1	1 mL
Tampon ammonium (NH₄Cl/NH₃) dilué au ½ (109478 ; Merck)	Alcalinisation du MR (pH 10-11)	500 µL
Solution aqueuse de DDP à 1 mM	0,5 mM	2 mL
Chauffer pendant 1h30 à 60°C, puis laisser refroidir à l'obscurité et déposer 200 µL de chaque échantillon/étalon sur une microplaque à fond noir pour mesurer la fluorescence ($\lambda_{exc} = 362$ nm ; $\lambda_{em} = 445$ nm) sur un lecteur de microplaque		

La détermination de la concentration intracellulaire en méthylglyoxal a été réalisée à partir de la gamme d'étalonnage en méthylglyoxal et selon une démarche et un calcul analogue à celui réalisé pour le dosage TBARS.

B. Analyse quantitative de l'équilibre redox du couple GSH/GSSG en réponse aux stress

1) Principe du dosage du glutathion



➔ C'est un dosage **colorimétrique, spectrophotométrique**

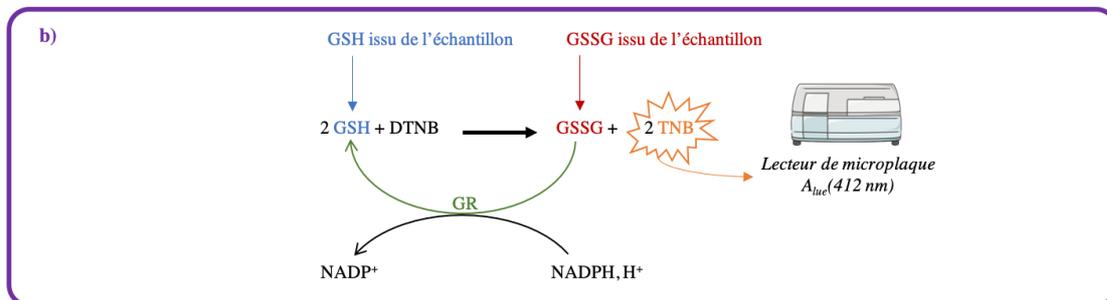


La présence de **GSSG** dans les échantillons peut déplacer l'équilibre thermodynamique dans le sens de formation du DTNB.

→ Or, on veut mesurer l'apparition du **TNB**

→ Et on veut doser le glutathion total (G_{total}) (= **GSH + GSSG**)

DONC : Utilisation de la **GR** (glutathion réductase)



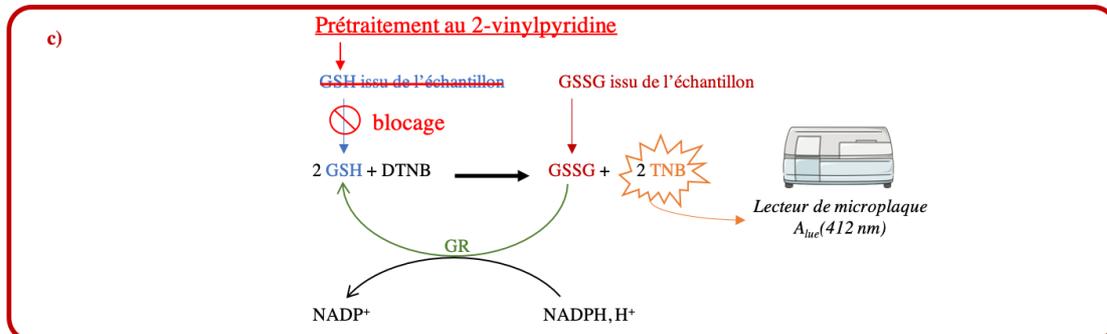
➔ C'est aussi un dosage **enzymatique par cinétique** ($A_{(412\text{nm})\text{TNB}} = f(\text{temps})$) donc mesure de la vitesse d'apparition (v_i) du **TNB**



Ce dosage du glutathion total nous permet de **déterminer la concentration en glutathion total** [G_{total}] (= [**GSH**] + [**GSSG**]).

→ On veut **en plus** calculer [**GSH**] et [**GSSG**]

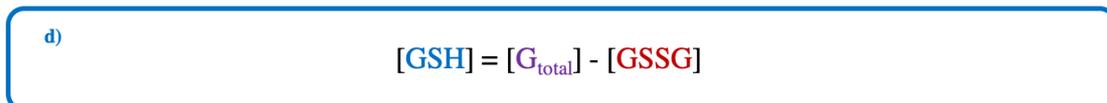
DONC : Blocage du glutathion réduit (**GSH**)



➔ Cette fois ci, on dose **uniquement le GSSG** issu de l'échantillon grâce au **blocage du GSH**

→ On obtient ainsi la concentration en **GSSG** ([**GSSG**]) dans l'échantillon

→ Par le calcul on peut donc déterminer la concentration en **GSH** ([**GSH**]) dans l'échantillon



➔ Il y a donc deux dosages :

→ un dosage du glutathion total (G_{total}) (= **GSH + GSSG**)

→ et un dosage du glutathion oxydé (**GSSG**)

Figure 146 – Représentation schématique du principe du dosage du glutathion
Adapté du rapport de stage de 2^{ème} année de BTS de Mathias RAGUIN

Le dosage du glutathion (glutathion total : **GSH** et **GSSG** et glutathion oxydé : **GSSG**) est un **dosage colorimétrique enzymatique par cinétique**, tel que décrit dans le principe schématisé dans la figure ci-cavant. En effet, il s'agit d'un dosage basé sur le suivi de l'apparition d'un produit coloré par spectrophotométrie au cours du temps en présence d'une enzyme.

Dans le **panel a)** : la réaction du dosage repose sur l'utilisation du réactif de Ellman ou DTNB (pour acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)) qui réagit avec 2 molécules de glutathion réduit (**GSH**) pour donner du glutathion oxydé (**GSSG**) et 2 molécules de TNB sous forme d'ion 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB^-), qui s'ionise alors dans l'eau à pH neutre sous forme d'ion TNB^{2-} , qui présente une couleur jaune facilement **mesurable par spectrophotométrie à 412nm** (Akerboom and Sies, 1981) (**dosage colorimétrique**).

Néanmoins, la présence de **GSSG** issue de l'échantillon peut déplacer l'équilibre de la réaction vers la formation de DTNB et non pas vers celle du TNB. C'est pourquoi, ce dosage intègre l'utilisation d'une enzyme : la **glutathion réductase (GR)**.

Dans le **panel b)** : la formation du **TNB**, qui est mesurée au cours du temps, est permise par le recyclage du **GSSG** en 2 molécules de **GSH** catalysé par la **GR (dosage enzymatique par cinétique)**. Enfin, le caractère cyclique de la réaction (couramment appelé en anglais *enzymatic recycling reaction* comme le montre l'équation-bilan finale), qui est imposé par la présence de la **GR**, explique que le dosage du glutathion (**GSH**) est un abus de langage puisqu'il s'agit en réalité du dosage du glutathion total (noté $G_{\text{total}} = \text{GSH} + \text{GSSG}$).

Dans le **panel c)** : l'accès au **GSSG** seul se fait au moyen d'un pré-traitement au 2-vinylpyridine qui bloque le **GSH** issu de l'échantillon. Le **GSSG** est alors tout de même converti en 2 **GSH** grâce à la **GR** et la réaction formant du **TNB** est de nouveau réalisable. Il est alors possible de déterminer :

- le glutathion total ($G_{\text{total}} = \text{GSH} + \text{GSSG}$),
- le glutathion oxydé (**GSSG**),
- et le glutathion réduit ($\text{GSH} = G_{\text{total}} - \text{GSSG}$).

2) Démarche expérimentale

a. Matériels et réactifs

Tous les réactifs ont été principalement achetés chez Sigma-Aldrich, comme le montre le tableau ci-dessous, qui précise les références et le mode de stockage des réactifs :

Nom & Abréviation		Référence	Masse molaire (en g/mol)	Pureté (en %)	Stockage
Tampon d'extraction et de réaction					
Dihydrogénophosphate de potassium	KH ₂ PO ₄	Sigma 60218	136,1 g/mol	99,5 %	T°C ambiante
Hydrogénophosphate de dipotassium	K ₂ HPO ₄	Sigma P3786	174,2 g/mol	98 %	T°C ambiante
Acide éthylène-diamine-tétra-acétique	EDTA	Gen-apex E508586	372,2 g/mol	99,9 %	T°C ambiante
Acide 5-sulfosalicylique	5-SSA	Sigma S2130	254,2 g/mol	99 %	T°C ambiante
Réactifs de pré-traitement					
2-vinylpyridine	2-VP	Sigma 132292	105,1 g/mol	97 %	- 20°C
Triéthanolamine	/	Sigma 90297	149,2 g/mol	98 %	4°C
Réactifs du dosage					
Acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)	DTNB	Sigma D-8130	396,3 g/mol	98 %	4°C et à l'abri de la lumière
Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate	NADPH	Sigma N-7505	833,4 g/mol	97 %	-20 °C, à l'abri de la lumière et dans un sachet hermétique avec un absorbeur de dioxygène
Glutathion réductase	GR	Sigma G-3664	250 U/mL	/	4°C
Glutathion réduit	GSH	Sigma G-4251	307,3 g/mol	98 %	4°C
Glutathion oxydé	GSSG	Sigma G-6654	612,6 g/mol	98 %	4°C
Matériels & Appareillages					
Plaquar agitante/virbante (Vibrax VXR, Ika)					
Membrane filtrante de cellulose (0,45 µm) (Supor® 0.45 µm 47 mm PES PALL : 69173)					
Colonne d'ultrafiltration par centrifugation (Amicon Ultra – 0.5 mL 30K ; Millipore : UFC503096)					
Microplaque 96 puits de microtitration (Non stérile, fond plat, volume : 25 à 340 µL ; Grenier Bio-One : 655101)					
Lecteur de microplaque (ClarioStar – BMG Labtech)					

b. Protocole opératoire

La figure ci-après propose une représentation de la démarche expérimentale globale du dosage du glutathion pour lequel le protocole opératoire est décrit ci-après, étape par étape.

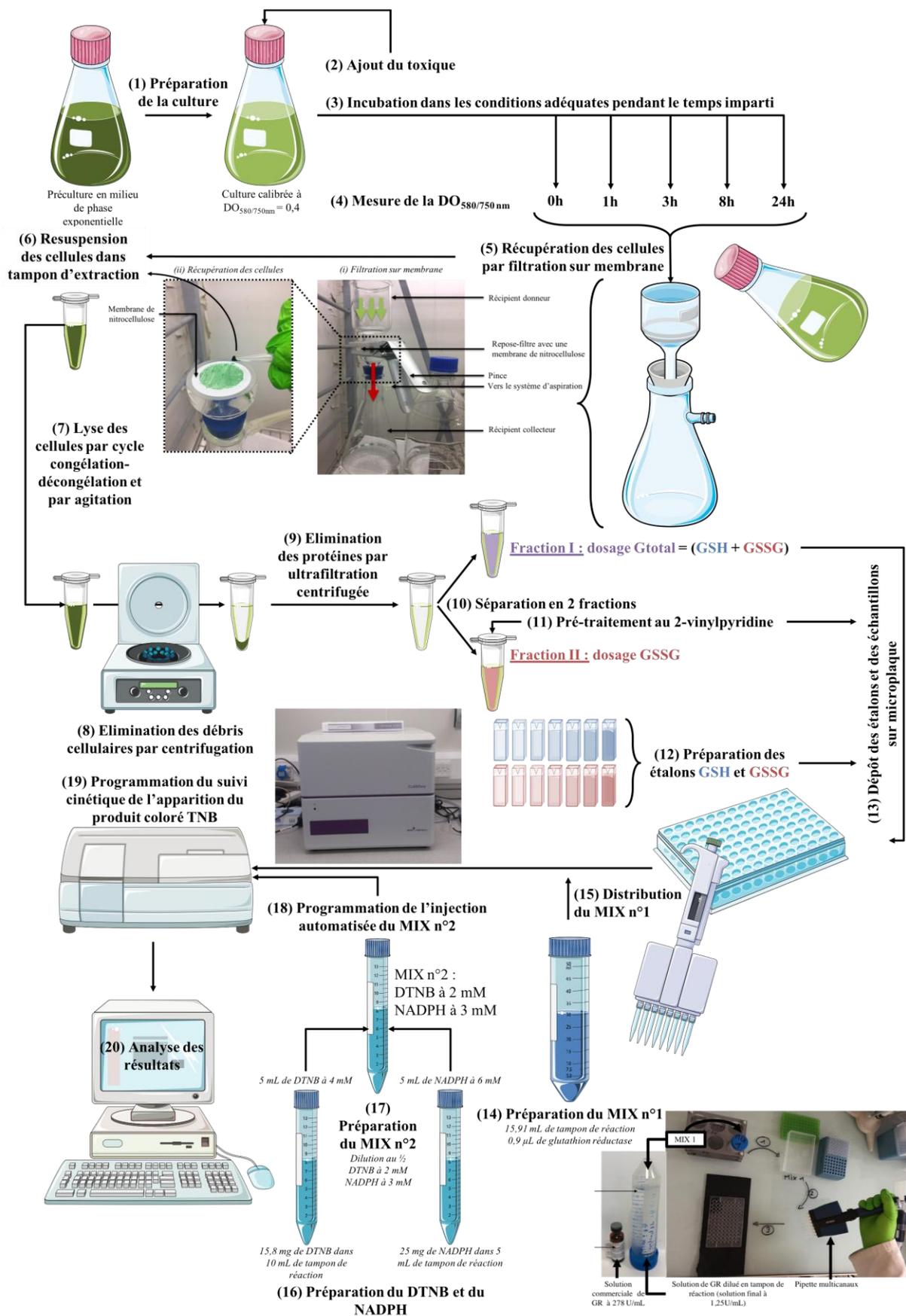


Figure 147 – Représentation schématique du mode opératoire du dosage du glutathion

Etape (1) : Préparation de la culture

A partir d'une pré-culture en milieu de phase exponentielle :

- Préparer 50 ml d'une culture calibrée à $DO_{580\text{ nm}} = 0,3$

Etape (2) : Ajout du toxique :

- Ajouter le volume adéquat de solution de toxique à tester (stress chimique)
OU
- Incuber dans les conditions adéquates de lumière ou de température (stress physique)

Etape (3) : Incubation dans les conditions adéquates pendant le temps imparti :

- Incuber dans différentes les conditions souhaitées pendant 0, 1, 3, 8 ou 24h (1 erlen par condition de temps)

Etape (4) : Mesure de la $DO_{580/750\text{ nm}}$:

- Après incubation, mesure la $DO_{580/750\text{ nm}}$.

Etape (5) : Récupération des cellules par filtration sur membrane :

- Collecter rapidement les cellules par filtration tangentielle sur membrane de cellulose (seuil de coupure : $0,45\ \mu\text{m}$; Millipore) sous une lumière blanche d'intensité lumineuse égale à 2500 lux (ou 7500 lux, le cas échéant)

Etape (6) : Resuspension des cellules dans tampon d'extraction :

- Récupérer les cellules en grattant la surface du filtre à l'aide d'un cône de P1000
- Ecraser le « morceau » de cellules contre la paroi d'un microtube de 1,5 mL content 1 mL de tampon phosphate d'extraction (100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7.5 ; 1 mM EDTA ; acide 5-sulfosalicylique 5 % (m/v) (SSA)) et vortexer vigoureusement pour resuspendre les cellules
- Congeler immédiatement la suspension cellulaire dans la carboglace

Etape (7) : Lyse des cellules par cycle de congélation-décongélation et par agitation :

- Réaliser 3 cycles congélation-décongélation dans l'azote liquide et dans l'eau tiède
- Placer les lysats cellulaires sur une plaque agitante/vibrante à 200 rpm pendant 10 min à 4°C

Etape (8) : Elimination des débris cellulaire par centrifugation :

- Centrifuger le lysat cellulaire obtenu à 14 000 rpm pendant 5 min à 4°C pour éliminer les débris cellulaires qui seront culottés

Etape (9) : Elimination des protéines par ultrafiltration centrifugée :

- Déposer 0,5 mL de surnageant du lysat dans une colonne d'ultrafiltration, préalablement lavé avec 0,5 mL d'eau ultra-pure par centrifugation à 14000 rpm pendant 5 min
- Centrifuger les colonnes d'ultrafiltration à 14 000 rpm pendant 20 min à 4°C afin d'éliminer les protéines de poids moléculaires supérieur à 30 kDa (dont les protéines GSH-dépendantes qui perturberaient le déroulé du dosage et l'équilibre du couple **GSH/GSSG**)

Etape (10) : Séparation en 2 fractions :

- Fractionner l'ultrafiltrat en :
 - a. une fraction I ($V_{\text{ultrafiltrat}} - 100\ \mu\text{L}$) pour le dosage du Gtotal (**GSH + GSSG**)
 - b. une fraction II (100 μL) pour le dosage **GSSG**
- Conserver à -80°C jusqu'au jour du dosage

Etape (11) : Prétraitement au 2-vinylpyridine :

A partir de la fraction I : pas de pré-traitement

A partir de la fraction II : pré-traitement au 2-vinylpyridine et à la triéthanolamine

- Ajouter 2 μL de 2-vinylpyridine pure
- Incuber sur glace pendant 1h
- Ajouter 2 μL de triéthanolamine à 25% (v/v) dans le tampon de réaction

Étape (12) : Préparation et dépôt des étalons :

- Procéder comme suit :

Protocole de préparation de la gamme d'étalonnage en GSH :

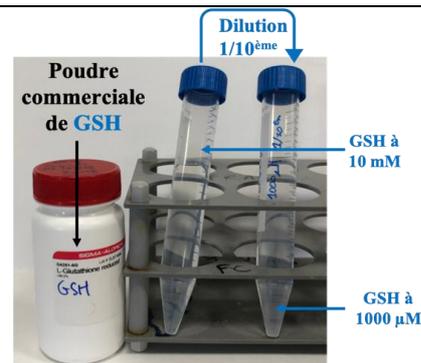
Étape 1 : Préparation d'une solution mère en GSH à 10 mM

- Peser une masse de 0,03073 g de GSH
- Dissoudre dans 10mL de tampon de réaction

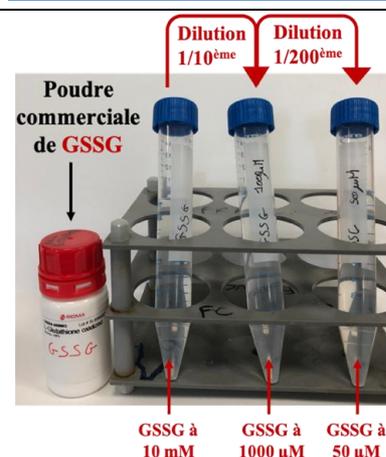
Étape 2 : Préparation d'une solution en GSH diluée au 1/10^{ème}

- Diluer 1 mL de solution mère en GSH à 10 mM dans 9 mL de tampon de réaction

Étape 3 : Préparation de la gamme d'étalonnage



[GSH] dans V _{TOT} étalon (en µM)	0	50	75	100	125	150	200	300	400	500	600	750
GSH diluée au 1/10 (en µL)		5	7,5	10	12,5	15	20	30	40	50	60	75
Tampon de réaction KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ 100 mM pH 7,5 EDTA 1mM (en µL)	100	95	92,5	90	87,5	85	80	70	60	50	40	25
[GSH] dans le MR (en µM)	0	2,5	3,75	5	6,25	7,5	10	15	20	25	30	37,5



Protocole de préparation de la gamme d'étalonnage en GSSG :

Étape 1 : Préparation d'une solution mère en GSSG à 10 mM

- Peser une masse de 0,06126 g de GSSG
- Dissoudre dans 10 mL de tampon de réaction

Étape 2 : Préparation d'une solution en GSSG diluée au 1/10^{ème}

- Diluer 1 mL de solution mère en GSSG à 10 mM dans 9 mL de tampon de réaction

Étape 3 : Préparation d'une solution en GSSG diluée au 1/200^{ème}

- Diluer 0,5 mL de solution en GSSG au 1/10^{ème} dans 9,5 mL de tampon de réaction

Étape 4 : Préparation de la gamme d'étalonnage

[GSSG] dans V _{TOT} étalon (en µM)	0	10	25	50	75	100	125	150	175	200	250
GSSG diluée au 1/10 ^{ème} (en µL)					7,5	10	12,5	15	17,5	20	25
GSSG diluée au 1/200 ^{ème} (en µL)		20	50	100							
Tampon de réaction KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ 100 mM pH 7,5 EDTA 1mM (en µL)	100	80	50	0	92,5	90	87,5	85	82,5	80	75
[GSSG] dans le MR (en µM)	0	0,25	0,625	1,25	1,875	2,5	3,125	3,75	4,375	5	6,25

Étape 4 : Traitement des étalons au 2-vinylpyridine et à la triéthanolamine

- Traiter les étalons GSSG comme les échantillons

Étape (13) : Dépôt des échantillons et des étalons sur microplaque :

- Déposer les échantillons selon un plan de microplaque pré-établi et selon les volumes prescrits dans le tableau ci-après dans une plaque 96 puits à fond plat :

	Dosage G _{total} (GSH + GSSG)	Dosage GSSG
Blanc	10 µL tampon	20 µL tampon
Étalon GSH	10 µL étalon	/
Étalon GSSG	/	5 µL étalon + 15 µL tampon
Echantillon	10 µL	20 µL
	10 µL MAX	20 µL MAX

La composition du mélange réactionnel pour le dosage G_{total} et GSSG est donnée ci-dessous :

	Dosage G_{total}	Dosage GSSG
Echantillon à analyser	10 μL	20 μL
Tampon phosphate de réaction ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 100 mM pH 7,5 et EDTA 1 mM)	169,1 μL	159,1 μL
Glutathion réductase (GR) à 278 U/mL	0,9 μL (1,25 U/mL final)	
DTNB à 4 mM	10 μL (0,2 mM final)	
NADPH à 6 mM	10 μL (0,3 mM final)	

Face aux nombre importants d'échantillons à traiter, procéder comme suit :

Étape (14) : Préparation du MIX n°1 :

- Préparer le MIX n°1 en fonction du nombre d'échantillons/microplaque à réaliser comme décrit dans le tableau ci-dessous :

	1 puits	1 μ plaque	2 μ plaques	3 μ plaques
$N_{\text{échantillon}}$	1	96	192	288
/	Prise en compte d'un volume de sécurité, soit :			
$N_{\text{échantillon corrigé}}$	1	100	200	300
/	<i>Cas du dosage G_{total} (GSH + GSSG)</i>			
Tampon de réaction	169,1 μL	16,91 mL	33,82 mL	50,73 mL
GR à 278 U/mL	0,9 μL	90 μL	180 μL	270 μL
V_{total} de MIX 1	160 μL	17 mL	34 mL	51 mL
V_{final} à distribuer par puits	170 μL			
/	<i>Cas du dosage GSSG</i>			
Tampon de réaction	159,1 μL	15,91 mL	31,82 mL	47,73 mL
GR à 278 U/mL	0,9 μL	90 μL	180 μL	270 μL
V_{total} de MIX 1	160 μL	16 mL	32 mL	48 mL
V_{final} à distribuer par puits	160 μL			

- Préchauffer le MIX n°1 à 37°C

Étape (15) : Distribution du MIX n°1 :

- Distribuer 160/170 μL de MIX n°1 par puits à l'aide d'une pipette multicanaux

Étape (16) Préparation du DTNB et du NADPH :

- Préparation d'une solution de DTNB à 4 mM dans le tampon de réaction :

- Peser 15,8 mg de DTNB
- Dissoudre dans 10 mL de tampon de réaction
- Conserver la solution à l'abri de la lumière

- Préparation d'une solution de NADPH à 6 mM dans le tampon de réaction :

- Dissoudre 25 mg de NADPH dans 5 mL de tampon de réaction (le flacon de NADPH commercial contient une masse de 25 mg)
- Conserver la solution à l'abri de la lumière

Étape (17) : Préparation du MIX n°2 :

- Diluer au $\frac{1}{2}$ les solutions de DTNB à 4 mM et de NADPH à 6 mM l'une avec l'autre de façon à obtenir un MIX n°23 contenant respectivement :

- du DTNB à 2 mM final
- du NADPH à 3 mM final

- Conserver la solution à l'abri de la lumière et pré-incuber à 37°C

Étape (18) : Programmation de l'injection automatisée du MIX n°2 et du lecteur:

- Mettre en milieu le système d'injection automatique du lecteur de microplaque par rinçage de 2 mL de MIX n°2
- Programmer le lecteur de microplaque pour assurer l'injection de 20 µL de MIX n°2 par puits

Étape (19) : Programmation du suivi cinétique de l'apparition du produit coloré TNB :

- Thermostater le lecteur de microplaque à 37°C
- Paramétrer le plan de microplaque et vérifier les paramètres de lecture

Étape (20) : Analyse des résultats

3) *Analyse des résultats*

A partir des résultats bruts donnés à l'issue du suivi cinétique de l'absorbance à 405 nm et en traçant la courbe $A_{405nm} = f(t \text{ en min})$, il est possible de déterminer la vitesse initiale formation du TNB (en unité d'absorbance à 405 nm par min) selon l'équation suivante :

$$\text{Vitesse initiale de formation du TNB} = \frac{\Delta A_{lue \text{ à } 405 \text{ nm}}}{\Delta t} = \text{coefficient directeur}$$

Ensuite, à l'aide des étalons, il est possible de tracer une courbe d'étalonnage qui corrèle la vitesse de formation du TNB à la concentration en GSH ou en GSSG dans le mélange réactionnel (MR). On peut ainsi déterminer :

$$[G]_{\text{dans } V_{TOT \text{ MR}}} = \frac{\text{Vitesse initiale de formation du TNB}}{\text{Coefficient directeur}} - \text{Ordonnée à l'origine}$$

A partir de la concentration en glutathion (G) ($G_{total} = GSH + GSSG$ ou $GSSG \text{ seul}$) dans le MR, il est alors possible de calculer la concentration en glutathion (G) dans la cellule en intégrant des données théoriques (volume interne d'une cellule de *Synechocystis* de $1,2 \cdot 10^{-11}$ mL (Mazouni et al., 2004)) et des données expérimentales (le nombre de cellules par mL correspond à 1 unité de DO à 580 nm, volume total de culture filtrée, volume total d'extrait...) et en suivant la démonstration ci-dessous :

On sait que :

$$\text{Quantité de G dans } V_{TOT \text{ MR}} = \text{Quantité de G dans } V_{PE \text{ extrait}}$$

$$[G]_{\text{dans } V_{TOT \text{ MR}}} \times V_{TOT \text{ MR}} = [G]_{\text{dans } V_{PE \text{ extrait}}} \times V_{PE \text{ extrait}}$$

$$[G]_{\text{dans } V_{PE \text{ extrait}}} = \frac{[G]_{\text{dans } V_{TOT \text{ MR}}} \times V_{TOT \text{ MR}}}{V_{PE \text{ extrait}}}$$

On sait également que :

$$[G]_{\text{par cellule}} = \frac{\text{Quantité de G dans } V_{TOT \text{ extrait}}}{N_{\text{cellules}}} \times \frac{1}{V_{\text{cellule } \textit{Synechocystis}}}$$

et :

$$\text{Quantité de G dans } V_{TOT \text{ extrait}} = [G]_{\text{dans VPE extrait}} \times V_{TOT \text{ extrait}}$$

J'en déduis donc que :

$$[G]_{\text{par cellule}} = \frac{[G]_{\text{dans VPE extrait}} \times V_{TOT \text{ extrait}}}{N_{\text{cellules}}} \times \frac{1}{V_{\text{cellule Synechocystis}}}$$

En remplaçant $[G]_{\text{dans VPE extrait}}$, j'obtiens alors :

$$[G]_{\text{par cellule}} = \frac{[G]_{\text{dans } V_{TOT MR}} \times V_{TOT MR}}{V_{PE \text{ extrait}}} \times \frac{V_{TOT \text{ extrait}}}{N_{\text{cellules}}} \times \frac{1}{V_{\text{cellule Synechocystis}}}$$

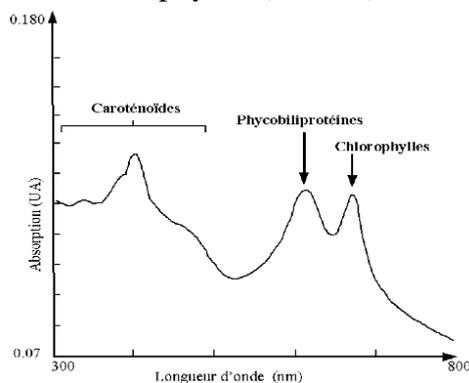
$$[G]_{\text{par cellule}} = \frac{[G]_{\text{dans } V_{TOT MR}} \times V_{TOT MR}}{V_{PE \text{ extrait}}} \times \frac{V_{TOT \text{ extrait}}}{DO_{580 \text{ nm}} \times \frac{N_{\text{cellules}}}{\text{ml}} \text{ pour } 1 \text{ DO}} \times \frac{1}{V_{\text{cellule Synechocystis}}}$$

En conclusion, les résultats ont été exprimés comme la moyenne de 3 réplicats donnant la valeur moyenne de 3 réplicats de la concentration intracellulaire en glutathion total (GSH + GSSG), du glutathion oxydé (GSSG) ou du glutathion réduit (GSH).

C. Analyse de la pigmentation en réponse aux stress

1) Analyse du contenu en pigments par spectre d'absorption

Un spectre d'absorption sur une culture de *Synechocystis* (dont un exemple est donné ci-dessous) permet d'évaluer l'abondance de 3 pigments : caroténoïdes (300-560 nm), phycobiliprotéines (620 nm) et les chlorophylles (680 nm).



	Caroténoïdes	Phycobiliprotéines	Chlorophylles	Couleur
Abondance	+++	+++	+++	Vert
	++++	+	++	Vert-Jaune clair
	+++++	++	+	Vert-Jaune clair
	++++	++	++	Vert-Jaune
	++++	++	+	Vert-Jaune
	+++	++	+	Bleu-vert
	+++	++	-	Bleu

Figure 148 – Spectre d'absorption typique d'une culture de *Synechocystis* et tableau de l'abondance relative des pigments selon la couleur de la culture

J'ai réalisé ce type de spectre d'absorption sur des cultures de *Synechocystis* (WT et mutants) calibrées à $DO_{800 \text{ nm}} = 0,1$.

2) Estimation du contenu en pigments par extraction au méthanol et chauffage

a. Estimation du contenu en chlorophylle *a* et en caroténoïdes par extraction à froid au méthanol

L'estimation du contenu en chlorophylle *a* et en caroténoïdes totaux repose sur une extraction à froid au méthanol et sur la mesure des absorbances à 470, 665 et 720 nm, d'après les formules de calculs suivantes :

Concentration en chlorophylle *a* (Chl *a*) (en µg/mL) :

$$[\text{Chl } a] = 12,9447 (A_{665 \text{ nm}} - A_{720 \text{ nm}})$$

(Ritchie, 2006)

Concentration en caroténoïdes totaux (en µg/mL) :

$$[\text{Caroténoïdes totaux}] = 1\,000 (A_{470 \text{ nm}} - A_{720 \text{ nm}}) - 2,86 ([\text{Chl } a]/221)$$

(Wellburn, 1994)

La démarche expérimentale à suivre est la suivante :

- A partir d'une préculture en milieu de phase exponentielle, préparer 10 mL d'une culture calibrée à $DO_{800 \text{ nm}} = 0,05$ et incuber pendant 1 nuit (environ 18h) dans les conditions testées
- Après incubation, mesurer $A_{800 \text{ nm}}$ (*celle-ci doit être comprise entre 0,1 et 0,3, si ce n'est pas le cas, diluer la culture pour être dans cet intervalle*)
- Dans un microtube de 1,5 mL, centrifuger 1 mL de culture à 14 000 rpm pendant 10 min à température ambiante et éliminer soigneusement la totalité du surnageant
- Ajouter 1 mL de méthanol pré-refroidi à 4°C et homogénéiser par aspiration-refoulement
- Incuber à 4°C à l'obscurité pendant 20 min (*le temps d'incubation peut être prolongé jusqu'à 2h*)
- Centrifuger à 14 000 rpm pendant 10 min et vérifier visuellement l'aspect du culot :
 - o Si le culot est bleu-violet : poursuivre le protocole (voir figure ci-après)
 - o Si le culot est : répéter l'extraction au méthanol (sans excéder 2h d'incubation)

***Synechocystis* sp. PCC 6803**

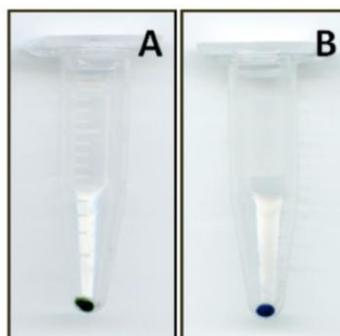


Figure 149 – Couleur des culots cyanobactériens avant ajout du méthanol (A) et après l'extraction de la chlorophylle *a* et des caroténoïdes par le méthanol (B)

- Mesurer contre du méthanol les absorbances des surnageants aux longueurs d'onde suivantes :
 - o 470 nm
 - o 665 nm
 - o 720 nm

b. Estimation du contenu en phycocyanine par chauffage

L'estimation du contenu en phycocyanine se fait par mesure des absorbances à 620 et 750 nm avant et après chauffage d'une culture cyanobactérienne et selon le calcul suivant :

Concentration en phycocyanine (PC) (en $\mu\text{g/mL}$) :

$$[\text{PC}] = (A_{620 \text{ nm}} - A_{750 \text{ nm}}) - (A_{620 \text{ nm chauffé}} - A_{750 \text{ nm chauffé}})$$

(Collier and Grossman, 1992)

La démarche expérimentale à suivre est la suivante :

- A partir d'une préculture en milieu de phase exponentielle, préparer 10 mL d'une culture calibrée à $\text{DO}_{800 \text{ nm}} = 0,05$ et incuber pendant 1 nuit (environ 18h) dans les conditions testées
- Après incubation, mesurer $A_{800 \text{ nm}}$ (*celle-ci doit être comprise entre 0,1 et 0,3, si ce n'est pas le cas, diluer la culture pour être dans cet intervalle*) et :
 - o $A_{620 \text{ nm}}$ et $A_{750 \text{ nm}}$
- Chauffer la culture pendant 8 min à 75°C et mesure de nouveau $A_{620 \text{ nm}}$ et $A_{750 \text{ nm}}$

III - Analyse biochimique et enzymatique de l'activité des GST recombinantes de *Synechocystis*

*A. Production et purification des GST recombinantes de *Synechocystis**

La production et la purification des GST cytosoliques (hors SII1147, la GST MAPEG membranaire) de *Synechocystis* a été réalisée au sein de l'équipe de Nicolas Rouhier et Arnaud Hecker (Interactions Arbres – Microorganismes, INRA, Université de Lorraine, UMR1136, Vandoeuvre-lès-Nancy, France). En conséquence, je ne présenterais pas ici le protocole détaillé. Néanmoins, à titre d'information, leur récent article « The poplar Phi class glutathione transferase : expression, activity and structure of GSTF1 » (Pégeot et al., 2014), ainsi que la section « Matériels et méthodes » de mon manuscrit intitulé « Methylglyoxal detoxification revisited: role of a cyanobacterial glutathione-S-transferase » donne des détails concernant ces manipulations.

*B. Caractérisation des activités enzymatiques des GST recombinantes de *Synechocystis**

La caractérisation des activités enzymatiques des GST recombinantes de *Synechocystis*, à l'aide de substrats classiques (CDNB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzene ; BITC : Benzy isothiocyanate ; PITC : Phenetyl isothiocyanate ; PNP-butyrates : 4-nitrophenyl butyrates ; HNE : 4-hydroxy-2-nonenal ; CuOOH : cumene hydroperoxyde) a également été réalisée par l'équipe de Nicolas Rouhier et Arnaud Hecker (Interactions Arbres – Microorganismes, INRA, Université de Lorraine, UMR1136, Vandoeuvre-lès-Nancy, France). Là encore, leur récent article « The poplar Phi class glutathione transferase : expression, activity and structure of GSTF1 » (Pégeot et al., 2014) expose les détails techniques relatifs à ces expériences.

C. Etude de l'activité enzymatique de la GST recombinante S110067 de Synechocystis sur le méthylglyoxal et le glutathion

Contrairement aux 2 items précédents, j'ai réalisé cette étude. De plus, s'agissant en partie d'une étude cinétique à 2 substrats, j'ai choisi de présenter en détail le principe et la mise en œuvre d'une telle caractérisation qui a été réalisé en 3 étapes :

- premièrement, j'ai réalisé le suivi cinétique de la consommation du méthylglyoxal (MG) et du glutathion (GSH) par mesure de la vitesse initiale,
- deuxièmement, j'ai étudié la cinétique enzymatique à 2 substrats de la GST S110067,
- et troisièmement, j'ai caractérisé l'influence du S-D-lactoylglutathion (un composé synthétisé au cours de la voie de détoxification du méthylglyoxal par les glyoxalases) sur la cinétique enzymatique de la GST S110067.

1) Suivi cinétique de la consommation du MG et du GSH par la GST S110067 par détermination de la vitesse initiale de la réaction

a. Principe

Le méthylglyoxal (MG) et le glutathion (GSH) étant toutes 2 des molécules ne présentant pas de propriétés spectrales ou acido-basiques facilement mesurable, il est impossible de suivre l'évolution de la réaction en temps réel par une méthode cinétique continue. Le suivi cinétique de la consommation du MG et du GSH par la GST S110067 par détermination de la vitesse initiale de la réaction a donc été réalisé selon une méthode cinétique discontinue par la technique de préparation de plusieurs milieux réactionnels (MR).

En d'autres termes, la réaction est déclenchée par l'ajout de l'enzyme puis stoppé à différents temps par l'ajout d'une solution d'arrêt, ce qui revient techniquement à ce schéma :

- Préparer plusieurs MR et déclencher la réaction à t_0 dans tous les MR,
 - o A t_1 : on stoppe la réaction dans le MR - on dose S
- on en déduit $[S]_{MR}$ à t_1
 - o A t_2 : on stoppe la réaction dans le MR - on dose S
- on en déduit $[S]_{MR}$ à t_2
 - o ...
 - o A t_n : on stoppe la réaction dans le MR - on dose S
- on en déduit $[S]_{MR}$ à t_n
- Et on trace ainsi point par point la courbe $[S]_{MR} = f(t)$.

b. Protocole

La détermination de la vitesse initiale pour le suivi cinétique de la consommation du MG et du GSH a été réalisée en présence de MG et de GSH aux concentrations initiales respectives de 50 et 1000 μM dans un volume final de mélange réactionnel de 1 mL, à 30°C et à pH 7,5 (tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 100 mM et EDTA 1 mM) pour différents temps d'incubation (10, 20, 30, 40, 50 et 60 s).

Pour le suivi cinétique de la consommation du MG, la réaction a été stoppée par incubation sur glace et ajout de 500 μL de tampon chlorure d'ammonium/ammoniac ($\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$) à pH 10-11 compatible avec le dosage par fluorimétrie du MG réalisé selon le protocole décrit précédemment (ajout de 2 mL d'une solution aqueuse de DDP à 1 mM,

incubation pendant 1h30 à 30°C, mesure de la fluorescence $\lambda_{exc} = 362 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 445 \text{ nm}$). Pour le suivi cinétique de la consommation du GSH, la réaction a été stoppée par incubation sur glace et ajout de 1 mL de tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 100 mM et EDTA 1 mM) supplémenté avec 1,2% (m/v) d'acide 5-sulfosalicylique (5-SSA) (pH 4-5), compatible avec le dosage du glutathion réalisé selon le protocole décrit précédemment (ajout du MIX1 contenant la GR, ajout du MIX2 contenant le DTNB et le NADPH et suivi cinétique de l'apparition du TNB à 402 nm).

Les vitesses initiales ont été exprimées en μmol de MG ou de GSH consommé par mg d'enzyme et par sec ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{sec}$).

2) Etude cinétique à 2 substrats de la GST SII0067

a. Principe et démarche expérimentale de l'analyse d'une cinétique à 2 substrats

Pour une réaction enzymatique à 2 substrats : $A + B \rightarrow P + Q$, l'analyse de la cinétique se fait en mesurant la vitesse initiale de disparition du substrat A en faisant varier la concentration du substrat A et inversement, selon la démarche détaillée décrite ci-après :

Lorsque le substrat A varie, on réalise :

- une première série de mesures des vitesses initiales est effectuée pour une gamme de concentration initiale en substrat A ($[A]_1, [A]_2 \dots [A]_n$) en présence d'une première concentration fixe en substrat B ($[B]_1$),
- une seconde série de mesures des vitesses initiales est effectuée pour une gamme de concentration initiale en substrat A ($[A]_1, [A]_2 \dots [A]_n$) en présence d'une deuxième concentration fixe en substrat B ($[B]_2$),
- une seconde série de mesures des vitesses initiales est effectuée pour une gamme de concentration initiale en substrat A ($[A]_1, [A]_2 \dots [A]_n$) en présence d'une n -ième concentration fixe en substrat B ($[B]_n$)...

On obtient ainsi ce type de tableau de résultats :

Vitesse initiales	Concentrations variables en substrat A			
	$[A]_1$	$[A]_2$...	$[A]_n$
$[B]_1$ fixe	$V_{i1} [B]_1$	$V_{i2} [B]_1$...	$V_{in} [B]_1$
$[B]_2$ fixe	$V_{i1} [B]_2$	$V_{i2} [B]_2$...	$V_{in} [B]_2$
...
$[B]_n$ fixe	$V_{i1} [B]_n$	$V_{i2} [B]_n$...	$V_{in} [B]_n$

Pour chaque concentration fixe en substrat B, on peut tracer un graphique dit « primaire » correspondant à une courbe de saturation en fonction de la concentration du substrat A. La représentation en double-inverse du type : $\frac{1}{V_{i[B]x}} = f\left(\frac{1}{[A]_i}\right)$ donne une droite dont l'ordonnée à l'origine vaut $\frac{1}{V_{max} [B]_x}$, tel que représenté ci-après.

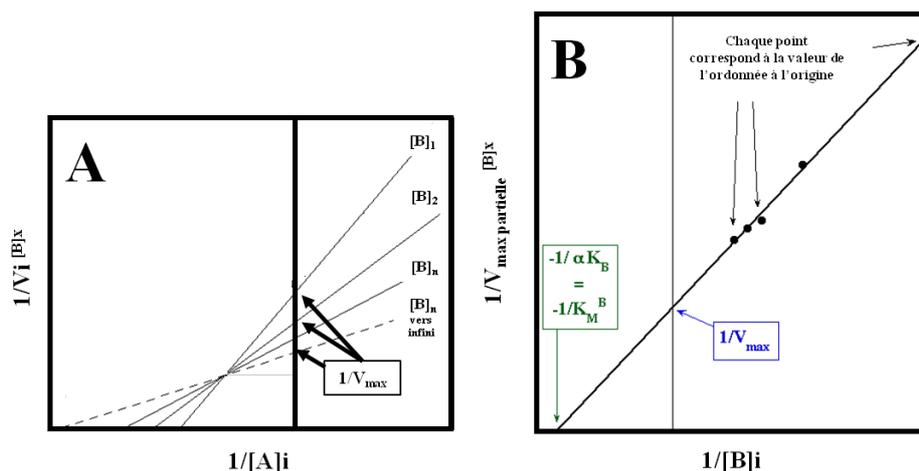


Figure 150 – Exemple théorique d'un (A) graphique primaire pour le substrat A en cinétique enzymatique à 2 substrats et du (B) graphique secondaire correspondant pour la détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme vis-à-vis du substrat B

Pour chaque concentration fixe du substrat B, on reporte la valeur de l'ordonnée à l'origine de chacune des droites obtenues (une pour chaque concentration fixe de B) correspondant à $\frac{1}{V_{max} [B]_x}$ dite « partielle ». On peut alors tracer la courbe du type $\frac{1}{V_{max} [B]_x} = f\left(\frac{1}{[B]_i}\right)$. Cette représentation en double-inverse et celle plus classique du type $V_{max} [B]_x = f([B]_i)$ qui sont dits graphique « secondaire », sont utilisés pour modéliser la cinétique michaelienne ou allostérique au moyen du logiciel GraphPad Prism 6, qui permet de déterminer les paramètres cinétiques (V_{max} et K_m apparent) pour le substrat B.

Lorsque le substrat B varie, on réalise :

- une première série de mesures des vitesses initiales est effectuée pour une gamme de concentration initiale en substrat B ($[B]_1, [B]_2 \dots [B]_n$) en présence d'une première concentration fixe en substrat A ($[A]_1$),
- une seconde série de mesures des vitesses initiales est effectuée pour une gamme de concentration initiale en substrat B ($[B]_1, [B]_2 \dots [B]_n$) en présence d'une deuxième concentration fixe en substrat A ($[A]_2$),
- une seconde série de mesures des vitesses initiales est effectuée pour une gamme de concentration initiale en substrat B ($[B]_1, [B]_2 \dots [B]_n$) en présence d'une n -ième concentration fixe en substrat A ($[A]_n$)...

On obtient ainsi ce type de tableau de résultats :

Vitesses initiales	Concentrations variables en substrat B			
	$[B]_1$	$[B]_2$...	$[B]_n$
$[A]_1$ fixe	$V_{i1} [A]_1$	$V_{i2} [A]_1$...	$V_{in} [A]_1$
$[A]_2$ fixe	$V_{i1} [A]_2$	$V_{i2} [A]_2$...	$V_{in} [A]_2$
...
$[A]_n$ fixe	$V_{i1} [A]_n$	$V_{i2} [A]_n$...	$V_{in} [A]_n$

Pour chaque concentration fixe en substrat A, on obtient une courbe de saturation en fonction de la concentration du substrat B. La représentation en double-inverse du type : $\frac{1}{v_i[A]_x} = f\left(\frac{1}{[B]_i}\right)$ donne une droite dont l'ordonnée à l'origine vaut $\frac{1}{V_{\max} [A]_x}$, tel que représenté ci-dessous :

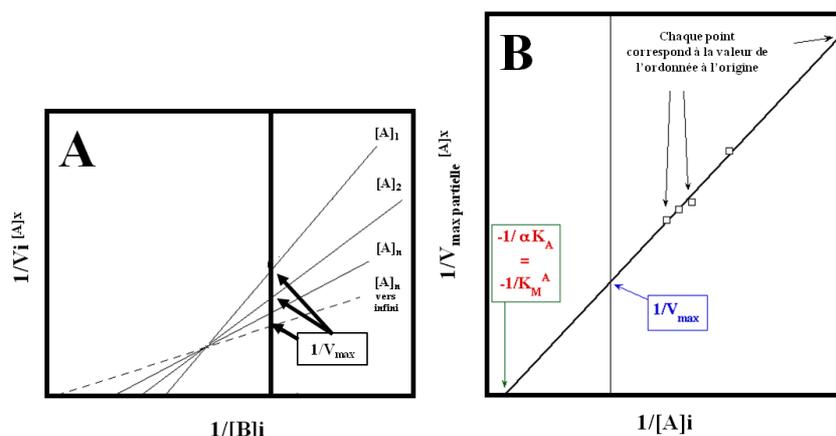


Figure 151 – Exemple théorique d'un (A) graphique primaire pour le substrat A en cinétique enzymatique à 2 substrats et du (B) graphique secondaire correspondant pour la détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme vis-à-vis du substrat B

Pour chaque concentration fixe du substrat A, on reporte la valeur de l'ordonnée à l'origine de chacune des droites obtenues (une pour chaque concentration fixe de A) correspondant à $\frac{1}{V_{\max} [A]_x}$ dite « partielle ». On peut alors tracer la courbe du type $\frac{1}{V_{\max} [A]_x} = f\left(\frac{1}{[A]_i}\right)$. Cette représentation en double-inverse et celle plus classique du type $V_{\max} [A]_x = f([A]_i)$ qui sont dits graphique « secondaire », sont utilisés pour modéliser la cinétique michaelienne ou allostérique au moyen du logiciel GraphPad Prism 6, qui permet de déterminer les paramètres cinétiques (V_{\max} et K_m apparent) pour le substrat A.

b. Protocole

L'étude cinétique à 2 substrats de l'enzyme SII0067 a été réalisée en présence de MG et de GSH à 30°C et à pH 7,5 (tampon phosphate 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 100 mM et EDTA 1 mM) selon les tableaux de protocole suivants :

Avec MG comme substrat variable :

	10 μM	25 μM	50 μM	75 μM	100 μM
MG à 2,5 mM	4 μL	10 μL	20 μL	30 μL	40 μL
GSH à 10 mM	10 μL (pour GSH fixe = 100 μM)				
	50 μL (pour GSH fixe = 500 μM)				
	100 μL (pour GSH fixe = 1000 μM)				
Tampon phosphate q.s.p 1 mL	985 μL	979 μL	969 μL	959 μL	949 μL
	945 μL	939 μL	929 μL	919 μL	909 μL
	895 μL	889 μL	879 μL	869 μL	859 μL
SII0067 à 2,21 mM	1 μL				

Avec GSH comme substrat variable :

	100 μM	500 μM	1000 μM	1500 μM	2000 μM
MG à 2,5 mM	10 μL (pour MG fixe = 25 μM)				
	20 μL (pour GSH fixe = 50 μM)				
	30 μL (pour GSH fixe = 75 μM)				
GSH à 10 mM	10 μL	50 μL	100 μL	150 μL	200 μL
Tampon phosphate q.s.p 1 mL	979 μL	939 μL	889 μL	839 μL	789 μL
	969 μL	929 μL	879 μL	829 μL	779 μL
	959 μL	919 μL	869 μL	819 μL	769 μL
SII0067 à 2,21 mM	1 μL				

Pour chaque condition, la réaction a été stoppée après 20 sec d'incubation par incubation sur glace et par ajout de :

- 500 μL de tampon ammonium ($\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$) dilué au $\frac{1}{2}$ pH 10 – 11 (Merck) de façon à réaliser le dosage du MG comme décrit précédemment,
- 1 mL de tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 100 mM et EDTA 1 mM) supplémenté avec 1,2 % (m/v) d'acide 5-sulfosalicylique (5-SSA) pour réaliser le dosage du GSH comme décrit précédemment.

3) *Etude de l'effet du S-D-lactoylglutathion sur la cinétique à 2 substrats de la GST SII0067*

Cette étude a été réalisée en présence de MG et de GSH avec des concentrations croissantes en S-D-lacotylglutathion.

Il est important d'analyser le rôle du glutathion (GSH) et des glutathion-S-transférases (GST) chez les cyanobactéries. En effet, elles sont considérées comme ayant développé le GSH et les GST pour combattre les ROS qu'elles produisent par leur métabolisme photosynthétique. Les cyanobactéries présentent également un intérêt biotechnologique croissant qui est néanmoins souvent limité par le manque de connaissances sur les réponses aux stress qui limitent la construction d'usines cellulaires performantes.

De plus, la plupart des mécanismes de gestion du stress ont été conservés dans l'évolution mais complexifiés chez les plantes supérieures et les mammifères, du fait de l'incroyable diversité des GST et de leur expression tissu-spécifique notamment. Ces observations rendent ainsi très difficile toute analyse de la redondance/sélectivité des GST chez ces organismes. A l'inverse, chez la cyanobactérie modèle *Synechocystis* PCC 6803 (*Synechocystis*), cette étude est réalisable puisqu'elle est facilement cultivable et génétiquement manipulable et elle ne possède que 6 GST. Ce manuscrit de Thèse, rapporte la première analyse *in vivo* des 6 GST de *Synechocystis*. Brièvement, j'ai montré que :

- Les GST **SII1545** et **Slr0236**, qui possèdent la meilleure homologie de séquence primaire (elles sont homologues), sont respectivement essentielle (SII1545) et non-essentielle (Slr0236) à la croissance de *Synechocystis* dans les conditions photo-autotrophiques standard. SII1545 et Slr0236 interviennent dans la tolérance aux stress photo-oxydant déclenchés par la forte lumière, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), la ménadione et le bleu de méthylène. Chez le mutant Δ *slr0236-sII1545*, le cumul de l'absence de Slr0236 et de la diminution de SII1545 augmente la sensibilité à la forte lumière et au bleu de méthylène. Ainsi traité, le mutant Δ *slr0236-sII1545* augmente transitoirement, et séquentiellement, son niveau de ROS, puis de GSH et de GSSG. Ceci montre que les GST SII1545 et Slr0236 interviennent dans des mécanismes utilisant le glutathion pour lutter contre ces stress. Par contre, l'absence de Slr0236 et la diminution de SII1545 augmentent, de façon cumulable, la résistance à H₂O₂ et à la ménadione, en raison de l'augmentation de l'activité peroxydase (H₂O₂) ou de l'activité catalase et/ou peroxydase (ménadione) de la catalase bifonctionnelle de *Synechocystis*. Ce travail est publié dans le journal *Frontiers in microbiology* (Kammerscheit et al., 2019).

Le dernier point que nous avons soulevé concernant le lien entre les GST SII1545 et Slr0236 et la catalase bifonctionnelle de *Synechocystis* est intéressant. Et ce d'autant plus que la GST SII1545 et la catalase sont toutes 2 des protéines glutathionylables chez *Synechocystis* (Chardonnet et al., 2015). Ainsi, une étude des interactions protéine-protéine ciblée par double hydride bactérien ainsi que l'étude des voies de signalisation/régulation en réponse au stress oxydant impliquant SII1545/Slr0236/catalase seraient pertinentes.

- **SII1147** n'est pas essentielle à la croissance de *Synechocystis* dans les conditions photo-autotrophiques standard, mais qu'elle joue un rôle important dans la tolérance aux stress thermiques (chaud et froid, immanquablement rencontrés par les cyanobactéries durant l'alternance jour/nuit et la succession des saisons), et au *n-tert*-butylhydroperoxyde (*n-t*BOOH) qui provoque une peroxydation des lipides, notamment membranaires. Le mutant Δ *sII1147* exposé à la chaleur, au froid ou au *n-t*BOOH augmente transitoirement, et séquentiellement, son niveau de lipides peroxydés puis de GSH et de GSSG. Ces résultats sont importants car on connaît mal les mécanismes moléculaires de signalisation et/ou de protection des cyanobactéries

contre les stress thermiques (jusqu'ici on connaît quelques kinases et désaturases), qui pourraient augmenter dans le futur (en fréquence et/ou en intensité) sous l'effet du changement climatique, et ainsi interférer avec la production de biomasse pour la chaîne alimentaire et/ou la synthèse de produits d'intérêt biotechnologiques. Nous avons également montré que la faible résistance du mutant $\Delta sll1147$ à la chaleur, au froid ou au *n*-*t*BOOH pouvait être augmentée par l'expression dans ses cellules des gènes humains (adaptés au biais de codon cyanobactérien) codant pour les MAPEG hmGST2 et hmGST3 homologues à Sll1147. Enfin l'expression de ces gènes humains dans la bactérie (non photosynthétique) *Escherichia coli* permet d'accroître sa tolérance à la chaleur et au *n*-*t*BOOH. Ceci montre que la GST Sll1147 intervient dans des mécanismes utilisant le glutathion pour lutter contre les stress thermiques et *n*-*t*BOOH qui perturbent la fluidité membranaires et que ces mécanismes ont été (au moins en partie) conservés par l'évolution des (cyano)bactéries à l'homme. Ce travail est soumis pour publication dans le journal *Frontiers in microbiology* (Kammerscheit *et al* 2019: From cyanobacteria to human, MAPEG-type glutathione-S-transferases operate in cell tolerance to heat, cold and lipid peroxidation).

Les résultats présentés dans ce manuscrit sont important pour les raisons suivantes : (i) les mécanismes qui régissent les réponses au froid (diminution de la fluidité membranaire compensée par une désaturation des lipides membranaires catalysée par des acides gras désaturases) ou au chaud (augmentation de la fluidité membranaire compensée par le remplacement des acides gras insaturés par de nouveaux acides gras saturés) sont peu décrits chez les cyanobactéries (Maksimov *et al.*, 2017; Pittera *et al.*, 2018), (ii) la démonstration qu'une GST est impliquée dans la gestion du stress thermique n'a jamais été décrite, à ma connaissance et (iii) bien que la plupart des cyanobactéries modèles soient cultivées de façon optimale en laboratoire pour de température comprise entre 25 et 35°C, les photobioréacteurs extérieurs dans les zones sub-tropicales présentent des températures qui peuvent aller au-delà de 40°C. L'essor des biotechnologies sur les cyanobactéries nécessitera donc une meilleure compréhension des mécanismes de gestion du stress thermique, d'autant plus que la culture à haute température peut diminuer la probabilité des contaminations. Enfin, le conservation du rôle des MAPEG des (cyano)bactéries à l'Homme dans la réponse aux températures élevées est à mettre en perspective avec le fait que d'autres MAPEG (PGES, LTC₄ synthase et FLAP) sont requises dans le processus d'inflammation (Sjögren *et al.*, 2013; Bankova *et al.*, 2016). Dans ce contexte, il est important de souligner que le rôle des MAPEG dans l'inflammation et plus encore dans la fièvre doit être pleinement étudié.

- **Sll0067** n'est pas essentielle à la croissance de *Synechocystis* dans les conditions photo-autotrophiques standard, mais elle intervient dans la tolérance au méthylglyoxal (MG). En réponse au MG exogène, le mutant $\Delta sll0067$ accumule transitoirement du MG puis du GSH. L'activité GST de Sll0067, mesurée *in vitro* par la conjugation du glutathion avec le CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene), est inhibée par le MG. L'activité de Sll0067 consomme du GSH et du MG, suggérant que Sll0067 est capable de conjuguer le GSH avec le MG. L'analyse cinétique à 2 substrats (GSH et MG) montre qu'effectivement Sll0067 catalyse la conjugaison GSH avec le MG. La fixation du MG est coopérative et augmente l'affinité de Sll0067 pour le GSH. Nous avons montré que cette activité, qui devrait logiquement produire de l'hémithioacetal (HTA), est stimulée par le S-D-lactoylglutathion, un métabolite issu de la transformation du HTA catalysée par la glyoxalase I qui est ensuite transformé en lactate par la glyoxalase II. Ces résultats indiquent que Sll0067 catalyse la conjugaison du GSH avec le MG, une réaction qui était considérée comme spontanée jusqu'ici. Cette

réaction qui initie la détoxification du MG est essentielle à la santé de la plupart des cellules. Chez l'homme l'accumulation du MG entraîne diverses pathologies graves (diabète, maladie d'Alzheimer, cancer...). Ce travail est exposé dans un manuscrit en cours d'écriture.

Ce résultat est novateur puisqu'il va à l'encontre de la voie glyoxalase-dépendante de détoxification du MG. Il doit, de plus, stimuler la communauté scientifique pour identifier d'éventuelles interactions protéine-protéine entre la GST SII0067 et les glyoxalases de *Synechocystis*. L'identification de GST aux propriétés similaires à SII0067 chez d'autres organismes m'apparaît également intéressante en particulier chez les plantes, chez l'Homme (chez lequel le MG est impliquée dans de nombreuses pathologies) et chez des parasites (comme *Plasmodium*) qui consomment énormément de glucose et nécessite donc une voie de détoxification du MG très efficace afin de faire de ces nouvelles GST détoxifiant le MG, de futures cibles thérapeutiques.

- J'ai également débuté l'analyse des deux dernières GST de *Synechocystis* : **SII1902** et **Slr0605** et montré qu'elles ne sont pas essentielles à la croissance de *Synechocystis* dans les conditions photo-autotrophiques standard. L'absence de l'une ou l'autre de ces protéines ne modifie pas la croissance des cellules (donc la fixation du CO₂ atmosphérique). Par contre, dans ces conditions, le double mutant $\Delta slr0605-sll1902$ pousse moins bien que les simples mutants $\Delta sll1902$ et $\Delta slr0605$ qui se comportent comme la souche sauvage (WT). La différence de croissance dépendante de l'assimilation du CO₂ atmosphérique est encore plus grande sous forte lumière (5000 lux) puisque le double mutant $\Delta slr0605-sll1902$ ne pousse quasiment pas dans ces conditions. Il adopte une couleur jaunâtre causée par l'accumulation de caroténoïdes, alors que les autres souches conservent une croissance active et une couleur (bleu-vert) normale. Ces résultats suggérant que l'absence de carbonate dans le milieu engendre un stress oxydant chez double mutant $\Delta slr0605-sll1902$ ont été confortés par les mesures de ROS et de glutathion (GSH et GSSG). Effectivement, en absence de carbonate dans le milieu, le double mutant $\Delta slr0605-sll1902$ accumule des ROS (pendant 8 heures) qui sont éliminés (en 24 heures) probablement plus par l'accumulation lente de caroténoïdes (ils sont 5 fois plus abondants à 24 heures) que de glutathion (légère augmentation lente). Ces résultats suggèrent que les protéines SII1902 et Slr0605 participent, de façon synergique (les perturbations sont plus fortes chez le double mutant de délétion que chacun des simples), à la gestion du stress photo-oxydant provoqué par une perturbation de l'équilibre de l'assimilation de l'énergie lumineuse (qui génère du NADPH et de l'ATP) et du CO₂ atmosphérique (qui consomme du NADPH et de l'ATP). Le mécanisme de tolérance à ce stress photo-oxydant implique plus une augmentation des caroténoïdes antioxydants que du glutathion, contrairement au mécanisme impliquant les GST SII1145 et Slr0236, évoqué plus haut.

L'ensemble de ces résultats illustrent la sélectivité des GST vis-à-vis des agents déclenchant le stress photo-oxydant (équilibre lumière/carbone inorganique, H₂O₂, ménadione, bleu de méthylène, n-tertbutylhydroperoxyde, température) et des mécanismes de protection mis en jeu (teneur et oxydo/réduction du glutathion, activité catalase/peroxidase, teneur en caroténoïde). Le schéma-bilan ci-après illustre parfaitement cette sélectivité.

Les résultats préliminaires obtenus lors de l'analyse du rôle des GST Sll1902 et Slr0605 sont particulièrement intéressants car ils dessinent un possible rôle régulateur central et ce pour plusieurs raisons.

- Premièrement, nos collaborateurs (Nicolas Rouhier et Arnaud Hecker) pensent que ces 2 protéines présenteraient des activités inverses à la conjugaison du GSH, à savoir une activité de déglutathionylation, du fait de l'absence de la sérine activatrice remplacée par une cystéine. Cela a été confirmé par leur analyse phylogénétique plaçant respectivement Sll1902 et Slr0605 dans la classe Iota/DHAR (déhydroascorbate réductase) et Xi (ou glutathionyl-hydroquinone réductase) dont les activités réductases provoquent des glutathionylation/déglutathionylation (activité thiol-transférase). De plus, le test HED (hydroxyéthyl disulfide) réalisés par l'équipe de Nicolas Rouhier et Arnaud Hecker a confirmé expérimentalement la présence d'une forte activité thiol-transférase pour Sll1902.
- Deuxièmement, la présence de plusieurs motifs de type CPXC révélés par l'analyse de la séquence et qui sont caractéristiques des glutarédoxines (GRX) qui participent à l'homéostasie des thiols. Est compatible avec une fonction de senseur de l'équilibre rédox du couple GSH/GSSG.
- Dernièrement, une caractéristique structurale étonnante en cours d'analyse par nos collaborateurs (données confidentielles) suggèrent la possible capacité de Sll1902 de sentir et de participer à l'équilibre du couple NAD(P)H/NAD(P)⁺.

Le potentiel double rôle de senseur rédox de l'état « oxydatif » (ratio GSH/GSSG) et de l'état « métabolique » (ratio NAD(P)H/NAD(P)⁺ en lien avec le rapport entre le flux photons/électrons et carbone) de la cellule est cohérent avec nos premiers résultats.

Ainsi, en confrontant cette hypothèse à la nature des conditions testées sur les mutants $\Delta sll1902$, $\Delta slr0605$ et $\Delta slr0605-sll1902$, il apparaît que le rôle de « senseur » de l'état des thiols en lien avec le stress oxydant est plutôt mis en évidence en condition standard de photoautotrophie (c'est-à-dire en présence de carbone dissous dans le milieu = MM + HCO₃⁻). Dans cette condition, nous avons tout d'abord observé une diminution du niveau de phycocyanine compatible avec la glutathionylation identifiée chez *Synechocystis* (Chardonnet et al., 2015) pour les protéines HemB, HemC, HemE, HemF et HemL impliquées dans la synthèse des hèmes pour les phycobilliprotéines et des protéines ApcC, ApcD, ApcE et CpcG et CpeS impliquées dans l'assemblage du phycobilisome. Nous avons ensuite constaté une réponse glutathion-dépendante à l'exposition à cette condition caractérisée par une accumulation à 1h de ROS, suivie à 3h d'une augmentation du contenu en GSH puis en GSSG à 8h. Cette réponse indique que Sll1902 et Slr0605 ont un rôle dans la détoxification des ROS via un mécanisme qui convertit le GSH en GSSG. Néanmoins, cette interprétation présente plusieurs limites. La première provient de son incompatibilité avec l'activité de glutathionylation/déglutathionylation. La deuxième s'explique par la faible homologie de séquence que ces 2 GST partagent avec Sll1545 et Slr0236, qui sont, elles, véritablement impliquées dans ce mécanisme GSH-dépendant de détoxification des ROS. Enfin, en notant une nouvelle fois que la GST Sll1545 et la catalase bifonctionnelle sont glutathionylables, il est envisageable que la réponse GSH-dépendante observée en réponse à la culture en MM +

HCO₃⁻ soient causée par la dérégulation de leurs activités causées par l'absence de Sll1902 et Slr0605. Notons en plus que d'autres protéines impliquées dans la réponse aux stress sont glutathionylables comme une peroxiredoxine (AhpC) et une glutathion peroxydase (GPX1) chez *Synechocystis* (Chardonnet et al., 2015).

Si maintenant nous nous intéressons aux phénotypes observés en absence de carbone dissous dans le milieu (MM – HCO₃⁻), ceux-ci semblent compatibles avec l'hypothèse du rôle « senseur » de l'état rédox métabolique de la cellule exercé par Sll1902 et Slr0605. Nous avons observé une accumulation massive de ROS chez les mutants $\Delta sll1902$, $\Delta slr0605$ et $\Delta slr0605-sll1902$. Celle-ci est bien plus tardive et prolongée (entre 1h et 3h et jusqu'à 8h) que chez les mutants $\Delta sll1545$, $\Delta slr0236$ et $\Delta sll1545-slr0236$ sensibles au stress oxydant (burst oxydatif à 1h). Cette observation me semble compatible avec une dérégulation métabolique globale. En effet, le niveau augmenté en glutathion réduit (GSH) qui semble atteindre une nouvelle valeur de consigne chez les mutants $\Delta sll1902$, $\Delta slr0605$ et $\Delta slr0605-sll1902$ n'a semble-t-il pas d'influence sur la diminution du contenu en ROS. A l'inverse, l'accumulation importante en caroténoïdes entre 8 et 24h est parfaitement corrélée à la diminution des ROS. Cette réponse caroténoïde-dépendante me semble donc être la conséquence du déséquilibre entre le flux de photons/électrons excédentaires et la faible conversion du NADPH en NADP⁺ causée par une assimilation du carbone minimale (son apport étant limité dans le milieu). En conséquence, les électrons excédentaires recombinent et induisent la formation de ROS, qui sont détoxifiés grâce aux caroténoïdes. Dans ces conditions, il convient de noter que ces observations sont compatibles avec les différentes potentielles cibles de (dé)glutathionylation de Sll1902 et Slr0605. Parmi elles, l'enzyme CrtE, qui est impliquée notamment dans la synthèse des caroténoïdes, est un candidat de choix même si l'augmentation des caroténoïdes me semble être plutôt la conséquence de la dérégulation globale du métabolisme. En effet, parmi les autres cibles glutathionylables, on compte la glutathion synthase (GshB) ce qui peut expliquer les niveaux plus élevés en GSH mesurés chez les mutants $\Delta sll1902$, $\Delta slr0605$ et $\Delta slr0605-sll1902$. L'augmentation du niveau en GSH peut également provenir d'une dérégulation globale de l'homéostasie des thiols. La croissance limitée en absence de carbone dissous du double mutant $\Delta slr0605-sll1902$ est cohérente avec la glutathionylation potentielle des protéines Slr0040 (bicarbonate-binding protein CmpA), Slr0537 (bicarbonate transport ATP-binding protein) qui assure le transport de l'ion HCO₃⁻ et de la protéine CupA (hypothetical protein ; protein involved in low CO₂-inducible high affinity CO₂ uptake) (Chardonnet et al., 2015).

En conclusion, j'estime que l'analyse du rôle des GST Sll1902 et Slr0605 est pour le moment incomplète mais se révèle très prometteuse tant leur possible fonction de régulateur peut apporter une vision plus fine du métabolisme et de la physiologie de *Synechocystis*.

Enfin, au cours de mes travaux, j'ai montré que la toxicité des terpènes était plutôt due à la présence d'un groupement fonctionnel (de type alcool, aldéhyde, cétone) qu'à la longueur de leur chaîne carbonnée. Ces analyses nous ont également révélés que la toxicité des terpènes varie selon leur stéréoisomérisation. J'ai également montré que les exopolysaccharides sont essentiels à la tolérance aux terpènes et confirment ainsi leur rôle de première barrière contre des toxiques. En analysant la tolérance/sensibilité des différents mutants de délétion Δgst , nous avons noté peu de différences entre la souche WT et ces mutants après une exposition en présence de solvants (le dodécane, utilisé pour collecter les terpènes produits par le laboratoire) ou d'alcools. En revanche, les résultats obtenus en présence des divers stéréoisomères du limonène et du pinène ont montré le possible rôle direct ou indirect des

GST de *Synechocystis* dans la résistance aux terpènes. Ainsi, le mutant $\Delta sll0067$ est plus tolérant au limonène que la souche WT mais également aux 2 formes α du pinène. En considérant les GST comme uniquement des enzymes dédiées à la détoxification des xénobiotiques, il est possible que la GST Sll0067 présente une stéréospécificité sur les liaisons α/β . Quant à la légère résistance des mutants $\Delta sll1545$ et $\Delta slr0236$ au pinène et au limonène, elle est difficile à expliquer. Néanmoins, 2 phénotypes de tolérance/sensibilité ont particulièrement attiré notre attention.

Le premier concerne la résistance globale du mutant $\Delta sll1147$, à la fois au limonène et au pinène. Ce résultat semble cohérent si l'on considère que la GST Sll1147 participe à la régulation de la fluidité membranaire et que les terpènes (hydrophobes) peuvent interagir avec les membranes. L'effet de triterpènes sur la fluidité, la perméabilité, la structure et le comportement thermique des bicouches lipidiques a d'ailleurs été étudié (Abboud, 2016).

Le second concerne la tolérance des mutants $\Delta sll1902$ et $\Delta slr0605$ au pinène et leur très forte sensibilité au limonène. En revenant sur la définition historique des GST, il est tout à fait possible d'imaginer que les GST Sll1902 et Slr0605 présentent une spécificité de substrats étroite. Néanmoins, elles ne sont pas censées posséder d'activité de conjugaison. En revanche, la sensibilité des mutants $\Delta sll1902$ et $\Delta slr0605$ au limonène serait compatible avec une activation de la peroxyrédoxine AhpC par glutathionylation/déglutathionylation dont l'activité cause une augmentation de la toxicité naturelle du limonène chez *E. coli* en catalysant la formation de limonène hydroperoxyde (Chubukov et al., 2015).

En conclusion, ce projet de thèse apporte une vision moins dogmatique des GST en démontrant qu'elles n'interviennent pas uniquement dans la détoxification des xénobiotiques mais aussi dans la gestion de stress « naturel » et endogène mais aussi probablement dans la régulation fine du métabolisme *via* des activités de glutathionylation/déglutathionylation. Enfin, nos résultats montrent une certaine redondance fonctionnelle en particulier concernant les GST Sll1545 et Slr0236 qui joue un rôle central dans la défense contre le stress oxydant, mais surtout une véritable sélectivité comme veut le montrer la figure-bilan ci-après.

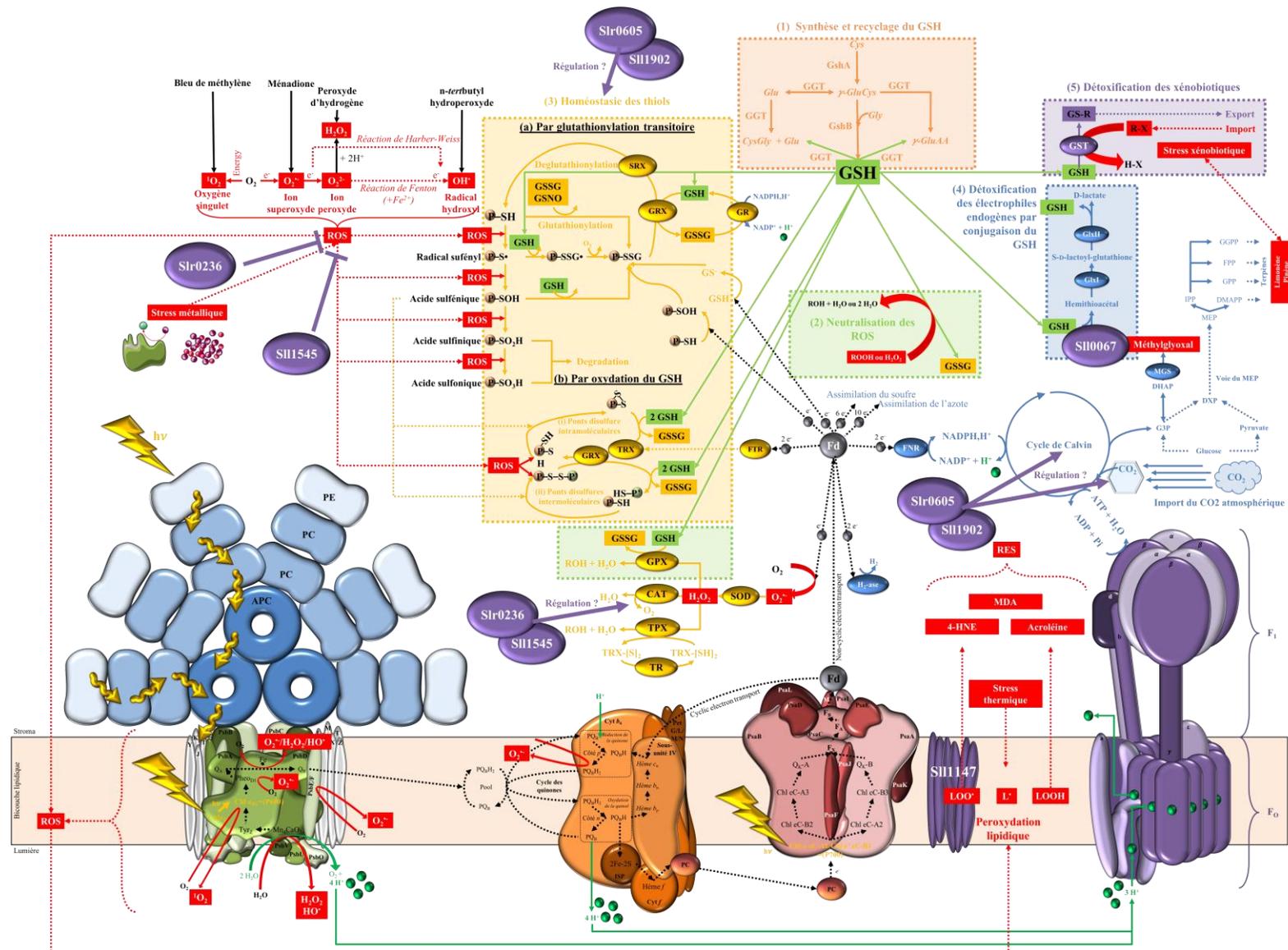


Figure 152 – Figure-bilan rendant compte de la sélectivité fonctionnelle des 6 GST de *Synechocystis*

REFERENCES

- Abboud, R., 2016. Interaction des triterpènes avec les membranes synthétiques et l'albumine humaine : application aux progestatifs et corticostéroïdes et à deux structures pentacycliques.
- Adir, N., Dines, M., Klartag, M., McGregor, A., Melamed-Frank, M., 2006. Assembly and Disassembly of Phycobilisomes, in: Shively, J.M. (Ed.), *Complex Intracellular Structures in Prokaryotes*, Microbiology Monographs. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 47–77. https://doi.org/10.1007/7171_020
- Aebi, H., 1984. [13] Catalase in vitro, in: *Methods in Enzymology, Oxygen Radicals in Biological Systems*. Academic Press, pp. 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Agarwal, R., Ortleb, S., Sainis, J.K., Melzer, M., 2009. Immunoelectron Microscopy for Locating Calvin Cycle Enzymes in the Thylakoids of *Synechocystis* 6803. *Mol. Plant* 2, 32–42. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn075>
- Ago, H., Kanaoka, Y., Irikura, D., Lam, B.K., Shimamura, T., Austen, K.F., Miyano, M., 2007. Crystal structure of a human membrane protein involved in cysteinyl leukotriene biosynthesis. *Nature* 448, 609–612. <https://doi.org/10.1038/nature05936>
- Akerboom, T.P., Sies, H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373–382.
- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M., Ilio, C.D., 2009. Glutathione transferases in bacteria. *FEBS J.* 276, 58–75. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06743.x>
- Alqarni, M.H., Muharram, M.M., Alshahrani, S.M., Labrou, N.E., 2019. Copper-induced oxidative cleavage of glutathione transferase F1-1 from *Zea mays*. *Int. J. Biol. Macromol.* 128, 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.128>
- Anderson, L.E., 1971. Chloroplast and cytoplasmic enzymes II. Pea leaf triose phosphate isomerases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.* 235, 237–244. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(71\)90051-9](https://doi.org/10.1016/0005-2744(71)90051-9)
- Armstrong, R.N., 1998. Mechanistic imperatives for the evolution of glutathione transferases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 618–623. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(98\)80093-8](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(98)80093-8)
- Atkinson, H.J., Babbitt, P.C., 2009a. An Atlas of the Thioredoxin Fold Class Reveals the Complexity of Function-Enabling Adaptations. *PLoS Comput. Biol.* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000541>
- Atkinson, H.J., Babbitt, P.C., 2009b. Glutathione Transferases Are Structural and Functional Outliers in the Thioredoxin Fold. *Biochemistry* 48, 11108–11116. <https://doi.org/10.1021/bi901180v>
- Awramik, S.M., 1992. The oldest records of photosynthesis. *Photosynth. Res.* 33, 75–89. <https://doi.org/10.1007/BF00039172>

- Badger, M.R., Price, G.D., Long, B.M., Woodger, F.J., 2006. The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *J. Exp. Bot.* 57, 249–265. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri286>
- Bankova, L.G., Lai, J., Yoshimoto, E., Boyce, J.A., Austen, K.F., Kanaoka, Y., Barrett, N.A., 2016. Leukotriene E₄ elicits respiratory epithelial cell mucin release through the G-protein–coupled receptor, GPR99. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 6242–6247. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605957113>
- Barnett, J.P., Millard, A., Ksibe, A.Z., Scanlan, D.J., Schmid, R., Blindauer, C.A., 2012. Mining Genomes of Marine Cyanobacteria for Elements of Zinc Homeostasis. *Front. Microbiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00142>
- Battchikova, N., Vainonen, J.P., Vorontsova, N., Keränen, M., Carmel, D., Aro, E.-M., 2010. Dynamic Changes in the Proteome of *Synechocystis* 6803 in Response to CO₂ Limitation Revealed by Quantitative Proteomics. *J. Proteome Res.* 9, 5896–5912. <https://doi.org/10.1021/pr100651w>
- Battistuzzi, F.U., Feijao, A., Hedges, S.B., 2004. A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evol. Biol.* 4, 44. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-4-44>
- Beck, C., Knoop, H., Axmann, I.M., Steuer, R., 2012. The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. *BMC Genomics* 13, 56. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-56>
- Benson, A.M., Talalay, P., Keen, J.H., Jakoby, W.B., 1977. Relationship between the soluble glutathione-dependent delta 5-3-ketosteroid isomerase and the glutathione S-transferases of the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 158–162. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.1.158>
- Bhaya, D., 2004. Light matters: phototaxis and signal transduction in unicellular cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* 53, 745–754. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04160.x>
- Blocki, F.A., Ellis, L.B., Wackett, L.P., 1993. MIF protein are theta-class glutathione S-transferase homologs. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 2, 2095–2102. <https://doi.org/10.1002/pro.5560021210>
- Board, P.G., Baker, R.T., Chelvanayagam, G., Jermini, L.S., 1997. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochem. J.* 328, 929–935.
- Board, P.G., Menon, D., 2016. Structure, function and disease relevance of Omega-class glutathione transferases. *Arch. Toxicol.* 90, 1049–1067. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1691-1>
- Board, P.G., Menon, D., 2013. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj., Cellular functions of glutathione* 1830, 3267–3288. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.019>

- Bocedi, A., Fabrini, R., Farrotti, A., Stella, L., Ketterman, A.J., Pedersen, J.Z., Allocati, N., Lau, P.C.K., Grosse, S., Eltis, L.D., Ruzzini, A., Edwards, T.E., Morici, L., Del Grosso, E., Guidoni, L., Bovi, D., Lo Bello, M., Federici, G., Parker, M.W., Board, P.G., Ricci, G., 2013. The Impact of Nitric Oxide Toxicity on the Evolution of the Glutathione Transferase Superfamily. *J. Biol. Chem.* 288, 24936–24947. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.476135>
- Booth, J., Boyland, E., Sims, P., 1961. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem. J.* 79, 516–524.
- Boronat, A., Rodríguez-Concepción, M., 2015. Terpenoid Biosynthesis in Prokaryotes, in: Schrader, J., Bohlmann, J. (Eds.), *Biotechnology of Isoprenoids, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 3–18. https://doi.org/10.1007/10_2014_285
- Breitmaier, E., 2006a. Terpenes: Importance, General Structure, and Biosynthesis, in: *Terpenes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1002/9783527609949.ch1>
- Breitmaier, E., 2006b. Hemi- and Monoterpenes, in: *Terpenes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 10–23. <https://doi.org/10.1002/9783527609949.ch2>
- Breitmaier, E., 2006c. Sesquiterpenes, in: *Terpenes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 24–51. <https://doi.org/10.1002/9783527609949.ch3>
- Breitmaier, E., 2006d. Diterpenes, in: *Terpenes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 52–81. <https://doi.org/10.1002/9783527609949.ch4>
- Breitmaier, E., 2006e. Sesterterpenes, in: *Terpenes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 82–85. <https://doi.org/10.1002/9783527609949.ch5>
- Breitmaier, E., 2006f. Triterpenes, in: *Terpenes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 86–108. <https://doi.org/10.1002/9783527609949.ch6>
- Breitmaier, E., 2006g. Tetraterpenes, in: *Terpenes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 109–114. <https://doi.org/10.1002/9783527609949.ch7>
- Breitmaier, E., 2006h. Polyterpenes and Prenylquinones, in: *Terpenes*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 115–118. <https://doi.org/10.1002/9783527609949.ch8>
- Bresell, A., Weinander, R., Lundqvist, G., Raza, H., Shimoji, M., Sun, T.-H., Balk, L., Wiklund, R., Eriksson, J., Jansson, C., Persson, B., Jakobsson, P.-J., Morgenstern, R., 2005. Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *FEBS J.* 272, 1688–1703. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04596.x>
- Bryant, D.A., 2006. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Springer Science & Business Media.
- Buetler, T.M., Eaton, D.L., 1992. Complementary DNA cloning, messenger RNA expression, and induction of alpha-class glutathione S-transferases in mouse tissues. *Cancer Res.* 52, 314–318.

- Calmes, B., Morel-Rouhier, M., Bataillé-Simoneau, N., Gelhaye, E., Guillemette, T., Simoneau, P., 2015. Characterization of glutathione transferases involved in the pathogenicity of *Alternaria brassicicola*. *BMC Microbiol.* 15, 123. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0462-0>
- Cardona, T., Murray, J.W., Rutherford, A.W., 2015. Origin and Evolution of Water Oxidation before the Last Common Ancestor of the Cyanobacteria. *Mol. Biol. Evol.* 32, 1310–1328. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv024>
- Carvalho, A.N., Marques, C., Guedes, R.C., Castro-Caldas, M., Rodrigues, E., Horssen, J. van, Gama, M.J., 2016. S-Glutathionylation of Keap1: a new role for glutathione S-transferase pi in neuronal protection. *FEBS Lett.* 590, 1455–1466. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12177>
- Caspers, H., 1974. Pierre Bourrelly: *Ls Algues d'eau douce*. Initiation à la systématique. Tome I: Les Algues vertes. Tome II: Chrysophytes, Xanthophycées et Diatomées. Tome III: Eugléniens, Péridiniens, Algues rouges et Algues bleues. – Avec 118 + 115 + 137 planches, 13+ 22+ 14 figures, 512 + 440 +544pp. Paris: Editions N. Boubée & Cie. 1966/1970. 120.–, 107.04, 150.– *F. Int. Rev. Gesamten Hydrobiol. Hydrogr.* 59, 286–287. <https://doi.org/10.1002/iroh.19740590219>
- Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2016. Genomics of the Resistance to Metal and Oxidative Stresses in Cyanobacteria, in: *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1154–1164. <https://doi.org/10.1002/9781119004813.ch112>
- Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2014a. Cell division in cyanobacteria.
- Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2014b. Responses to Oxidative and Heavy Metal Stresses in Cyanobacteria: Recent Advances. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 871–886. <https://doi.org/10.3390/ijms16010871>
- Chandel, A., Bachhawat, A.K., 2017. Redox regulation of the yeast voltage-gated Ca²⁺ channel homolog Cch1p by glutathionylation of specific cysteine residues. *J. Cell Sci.* 130, 2317–2328. <https://doi.org/10.1242/jcs.202853>
- Chandel, A., Das, K.K., Bachhawat, A.K., 2016. Glutathione depletion activates the yeast vacuolar transient receptor potential channel, Yvc1p, by reversible glutathionylation of specific cysteines. *Mol. Biol. Cell* 27, 3913–3925. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-05-0281>
- Chardonnet, S., Sakr, S., Cassier-Chauvat, C., Le Maréchal, P., Chauvat, F., Lemaire, S.D., Decottignies, P., 2015. First proteomic study of S-glutathionylation in cyanobacteria. *J. Proteome Res.* 14, 59–71. <https://doi.org/10.1021/pr500625a>
- Chauvat, F., Astier, C., Vedel, F., Joset-Espardellier, F., 1983. Transformation in the cyanobacterium *Synechococcus* R2: Improvement of efficiency; Role of the pUH24 plasmid. *Mol. Gen. Genet.* MGG 191, 39–45. <https://doi.org/10.1007/BF00330887>
- Chen, L., Wu, H., Zhao, J., Zhang, W., Zhang, L., Sun, S., Yang, D., Cheng, B., Wang, Q., 2018. The role of GST omega in metabolism and detoxification of arsenic in clam

- Ruditapes philippinarum. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 204, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.08.016>
- Chizzola, R., 2013. Regular monoterpenes and sesquiterpenes (Essential oils). *Natural Products* 2973–3008. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_130
- Christ-Hazelhof, E., Nugteren, D.H., 1979. Purification and characterisation of prostaglandin endoperoxide D-isomerase, a cytoplasmic, glutathione-requiring enzyme. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* 572, 43–51. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(79\)90198-X](https://doi.org/10.1016/0005-2760(79)90198-X)
- Chubukov, V., Mingardon, F., Schackwitz, W., Baidoo, E.E.K., Alonso-Gutierrez, J., Hu, Q., Lee, T.S., Keasling, J.D., Mukhopadhyay, A., 2015. Acute Limonene Toxicity in *Escherichia coli* Is Caused by Limonene Hydroperoxide and Alleviated by a Point Mutation in Alkyl Hydroperoxidase AhpC. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 4690–4696. <https://doi.org/10.1128/AEM.01102-15>
- Collier, J.L., Grossman, A.R., 1992. Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *J. Bacteriol.* 174, 4718–4726. <https://doi.org/10.1128/jb.174.14.4718-4726.1992>
- Couradeau, E., Benzerara, K., Moreira, D., Gérard, E., Kaźmierczak, J., Tavera, R., López-García, P., 2011. Prokaryotic and Eukaryotic Community Structure in Field and Cultured Microbialites from the Alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLOS ONE* 6, e28767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028767>
- Crane, E.J., 1955. SYSTEM OF NOMENCLATURE FOR TERPENE HYDROCARBONS, Copyright, FOREWORD, in: SYSTEM OF NOMENCLATURE FOR TERPENE HYDROCARBONS, *Advances in Chemistry. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, pp. i–iv. <https://doi.org/10.1021/ba-1955-0014.fw001>
- Czerniawski, P., Bednarek, P., 2018. Glutathione S-Transferases in the Biosynthesis of Sulfur-Containing Secondary Metabolites in Brassicaceae Plants. *Front. Plant Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01639>
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D., Milzani, A., 2009. Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* 34, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.11.002>
- Davies, F.K., Jinkerson, R.E., Posewitz, M.C., 2015. Toward a photosynthetic microbial platform for terpenoid engineering. *Photosynth. Res.* 123, 265–284. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-9979-6>
- De Marais, D.J., 2000. Evolution. When did photosynthesis emerge on Earth? *Science* 289, 1703–1705.
- Deponte, M., 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3217–3266. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>
- Des Marais, D.J., 1991. Microbial mats, stromatolites and the rise of oxygen in the Precambrian atmosphere. *Glob. Planet. Change* 97, 93–96.

- Dhingra, A., Portis, A.R., Daniell, H., 2004. Enhanced translation of a chloroplast-expressed RbcS gene restores small subunit levels and photosynthesis in nuclear RbcS antisense plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6315–6320. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400981101>
- Diaz, J.M., Plummer, S., 2018. Production of extracellular reactive oxygen species by phytoplankton: past and future directions. *J. Plankton Res.* 40, 655–666. <https://doi.org/10.1093/plankt/fby039>
- Dixon, D.P., Cummins, I., Cole, D.J., Edwards, R., 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 258–266. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(98\)80114-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(98)80114-3)
- Dixon, D.P., Laphorn, A., Edwards, R., 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biol.* 3, reviews3004.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-3-reviews3004>
- Drews, G., 2011. The Evolution of Cyanobacteria and Photosynthesis, in: Peschek, G.A., Obinger, C., Renger, G. (Eds.), *Bioenergetic Processes of Cyanobacteria: From Evolutionary Singularity to Ecological Diversity*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 265–284. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0388-9_11
- Drouet, F., 1981. Revision of the Stigonemataceae with a summary of the classification of the blue-green algae / by Francis Drouet, *Beihefte zur Nova Hedwigia*; Heft 66. J. Cramer, Vaduz.
- Ducat, D.C., Way, J.C., Silver, P.A., 2011. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnol.* 29, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.12.003>
- Eisenhut, M., Ruth, W., Haimovich, M., Bauwe, H., Kaplan, A., Hagemann, M., 2008. The photorespiratory glycolate metabolism is essential for cyanobacteria and might have been conveyed endosymbiotically to plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 17199–17204. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807043105>
- Encyclopedia of Microbiology - Moselio Schaechter - Third Edition - Volume 1 [WWW Document], n.d. URL https://books.google.fr/books/about/Encyclopedia_of_Microbiology.html?id=otC6PwAACAAJ&redir_esc=y (accessed 10.14.17).
- Englund, E., Andersen-Ranberg, J., Miao, R., Hamberger, B., Lindberg, P., 2015. Metabolic Engineering of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for Production of the Plant Diterpenoid Manoyl Oxide. *ACS Synth. Biol.* 4, 1270–1278. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00070>
- Espinosa-Mansilla, A., Durán-Merás, I., Cañada, F.C., Márquez, M.P., 2007. High-performance liquid chromatographic determination of glyoxal and methylglyoxal in urine by prederivatization to lumazinic rings using in serial fast scan fluorimetric and diode array detectors. *Anal. Biochem.* 371, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.07.028>

- Evans, J.W., Taylor, Y.C., Brown, J.M., 1984. The role of glutathione and DNA strand break repair in determining the shoulder of the radiation survival curve. *Br. J. Cancer. Suppl.* 6, 49–53.
- Fahey, R.C., 2013. Glutathione analogs in prokaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3182–3198. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.006>
- Feng, L., Sun, Y., Deng, H., Li, D., Wan, J., Wang, X., Wang, W., Liao, X., Ren, Y., Hu, X., 2014. Structural and biochemical characterization of fructose-1,6/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase from the cyanobacterium *Synechocystis* strain 6803. *FEBS J.* 281, 916–926. <https://doi.org/10.1111/febs.12657>
- Feng, S., Zhang, L., Adilijiang, G., Liu, J., Luo, M., Deng, H., 2014. Substrate Profiling of Glutathione S-transferase with Engineered Enzymes and Matched Glutathione Analogues. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 7149–7153. <https://doi.org/10.1002/anie.201402000>
- Fernández-Cañón, J.M., Peñalva, M.A., 1998. Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J. Biol. Chem.* 273, 329–337. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.1.329>
- Florencio, F.J., Marqués, S., Candau, P., 1987. Identification and characterization of a glutamate dehydrogenase in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Lett.* 223, 37–41. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80505-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80505-7)
- Fowler, C.F., 1977. Proton evolution from photosystem II. Stoichiometry and mechanistic considerations. *Biochim. Biophys. Acta* 462, 414–421. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(77\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(77)90139-6)
- Fromme, P., Jordan, P., Krauß, N., 2001. Structure of photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1507, 5–31. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00195-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00195-5)
- Frova, C., 2006. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomol. Eng.* 23, 149–169. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.05.020>
- Gao, J., Wang, H., Yuan, Q., Feng, Y., 2018. Structure and Function of the Photosystem Supercomplexes. *Front. Plant Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00357>
- García-Giménez, J.L., Markovic, J., Dasí, F., Queval, G., Schnaubelt, D., Foyer, C.H., Pallardó, F.V., 2013. Nuclear glutathione. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3304–3316. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.005>
- Garcia-Pichel, F., Pringault, O., 2001. Microbiology. Cyanobacteria track water in desert soils. *Nature* 413, 380–381. <https://doi.org/10.1038/35096640>
- Garcia-Pichel, Ferran, Pringault, O., 2001. Microbiology: Cyanobacteria track water in desert soils. *Nature* 413, 380–381. <https://doi.org/10.1038/35096640>
- George, K.W., Alonso-Gutierrez, J., Keasling, J.D., Lee, T.S., 2015. Isoprenoid drugs, biofuels, and chemicals--artemisinin, farnesene, and beyond. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 148, 355–389. https://doi.org/10.1007/10_2014_288

- Ghosh Dastidar, S., Jagatheesan, G., Haberzettl, P., Shah, J., Hill, B.G., Bhatnagar, A., Conklin, D.J., 2018. Glutathione S-transferase P deficiency induces glucose intolerance via JNK-dependent enhancement of hepatic gluconeogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 315, E1005–E1018. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00345.2017>
- Giovannoni, S.J., Turner, S., Olsen, G.J., Barns, S., Lane, D.J., Pace, N.R., 1988. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* 170, 3584–3592.
- Glazer, A.N., 1989. Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J. Biol. Chem.* 264, 1–4.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L.F.C., 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* 65, 45–80. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003>
- Gray, M.W., 1993. Origin and evolution of organelle genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, 884–890.
- Grigorieva, G., Shestakov, S., 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 13, 367–370. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1982.tb08289.x>
- Grizeau, D., Bui, L.A., Dupré, C., Legrand, J., 2016. Ammonium photo-production by heterocytous cyanobacteria: potentials and constraints. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36, 607–618. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.1002380>
- Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G., Collier, J.L., 1993. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol. Rev.* 57, 725–749.
- Grotjohann, I., Fromme, P., 2005. Structure of cyanobacterial photosystem I. *Photosynth. Res.* 85, 51–72. <https://doi.org/10.1007/s11120-005-1440-4>
- Gullner, G., Komives, T., Király, L., Schröder, P., 2018. Glutathione S-Transferase Enzymes in Plant-Pathogen Interactions. *Front. Plant Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01836>
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hagemann, M., 2011. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 87–123. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00234.x>
- Hansson, L.O., Bolton-Grob, R., Massoud, T., Mannervik, B., 1999. Evolution of differential substrate specificities in Mu class glutathione transferases probed by DNA shuffling. *J. Mol. Biol.* 287, 265–276. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2607>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Anee, T.I., Fujita, M., 2017. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiol. Mol.*

- Biol. Plants Int. J. Funct. Plant Biol. 23, 249–268. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0422-2>
- Hauser, T., Popilka, L., Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M., 2015. Role of auxiliary proteins in Rubisco biogenesis and function. *Nat. Plants* 1, 15065. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.65>
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>
- Hayes, J.D., Mantle, T.J., 1986. Use of immuno-blot techniques to discriminate between the glutathione S-transferase Yf, Yk, Ya, Yn/Yb and Yc subunits and to study their distribution in extrahepatic tissues. Evidence for three immunochemically distinct groups of transferase in the rat. *Biochem. J.* 233, 779–788. <https://doi.org/10.1042/bj2330779>
- Hayes, J.D., McLellan, L.I., 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 31, 273–300.
- Hayes, J.D., Pulford, D.J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445–600. <https://doi.org/10.3109/10409239509083491>
- Heckman, K.L., Pease, L.R., 2007. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat. Protoc.* 2, 924–932. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.132>
- Hein, S., Tran, H., Steinbüchel, A., 1998. *Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a two-component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* 170, 162–170.
- Hellier, P., Al-Haj, L., Talibi, M., Purton, S., Ladommatos, N., 2013. Combustion and emissions characterization of terpenes with a view to their biological production in cyanobacteria. *Fuel* 111, 670–688. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.042>
- Hoehler, T.M., Bebout, B.M., Des Marais, D.J., 2001. The role of microbial mats in the production of reduced gases on the early Earth. *Nature* 412, 324–327. <https://doi.org/10.1038/35085554>
- Holm, P.J., Bhakat, P., Jegerschöld, C., Gyobu, N., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y., Morgenstern, R., Hebert, H., 2006. Structural Basis for Detoxification and Oxidative Stress Protection in Membranes. *J. Mol. Biol.* 360, 934–945. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.05.056>
- Holm, P.J., Morgenstern, R., Hebert, H., 2002. The 3-D structure of microsomal glutathione transferase 1 at 6 Å resolution as determined by electron crystallography of p22(1)2(1) crystals. *Biochim. Biophys. Acta* 1594, 276–285.
- Holt, J.G., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins.

- Iizuka, M., Inoue, Y., Murata, K., Kimura, A., 1989. Purification and some properties of glutathione S-transferase from *Escherichia coli* B. *J. Bacteriol.* 171, 6039–6042. <https://doi.org/10.1128/jb.171.11.6039-6042.1989>
- Ilio, C.D., Aceto, A., Piccolomini, R., Allocati, N., Faraone, A., Cellini, L., Ravagnan, G., Federici, G., 1988. Purification and characterization of three forms of glutathione transferase from *Proteus mirabilis*. *Biochem. J.* 255, 971–975. <https://doi.org/10.1042/bj2550971>
- Inoue, N., Taira, Y., Emi, T., Yamane, Y., Kashino, Y., Koike, H., Satoh, K., 2001. Acclimation to the growth temperature and the high-temperature effects on photosystem II and plasma membranes in a mesophilic cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol.* 42, 1140–1148. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce147>
- Islam, S., Rahman, I.A., Islam, T., Ghosh, A., 2017. Genome-wide identification and expression analysis of glutathione S-transferase gene family in tomato: Gaining an insight to their physiological and stress-specific roles. *PLOS ONE* 12, e0187504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187504>
- Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B., 2000. Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, S20-24. https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.supplement_1.lta-5
- Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B., 1999. Common structural features of MAPEG -- a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 8, 689–692. <https://doi.org/10.1110/ps.8.3.689>
- Jansson, C., Northen, T., 2010. Calcifying cyanobacteria--the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.017>
- Jeppesen, M.G., Ortiz, P., Shepard, W., Kinzy, T.G., Nyborg, J., Andersen, G.R., 2003. The crystal structure of the glutathione S-transferase-like domain of elongation factor 1B γ from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 47190–47198. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306630200>
- Ji, X., Zhang, P., Armstrong, R.N., Gilliland, G.L., 1992. The three-dimensional structure of a glutathione S-transferase from the Mu gene class. Structural analysis of the binary complex of isoenzyme 3-3 and glutathione at 2.2-Å resolution. *Biochemistry* 31, 10169–10184. <https://doi.org/10.1021/bi00157a004>
- Jittawuttipoka, T., Planchon, M., Spalla, O., Benzerara, K., Guyot, F., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2013. Multidisciplinary evidences that *Synechocystis* PCC6803 exopolysaccharides operate in cell sedimentation and protection against salt and metal stresses. *PloS One* 8, e55564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055564>

- Johansson, A.S., Mannervik, B., 2001. Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *J. Biol. Chem.* 276, 33061–33065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104539200>
- Johnson, J.E., Webb, S.M., Thomas, K., Ono, S., Kirschvink, J.L., Fischer, W.W., 2013. Manganese-oxidizing photosynthesis before the rise of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11238–11243. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305530110>
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W., Krauß, N., 2001. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411, 909. <https://doi.org/10.1038/35082000>
- Kammerscheit, X., Chauvat, F., Cassier-Chauvat, C., 2019. First in vivo evidences that glutathione-S-transferase operates in photo-oxidative stress in cyanobacteria. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01899>
- Kanai, T., Takahashi, K., Inoue, H., 2006. Three distinct-type glutathione S-transferases from *Escherichia coli* important for defense against oxidative stress. *J. Biochem. (Tokyo)* 140, 703–711. <https://doi.org/10.1093/jb/mvj199>
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., Tabata, S., 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* 3, 109–136.
- Kelly, G.J., Latzko, E., 1976. Inhibition of spinach-leaf phosphofructokinase by 2-phosphoglycollate. *FEBS Lett.* 68, 55–58.
- Kirilovsky, D., 2010. The photoactive orange carotenoid protein and photoprotection in cyanobacteria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 675, 139–159. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1528-3_9
- Kitchener, R.L., Grunden, A.M., 2018. Methods for enhancing cyanobacterial stress tolerance to enable improved production of biofuels and industrially relevant chemicals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 1617–1628. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8755-5>
- Kobayashi, D., Tamoi, M., Iwaki, T., Shigeoka, S., Wadano, A., 2003. Molecular Characterization and Redox Regulation of Phosphoribulokinase from the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* 44, 269–276. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg048>
- Köhler, U., Cerff, R., Brinkmann, H., 1996. Transaldolase genes from the cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Synechocystis* sp. PCC 6803: comparison with other eubacterial and eukaryotic homologues. *Plant Mol. Biol.* 30, 213–218.
- Koksharova, O., Schubert, M., Shestakov, S., Cerff, R., 1998. Genetic and biochemical evidence for distinct key functions of two highly divergent GAPDH genes in catabolic and anabolic carbon flow of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol. Biol.* 36, 183–194. <https://doi.org/10.1023/A:1005925732743>

- Kontur, W.S., Olmsted, C.N., Yusko, L.M., Niles, A.V., Walters, K.A., Beebe, E.T., Meulen, K.A.V., Karlen, S.D., Gall, D.L., Noguera, D.R., Donohue, T.J., 2018. A heterodimeric glutathione S-transferase that stereospecifically breaks lignin's β (R)-aryl ether bond reveals the diversity of bacterial β -etherases. *J. Biol. Chem.* jbc.RA118.006548. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006548>
- Kosower, N.S., Vanderhoff, G.A., Kosower, E.M., 1972. Glutathione: VIII. The effects of glutathione disulfide on initiation of protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Nucleic Acids Protein Synth.* 272, 623–637. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(72\)90518-7](https://doi.org/10.1016/0005-2787(72)90518-7)
- Kou, M., Liu, Y.-J., Li, Z.-Y., Zhang, Y.-G., Tang, W., Yan, H., Wang, X., Chen, X.-G., Su, Z.-X., Arisha, M.H., Li, Q., Ma, D.-F., 2019. A novel glutathione S-transferase gene from sweetpotato, IbGSTF4, is involved in anthocyanin sequestration. *Plant Physiol. Biochem. PPB* 135, 395–403. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.12.028>
- KRAUS, P., 2009. Resolution, Purification and Some Properties of Three Glutathione Transferases from Rat Liver Mitochondria. *Hoppe-Seyler's Z. Für Physiol. Chem.* 361, 9–16. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1980.361.1.9>
- Kurusu, G., Zhang, H., Smith, J.L., Cramer, W.A., 2003. Structure of the Cytochrome b6f Complex of Oxygenic Photosynthesis: Tuning the Cavity. *Science* 302, 1009–1014. <https://doi.org/10.1126/science.1090165>
- Labarre, J., Chauvat, F., Thuriaux, P., 1989. Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 171, 3449–3457.
- Ladner, J.E., Parsons, J.F., Rife, C.L., Gilliland, G.L., Armstrong, R.N., 2004. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry* 43, 352–361. <https://doi.org/10.1021/bi035832z>
- Latifi, A., Ruiz, M., Zhang, C.-C., 2009. Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 258–278. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00134.x>
- Leister, D., Schneider, A., 2003. From genes to photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Int. Rev. Cytol.* 228, 31–83.
- Li, J., Xia, Z., Ding, J., 2005. Thioredoxin-like domain of human kappa class glutathione transferase reveals sequence homology and structure similarity to the theta class enzyme. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 14, 2361–2369. <https://doi.org/10.1110/ps.051463905>
- Li, Y., Zhang, G., Pfeifer, B.A., 2015. Current and emerging options for taxol production. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 148, 405–425. https://doi.org/10.1007/10_2014_292
- Loi, V.V., Rossius, M., Antelmann, H., 2015. Redox regulation by reversible protein S-thiolation in bacteria. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00187>
- Lu, S.C., 2013. GLUTATHIONE SYNTHESIS. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3143–3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>

- Maksimov, E.G., Mironov, K.S., Trofimova, M.S., Nechaeva, N.L., Todorenko, D.A., Klementiev, K.E., Tsoraev, G.V., Tyutyayev, E.V., Zorina, A.A., Feduraev, P.V., Allakhverdiev, S.I., Paschenko, V.Z., Los, D.A., 2017. Membrane fluidity controls redox-regulated cold stress responses in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 133, 215–223. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0337-3>
- Manevich, Y., Feinstein, S.I., Fisher, A.B., 2004. Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3780–3785. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400181101>
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M.K., Warholm, M., Jörnvall, H., 1985. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 7202–7206.
- Mannervik, B., Board, P.G., Hayes, J.D., Listowsky, I., Pearson, W.R., 2005. Nomenclature for Mammalian Soluble Glutathione Transferases, in: Sies, H., Packer, L. (Eds.), *Methods in Enzymology, Glutathione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases*. Academic Press, pp. 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01001-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01001-3)
- Mannervik, B., Danielson, U.H., Ketterer, B., 1988. Glutathione Transferases—Structure and Catalytic Activit. *Crit. Rev. Biochem.* 23, 283–337. <https://doi.org/10.3109/10409238809088226>
- Mannervik, B., Jensson, H., 1982. Binary combinations of four protein subunits with different catalytic specificities explain the relationship between six basic glutathione S-transferases in rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* 257, 9909–9912.
- Mano, J., Ishibashi, A., Muneuchi, H., Morita, C., Sakai, H., Biswas, M.S., Koeduka, T., Kitajima, S., 2017. Acrolein-detoxifying isozymes of glutathione transferase in plants. *Planta* 245, 255–264. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2604-5>
- Marbouty, M., Saguez, C., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2009. ZipN, an FtsA-like orchestrator of divisome assembly in the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Mol. Microbiol.* 74, 409–420. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06873.x>
- Marraccini, P., Bulteau, S., Cassier-Chauvat, C., Mermet-Bouvier, P., Chauvat, F., 1993. A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Mol. Biol.* 23, 905–909.
- Marteyn, B., Domain, F., Legrain, P., Chauvat, F., Cassier-Chauvat, C., 2009. The thioredoxin reductase-glutaredoxins-ferredoxin crossroad pathway for selenate tolerance in *Synechocystis* PCC6803. *Mol. Microbiol.* 71, 520–532. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06550.x>
- Martin, J.L., 1995. Thioredoxin —a fold for all reasons. *Structure* 3, 245–250. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00154-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00154-X)

- Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hapsmann, S., Hasegawa, M., Kowallik, K.V., 1998. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393, 162–165. <https://doi.org/10.1038/30234>
- Masip, L., Veeravalli, K., Georgiou, G., 2006. The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 753–762. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.753>
- Mazouni, K., Domain, F., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2004. Molecular analysis of the key cytokinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE. *Mol. Microbiol.* 52, 1145–1158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04042.x>
- Mazouni, K., Domain, F., Chauvat, F., Cassier-Chauvat, C., 2003. Expression and regulation of the crucial plant-like ferredoxin of cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* 49, 1019–1029.
- Mermet-Bouvier, P., Chauvat, F., 1994. A conditional expression vector for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942 and PCC6301. *Curr. Microbiol.* 28, 145–148.
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Morisse, S., Sparla, F., Pérez-Pérez, M.E., Francia, F., Danon, A., Marchand, C.H., Fermani, S., Trost, P., Lemaire, S.D., 2013. Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: something old, something new. *Front. Plant Sci.* 4, 470. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00470>
- Miroux, B., Walker, J.E., 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* 260, 289–298. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0399>
- Miyagishima, S.-Y., Wolk, C.P., Osteryoung, K.W., 2005. Identification of cyanobacterial cell division genes by comparative and mutational analyses. *Mol. Microbiol.* 56, 126–143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04548.x>
- Moirangthem, L.D., Bhattacharya, S., Stensjö, K., Lindblad, P., Bhattacharya, J., 2014. A high constitutive catalase activity confers resistance to methyl viologen-promoted oxidative stress in a mutant of the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 3809–3818. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5443-3>
- Moons, A., 2005. Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitam. Horm.* 72, 155–202. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)72005-7](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)72005-7)
- Morel, F., Aninat, C., 2011. The glutathione transferase kappa family. *Drug Metab. Rev.* 43, 281–291. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.556122>
- Morel, F., Rauch, C., Petit, E., Piton, A., Theret, N., Coles, B., Guillouzo, A., 2004. Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. *J. Biol. Chem.* 279, 16246–16253. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313357200>
- Mosialou, E., Piemonte, F., Andersson, C., Vos, R.M., van Bladeren, P.J., Morgenstern, R., 1995. Microsomal glutathione transferase: lipid-derived substrates and lipid dependence. *Arch. Biochem. Biophys.* 320, 210–216.

- Muro-Pastor, M.I., Reyes, J.C., Florencio, F.J., 2005. Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 83, 135–150. <https://doi.org/10.1007/s11120-004-2082-7>
- Nagashima, H., Asada, M., Mino, H., 2018. Magnetic structure of manganese cluster in photosystem II investigated by electron paramagnetic resonance. *Biophys. Physicobiology* 15, 45–50. https://doi.org/10.2142/biophysico.15.0_45
- Nakahara, K., Yamamoto, H., Miyake, C., Yokota, A., 2003. Purification and Characterization of Class-I and Class-II Fructose-1,6-bisphosphate Aldolases from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 44, 326–333. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg044>
- Narainsamy, K., Marteyn, B., Sakr, S., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2013. Genomics of the Pleiotropic Glutathione System in Cyanobacteria, in: *Advances in Botanical Research*. pp. 157–188. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394313-2.00005-6>
- Narainsamy, K., Cassier-Chauvat, C., Junot, C., Chauvat, F., 2013. High performance analysis of the cyanobacterial metabolism via liquid chromatography coupled to a LTQ-Orbitrap mass spectrometer: evidence that glucose reprograms the whole carbon metabolism and triggers oxidative stress. *Metabolomics* 9, 21–32. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0382-4>
- Nianiou-Obeidat, I., Madesis, P., Kissoudis, C., Voulgari, G., Chronopoulou, E., Tsaftaris, A., Labrou, N.E., 2017. Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: functions and biotechnological applications. *Plant Cell Rep.* 36, 791–805. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2139-7>
- Nutman, A.P., Bennett, V.C., Friend, C.R.L., Van Kranendonk, M.J., Chivas, A.R., 2016. Rapid emergence of life shown by discovery of 3,700-million-year-old microbial structures. *Nature* 537, 535–538. <https://doi.org/10.1038/nature19355>
- Oakley, A., 2011. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab. Rev.* 43, 138–151. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.558093>
- Ogino, N., Miyamoto, T., Yamamoto, S., Hayaishi, O., 1977. Prostaglandin endoperoxide E isomerase from bovine vesicular gland microsomes, a glutathione-requiring enzyme. *J. Biol. Chem.* 252, 890–895.
- Pandey, T., Chhetri, G., Chinta, R., Kumar, B., Singh, D.B., Tripathi, T., Singh, A.K., 2015a. Functional classification and biochemical characterization of a novel rho class glutathione S-transferase in *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Open Bio* 5, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.11.006>
- Pandey, T., Shukla, R., Shukla, H., Sonkar, A., Tripathi, T., Singh, A.K., 2017. A combined biochemical and computational studies of the rho-class glutathione s-transferase sll1545 of *Synechocystis* PCC 6803. *Int. J. Biol. Macromol.* 94, 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.040>
- Pandey, T., Singh, S.K., Chhetri, G., Tripathi, T., Singh, A.K., 2015b. Characterization of a Highly pH Stable Chi-Class Glutathione S-Transferase from *Synechocystis* PCC 6803. *PLoS One* 10, e0126811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126811>

- Parsons, J.L., Chipman, J.K., 2000. The role of glutathione in DNA damage by potassium bromate in vitro. *Mutagenesis* 15, 311–316. <https://doi.org/10.1093/mutage/15.4.311>
- Partensky, F., Hess, W.R., Vaultot, D., 1999. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 63, 106–127.
- Pearson, W.R., 2005. Phylogenies of Glutathione Transferase Families, in: Sies, H., Packer, L. (Eds.), *Methods in Enzymology, Glutathione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases*. Academic Press, pp. 186–204. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01012-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01012-8)
- Pégeot, H., Koh, C.S., Petre, B., Mathiot, S., Duplessis, S., Hecker, A., Didierjean, C., Rouhier, N., 2014. The poplar Phi class glutathione transferase: expression, activity and structure of GSTF1. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00712>
- Pemble, S.E., Wardle, A.F., Taylor, J.B., 1996. Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem. J.* 319, 749–754.
- Persson, B.C., Esberg, B., Ólafsson, Ó., Björk, G.R., 1994. Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA. *Biochimie* 76, 1152–1160. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(94\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0300-9084(94)90044-2)
- Peterhansel, C., Horst, I., Niessen, M., Blume, C., Kebeish, R., Kürkcüoglu, S., Kreuzaler, F., 2010. Photorespiration. *Arab. Book* 8, e0130. <https://doi.org/10.1199/tab.0130>
- Pittera, J., Jouhet, J., Breton, S., Garczarek, L., Partensky, F., Maréchal, É., Nguyen, N.A., Doré, H., Ratin, M., Pitt, F.D., Scanlan, D.J., Six, C., 2018. Thermoacclimation and genome adaptation of the membrane lipidome in marine *Synechococcus*. *Environ. Microbiol.* 20, 612–631. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13985>
- Poncelet, M., Cassier-Chauvat, C., Leschelle, X., Bottin, H., Chauvat, F., 1998. Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in *Synechocystis* PCC6803 by plasmid shuffling. *Mol. Microbiol.* 28, 813–821.
- Porter, M.A., Hartman, F.C., 1988. Catalytic nonessentiality of an active-site cysteinyl residue of phosphoribulokinase. *J. Biol. Chem.* 263, 14846–14849.
- Pospíšil, P., 2016. Production of Reactive Oxygen Species by Photosystem II as a Response to Light and Temperature Stress. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01950>
- Pospíšil, P., 2009. Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1787, 1151–1160. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.05.005>
- Prohaska, J.R., Ganther, H.E., 1976. Glutathione peroxidase activity of glutathione-S-transferases purified from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 437–445. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(77\)90744-6](https://doi.org/10.1016/0006-291x(77)90744-6)
- Quintero, M.J., Muro-Pastor, A.M., Herrero, A., Flores, E., 2000. Arginine catabolism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 involves the urea cycle and

- arginase pathway. *J. Bacteriol.* 182, 1008–1015. <https://doi.org/10.1128/jb.182.4.1008-1015.2000>
- Rai, R., Tate, J.J., Cooper, T.G., 2003. Ure2, a prion precursor with homology to glutathione S-transferase, protects *Saccharomyces cerevisiae* cells from heavy metal ion and oxidant toxicity. *J. Biol. Chem.* 278, 12826–12833. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212186200>
- Reinemer, P., Dirr, H.W., Ladenstein, R., Schäffer, J., Gally, O., Huber, R., 1991. The three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution. *EMBO J.* 10, 1997–2005.
- Richardson, D.L., Reed, R.H., Stewart, W.D.P., 1983. *Synechocystis* PCC6803: a euryhaline cyanobacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 18, 99–102.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y., 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology* 111, 1–61. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>
- Ritchie, R.J., 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth. Res.* 89, 27–41. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>
- Robinson, A., Huttley, G.A., Booth, H.S., Board, P.G., 2004. Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases. *Biochem. J.* 379, 541–552. <https://doi.org/10.1042/BJ20031656>
- Rochaix, J.-D., 1992. Genetic analysis of photosynthesis in prokaryotes and lower eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2, 785–791. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(05\)80140-6](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(05)80140-6)
- Rosgaard, L., de Porcellinis, A.J., Jacobsen, J.H., Frigaard, N.-U., Sakuragi, Y., 2012. Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants. *J. Biotechnol.* 162, 134–147. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.05.006>
- Ruzicka, L., 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* 9, 357–367.
- Sadekar, S., Raymond, J., Blankenship, R.E., 2006. Conservation of distantly related membrane proteins: photosynthetic reaction centers share a common structural core. *Mol. Biol. Evol.* 23, 2001–2007. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl079>
- Saer, R.G., Blankenship, R.E., 2017. Light harvesting in phototrophic bacteria: structure and function. *Biochem. J.* 474, 2107–2131. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160753>
- Sarria, S., Wong, B., García Martín, H., Keasling, J.D., Peralta-Yahya, P., 2014. Microbial synthesis of pinene. *ACS Synth. Biol.* 3, 466–475. <https://doi.org/10.1021/sb4001382>
- Savakis, P., Hellingwerf, K.J., 2015. Engineering cyanobacteria for direct biofuel production from CO₂. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.09.007>

- Schuller, D.J., Liu, Q., Kriksunov, I.A., Campbell, A.M., Barrett, J., Brophy, P.M., Hao, Q., 2005. Crystal structure of a new class of glutathione transferase from the model human hookworm nematode *Heligmosomoides polygyrus*. *Proteins* 61, 1024–1031. <https://doi.org/10.1002/prot.20649>
- Sciarretta, F., Fulci, C., Palumbo, C., Aquilano, K., Pastore, A., Iorio, E., Lettieri-Barbato, D., Cicconi, R., Minutolo, A., Parravano, M., Gilardi, M., Varano, M., Caccuri, A.M., 2019. Glutathione transferase P silencing promotes neuronal differentiation of retinal R28 cells. *J. Cell. Physiol.* <https://doi.org/10.1002/jcp.28246>
- Sedgeman, C.A., Su, Y., Guengerich, F.P., 2017. Formation of S-[2-(N6-Deoxyadenosinyl)ethyl]glutathione in DNA and Replication Past the Adduct by Translesion DNA Polymerases. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 1188–1196. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00022>
- Shcolnick, S., Keren, N., 2006. Metal homeostasis in cyanobacteria and chloroplasts. Balancing benefits and risks to the photosynthetic apparatus. *Plant Physiol.* 141, 805–810. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079251>
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16.
- Shen, W., Wen, J.-F., Sun, G.-L., Lu, Y., 2005. Identification of triosephosphate isomerase (TIM) genes from *Microcystis* (Cyanobacteria: Chroococcales) and theoretical analyses of the potential of cyanobacterial TIM as a target for designing specific inhibitors. *Phycologia* 44, 447–452. [https://doi.org/10.2216/0031-8884\(2005\)44\[447:IOTITG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2216/0031-8884(2005)44[447:IOTITG]2.0.CO;2)
- Shestakov, S.V., Khyen, N.T., 1970. Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Mol. Gen. Genet. MGG* 107, 372–375.
- Shi, T., Falkowski, P.G., 2008. Genome evolution in cyanobacteria: the stable core and the variable shell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2510–2515. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711165105>
- Shively, J.M., Ball, F.L., Kline, B.W., 1973. Electron microscopy of the carboxysomes (polyhedral bodies) of *Thiobacillus neapolitanus*. *J. Bacteriol.* 116, 1405–1411.
- Singh, A.K., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Elvitigala, T., Ghosh, B., Aurora, R., Pakrasi, H.B., 2009. A systems-level analysis of the effects of light quality on the metabolism of a cyanobacterium. *Plant Physiol.* 151, 1596–1608. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144824>
- Sjögren, T., Nord, J., Ek, M., Johansson, P., Liu, G., Geschwindner, S., 2013. Crystal structure of microsomal prostaglandin E2 synthase provides insight into diversity in the MAPEG superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 3806–3811. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218504110>
- Smith, D.B., Johnson, K.S., 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31–40. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90005-4)

- Soo, R.M., Hemp, J., Parks, D.H., Fischer, W.W., Hugenholtz, P., 2017. On the origins of oxygenic photosynthesis and aerobic respiration in Cyanobacteria. *Science* 355, 1436–1440. <https://doi.org/10.1126/science.aal3794>
- Summerfield, T.C., Sherman, L.A., 2008. Global transcriptional response of the alkali-tolerant cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 to a pH 10 environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5276–5284. <https://doi.org/10.1128/AEM.00883-08>
- Surapureddi, S., Svartz, J., Magnusson, K.-E., Hammarström, S., Söderström, M., 2000. Colocalization of leukotriene C synthase and microsomal glutathione S-transferase elucidated by indirect immunofluorescence analysis. *FEBS Lett.* 480, 239–243. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01885-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01885-8)
- Sylvestre-Gonon, E., Law, S.R., Schwartz, M., Robe, K., Keech, O., Didierjean, C., Dubos, C., Rouhier, N., Hecker, A., 2019. Functional, Structural and Biochemical Features of Plant Serinyl-Glutathione Transferases. *Front. Plant Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00608>
- Tamoi, M., Murakami, A., Takeda, T., Shigeoka, S., 1998. Lack of Light/Dark Regulation of Enzymes Involved in the Photosynthetic Carbon Reduction Cycle in Cyanobacteria, *Synechococcus* PCC 7942 and *Synechocystis* PCC 6803. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 374–376. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.374>
- Tamoi, M., Takeda, T., Shigeoka, S., 1999. Functional Analysis of Fructose-1,6-Bisphosphatase Isozymes (fbp-I and fbp-II Gene Products) in Cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 40, 257–261. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029536>
- Taroncher-Oldenburg, G., Nishina, K., Stephanopoulos, G., 2000. Identification and analysis of the polyhydroxyalkanoate-specific beta-ketothiolase and acetoacetyl coenzyme A reductase genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4440–4448. <https://doi.org/10.1128/aem.66.10.4440-4448.2000>
- Thom, R., Dixon, D.P., Edwards, R., Cole, D.J., Laphorn, A.J., 2001. The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism¹ Edited by I. A. Wilson. *J. Mol. Biol.* 308, 949–962. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4638>
- Townsend, D.M., Manevich, Y., He, L., Hutchens, S., Pazoles, C.J., Tew, K.D., 2009. Novel role for glutathione S-transferase pi. Regulator of protein S-Glutathionylation following oxidative and nitrosative stress. *J. Biol. Chem.* 284, 436–445. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805586200>
- Tripathy, B.C., Oelmüller, R., 2012. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* 7, 1621–1633. <https://doi.org/10.4161/psb.22455>
- Turner, S., Burger-Wiersma, T., Giovannoni, S.J., Mur, L.R., Pace, N.R., 1989. The relationship of a prochlorophyte *Prochlorothrix hollandica* to green chloroplasts. *Nature* 337, 380–382. <https://doi.org/10.1038/337380a0>
- Valladares, A., Montesinos, M.L., Herrero, A., Flores, E., 2002. An ABC-type, high-affinity urea permease identified in cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* 43, 703–715.

- Vickers, C.E., Sabri, S., 2015. Isoprene. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 148, 289–317. https://doi.org/10.1007/10_2014_303
- Wahländer, A., Soboll, S., Sies, H., Ingrid, L., Monika, M., 1979. Hepatic mitochondrial and cytosolic glutathione content and the subcellular distribution of GSH-S-transferases. *FEBS Lett.* 97, 138–140. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)80069-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80069-1)
- Wegener, K.M., Singh, A.K., Jacobs, J.M., Elvitigala, T., Welsh, E.A., Keren, N., Gritsenko, M.A., Ghosh, B.K., Camp, D.G., Smith, R.D., Pakrasi, H.B., 2010. Global proteomics reveal an atypical strategy for carbon/nitrogen assimilation by a cyanobacterium under diverse environmental perturbations. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 9, 2678–2689. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.000109>
- Weisbeek, P., Hageman, J., de Boer, D., Pilon, R., Smeekens, S., 1989. Import of proteins into the chloroplast lumen. *J. Cell Sci. Suppl.* 11, 199–223.
- Wellburn, A.R., 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *J. Plant Physiol.* 144, 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Whitmarsh, J., Govindjee, 2002. Photosystem II, in: *ELS*. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0000669>
- Wichaphon, J., Giri, A., Ohshima, T., Lertsiri, S., 2014. Determination of glyoxal and methylglyoxal in Thai fish sauce and their changes during storage test. *J. Food Meas. Charact.* 8, 241–248. <https://doi.org/10.1007/s11694-014-9197-0>
- Wiktelius, E., Stenberg, G., 2007. Novel class of glutathione transferases from cyanobacteria exhibit high catalytic activities towards naturally occurring isothiocyanates. *Biochem. J.* 406, 115–123. <https://doi.org/10.1042/BJ20070328>
- Williams, J.G.K., 1988. [85] Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803, in: *Methods in Enzymology, Cyanobacteria*. Academic Press, pp. 766–778. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)67088-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67088-1)
- Wise, E.L., Akana, J., Gerlt, J.A., Rayment, I., 2004. Structure of D-ribulose 5-phosphate 3-epimerase from *Synechocystis* to 1.6 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 1687–1690. <https://doi.org/10.1107/S09074444904015896>
- Woese, C.R., Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5088–5090.
- Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J.R., Turner, N.D., 2004. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J. Nutr.* 134, 489–492. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>
- Xiong, J., Fischer, W.M., Inoue, K., Nakahara, M., Bauer, C.E., 2000. Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis. *Science* 289, 1724–1730.

- Xu, W., Tang, H., Wang, Y., Chitnis, P.R., 2001. Proteins of the cyanobacterial photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1507, 32–40. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00208-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00208-0)
- Zhang, H., Forman, H.J., 2012. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 722–728. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.03.017>
- Zhang, J., Ye, Z.-W., Singh, S., Townsend, D.M., Tew, K.D., 2018. An evolving understanding of the S-glutathionylation cycle in pathways of redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 120, 204–216. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.038>
- Zhang, S., Bryant, D.A., 2015. Biochemical Validation of the Glyoxylate Cycle in the Cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* Strain PCC 9212. *J. Biol. Chem.* 290, 14019–14030. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.648170>
- Zhang, S., Qian, X., Chang, S., Dismukes, G.C., Bryant, D.A., 2016. Natural and Synthetic Variants of the Tricarboxylic Acid Cycle in Cyanobacteria: Introduction of the GABA Shunt into *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01972>

Annexe n°1 - Liste des codes UNIPROT des séquences protéiques de diverses protéines de la superfamille des GST

Annexe n°2 - Liste des séquences et des caractéristiques des amorces utilisées dans ce mémoire

Annexe n°3 - Liste des constructions synthétiques utilisées dans ce mémoire.

Annexe n°4 - Liste des plasmides utilisés et construits dans ce mémoire.

Annexe n°1 – Liste des codes UNIPROT des séquences protéiques de diverses protéines de la superfamille des GST

Classification				Membres représentatifs de chaque classe issues de la base de données publiques UniProtKB/Swiss-Prot (http://www.uniprot.org) et utilisées pour les analyses phylogénétiques et les modélisations structurales				
Catégorie	Répartition	Origine	Classe	Origine	Symbole	Uniprot ID	PDB ID	
GST cytosoliques ou solubles	Organismes dépendants	Mammifères	Alpha A (A)	<i>Homo sapiens</i>	Hs-GSTA1-1	P08263	1PKW	
				<i>Mus musculus</i>	Mm-GSTA4-4	P24472	1GUK	
				<i>Rattus norvegicus</i>	Rn-GSTA2-2	P04903	5LD0	
				<i>Bos taurus</i>	Bt-GSTA2	O18879	/	
				<i>Gallus gallus</i>	Gg-GSTA3	P26697	1VF1	
				<i>Danio rerio</i>	Dr-GSTA1	Q6P962	/	
			Mu M (M)	<i>Homo sapiens</i>	Hs-GSTM4-4	Q03013	4GTU	
				<i>Mus Musculus</i>	Mm-GSTM7	Q80W21	2DC5	
				<i>Rattus norvegicus</i>	Rn-GSTM3	P08009	/	
				<i>Gallus gallus</i>	Gg-GSTM2	P20136	1C72	
				Pi II (P)	<i>Homo sapiens</i>	Hs-GSTP1-1	P09211	10GS
					<i>Xenopus laevis</i>	Xl-GSTP1	Q8JFZ2	
		<i>Onchocerca volvulus</i>	Ov-GSTP2		P46427	1TU8		
		<i>Dirofilaria immitis</i>	Di-GSTP		P46426			
		Animaux	Omega Ω (O)	<i>Homo sapiens</i>	Hs-GSTO1	P78417	3LFL	
					Hs-GSTO2	Q9H4Y5	/	
				<i>Rattus norvegicus</i>	Rn-GSTO1	Q9Z339	/	
		Bactéries	Beta B (B)	<i>Mus musculus</i>	Mm-GSTO2	Q8K2Q2	3QAG	
				<i>Proteus mirabilis</i>	Pm-GSTB	P15214	2PMT	
		Champignons	Gamma Γ (G)	<i>Haemophilus influenzae</i>	Hi-GSTB	P44521	5GNG	
<i>Cunninghamella elegans</i>	Cue-GSTG1			Q8X138				
	Cue-GSTG2	Q96UI6						

Classification				Membres représentatifs de chaque classe issues de la base de données publiques UniProtKB/Swiss-Prot (http://www.uniprot.org) et utilisées pour les analyses phylogénétiques et les modélisations structurales			
Catégorie	Répartition	Origine	Classe	Origine	Symbole	Uniprot ID	PDB ID
		Insectes	Delta Δ (D)	<i>Anopheles gambiae</i>	Ag-GSTT1	Q93113	1PN9
				<i>Drosophila melanogaster</i>	Dm-GSTD2	Q9VG98	5F0G
					Dm-GSTD3	Q9VG97	3EIN
					Dm-GSTD4	Q9VG96	/
					Dm-GSTD3	Q9VG95	/
					Dm-GSTD6	Q9VG94	/
			<i>Musca domestica</i>	Mm-GSTD1	P28338	/	
			<i>Musca domestica</i>	Mm-GSTD2	P46431	/	
			Epsilon E (E)	<i>Anopheles gambiae</i>	Ag-GSTE1	Q8WQM1	
				<i>Anopheles melas</i>	Am-GSTE	A0A182TNA4	
		<i>Anopheles arabiensis</i>		Aa-GSTE	A0A182IIE3		
		Plantes terrestres	Lambda Λ (L)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At-GSTL1	Q6NLB0	
					At-GSTL2	Q9M2W2	
					At-GSTL3	Q9LZ06	
			Tau T (U)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At-GSTU1	Q9ZW30	
					At-GSTU2	Q9ZW29	4CHS
					At-GSTU4	Q9ZW27	
					At-GSTU5	P46421	
					At-GSTU6	Q9ZW26	
			Phi Φ (F)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At-GSTF2	P46422	5A4U
					At-GSTF3	Q9SLM6	5A4U
					At-GSTF4	Q96266	5F05
					At-GSTF6	P42760	5A4U
					At-GSTF7	Q9SRY5	/
					At-GSTF9	O80852	5F07
				<i>Nicotiana tabacum</i>	Nt-GSTF	P46440	5F05
				<i>Zea mays</i>	Zm-GSTF1	P12653	1BYE
Hémérythrine (H)	<i>Physcomitrella patens</i>		Pp-GSTH1	K9Y311			
		Pp-GSTH2	K9Y435				

Classification				Membres représentatifs de chaque classe issues de la base de données publiques UniProtKB/Swiss-Prot (http://www.uniprot.org) et utilisées pour les analyses phylogénétiques et les modélisations structurales			
Catégorie	Répartition	Origine	Classe	Origine	Symbole	Uniprot ID	PDB ID
	Organismes dp	Nématodes	Nu N (N)	<i>Haemonchus contortus</i>	Hc-GSTN	Q9NAW7	
				<i>Heligmosomoides pylogyus</i>	Hp-GSTN	Q9NJQ6	
				<i>Ancylostoma caninum</i>	Ac-GSTN	Q6J1M5	
		Poissons	Rho P (R)	<i>Anguilla anguilla</i>	Aa-GSTR	A9YX62	/
				<i>Tilapia nilotica</i>	Tn-GSTR	A7XZW5	/
				<i>Oreochromis aureus</i>	Or-GSTR1	G7Z099	/
				<i>Pleuronectes platessa</i>	Pp-GSTRA	Q92103	/
					Pp-GSTRB	P30568	
				<i>Pagrus major</i>	Pm-GSTR1	Q50LH1	/
				<i>Micropterus salmoides</i>	Ms-GSTR	Q6VNV2	/
				<i>Branchiostoma b.</i>	Bb-GSTR	Q6WMS8	/
GST	Non-organismes dépendants	Mammifères, nématodes, plantes terrestres et bactéries	Zeta Z (Z)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At-GSTZ1	Q9ZVQ3	1E6B
				<i>Arabidopsis thaliana</i>	At-GSTZ2	Q9ZVQ4	1E6B
				<i>Euphorbia esula</i>	Ee-GSTZ	P57108	1E6B
				<i>Triticum aestivum</i>	Ta-GSTZ1	O04437	
				<i>Dianthus caryophyllus</i>	Dc-GSTZ1	P28342	
				<i>Dianthus caryophyllus</i>	Dc-GSTZ2	Q03425	
				<i>Homo sapiens</i>	Hs-GSTZ1	Q43708	
				<i>C. elegans</i>	Ce-GSTZ42	Q18938	
				Animaux, poissons, plantes terrestres, et	Theta Θ (T)	<i>Homo sapiens</i>	Hs-GSTT1
		<i>Homo sapiens</i>	Hs-GSTT2			P0CG29	4MPF
		<i>Rattus norvegicus</i>	Rt-GSTT1			Q01579	2C3N
		<i>Mus musculus</i>	Mm-GSTT1			Q64471	2C3N
		<i>Bos taurus</i>	Bt-GSTT1			Q2NL00	
		<i>Gallus gallus</i>	Gg-GSTT1			P20135	
		<i>Pleuronectes platessa</i>	Pp-GSTT			P30568	
		<i>Arabidopsis thaliana</i>	At-GSTT1			Q9ZRT5	
		<i>Arabidopsis thaliana</i>	At-GSTT3	Q9FHE1			

Classification				Membres représentatifs de chaque classe issues de la base de données publiques UniProtKB/Swiss-Prot (http://www.uniprot.org) et utilisées pour les analyses phylogénétiques et les modélisations structurales			
Catégorie	Répartition	Origine	Classe	Origine	Symbole	Uniprot ID	PDB ID
GST	Non-organismes dépendants	Animaux, insectes, nématodes, algues rouges & brunes	Sigma Σ (S)	<i>Nototodarus sloanii</i>	Ns-GSTS	P18425	
				<i>Nototodarus sloanii</i>	Ns-GSTS11	P18426	
				<i>D. melanogaster</i>	Dm-GSTS1	P41043	1MOU
		Glutathionyl-hydroquinone réductase	Xi (Xi)	<i>Halobacterium salinarum</i>	Halo-GSTXi	Q9HN26	
				<i>Arabidopsis thaliana</i>	At-GSTXi	Q9FL95	
				<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sc-GSTXi	P36156	
				<i>Escherichia coli</i>	Ec-GSTXi	P42620	
Nouvelle classe récentes			Eta (H)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Agro-GSTEta	AAK89703.1	
			Iota (I)	<i>Physcomitrella patens</i>	Pp-GSTI	A9SSZ0	
			Khi X (X)	<i>Thermosynechococcus elongatus BP-1</i>	Te-GSTX	Q8DMB4	
			<i>Synechococcus elongatus PCC 6301</i>	Se-GSTX	A0A0H3K2X6		
GST mitochondriales			Kappa K (K)	<i>Homo sapiens</i>	Hs-GSTK1	Q9Y2Q3	
				<i>Bos taurus</i>	Bs-GSTK1	Q2KIW8	
				<i>Rattus norvegicus</i>	Rn-GSTK1	P24473	
				<i>Mus musculus</i>	Mm-GSTK1	Q9DCM2	

Classification				Membres représentatifs de chaque classe issues de la base de données publiques UniProtKB/Swiss-Prot (http://www.uniprot.org) et utilisées pour les analyses phylogénétiques et les modélisations structurales			
Catégorie	Répartition	Origine	Classe	Origine	Symbole	Uniprot ID	PDB ID
MAPEG	GST microsomaux	mGST1		<i>Homo sapiens</i>		Hs-mGST1	P10620
				<i>Bos taurus</i>		Bs-mGST1	F1MXY2
				<i>Rattus norvegicus</i>		Rn-mGST1	P08011
		mGST2		<i>Homo sapiens</i>		Hs-mGST2	Q99735
				<i>Bos taurus</i>		Bt-mGST2	Q2KJG4
		mGST3		<i>Homo sapiens</i>		Hs-mGST3	O14880
				<i>Bos taurus</i>		Bt-mGST3	Q3T100
				<i>Arabidopsis thaliana</i>		At-mGST3	Q94BY2
				<i>Mus musculus</i>		Mm-mGST3	Q9CPU4
		LTC ₄ synthase		<i>Homo sapiens</i>		Hs-LTC4s	Q16873
	<i>Bos taurus</i>				Bt-LTC4s	Q2NKS0	
	<i>Cavia porcellus</i>				Cp-LTC4s	A6XA80	
	<i>Rattus norvegicus</i>				Rt-LTC4s	Q925U2	
	<i>Mus musculus</i>				Mm-LTC4s	Q60860	
	PGE ₂ synthase		<i>Homo sapiens</i>		Hs-PGE2s	O16484	
			<i>Rattus norvegicus</i>		Rn-PGE2s	Q9JHF3	
	FLAP		<i>Homo sapiens</i>		Hs-FLAP	P20292	
			<i>Rattus norvegicus</i>		Rn-FLAP	P20291	
			<i>Danio rerio</i>		Dr-FLAP	Q7T3B7	
	Groupe « Insectes »		<i>Anopheles gambiae</i>		Ag-mGST2	Q7Z274	
			<i>Anopheles gambiae</i>		Ag-mGST3	Q7Z273	
	Groupe "Bacteria"		<i>Pseudomonas syringae</i>		Ps-mGST	Q88AL0	
			<i>Chromobacterium violaceum</i>		Cv-mGST	Q7P1E4	
Groupe "Escherichia coli"		<i>Escherichia coli</i>		Ec-mGST			
		<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>		Mm-mGST	A0A0C2YV55		

Classification				Membres représentatifs de chaque classe issues de la base de données publiques UniProtKB/Swiss-Prot (http://www.uniprot.org) et utilisées pour les analyses phylogénétiques et les modélisations structurales					
Catégorie	Répartition	Origine	Classe	Origine	Symbole	Uniprot ID	PDB ID		
Protéine de la superfamille des GST	GST-like			<i>Aspergillus terreus</i>	GST-like GedE	Q0CCY0			
				<i>Aspergillus fumigatus</i>	GST-like TpcF	Q4WQZ2			
				<i>Beauveria bassiana</i>	GST-like OpS6	J4UHQ8			
	URE2				<i>Ashbya gossypii</i>	URE2	Q8NJR2		
					<i>Candida glabrata</i>	URE2	Q8NJR5		
					<i>Candida albicans</i>	URE2	Q96WL3		
					<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	URE2	p23202	1G6Y	
	eEF1B γ				<i>C. elegans</i>	Ce-EF1G	P54412		
					<i>Xenopus laevis</i>	Xl-EF1G	P26642		
					<i>Oryza sativa</i>	Os-EF1G	Q9ZRI7		
					<i>Arabidopsis thaliana</i>	At-EF1G	O04487		
	GSH-dependent disulfide-bond reductases (GD2BR)				<i>Escherichia coli</i>	YfcG	P77526	5HFK	
						YghU	Q46845	3C8E	
	(DHAR)				<i>Arabidopsis thaliana</i>	At-DHAR1	Q9FWR4		
						At-DHAR2	Q9FRL8		
						At-DHAR3	Q8LE52		
						<i>Oryza sativa</i>	Os-DHAR2	Q67UK9	
	Stringent starvation protein A (SSPA)				<i>Escherichia coli</i>	Ec-SSPA	P0ACA5		
						<i>Haemophilus</i>	Hae-SSPHA	Q7VLK4	
						<i>Pasteurella</i>	Psr-SSPHA	Q9CNB0	
Chloride Ion Channel protein (CLICs)				<i>Homo sapiens</i>	Hs-CLIC	Q5SRT3			
					<i>Danio rerio</i>	Dr-CLIC	Q6NYF2		
Tétrachloro(hydro)quinone déhalogenase (TCHQD)				<i>Arabidopsis thaliana</i>	At-TCHQD	O80662			
					<i>Zea mays</i>	Zm-TCHQD	B4FGR9		

Annexe n°2 - Liste des séquences et des caractéristiques des amorces utilisées dans ce mémoire.

Amplification of the Km^R cassette		
KmHincII-FW	GGCGCTGAGGTCGACCTCGTGAAGAAG	Amplification of Km ^R cassette to be cloned as a <i>HincII</i> fragment
KmHincII-RV	ACCTGCAGGGGGTCGACGGAAAGCCAC	
Amplification of a fragment of the Km^R cassette		
KmFW	GGTGTTATGAGCCATATTCAACGGG	Amplification of Km ^R cassette to check the <i>gst</i> segregation
KmRV	GGAAGATGCGTGATCTGATCCTC	
Amplification of a fragment of the Sm^R/Sp^R cassette		
Sm/Sp-FW	ATCTCGAACCGACGTTGCTG	Amplification of Sm ^R /Sp ^R cassette to check the <i>gst</i> segregation
Sm/Sp-RV	CCGACTACCTTGGTGATCTC	
Inactivation of <i>slI0067</i>		
L0067-FWa	GGAGCGCATCGAACCAA	Amplification of the downstream flanking regions of the <i>slI0067</i> coding sequence
L0067-RVa	TTGTTCCCGGGTACTACATGATTTTTTCTCCGATT	Amplification of the downstream flanking region of the <i>slI0067</i> coding sequence and simultaneous introduction of a <i>SmaI</i> site and a reverse-complement sequence to L0067-FWb
L0067-FWb	TAGTACCCGGGAACAACCAGTGACCAGATCAACCT	Amplification of the upstream flanking region of the <i>slI0067</i> coding sequence and simultaneous introduction of a <i>SmaI</i> site and a reverse-complement sequence to L0067-RVa
L0067-RVb	TTCTTGACCGTGTTGATTGTT	Amplification of the upstream flanking region of the <i>slI0067</i> coding sequence
SLL0067-FW	CGTTAACCTCAAGGAAGGGG	Amplification of a fragment of <i>slI0067</i> gene to check <i>slI0067</i> segregation
SLL0067-RV	CCACTGGTTAACTAGAGCTC	
Inactivation of <i>slI147</i>		
L1147-FWa	CAGGATAGCGGCGGAAAT	Amplification of the downstream flanking regions of the <i>slI147</i> coding sequence
L1147-RVa	ACAGTCCCGGGACTTTTTGTTCATCGGTCATGGT	Amplification of the downstream flanking region of the <i>slI147</i> coding sequence and simultaneous introduction of a <i>SmaI</i> site and a reverse-complement sequence to L1147-FWb
L1147-FWb	AGTCCCGGGAAGTGTCCAGTTTTGAACA	Amplification of the upstream flanking region of the <i>slI147</i> coding sequence and simultaneous introduction of a <i>SmaI</i> site and a reverse-complement sequence to L1147-RVa
L1147-RVb	GTACAAAGGCATTTTGGATGTG	Amplification of the upstream flanking region of the <i>slI147</i> coding sequence
SLL1147-FW	GCAACTGCCAAAGGATGGACAGCAG	Amplification of a fragment of <i>slI147</i> gene to check <i>slI147</i> segregation
SLL1147-RV	GCTTTGGCGACGATGCTTTACCTGG	
Inactivation of <i>slr0236</i>		
R0236-FWa	CTGGGAACAGCGGAAGTG	Amplification of the downstream flanking regions of the <i>slr0236</i> coding sequence
R0236-RVa	AGACCCGGGGCAACAGCAACAACATCCTA	Amplification of the downstream flanking region of the <i>slr0236</i> coding sequence and simultaneous introduction of a <i>SmaI</i> site and a reverse-complement sequence to R0236-FWb
R0236-FWb	GTTGCCCCCGGGTCTAGGTTAGGGATCGTT	Amplification of the upstream flanking region of the <i>slr0236</i> coding sequence and simultaneous introduction of a <i>SmaI</i> site and a reverse-complement sequence to R0236-RVa
R0236-RVb	TTGGAAAACAAGCAGAAATTAAC	Amplification of the upstream flanking region of the <i>slr0236</i> coding sequence
SLR0236-FW	GTGTCCATGCCCTGCAACTTAAACC	Amplification of a fragment of <i>slr0236</i> gene to check <i>slr0236</i> segregation
SLR0236-RV	CGTTAGGTCTGCTATGGTCAACTGG	
Inactivation of <i>slI1545</i>		
<i>For simple mutant Km^R construction</i>		
L1545-FWa	TGGTCTAAATTTTTAATTTCCCACT	Amplification of the downstream flanking regions of the <i>slI1545</i> coding sequence
L1545-RVa	TTGTTCCCGGGTACTAAGCATGGTAGGAATTTAG	Amplification of the downstream flanking region of the <i>slI1545</i> coding sequence and simultaneous introduction of a <i>SmaI</i> site and a reverse-complement sequence to L1545-FWb
L1545-FWb	TAGTACCCGGGAACAAAGTAGGTGGTTTTCAACAA	Amplification of the upstream flanking region of the <i>slI1545</i> coding sequence and simultaneous

L1545-RVb	CCTGGATTGGGCCTTATTG	introduction of a <i>Sma</i> I site and a reverse-complement sequence to L1545-RVa
SLL1545-FW	GGACATTGTCATTGCAGATTTCGACG	Amplification of the upstream flanking region of the <i>sll1545</i> coding sequence
SLL1545-RV	CAGAGTTAAAGCCTCCAAGTCCTGA	
For double mutant <i>Km^R</i> and <i>Sm^R/Sp^R</i> construction		
Vect1545-FW	GGGAACAAAGTAGGTGG	Amplification of pGEMt-AB <i>sll1545</i>
Vect1545-FV	GGGTACTAAGCATGGTAGG	
Sm/Sp-A1545-FW	TCCTACCATGCTTAGTACCCGCGCTCACGCAACTGGTCCA	Amplification of <i>Sm^R/Sp^R</i> cassette from pFC1 plasmid with a 20-bp reverse-complement fragment to Vect1545-RV primer and a 20-bp reverse-complement fragment to Vect-1545-FW primer
Sm/Sp-B1545-RV	AAACCACCTACTTTGTTCCTCCCAATTTGTGTAGGGCT	
Inactivation of <i>sll1902</i>		
pGEMt-L1902-FWa	tccggccgccatggccggggattGGTCTAAATGCCATTCTGCAGGCTC	Amplification of the downstream flanking regions of the <i>sll1902</i> coding sequence with a fragment identical to 3'-extremity of pGEMt
L1902-RVa	GGTTCTAACCGTCTCGATCTTCGC	
L1902-FWb	TGTTAAGCAAGAGGCGATCG	Amplification of the upstream flanking region of the <i>sll1902</i> coding sequence with a reverse-complement fragment identical to the 5'-extremity of pGEMt
pGEMt-L1902-RVb	caggcgccgactagtattCTGAGCAACGTTGATCTCAATCC	
Sm/Sp-A1902-FW	GCGAAGATCGAGACGGTTAGAACCgcgctcagcaactggtcca	Amplification of <i>Sm^R/Sp^R</i> cassette from pFC1 plasmid with homology platform to assemble with up- and downstream flanking regions of the <i>sll1902</i> coding sequence
Sm/Sp-B1902-RV	CGATCGCCTCTTGCTTAAACActcccaattgtgtaggct	
Inactivation of <i>slr0605</i>		
pGEMt-R0605-FWa	tccggccgccatggccggggattCCATGATTGTCCACCGGGATAAGGC	Amplification of the downstream flanking regions of the <i>slr0605</i> coding sequence with a fragment identical to 3'-extremity of pGEMt
R0605-RVa	GTCCCTGCGCTGAAGATTGCC	
R0605-FWb	CTGGCTAATAATTCCTGACGCTC	Amplification of the upstream flanking region of the <i>slr0605</i> coding sequence with a reverse-complement fragment identical to the 5'-extremity of pGEMt
pGEMt-R0605-RVb	caggcgccgactagtattCTGGGTTGCCTCCATCCACTCAATGTCAGC	
Sm/Sp-A0605-FW	GGCAATCTCAGCGCAGGGACgcgctcagcaactggtcca	Amplification of <i>Sm^R/Sp^R</i> cassette from pFC1 plasmid with homology platform to assemble with up- and downstream flanking regions of the <i>slr0605</i> coding sequence
Sm/Sp-B0605-RV	CAGGAATTATTAGCCAAgctcccaattgtgtaggct	
Construction of plasmids for the overexpression of GST		
T7-FW	TAATACGACTCACTATAGGG	Amplification of the insert on the pET-26b(+) plasmid
T7-RV	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
Construction of plasmids for the heterologous complementation with human MAPEG		
pEX-FW	GGAGCAGACAAGCCCGTCAGG	Amplification of each interest DNA segment for the construction of the corresponding plasmids pGEMt-ABsll1147-pR-hmGST2-Sm/Sp and pGEMt-ABsll1147-pR-hmGST3-Sm/Sp by DNA assembly strategy.
pEX-RV	AGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC	
pR-FW	acaccgtgctgTTGAC	
pR-mGST2-RV	TTAAAATTGCCGCCGCA	
pR-A1147-FW	ACCATGACCGATGACAAAAGTcccacaccgtgctgTTGAC	
pR-mGST2-Sm/Sp-RV	ggttctgaccagttgctgagcgcTTAAAATTGCCGCCGCA	
pR-mGST3-Sm/Sp-RV	ggttctgaccagttgctgagcgcTTAATGACAACATTTGG	
pR-pGEMt-FW	tccggccgccatggccggggattacaccgtgctgTTGAC	
GFP-pGEMt-RV	caggcgccgactagtattTACCTACATCcccAA	
Sm/Sp-FW	gcgctcagcaactggtcca	
Sm/Sp-B1147-RV	TTGTTCAAAACTGGGACAGTTcccctcccaattgtgtaggct	

Abbreviations : FW : forward ; RV : reverse

Annexe n°3 - Liste des constructions synthétiques utilisées dans ce mémoire.

Synthetic gene	Relevant features	Reference
<i>NdeI-sll0067-XhoI</i>	Coding sequence of the corresponding <i>gst</i> gene fused to His-tag with DNA flanking regions homologous to both extremities of a double digest <i>NdeI</i> / <i>XhoI</i> pET-26b(+)	This study
<i>NdeI-sll1545-XhoI</i>		
<i>NdeI-slr0236-XhoI</i>		
<i>NdeI-sll1902-XhoI</i>		
<i>NdeI-slr0605-XhoI</i>		
pEX-A128-pRmGST2	pEX-A128 (Eurofins Genomics) containing the <i>mGST2</i> coding sequence adapted to cyanobacterial codon table usage under the control of the pR promoter	This study
pEX-A128-pRmGST3	pEX-A128 (Eurofins Genomics) containing the <i>mGST3</i> coding sequence adapted to cyanobacterial codon table usage under the control of the pR promoter	This study

Annexe n°4 - Liste des plasmides utilisés et construits dans ce mémoire.

Plasmid	Relevant features	Reference
pGEMT	Amp ^R AT overhang cloning vector	Promega
pUC4K	Source of the Km ^R marker gene	Pharmacia
pFC1	Source of the Sm ^R /Sp ^R marker gene	(1)
pGEMT-AB <i>sll0067</i>	pGEMT with the downstream and upstream flanking sequences of <i>sll0067</i> gene, where the most of the <i>sll0067</i> coding sequences (from the 3 rd bp downstream of the ATG codon down to the stop codon) was replaced by a <i>SmaI</i> restriction site	This study
pGEMT-Δ <i>sll0067</i> ::Km ^R	pGEMT-AB <i>sll0067</i> with the Km ^R marker inserted in the unique <i>SmaI</i> site	This study
pGEMT-AB <i>sll1147</i>	pGEMT with the downstream and upstream flanking sequences of <i>sll1147</i> gene, where the most of the <i>sll1147</i> coding sequences (from the 24 th bp downstream of the ATG codon down to the 26 th bp upstream of the stop codon up) was replaced by a <i>SmaI</i> restriction site	This study
pGEMT-Δ <i>sll1147</i> ::Km ^R	pGEMT-ZB <i>sll1147</i> with the Km ^R marker inserted in the unique <i>SmaI</i> site	This study
pGEMT-AB <i>sll1545</i>	pGEMT with the downstream and upstream flanking sequences of <i>sll1545</i> gene, where the most of the <i>sll1545</i> coding sequences (from the 5 th bp downstream of the ATG codon down to 5 th bp upstream to the stop codon up) was replaced by a <i>SmaI</i> restriction site	This study
pGEMT-Δ <i>sll1545</i> ::Km ^R	pGEMT-AB <i>sll1545</i> with the Km ^R marker inserted in the unique <i>SmaI</i> site	This study
pGEMT-Δ <i>sll1545</i> ::Sm ^R /Sp ^R	pGEMT-AB <i>sll1545</i> with the Sm ^R /Sp ^R marker inserted in the unique <i>SmaI</i> site	This study
pGEMT-AB <i>slr0236</i>	pGEMT with the downstream and upstream flanking sequences of <i>slr0236</i> gene, where the most of the <i>slr0236</i> coding sequences (from the 26 th bp downstream of the ATG codon down to the 22 th bp upstream the stop codon up) was replaced by a <i>SmaI</i> restriction site	This study
pGEMT-Δ <i>slr0236</i> ::Km ^R	pGEMT-AB <i>slr0236</i> with the Km ^R marker inserted in the unique <i>SmaI</i> site	This study
pGEMT-Δ <i>slr0236</i> ::Sm ^R /Sp ^R	pGEMT-AB <i>slr0236</i> with the Sm ^R /Sp ^R marker inserted in the unique <i>SmaI</i> site	This study
pGEMT-Δ <i>sll1902</i> ::Km ^R	pGEMT-Δ <i>sll1902</i> ::Sm ^R /Sp ^R with the Km ^R marker which replaced the Sm ^R /Sp ^R marker	This study
pGEMT-Δ <i>sll1902</i> ::Sm ^R /Sp ^R	pGEMT with the downstream and upstream flanking sequences of <i>sll1902</i> gene, where the most of the <i>sll1902</i> coding sequences (from the 1 st bp(ATG codon) down to the 920 th bp upstream the stop codon up) was replaced by the Sm ^R /Sp ^R marker	This study
pGEMT-Δ <i>slr0605</i> ::Sm ^R /Sp ^R	pGEMT with the downstream and upstream flanking sequences of <i>slr0605</i> gene, where the most of the <i>slr0605</i> coding sequences (from the 1 st bp(ATG codon) down to the stop codon up) was replaced by the Sm ^R /Sp ^R marker	This study
pET-26b(+)- <i>sll0067</i>	pET-26b(+) containing the <i>sll0067</i> -His tag coding sequence under the control of the T7 promoter	This study
pET-26b(+)- <i>sll1545</i>	pET-26b(+) containing the <i>sll1545</i> -His tag coding sequence under the control of the T7 promoter	This study
pET-26b(+)- <i>slr0236</i>	pET-26b(+) containing the <i>slr0236</i> -His tag coding sequence under the control of the T7 promoter	This study
pET-26b(+)- <i>sll1902</i>	pET-26b(+) containing the <i>sll1902</i> -His tag coding sequence under the control of the T7 promoter	This study
pET-26b(+)- <i>slr0605</i>	pET-26b(+) containing the <i>slr0605</i> -His tag coding sequence under the control of the T7 promoter	This study
pEX-p <i>RmGST2</i>	pEX-A128 (Eurofins genomics) which contains the synthetic gene p <i>RmGST2</i>	This study
pEX-p <i>RmGST3</i>	pEX-A128 (Eurofins genomics) which contains the synthetic gene p <i>RmGST3</i>	This study

(1) (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994)

REMERCIEMENTS

Si à l'évidence la rédaction d'un mémoire de thèse et la soutenance de celui-ci se déroule dans une forme de solitude, j'affirme que sa construction est, quant à elle, le fruit d'un collectif. J'écris, ici, que l'accomplissement d'un travail de 3 ans de thèse est en réalité une construction issue de plus de 25 ans de carrière comme écolier, élève puis étudiant passée à vos côtés, comme enfant, ami ou collègue. C'est à ce collectif que j'aimerais présenter mes remerciements.

Ce collectif c'est vous !

Vous les enseignants d'hier, d'aujourd'hui et de demain.

Vous les collègues de travail (que l'on apprécie ou pas). Vous les amis. Vous la famille.

Chaque étape de la vie est faite de rencontres durant lesquelles, premièrement, nous enseignons à autrui et, deuxièmement, nous apprenons des autres.

C'est donc à l'éducation (dans sa globalité : *éducation, instruction, formation*) que je voudrai rendre hommage, car à l'heure où la mort entre dans l'école de la vie, j'espère que mes mots seront vous donner un second souffle, un nouvel élan.

A vous qui lirait et esquisserait un sourire (je l'espère) à la lecture de mes multiples remerciements et anecdotes, je vous autorise à ne lire que la partie qui vous est dédié sachant que je dois donc revenir sur près d'un peu plus d'un quart de siècle d'histoire.

Bien que l'*éducation-instruction-formation* me semble être indissociable, interdépendante et particulièrement connectées, j'ai tout de même choisi de les séparer en 3 parties par souci de clarté :

- (i) celle de l'école de l'éducation-instruction
- (ii) celle de l'école de l'instruction-formation
- (iii) celle de l'école de l'éducation-formation

L'école de l'éducation/instruction

Commençons donc par la crèche et l'école maternelle.

Du haut de mes 62 cm et du poids de mes 6 kg, je suis entré dans la section des bébés le lundi 28 septembre 1992. Du haut de mes 79 cm et du poids de mes 10 kg, je suis passé dans la section des moyens le lundi 30 août 1993. Du haut de mes 88 cm et du poids de mes 12 kg, je suis passé dans la section des grands le lundi 29 août 1994 jusqu'à mon départ le vendredi 30 juin 1995.

Autant vous dire que je n'ai aucun souvenir de cette période, néanmoins je tiens à remercier la directrice Madame POIRIER, les « taties » qui m'ont accueilli durant ces années : Carole, Chantal, Fabienne, Jocelyne, Jo, Laure, Laurence, Martine, Maryse C., Maryse T., Mauricette, Murielle, Odette, Odile, Pierrette, Réjane, Solange et Yvelise, pour m'avoir fait aimé l'école en la rendant ludique et en m'ayant transmis l'art indispensable du collage des gommettes que j'utilise toujours pour annoter mes microtubes au laboratoire.

Bien que n'ayant pas souvenir de mes enseignantes (à mon grand regret), je garde en mémoire les récréations, les jeux d'eau, les tricycles, les siestes que je n'aimé pas, les portes manteaux. Je me souviens donc de l'atmosphère agréable à l'école. Et tout débute là, comment rester 25 ans dans le sillage de l'Education si au départ on n'aime pas l'école. Un grand MERCI donc pour mes débuts.

Poursuivons avec l'école primaire de Jean Macé à Evreux.

Durant mes 2 premières années, j'ai eu le plaisir de commencer l'apprentissage de la lecture et de l'écriture de la langue de Molière auprès de **Madame COULLANGE**, ma « *maîtresse* » (comme on disait à l'époque) de CP et de CE1. C'est avec une profonde sincérité que je vous remercie puisque sans vos apprentissages, sans votre bienveillance je n'aurais pas pu écrire ces plus de 400 pages. L'anecdote qui me tient particulièrement à cœur c'est que sans vous, je n'aurais également pas reçu les gouttes que l'ophtalmologue m'avait prescrit à l'issue d'une blessure à l'œil droit provoqué par la réception d'une branche d'arbre dans l'œil. Avec le recul que j'ai aujourd'hui, je pense que vous m'avez ouvert la voie de l'« école de la confiance » avant notre cher Monsieur B et qu'il faut donc faire confiance à l'expertise du terrain. Un grand merci à vous.

J'ai poursuivi ma scolarité en classe de CE2 avec une enseignante dont j'ai malheureusement oublié le nom. J'en suis profondément meurtri, car en écrivant ces mots, je me souviens de son fameux « *Lundi ! Quoi de neuf ?* » : une séance où chaque élève devait rapporter les nouvelles qu'il avait entendu, vu ou lu durant le weekend. Au jour d'aujourd'hui, je trouve cette idée incroyablement astucieuse sur bien des aspects. En cela, je vous remercie car j'ai été passionné et ces séances aussi petites soient-elle devant la machine qu'est l'Education Nationale, m'ont inspiré et m'inspire encore.

Je suis ensuite passé en CM1-CM2 sous l'égide de **Monsieur BAUMARD**. Là aussi une anecdote me vient immédiatement à l'esprit, celle d'un cours de science qui a mal tourné. Rien de grave ! Souvenez-vous, je vous avais gentiment prêté ma règle en plastique pour une expérience. Ma règle n'avait pas résisté et fût brisé en 2. A ma grande surprise, quelques jours plus tard, vous m'aviez acheté une nouvelle règle en métal, bien plus jolie et bien plus résistante que celle que je possédais jusqu'alors. Avec le recul, votre attitude m'inspire et m'oblige à être moi-même bienveillant. Cela a distillé, en moi et dans mon attitude à l'égard de mes élèves et étudiants, la persévérance. Même si l'échec est présent, la réussite n'est pas loin. Sur une note plus légère, il peut être pertinent de noter que l'expérimentation (parfois ratée) fait partie intégrante d'un travail de thèse. Fallait-il y voir un signe ? Aucune idée ! La seule certitude que j'ai pour vous c'est Merci !

J'aimerais ajouter une petite dose d'ironie pour inciter l'Education Nationale à revoir sa copie en matière de recrutement. En relisant mes bulletins d'école primaire, il semblerait que vous aviez détecté mon altruisme, mon souci de l'autre, mon envie d'aider mes camarades. Je cite Madame COULLANGE « *ne t'occupe pas trop des autres, ils sont assez responsables pour savoir ce qu'ils doivent faire ! Pense à ton travail.* » Même chose du côté de Monsieur BAUMARD, où il semblerait que je « *génère des envies de travail* » et je « *fédère autour de mes idées et permet souvent au groupe et donc à la classe de progresser* ». Ironie du sort ou complot de recrutement ! Si vous saviez à l'époque que mon travail serait désormais de m'occuper justement des autres (de mes élèves) et de les faire progresser. Ou peut-être est-ce un nouveau mode de recrutement précoce à l'Education Nationale. Trêve de

plaisanterie ! Je souhaiterais vivement vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté car on ne peut pas construire sa maison (son parcours) sans une fondation (un début) solide.

Continuons désormais avec mes années collèges et lycées que j'ai successivement passées dans le collège Jean-Rostand et le lycée Aristide Briand.

- **Merci à mes enseignantes de Français : Mme ROSE (6^{ème} D), Mme BENSACI (5^{ème} D), Mme VELU-MARTIN (4^{ème} E & 3^{ème} C), Mme SAUMET (2^{nde} M) et Mme MURCUILLAT (1^{ère} S1).**

Merci à Mme ROSE pour m'avoir fait débiter dans l'art subtil de l'analyse des textes classiques en lettre modèles. Merci à Mme BENSACI d'avoir poursuivi l'œuvre de votre collègue et en particulier m'avoir fait prendre confiance en moi en dépit des mes difficultés en groupe de niveau. Merci à Mme VELU-MARTIN pour la réelle passion avec laquelle vous m'avez enseigné le français et en particulier pour l'opportunité d'avoir crié « Au voleur ! Au voleur ! A l'assassin ! Au meurtrier ! Justice, juste ciel ! » et aux nombreuses poésies que j'ai récité et interprété avec plaisir. Merci à Mme SAUMET pour la douceur avec laquelle vous enseigné l'art subtil de l'analyse de texte.

Et enfin, merci à vous, Mme MURCUILLAT, vous m'avez littéralement transporté, motivé, passionné. J'ai pris un réel plaisir à décortiquer, à analyser, à développer une compréhension fine des textes que vous avez sélectionné pour notre année décisive de baccalauréat de français. Je me souviens encore de « *1984* » de Georges Orwell que j'ai dévoré alors que je n'étais pas un lecteur assidu. Je suis encore effaré par la beauté et l'ingéniosité de la métaphore filée de la ruche dans « *Au Bonheur de Dames* » d'Emile Zola que vous nous avez fait découvrir avec passion et envie.

Je n'ai que 2 regrets. Le premier concerne l'attitude de certains de mes camarades de la classe de 1^{ère} S1 qui a pu jouer en votre défaveur lors de votre inspection. J'aimerais donc vous convaincre par mes mots que le rapport d'inspection (bon ou mauvais) que vous aviez reçu à l'époque n'a que peu d'importance entre la relation stricto-professionnelle que vous avez avec un inspecteur qui rendra décision au bout de 50 min de cours contre la motivation, la passion et l'envie que vous m'avez fait ressentir pour les mots et la langue française pendant près d'une année. Cela me permet d'en venir à mon second regret, celui de ne pas avoir su vous honorer à la hauteur de votre passion et de votre amour pour les belles lettres. Laissez-moi donc aujourd'hui vous faire part de ma plus grande sympathie et de ma plus grande reconnaissance.

Enfin, je vous serai gré de bien tenir compte des fautes, des erreurs de syntaxe et autres formulations inappropriées car ce n'est pas mon esprit rationnel mais mon cœur qui rédige.

- **Merci à mes enseignantes et enseignants de LV1 Anglais : Mme LANGOLFF (6^{ème} D & 4^{ème} E), Mr STEFFAN (5^{ème} D), Mlle DELBARD (3^{ème} C), Mme PINTE (2^{nde} M), Mme LUCAS (1^{ère} S1) & Mme FOUESNEL (T^{ale} S1),**

I was not really good in English probably because of my shyness and my fear of speaking in front of my classmates. Anyway, thanks to you, I spoke in English everyday during my PhD program. For this, I would to to sincerely thank you. I would like to especially thank **Miss PINTE** to make me confident by choosing a topic about forensic science that I liked. I don't know if you choose it to help me but it was clearly efficient for me to participate more in class. I did not honor your professionalism **Miss FOUESNEL** during my final exam but you have to know that I enjoyed your lessons. Please don't correct this paragraph.

- **Merci à mes enseignantes de LV2 Italien : Mme GIVONETTI (Collège) & Mme MIGLIERINA (Lycée),**

Non credo che ci sia bisogno di spiegare che la lingua italiana é stata una scoperta fabulosa per me. Dunque, voglio ringraziare le professoressa **GIVONETTI** e **MIGLIERINA** per l'opportunit  che mi avette offerto con il viaggio in Italia che ho provato ad ogni lezione. Grazie per avermi fatto sentire sicuro, incoraggiato a prendere la parola e per la nascita del mio cuore italiano nel mio corpo di francese. Per finire, sarebbe possibile per voi di non prestare attenzione agli errori ? Grazie mille !

- **Merci   mes enseignantes et enseignants d'Histoire-Géographie, d'éducation civique et d'éducation civique, juridique et sociale : Mlle LAZENNEC (6 me D & 3 me C), Mr PERNES (5 me D), Mlle FOURCIN (4 me E), Mme SINEUX (2nde M & 1re S1) & Mr RAFFRAY (Tale S1).**

S'il y a bien une discipline que je regrette c'est l'Histoire-Géographie. Je ne sais pas si cela est propre à votre discipline, mais j'ai eu le plaisir de trouver sur mon chemin des enseignants plus que passionné et je me suis moi-même passionné pour vos cours pour notre histoire et pour notre géographie. Profondément confiant en l'humanité (ou pas), j'ai trouvé dans vos cours de formidables outils pour comprendre le monde d'hier afin de construire aujourd'hui le monde de demain. Est-ce d'ailleurs en cela que je m'oriente naturellement vers l'enseignement ? Je l'ignore. Mais je n'ignore pas toute l'énergie que vous m'avez transmise au travers de vos séances passionnantes.

En cela je vous remercie **Madame LAZENNEC** car je me suis littéralement «  clat , amusé, passionné » durant vos cours. J'y cherchais avec ma camarade Alison de l'époque les réponses pour remplir vos fameux photocopiés que j'ai toujours en mémoire tant votre approche ludique, je crois, nous a Alison et moi-même tant stimulé.

Je souhaite souligner toute la vie et toute l'énergie que vous puisez pour rendre vos cours si passionnant **Monsieur PERNES**. J'espère que ces mots de remerciements seront vous rendre, ne serait-ce qu'une infime partie de cette énergie.

A **Madame FOURCIN**, si à l'époque vous aviez été confronté à l'un de mes camarades peu enclin à respecter vos cours, sachez qu'aujourd'hui vous recevez de ma part quelques mots d'encouragements car, là encore, vous vivez vos cours et c'était un plaisir de voyager dans les temps de l'histoire avec vous.

C'est donc à tous les 3 que je souhaite dédier mon prix départemental au Concours National de la Résistance que j'ai reçu en 3 me.

A **Madame SINEUX** et à **Monsieur RAFFRAY**, que j'ai eu la chance d'avoir pour mes années lycées, c'est avec de profonds remerciements que je vous dédie mon prix, cette fois-ci, national au Concours National de la Résistance et de la Déportation. En effet, j'ai été profondément d cu par l'Administration (fallait-il un voir un signe ?) qui ne vous convié, **Madame SINEUX**, au voyage organisé pour les lauréats du CNRD, car vous le m ritiez à l'époque, vous le méritez, aujourd'hui et à jamais. Je tiens à souligner également que je garde d'excellents souvenirs lorsque vous nous enseigniez l'Histoire au travers des œuvres d'art. J'ai juste adoré cette approche. Et si une de mes camarades avez, à l'époque, votre compétence, regardez où j'en suis grâce à vous !

- **Merci à mes enseignantes et enseignants d'Arts plastiques, de Musique et d'Education Physique et Sportive : Monsieur LANGOLFF (Arts plastiques, 6^{ème} D, 4^{ème} E) Mademoiselle DUPORTE (Arts plastiques 5^{ème} D) & Madame GOUET (3^{ème} C), Monsieur CHAUCHOT (EPS, 6^{ème} D), Madame STEFFAN (EPS, 5^{ème} D & 4^{ème} E) & Monsieur OIZEL (EPS, 3^{ème} C), Madame ADAMIEC (Musique)**

Même si, à l'époque, je n'ai pas pris la mesure de l'importance de vos enseignements, ce n'est que tardivement que j'ai compris le rôle essentiel que vous joué dans l'ouverture culturelle et pour l'équilibre physique des élèves. Je vous remercie donc pour l'idée positive que je me fais désormais de vos enseignements et de ma motivation et du combat que je mènerai à l'avenir pour rendre toutes les lettres de noblesse à vos disciplines respectives.

Je remercie tout particulièrement **Monsieur LANGOLFF** pour ces tout premiers cours qui portait sur les couleurs primaires et secondaires, j'avais trouvé ça passionnant et j'en garde toujours un bon souvenir. Je souhaite remercier Madame STEFFAN pour les cours d'orientation car je suis désormais un « pro » lorsqu'il s'agit de m'orienter et cela, croyez-moi, ce n'est pas donné à tout le monde ! Je remercie également **Monsieur OIZEL** pour le match improvisé de Volley contre vous. Enfin, je remercie **Madame ADAMIEC** qui, en dépit de nos regards non intéressés, n'a cessé de se battre pour nous transmettre un peu de culture musicale.

Sachez aujourd'hui que l'ouverture culturelle que je n'ai pas su attrapé au vol durant ma scolarité, je l'ai désormais pleinement inscrite dans ma vie, puisque la danse m'offre une activité sportive, artistiques et musicale qui réunit parfaitement ce que vous m'avez transmis. Merci pour cela !

- **Merci à mes enseignants de Technologies : Monsieur CORNIL (6^{ème} D, 4^{ème} E & 3^{ème} C), Monsieur NICOSIA (5^{ème} D) Monsieur KUNZE (4^{ème} E & 3^{ème} C) et Monsieur**

Je vous remercie pour vos cours car à l'ère du numérique et des nouvelles technologies, votre enseignement m'est plus qu'utile au jour le jour. A l'ère du futur avènement de l'intelligence artificielle et de la transition écologique, nous avons plus que jamais besoin d'enseignant comme vous pour nous faire apprendre et comprendre l'usage des technologies allant de la plus simple horloge que nous avons construite avec vous au plus sophistiqué ordinateur. Un grand merci à **Monsieur CORNIL** avec lequel j'ai eu le plaisir de découvrir le logiciel MEDIATOR (si je me souviens) pour créer un super diaporama sur le cyclone Katrina lors d'un IDD avec Monsieur PERNES. Sachez que je maîtrise les outils informatiques, alors soyez fier !

- **Merci à mes enseignantes et enseignants de Mathématiques : Mr GOMEZ (6^{ème} D), Mlle DE PAUW (5^{ème} D & 3^{ème} C), Mme PLET (4^{ème} E) et Mme DUVAL (2^{nde} M, 1^{ère} S1 et T^{ale} S1).**

Bien que je ne puisse pas dire avoir aimé passionnément les mathématiques durant toute ma scolarité, je me dois de vous remercier pour m'avoir poussé et encouragé à poursuivre mes efforts. Je suis aujourd'hui un « pro » du produit en croix que j'ai longuement utilisé au cours de ma thèse. Je remercie particulièrement **Madame PLET** et **Madame DE PAUW** qui ont su, toutes 2, me redonner confiance en mes capacités alors que j'avais des difficultés. Enfin, j'ai une petite dédicace à faire à **Madame DUVAL** avec laquelle j'ai passé mes 3 années de lycée alors même que vous nous avez souhaité que cela ne nous arrive pas. Et bien, j'ai survécu et j'ai réussi, ce n'était donc pas si terrible ! Un grand MERCI, car j'ai quand même eu 12 au BAC.

- **Merci à mes enseignantes et enseignants de Physique-Chimie : Mme NUTTENS (5^{ème} D), Mme LEMOINE (4^{ème} E & 3^{ème} C), Mlle LAUNEY (3^{ème} C), Mr POTTIER (2^{nde} M), Mme GARNIER (1^{ère} S1), Mme GUESNON (T^{ale} S1).**

Bien que je me sois pas destiné aux sciences physiques et chimiques ou à la physique-chimie (je ne sais jamais laquelle des dénominations est juste), je dois dire que je garde d'excellents souvenirs des séances que j'ai passé à vos côtés.

Je me souviens des travaux pratiques (TP) qui rendaient parfaitement vivant et concret vos enseignements. Et ici, c'est l'élève qui parle ! A quant le temps où le ministère entendra ce message pour donner la par belle à ces TP avec des dédoublements vraiment efficace et des moyens humains et matériels à la hauteur... A la hauteur de la passion que j'ai ressentir pour vos cours. Je me souviens du triangle du feu, des réactions de combustions, de la caractérisation des métaux en fonction de la couleur que nous observions en TP. Je me souviens aussi des calculs en mol auxquels je ne comprenais rien. Soyez rassuré j'ai enfin compris et je l'enseigne désormais ! Merci à **Madame NUTTENS et Madame LEMOINE** pour leur formidable IDD (Itinéraire de Découverte) sur les fusées.

Pour tout cela, un grand merci et soyez assuré qu'en biologie on ne cesse de faire de la physique et de la chimie. D'où l'intérêt de ne pas cloisonner ces enseignements à des choix de spécialités !

- **Merci à mes enseignantes et enseignants de SVT : Mlle TREMEL (6^{ème} D, 4^{ème} E & 3^{ème} C), Mlle EYRAULT (5^{ème} D), Mme PARREIN (2^{nde} M & 1^{ère} S1) & Mme JEANNEAU (T^{ale} S1),**

Je m'excuse d'avance d'avoir choisi l'agrégation Biochimie génie-biologique (BGB) non pas celle de Sciences de la Vie & Sciences de la Terre et de l'Univers (SV-STU), mais sachez qu'il m'a bien fallu commencer par me passionner et adorer la SVT. Cela a été très rapidement une évidence et c'est à **Mademoiselle TREMEL** que je le dois véritablement puisqu'en tant que première enseignante de SVT que j'ai eu, vous avez scellé (en bien) mon avenir. Vous avez fait germer cette graine qui n'a jamais cessé de croître au fil des années. Si passionné j'ai été grâce à vous, que j'enchaînais les points bonus à en obtenir des notes improbables de 21,5/20 mais si réjouissantes et motivantes. A **Mademoiselle EYRAULT**, j'ai « kiffé », « surkiffé » et adoré vos cours. Vous avez continué à arroser la graine déjà bien germée en ancrant profondément ces racines dans mon être. Je me souviens avec plaisir les nombreuses fois où vous m'appeliez par le prénom de mon frère.

Si j'avais pu craindre de ne plus aimer la SVT au lycée, il n'a en était rien grâce à **Madame PARREIN**, une enseignante, ô combien, passionnée et passionnante. J'ai eu la chance de participer à un projet EDD (une option sur le développement durable) qui n'avait pas reçu de financement de la part du ministère, à l'époque. Lorsque j'écris les enseignants construisent la société de demain, c'est véritable ! Et c'est bel et bien par ce genre d'initiative que les choses commencent à bouger face à l'immobilisme croissant des gouvernements successifs. Bref ! Revenons à ce qui me semble plus important. Madame PARREIN, je vous dois un grand merci pour le voyage à Briançon qui a amené indéniablement du concret en partie en ce qui concerne la géologie et l'ophiolite obduite. Bien que déçu de ne pas avoir fait mieux, je vous dédie ma 20^{ème} place au concours Géosciences. Je vous remercie également car j'ai réalisé une séance d'extraction d'ADN du chou-fleur pour mes actuels élèves en utilisant le propre TP que j'avais réalisé avec vous.

J'ai poursuivi mes classes auprès de **Madame JEANNEAU**. Là encore que décrire de plus que la passion que j'ai éprouvé durant vos cours, en dépit de la pression du BAC. Je vous

remercie pour le 18/20, « plus haute note que vous n'aviez jamais mise à un premier devoir type-BAC de votre carrière jusque-là » et pour le précieux conseil que vous m'aviez donné concernant Admission POST-BAC (l'ancêtre de PARCOURSUP, qui fonctionnait bien *a priori* mais on ne change pas une équipe qui gagne c'est bien connu !). En effet, sur ce point, vous m'aviez conseillé d'aller en BTS pour échapper aux horaires importants de mathématiques et de physique-chimie qui peuvent exister en prépa et ainsi entrer directement dans le vif du sujet en BTS de biologie appliquée. Aujourd'hui, vous ne savez pas à quel point ce conseil a été décisif puisque que sans ce fameux BTS, pas d'admission comme étudiant à l'ENS Cachan puis comme élève normalien à l'ENS Cachan à l'issue du second concours, pas d'admission à l'agrégation BGB. Bref ! C'est plus qu'un grand MERCI que je vous dois !

Pour finir sur une note positive, sachez que j'ai conservé vos cours depuis la 6^{ème} à la T^{ale} ! Et le mieux dans tout ça, c'est que je les utilise parfois pour mes propres cours !

L'école de l'instruction-formation

Vous l'aurez compris, la suite logique est celle de mes enseignants en BTS BioAnalyses et Contrôles du lycée Léopold Sédar Senghor où j'y ai débutais ma formation.

Ce n'est pas une nouveauté pour vous mes enseignants de BTS ! Vous savez déjà tout ce que m'a apporté ce BTS par le passé (admission à l'ENS Cachan, au second-concours de l'ENS Cachan et à l'agrégation BGB). C'est donc à moi désormais de vous m'apportez ce petite bout de vous que vous m'avez transmis. Car c'est véritablement dans vos classes qu'est né ma vocation, celle que nous partageons, celle de l'enseignement. Un grand MERCI donc à **Madame JURASZEK** pour avoir détecté en moi des qualités didactiques et pédagogiques, **Madame TEYCHENNE** pour m'avoir redonné confiance en mon anglais, **Monsieur FRAINAY**, pour vos cours de mathématiques éclatant, **Madame LE CALLONNEC** et **Madame SOLIGNY** pour votre passion à enseigner la physique-chimie. Un grand MERCI également à **Madame BERNIERE** et **BERGERE** avec lesquelles j'ai su apprécié la « bête noire » des étudiants, la biochimie. J'ai utilisé vos cours pour mes propres cours et pour ma thèse, c'est dire tant ils sont de qualités. Je souhaite faire une petite dédicace mais si grande de sens à **Madame CHAUVIN**, qui innocemment m'a dit à la volée d'un début de cours qu'il fallait faire l'ENS Cachan pour devenir enseignant comme elle. Et bah j'ai suivi votre petit conseil et voilà où j'en suis ! Un « putain » de grand MERCI pour ça ! Je remercie vivement **Monsieur LOUVET** et **BEAUMESNIL** pour m'avoir fait « kiffé » littéralement la microbiologie, vous m'avez transmis votre passion indéniablement et j'espère la transmettre à mon tour. Enfin, je remercie **Monsieur COLOMB** que j'ai eu plaisir à découvrir en cours de STBI et qui, avec ses collègues, j'en suis sûr, m'a rédigé une super lettre de recommandation pour l'ENS Cachan (ce serait d'ailleurs avec plaisir que j'aimerais la lire, aujourd'hui, puisqu'il y prescription).

- **Merci à l'ENS Cachan pour la formidable chance et opportunité que l'école m'a offert.** Si « grande école » vous vous considérez, « Grande Ecole », vous êtes désormais de par l'ouverture à des étudiants issus de formations considérées à la marge par l'Administration ou non destiné à entrer dans une grande école (BTS, Licence, Prépa TB...). Telle une appréciation sur un bulletin, je vous « encourage à poursuivre dans cette voie » car on a tant à apprendre des autres.

Bien qu'il y ait eu d'autres forces mises en cause dans mon admission à l'ENS Cachan (avec le jeu des remontées dans les listes complémentaires d'admission, par exemple) et que mon « culot » de présenter un dossier alors que je viens de BTS ait pu jouer ou déjouer en ma faveur, je considère qu'avoir accepté de vous entretenir avec moi, **Madame RAILLAND-LEFEVRE**, a été une chance. Je vous remercie pour cela mais également pour vos excellents cours de Physiologie durant lesquels j'ai « galéré » mais cela a payé. Merci également à vous, pour votre soutien, lors de l'entretien de fin de 1^{er} semestre en me montrant que mon niveau (bien que mauvais en terme quantitatif) était à la hauteur en prenant en compte ma formation d'origine. Je crois qu'aujourd'hui on peut dire que j'ai réussi si vous me le permettez. Je remercie également **Madame GUILLAUME** pour ces cours de biochimie d'une grande qualité. Enfin, petite dédicace à **Madame PERIS-DELACROIX**, merci pour vos encouragements et votre soutien. Seul microbiologiste dans la promo, j'ai été ravi de trouver un appui en vous.

A tous mes enseignants, je crois, sans arrogance, que nous pouvons nous permettre d'écrire que l'ascenseur social fonctionne (trop rarement, certes) mais il fonctionne. J'en suis l'exemple vivant. Alors profitons de cette preuve par l'expérience pour analyser et comprendre les raisons de ce succès et tentons de le généraliser ou de le rendre plus fréquent afin que cela profite au plus grand nombre. Si nous réussissons ce n'est pas grâce au Ministère, c'est grâce à ce qui se passe dans vos classes au jour le jour. *A contrario* et aussi étonnant que cela puisse paraître, nous échouons à cause du Ministère et de ses Administrations. Aller savoir pourquoi ! Je considère également que ma (notre) thèse ne s'est pas construite en 3 ans comme voudrais-nous l'enseigner le système éducatif. Elle est le fruit de plus de 25 ans de carrière dans l'Education nationale comme votre écolier, votre élève et votre étudiant. C'est pourquoi, je tenais à inscrire et à graver dans l'Histoire vos noms. **A tous mes enseignants** donc je vous prie de recevoir mes plus sincères remerciements. Sachez enfin que si mes remerciements et toute ma gratitude ne peuvent pas « faire valoir ce que de droit » pour vos mutations et avancements, sachez que la vérité n'est pas dans l'Administration, elle est dans les petits bouts d'homme et de femme que vous croisez chaque année, elle est en nous, nous, vos écoliers, vos élèves et vos étudiants.

Un grand MERCI !

L'école de l'éducation-formation

C'est ici que les collègues, les amis et la famille vont prendre place.

« *Quoi ! Les collègues, les amis et la famille arrivent en dernier !* »

« *Surprenant !* »

J'y réponds « *Justifié !* ».

En effet, j'ai décidé de conserver le meilleur pour la fin car nos collègues (en particulier ceux qui m'ont accompagné pour ces 3 dernières années), nos amis et notre famille construisent notre éducation en ce sens où ils nous confrontent aux relations avec autrui et aux épreuves de la vie en stimulant sans cesse notre intelligence émotionnelle et humaine.

Je tiens tout d'abord à remercier tous les locataires du bâtiment 142 avec lesquels j'ai évolué au cours de ces 3 dernières années. De par nos discussions et nos échanges, je garde un bon souvenir de chacun et chacune.

Je pense bien évidemment aux habitants du 1^{er} étage avec qui je me suis « battu » pour l'accès au ClarioStar (le lecteur de microplaque !, je le remercie d'ailleurs d'avoir fonctionné à merveille). En réalité, je remercie vivement **Agnès** et **Gwen** qui m'ont permis un accès facilité à cet outil merveilleux. Je tiens également à souligner la parfaite communication que nous avons à ce sujet assurant ainsi une coordination de nos « manips » et des échanges intéressants sur la technique de dosage du glutathion. Je remercie **Jean-Yves** qui a parfaitement détecté mon côté râleur (moi je dis, esprit critique !). J'ai une pensée pour **Régis** qui a géré l'ingérable des commandes du CEA et du stock au sous-sol tout en conservant sa bonne humeur, qu'il transmet sans hésiter aux étudiants de son équipe. C'est d'ailleurs vers eux que je me tourne désormais puisque j'ai eu la chance d'échanger avec eux l'avancée de nos travaux respectifs, alors merci à **Adèle** et **Valentin**. Je souhaiterais finir avec **Benoit**, **Batoul** et **Sylvain** avec lesquels j'ai été heureux de collaborer pour l'autoclave, de discuter autour de problèmes de protéines et de partager le spectrophotomètre.

Direction le rez-de-chaussée où j'ai pu énormément parler d'autres choses que de sciences avec **Hélène**, **Marina** et **Emilie** ce qui nous a valu de nombreux fous-rires. D'ailleurs à ce sujet, je n'ai aucune nouvelle à vous partager (et vous voyez de quoi je veux parler). J'espère que vous aurez l'occasion de partager (y compris sans moi) de petits quarts d'heure potins. Je me souviens également de **Stéphane** pour l'accès au PSM qu'il m'a gentiment octroyé lorsqu'il n'en avait pas besoin. Je me remémore ces instants magiques où l'on croît que Stéphane n'est pas dans son bureau alors qu'en réalité il est bien présent mais simplement caché par le mur !

Passons désormais à mes partenaires de labo ! Je remercie toutes les doctorantes : **Célia**, **Victoire** et **Sigrid** pour avoir amené un peu de vie dans le labo. Merci d'avoir supporté mes monologues sur l'éducation à table ou ailleurs. Voglio ringraziare **Giacomo** per gli scambi scientifici et per aver portato un po di bellezza maschile. Je remercie tous les stagiaires de tous niveaux que nous avons accueillis au laboratoire. Je pense tout particulièrement aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer : Antoine, William, Laurine,

Mathias, Guillaume et Julie. J'ai une pensée toute particulière pour Mathias qui a fourni un travail extraordinaire sans lequel je n'aurais pas accumulé toutes ses données. Un grand merci !

Pour finir, je souhaite remercier **Sandrine** avec qui j'ai passé bien plus que 3 années de labo mais 3 années d'échanges, de soutien et d'amitiés. Je suis ravi d'avoir travaillé à tes côtés et espère avoir l'occasion de réitérer. Es el momento español, el que te prometí. Es para ti guapita, **Encarni** ! Fuiste mi mejor descubrimiento durante estos 3 años. Trabajamos juntos, disfrutamos la vida juntos y hicimos amigos juntos. Por todas estas cosas, quiero agradecer desde el fondo de mi corazón.

S'il est de coutume de commencer par remercier ses encadrants, je crois qu'il est plus intéressant de leur donner une place de choix, celle du meilleur pour la fin. En effet, je ne tiens pas à les remercier de façon banale et/ou protocolaire comme on peut le voir dans de nombreux remerciements. Je ne veux pas d'un merci automatique. C'est pourquoi, je rejoins le fond avec la forme en vous dédiant un modeste paragraphe et des remerciements qui ne proviennent pas de la bienséance mais du cœur. C'est donc avec une profonde émotion que je tiens à remercier **Franck CHAUVAT** et **Corinne CASSIER-CHAUVAT** pour leurs immenses qualités scientifiques qui nous ont d'ores et déjà permis de publier 2 jolis papiers dont nous pouvons être fier. J'ai eu plaisir à échanger et à parler science avec vous mais aussi de tout autre sujet. Je pense qu'aucun autre doctorant ne peut imaginer la chance que j'ai eue, en recevant de votre part un encadrement scientifique rigoureux et un encadrement humain prodigieux (autant vous dire que l'HDR n'a rien à voir là-dedans). J'ai également eu l'opportunité de me voir confier une autonomie presque illimitée et une confiance inégalée autant sur le plan technique que scientifique. Je me suis littéralement « éclaté » durant ces 3 ans. Quoi de mieux pour un technicien supérieur que de développer des techniques, de les valider, de les mettre en œuvre et d'en obtenir des résultats. Quoi de mieux pour un ingénieur, d'encadrer, de concevoir et d'appliquer. Quoi de mieux pour un esprit chercheur que de rechercher, d'expérimenter, de critiquer, d'évoluer et de créer. Toutes ces opportunités m'ont été offertes grâce à vous. Vous avez donc fait de moi plus qu'un chercheur mais un penseur du passé vivant dans le présent pour construire l'avenir. Tout cela n'a été possible que parce que vous m'avez transmis votre passion et vous m'avez confié un peu de vous. Même si le mot n'est pas assez fort : MERCI !

Il est temps de remercier les amis. Ils sont peu mais comme ils sont de qualité dans cette société quantitative, ils ont une place toute choisie ici. Je pense en premier lieu à ma meilleure amie depuis le collège, **Célia**. Nous avons fait les 400 coups et vécu des coups durs ensemble. Il est donc normal de te remercier d'avoir été là, d'être là et je l'espère d'être encore là. Merci pour ton soutien et pour ton intérêt sur ma thèse. Je remercie tous mes camarades du M2 : **Mahnaz, Emilie, Yohan**... avec lesquels nous avons échangés sur nos parcours de thésard. Je remercie tout spécialement **Mélanie** et **Charlène** pour avoir été présentes à un moment décisif de ma vie. Je remercie toute la famille du dancefloor, je pense à **Mégane, Marie, Fabienne, Véro, Stéfy, Odile, Patricia, Alison, Chloé**... Comme on ne peut pas être un homme totalement libre et accompli sans un accès à la culture, aux loisirs et au bonheur que procure l'art de la danse, je vous exprime un grand MERCI pour tous ces moments de joie.

Comme promis le meilleur pour la fin est là !

S'il y a bien 2 personnes qui peuvent « se la péter » à vie, être fier et qu'il faut absolument remercier, c'est mon **père** et mon **frère** sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Sans qui, ce petit bout d'homme né un 27 dans le 27 ne serait pas devenu un homme de 27 ans éduqué, citoyen et libre. Et tout ça simplement parce que sans amour on ne grandit pas vraiment. Sachez que je suis fier d'être ton fils et ton frère et que cette thèse c'est avant celle des **KAMMERSCHEIT**.

En réalité, j'ai menti ! Le meilleur pour la fin est définitivement ici !

Bien que mon contrat doctoral ait officiellement débuté au 1^{er} septembre 2016, ma thèse n'a pris son envol et tout son sens que le 25 octobre 2016. Pour les plus observateurs, vous aurez, sans nul doute, remarqué que cette date est marqué au « fer rouge » (au démographe en réalité !) sur ma peau. Et pour les plus perspicaces, vous aurez également remarqué que ma soutenance a eu lieu un 25 octobre, précisément 3 ans après cette date symbolique de début de thèse. Rien n'est jamais fait au hasard. J'ai fait le choix de cette date pour rendre hommage à mon plus grand regret. Ton absence est terrible mais elle me rend fier. Comme promis le jour de ton départ, cette thèse de doctorat est tienne :

MAMAN...

Titre : Rôles des glutathion-S-transférases chez la cyanobactérie modèle *Synechocystis* PCC 6803

Mots clés : Glutathion, MAPEG cyanobactériennes et humaines, Méthylglyoxal, Stress oxydant, Stress thermique, Terpènes

Résumé : Grâce à leur puissante photosynthèse, les cyanobactéries utilisent l'énergie solaire, le CO₂ atmosphérique et l'eau (même polluée) pour proliférer (elles colonisent la planète depuis 2 à 3 milliard d'années) et produire une grande partie de la biomasse et de l'oxygène (O₂) nécessaire à la chaîne alimentaire. Elles peuvent aussi être modifiées pour la production de composés d'intérêt (biocarburants, bioplastiques biodégradable, molécules anti-oxydantes...). Cependant, les cyanobactéries sont continuellement confrontées aux stress (brutales variations de lumière et de température, carence ou excès de métaux et minéraux...). Ainsi, l'analyse des réponses aux stress (notamment photo-oxydant généré par la photosynthèse) a donc un double objectif : (i) le premier, fondamental, vise à améliorer nos connaissances sur ces processus encore mal connus et (ii) le second, appliqué, vise à accroître la tolérance des cyanobactéries aux stress et aux composés que l'on souhaite leur faire produire. Pour répondre à divers stress, les cyanobactéries ont inventé le « système glutathion », qui a été conservé par l'évolution jusqu'à l'homme. Ce système est basé sur le glutathion (GSH), un tripeptide qui peut se conjuguer sur de nombreux toxiques (grâce notamment aux enzymes glutathion-S-transférases (GST)) et sert de réducteurs à d'autres enzymes (glutarédoxines, glutathion peroxydases...).

Pour analyser la redondance/sélectivité des GST, qui est mal connue, j'ai utilisé la cyanobactérie modèle *Synechocystis* PCC 6803 car elle est unicellulaire (pas de différenciation cellulaire et tissulaire), et elle possède un petit génome entièrement séquencé et facilement manipulable (grâce aux outils du laboratoire). Ma thèse décrit l'analyse des six GST de *Synechocystis* PCC 6803 (leurs orthologues sont présents chez la plante et l'homme) par une approche génétique (délétion/surexpression des gènes *gst*) ; physiologique (sensibilité/résistance à divers stress) ; et biochimique (dosage de molécules oxydantes, de glutathion et d'activité enzymatiques). Ainsi, j'ai démontré pour la première fois : (i) qu'une GST joue un rôle central dans la tolérance aux stress thermique et (ii) qu'une autre GST joue un rôle prépondérant dans la détoxification du méthylglyoxal, un métabolite toxique issu du catabolisme du glucose qui s'accumule dans les cellules diabétiques et dérègle leur fonctionnement. Ces résultats sont discutés au regard des connaissances actuelles sur les GST et leur classification dans le règne du vivant. Ils sont présentés dans trois manuscrits d'articles (un est soumis pour publication, deux sont en cours d'écriture).

Title : Roles of glutathione-S-transferases in the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803

Keywords : Glutathione, Cyanobacterial and human MAPEG, Methylglyoxal, Oxidative stress, Thermal stress, Terpenes

Abstract : Cyanobacteria are environmentally-crucial prokaryotes that perform the (plant-like) oxygen producing photosynthesis, which use solar energy to assimilate a huge amount of CO₂ and minerals to produce a huge amount biomass (and O₂) that sustain a large part of our food chain. Furthermore, cyanobacteria are increasingly studied for a future ecologically-responsible production of high-value chemicals (drugs, perfumes, biodegradable bioplastics, biofuels...). The realization of this important objective requires a better understanding of the cyanobacterial tolerance to stresses. Furthermore, in colonizing most waters and soils of our planet, cyanobacteria are inevitably challenged by environmental stresses triggered by drastic changes of sun light (the overstimulation of photosynthesis generates toxic oxygen reactive species) or availability of minerals nutrient and/or pollutants (heavy metals and pesticides).

In response to these stresses cyanobacteria have developed various strategies including the key metabolite glutathione and the glutathione-dependent enzymes glutathione-S-transferases that have been conserved through evolution from (cyano)bacteria to human.4 During my thesis, I have used a combination of techniques (genetic, biochemistry and cell physiology) to decipher the role of the six GSTs of the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Very interestingly, I report that one GST (conserved in human) plays a crucial role in the detoxification of the methylglyoxal a toxic by-product of glucose catabolism that is involved in diabetes and neurological diseases. Another GST operates in the protection against heat (fever in human), cold and lipid peroxidation, while other *Synechocystis* GST are involved in photosynthesis and CO₂ assimilation. All these results are presented in three articles manuscripts (one already submitted for publication).