



HAL
open science

Mécanisme catalytique de la protochlorophyllide oxydoréductase : étude du couplage entre activité fonctionnelle et dynamique de la protéine

Guillaume Durin

► **To cite this version:**

Guillaume Durin. Mécanisme catalytique de la protochlorophyllide oxydoréductase : étude du couplage entre activité fonctionnelle et dynamique de la protéine. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00011429

HAL Id: tel-00011429

<https://theses.hal.science/tel-00011429>

Submitted on 19 Jan 2006

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

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

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1
SCIENCE & GEOGRAPHIE**

**THESE
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**

Discipline : Physique

Présentée et soutenue publiquement par

Guillaume DURIN

Le 21 décembre 2005

**Mécanisme catalytique de la protochlorophyllide
oxydoréductase : étude du couplage entre activité fonctionnelle
et dynamique de la protéine**

Composition du jury

Président

M. Giuseppe Zaccai

Rapporteurs

Mme Catherine Tétreau

M. Klaus Brettel

Examineur

M. Derren J. Heyes

Directeur de thèse

M. Dominique Bourgeois

Thèse préparée à l'Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre EBEL et à
l'Installation Européenne de Rayonnement Synchrotron (ESRF)

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à dire un grand merci à Dominique Bourgeois, directeur de thèse qui a su rester patient et disponible tout au long de ces presque quatre années de travail en commun.

Je tiens aussi particulièrement à remercier Klaus Brettel et Catherine Tétreau, qui ont rapporté avec rigueur mon manuscrit. Leurs remarques constructives ont été très appréciables et ont grandement contribué à l'interprétation des phénomènes.

Je remercie aussi Giuseppe Zaccai, pour avoir accepté de présider mon jury, et pour y avoir apporté sa bonne humeur.

Merci à Derren J. Heyes, d'avoir fait le voyage depuis Sheffield pour assister à ma soutenance, et pour ces trois années de collaboration durant lesquelles il a toujours essayé de me fournir la protéine la plus stable possible.

Merci à Juan Fontecilla-Camps et à tous les membres du LCCP pour m'avoir accueilli au laboratoire durant ces années de thèse.

Merci à Sean McSweeney et à tout le MX group pour m'avoir accueilli à l'ESRF.

Merci à Martin Weik, qui est à l'origine du projet, et dont les remarques et suggestions sont toujours fort à-propos.

Merci à Antoine d'avoir, en plus des mêmes goûts musicaux que moi, lutté pour l'intégrité de la POR.

Et enfin un grand merci à tous les membre -ou pas- de l'équipe Cryobench pour tout le reste, et ils sauront bien pourquoi. Avec par ordre aléatoire d'apparition : Philippe, Jeremy, Xavier, Manue, Yvain, Eric, Eve, Gergely, Virgile, Jacques.

Table des matières

REMERCIEMENTS	i
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES NOTATIONS ET DES SYMBOLES	x
AVANT-PROPOS	1
1 Introduction	3
1.1 La photosynthèse	3
1.1.1 La phase lumineuse	4
1.1.2 La phase obscure	7
1.2 Biosynthèse de la chlorophylle	10
1.2.1 Tronc commun aux biosynthèses des hèmes et de la chlorophylle	10
1.2.2 Chemin spécifique à la biosynthèse de la chlorophylle .	13
1.3 Réduction de la protochlorophyllide	16
1.3.1 Mécanisme lumière dépendant	16
1.3.2 Mécanisme lumière indépendant	28
1.3.3 Choix évolutifs	28
1.4 La cristallographie cinétique	29
1.4.1 Présentation de la technique	29
1.4.2 Techniques de piégeage d'intermédiaires réactionnels .	32
1.4.3 Expérience de « freeze-trigger »	34
1.5 Activité à basse température	35
1.5.1 Le paysage énergétique des protéines	36
1.5.2 La transition dynamique des protéines	36
1.5.3 Les transitions de phase dans le solvant	41
1.5.4 Effets du solvant sur les mouvements des protéines . .	43
1.5.5 Activité dans les cristaux de protéine	45

1.6	Méthodologies	46
1.6.1	Le microspectrophotomètre	47
1.6.2	Microspectrophotométrie dépendante en température	49
2	Études biochimiques	51
2.1	Expression et purification de la POR	51
2.1.1	Principe de biologie moléculaire et biochimie	51
2.1.2	Résultats de la purification	52
2.1.3	Caractérisation de la protéine	53
2.2	Stabilité de la protéine	55
2.2.1	Migration sur gel SDS Page	56
2.2.2	Diffusion dynamique de la lumière	60
2.2.3	Spectrométrie de masse	61
2.2.4	Discussion	65
2.2.5	Stratégie et perspectives	67
2.3	Essais de cristallisation	68
2.3.1	Matériel et méthode	68
2.3.2	Essais de cristallisation	70
2.3.3	Perspectives	72
3	Études biophysiques	73
3.1	Matériel et méthodes	73
3.1.1	Spécifications du Cryobench	73
3.1.2	Études en solution	76
3.1.3	Méthodologie pour les expériences en solution	79
3.1.4	Traitement des spectres	81
3.2	Mécanisme à basse température	84
3.2.1	Rappels spectroscopiques sur la réaction	84
3.2.2	Photooxydation de la Pchl _a libre	87
3.2.3	Premier état intermédiaire	89
3.2.4	Mécanisme non-fonctionnel	91
3.2.5	Mécanisme fonctionnel	95
3.3	Couplage activité/ transition vitreuse	95
3.3.1	Mesure de la transition vitreuse	97
3.3.2	Couplage entre activité fonctionnelle et dynamique du solvant	101
3.3.3	Couplage entre activité non-fonctionnelle et dynamique du solvant	109
3.4	Discussion	114
3.4.1	Couplage entre l'activité de la POR et la dynamique du solvant	114
3.4.2	Mécanisme catalytique : état de l'art	117
3.4.3	Mécanismes catalytiques : interprétation des résultats	119
3.4.4	Conclusions	123

4	Conclusions & Perspectives	125
4.1	Rappels des conclusions	125
4.2	Perspectives	126
A	Glossaire d'enzymologie	127
A.1	Définitions	127
A.2	Aspects énergétiques	127
A.3	Aspects cinétiques	128
B	Protocole de purification	130
C	Décomposition par valeurs singulières (SVD)	132
C.1	Principes de la SVD	132
C.2	Application au traitement des spectres	132
C.3	Application au traitement d'un cas particulier	133

Liste des figures

1.1	Chloroplaste vue par microscopie électronique à transmission, et gros plans sur quelques <i>grana</i> . Figure extraite de www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours	4
1.2	Représentation de la structure d'un chloroplaste. Image extraite de www.daviddarling.info/encyclopedia/C/chloroplasts.html	5
1.3	Schémas en Z des chaînes non cyclique et cyclique de transfert d'électron chez les cellules photosynthétiques.	6
1.4	Représentation schématique d'un flux non cyclique d'électrons et des différentes protéines impliquées dans ce processus.	8
1.5	Représentation du cycle de Calvin. Figure modifiée à partir de www.ualr.edu/botany/calvencycle.gif	9
1.6	Étapes communes à la biosynthèse de chlorophylle et à la synthèse des hèmes.	11
1.7	Le mécanisme spécifique de biosynthèse de la chlorophylle.	14
1.8	Plastes vus par microscopie électronique à transmission.	18
1.9	Alignements de séquences de protéines appartenant à la famille des SDR.	22
1.10	Alignement de séquences de POR de différents organismes avec visualisation de la prédiction des éléments de structure secondaire.	24
1.11	Représentation du modèle de la structure tertiaire de la POR.	25
1.12	Modèle proposé pour la mécanisme catalytique de la POR.	26
1.13	Cartes de densités électroniques différences superposées au modèle de la myoglobine.	31
1.14	Schéma récapitulant les différentes techniques de cristallographie cinétique.	33
1.15	Schéma idéalisé représentant le déroulement d'une étude de cristallographie cinétique par piégeage d'états intermédiaires.	35
1.16	Arbre hiérarchique représentant le paysage énergétique de la crambine.	37
1.17	Déplacement quadratique moyen pour de la myoglobine en poudre hydratée dans de l'eau lourde et dans le tréhalose.	39

1.18	Diagrammes des changements de phase pour de l'eau.	42
1.19	Vue stylisée de la myoglobine avec les parties impliquées dans la dynamique et la fonction.	44
1.20	Vue schématique d'un microspectrophotomètre.	48
2.1	Gel SDS des fractions récoltées lors de la purification	52
2.2	Spectre de fluorescence et d'absorption de l'échantillon avant et après illumination.	54
2.3	Activité de la POR de <i>T. elongatus</i> en fonction de la température.	55
2.4	Activité de la POR en fonction de sa concentration.	56
2.5	Gels de migrations SDS de POR de <i>T. elongatus</i> et de <i>Synechocystis</i> en fonction de la température.	58
2.6	Gels de migrations SDS de POR de <i>T. elongatus</i>	59
2.7	Spectre typique de la POR obtenu par spectrométrie de masse, en MALDI-TOF	62
2.8	Alignement de séquence de différentes POR.	65
2.9	Illustration des résultats obtenus par spectrométrie de masse sur le modèle tridimensionnel de la POR.	66
2.10	Gels de dégradation de la POR en présence de chymostatine.	67
2.11	Diagramme de phase d'une protéine.	69
2.12	Schéma de principe de la cristallisation par la méthode de la goutte suspendue.	69
3.1	Photo du Cryobench.	74
3.2	Schéma représentant les propriétés optiques des objectifs utilisés sur le Cryobench.	75
3.3	Spectres d'absorption de la Pchl _a en fonction de son solvant. Chemin optique de 1 cm. Concentration de Pchl _a de 0.011 mM.	77
3.4	Montage pour les expériences d'absorption en capillaires.	78
3.5	Capillaires à 100 K après le refroidissement quasi-instantané.	79
3.6	Protocoles d'études en TDFM et en TDAM.	81
3.7	Réaction de réduction de la Pchl _a par la POR.	85
3.8	Détail des états intermédiaires et de leurs propriétés spectroscopiques lors de la réduction de la Pchl _a par la POR de <i>T. elongatus</i>	86
3.9	Spectres de la Pchl _a après exposition au laser bleu.	88
3.10	Spectre d'absorption complet du complexe ternaire à 100 K avant le déclenchement de l'étape photosensible.	89
3.11	Représentation de la consommation de F644 à 100 K, lors de l'illumination par différentes sources laser.	90
3.12	Spectres d'absorption après illumination du complexe ternaire à 160 K.	92

3.13	Spectres de fluorescence des différents états intermédiaires de la « branche morte » lors de la réduction de la Pchl _d	93
3.14	Description des propriétés spectroscopiques des états intermédiaires de la « branche morte » et de leur dépendance en température.	94
3.15	Spectres d'absorption des différents états intermédiaires du mécanisme fonctionnel de réduction de la Pchl _d	96
3.16	Transitions de phase dans un mélange binaire eau/glycérol (40% v/v) vues par TDFM.	98
3.17	Spectres de fluorescence dans l'obscurité et à 100 K d'une solution contenant le mélange ternaire et le marqueur de fluorescence Oregon Green.	100
3.18	Spectres de TDFM sur deux solutions contenant le tampon d'activité basse température de viscosités différentes.	102
3.19	Expérience de contrôle, mélange ternaire exposé à la lampe blanche utilisé pour les spectres d'absorption pendant une rampe de température à 100 K/h.	103
3.20	Spectres d'absorption obtenus lors d'une expériences de TDAM suivant le mécanisme fonctionnel.	106
3.21	Spectres déconvolués mesurés lors de la consommation du complexe ternaire, et leur dépendance en température dans la gamme 600 - 660 nm.	107
3.22	Spectres déconvolués mesurés lors de la consommation du complexe ternaire, et leur dépendance en température dans la gamme 660 - 740 nm.	108
3.23	Consommation du complexe ternaire en fonction de la température pour deux solutions de viscosités différentes, superposition du modèle théorique aux données expérimentales.	109
3.24	Spectres de fluorescence obtenus lors d'une expériences de TDFM suivant le mécanisme non-fonctionnel.	112
3.25	Spectres de fluorescence obtenus lors d'une expériences de TDFM suivant le mécanisme non-fonctionnel.	113
3.26	Mécanisme biochimique proposé pour le mécanisme réactionnel.	118
3.27	Diagramme énergétique représentant les différents états électroniques de la chlorophylle. $h\nu_{b1}$ représente le premier photon du chemin bleu, $h\nu_{b2}$ le second. Les cases indiquées solvant représente l'absence, ou non, de couplage entre la réaction et l'état du solvant.	122
A.1	Mécanisme catalytique, déroulement en fonction des coordonnées de réaction.	128

Liste des tableaux

1.1	Tableau récapitulatif de la distribution de la POR dans le vivant.	21
2.1	Résultats obtenus par DLS	60
2.2	Résultats obtenus par spectrométrie de masse en Maldi-TOF.	63
2.3	Sites de coupure obtenus par spectrométrie de masse.	64
2.4	Sites de coupure obtenus par séquençage N-terminal	64
3.1	Résultats obtenus par TDFM sur la température de transition vitreuse d'une solution de tampon d'activité basse température de la POR, pour différents pourcentages de glycérol et de sucrose.	101

Liste des notations et des symboles

B-factor :	facteur de température
CCD :	Charge Coupled Device
CTC :	Complexe de Transfert de Charge
Chlide :	chlorophyllide
DLS :	Dynamic Light Scattering
DO :	Densité optique
EDTA :	acide éthylènediamine tétraacétique
EMBL :	European Molecular Biology Laboratory
ESRF :	European Synchrotron Radiation Facility
Hepes :	acide N-2-hydroxyéthylpiperazine-N-2-éthanesulfonique
I :	Intensité
IBS :	Institut de Biologie Structurale
LB :	Luria Broth
K_D :	Constante de dissociation d'un complexe AB. Elle exprime la force de l'interaction entre un ligand A et son récepteur B. $K_D = \frac{[A][B]}{[AB]}$
MALDI-TOF :	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight
MW :	Poids moléculaire
NF :	Non Fluorescent
Pchlde :	protochlorophyllide
PEG :	polyéthylène glycol
POR :	protochlorophyllide oxydoréductase
PYP :	photoactive yellow protein
RMN :	résonance magnétique nucléaire
RPE :	résonance paramagnétique électronique
SVD :	Singular Value Decomposition
TDFM :	Temperature Derivative Fluorescence Microspectrophotometry
Tg :	Température de transition vitreuse
Tris :	tris(hydroxyméthyl)-amino-méthane
ua :	unité arbitraire
v/v :	volume/volume
v/w :	volume/masse

Avant-propos

La protochlorophyllide oxydoréductase (POR) est l'enzyme responsable de la pénultième étape dans la synthèse de la chlorophylle. Elle catalyse la réduction de la protochlorophyllide en chlorophyllide. Les propriétés de cette enzyme sont remarquables : son activité est lumière-dépendante et le mécanisme catalytique de la réaction est caractérisé par des propriétés spectroscopiques spécifiques à chaque état intermédiaire.

Le mécanisme catalytique de la POR est encore largement méconnu, et ce même si l'enzyme est étudiée depuis longtemps. Derren Heyes et Neil Hunter, de l'université de Sheffield, travaillent sur la POR de cyanobactéries provenant de deux organismes : *Thermophilus elongatus* et *Synechocystis*. Ce sont les propriétés spectroscopiques particulières de la POR, et le fait que la réaction soit photoactivable (offrant la possibilité d'amorcer la réaction à température cryogénique), qui ont particulièrement intéressé Martin Weik et Dominique Bourgeois de l'équipe de cristallographie cinétique des protéines à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble (IBS). Ces propriétés spectroscopiques permettent de suivre l'avancement de la réaction et offrent la perspective de pouvoir réaliser des expériences de cristallographie cinétique « idéales » sur ce système biologique. De telles études, sujet initial de mon travail de thèse, outre la possibilité d'étudier le mécanisme catalytique d'un point de vue structural et d'apporter des informations cruciales à sa compréhension, constitueraient aussi un formidable outil méthodologique.

La très grande sensibilité de l'enzyme aux phénomènes de dégradation a toutefois rendu longues et délicates les tentatives de cristallisation, et nous a conduit à envisager différemment l'étude du mécanisme catalytique de la POR. Nous avons alors travaillé en solution, mais en tirant parti des outils utilisés en cristallographie cinétique des protéines. Les protocoles mis au point nous ont permis d'étudier en fonction de la température (entre 100 et 293 K) le déroulement de la réaction, en suivant en parallèle les transitions de phase du solvant. Ces travaux permettent de discuter l'existence de différents types de mouvements régissant l'activité de la protéine, certains couplés avec le solvant et d'autres de type harmonique, indépendants du solvant.

Toutes les expériences ont été réalisées sur le microspectrophotomètre Cryobench disponible à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), qui est la réalisation la plus visible de la collaboration étroite nouée entre l'IBS et l'ESRF par l'équipe de Dominique Bourgeois. Initialement développé pour travailler sur des cristaux de protéine, j'ai adapté un protocole d'étude permettant de travailler en solution sur des échantillons d'un volume inférieur au microlitre.

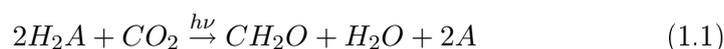
J'ai donc effectué mon travail de thèse dans le cadre d'une collaboration internationale (D.J. Heyes et N. Hunter de l'université de Sheffield) avec une localisation stratégique à Grenoble entre le synchrotron européen de troisième génération (l'ESRF et le groupe de Cristallographie Macromoléculaire de S. Mc Sweeney) et un institut français dédié à la biologie structurale (l'IBS et le Laboratoire de Cristallographie et Cristallogenèse des Protéines de J.C. Fontecilla-Camps), sous la direction de Dominique Bourgeois.

Chapitre 1

Introduction

1.1 La photosynthèse

Phénomène indispensable à la vie sur terre, la photosynthèse est le processus par lequel l'énergie lumineuse du soleil est convertie en énergie chimique. Commune à beaucoup d'organismes vivants, comme les plantes, les algues unicellulaires et certaines bactéries (les bactéries pourpres, vertes et les cyanobactéries), elle a été étudiée intensivement. Il est possible de la résumer par la réaction 1.1, où H_2A représente le donneur de proton et d'électron utilisé pour réduire le dioxyde de carbone (CO_2) en carbohydrate (CH_2O) et A le produit de l'oxydation.



Dans le cas commun des plantes, l'eau est le réducteur et l'oxygène est le produit de l'oxydation. On parle alors de photosynthèse aérobie. Des bactéries photosynthétiques (autres que les cyanobactéries) peuvent utiliser des réducteurs différents, comme de l'hydrogène moléculaire, des composés soufrés réduits ou des acides organiques. Le produit de l'oxydation n'étant plus de l'oxygène, on parle alors de photosynthèse anaérobie.

La photosynthèse peut être séparée en deux étapes : une première dite **phase lumineuse** et une seconde dite **phase obscure**. Lors de la première, la lumière excite un électron d'un pigment, qui, en retournant à l'état fondamental, fournit l'énergie nécessaire pour la synthèse d'une réserve d'énergie (sous forme d'ATP) et d'un pouvoir réducteur fort (sous forme de NADPH). Dans la seconde, l'ATP et le NADPH sont utilisés pour synthétiser de la matière organique, sous forme de glucides.

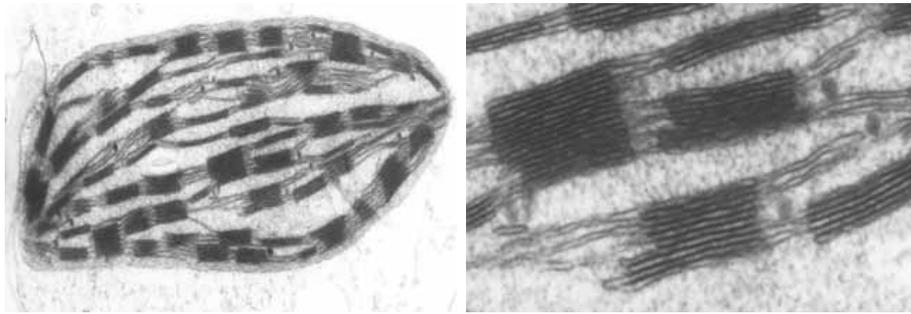


FIG. 1.1 – Chloroplaste vue par microscopie électronique à transmission, et gros plans sur quelques *grana*. Figure extraite de www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours.

1.1.1 La phase lumineuse

La photosynthèse a lieu dans la membrane des thylacoïdes. Ceux-ci baignent directement dans le cytoplasme chez les cyanobactéries alors que chez les eucaryotes ils sont regroupées dans un compartiment cellulaire appelé chloroplaste (figure 1.1). Chez la plupart des végétaux supérieurs, ce système membranaire est localement replié sur lui même pour donner des empilements appelés *grana*, qui sont le siège essentiel de la phase lumineuse (figure 1.2). Le *stroma* constitue le liquide intra-chloroplastique. Les parties de la membrane des thylacoïdes qui ne forment pas les *grana* et baignent dans le *stroma* sont appelées *lamelles du stroma*.

C'est dans la membrane des thylacoïdes que le végétal possède les structures capables de collecter les photons : les pigments. Il existe deux grands groupes de pigment capables d'absorber la lumière dans les organismes photosynthétiques : les chlorophylles *a* et *b* et les caroténoïdes. Ces pigments sont regroupés pour former des **antennes collectrices** qui absorbent les photons et transfèrent l'énergie jusqu'au site où ont lieu les réactions chimiques. Une paire spéciale de chlorophylle forme le **centre réactionnel** qui est au cœur de ces photosystèmes.

Dans la membrane des thylacoïdes se trouvent donc accumulés les pigments dans des complexes hétéroprotéiques, appelés photosystème II et photosystème I. Les photosystèmes sont les unités où se déroulent les réactions photochimiques proprement dites. Il en existe deux types :

- Le premier photosystème (dit **photosystème II**, car il a été découvert en second) est un complexe multiprotéique membranaire localisé principalement dans les lamelles des *grana*. Il a pour centre réactionnel une paire spéciale de molécules de chlorophylle *a* appelée P680 (absorbant de façon maximale la lumière de longueur d'onde 680 nm).

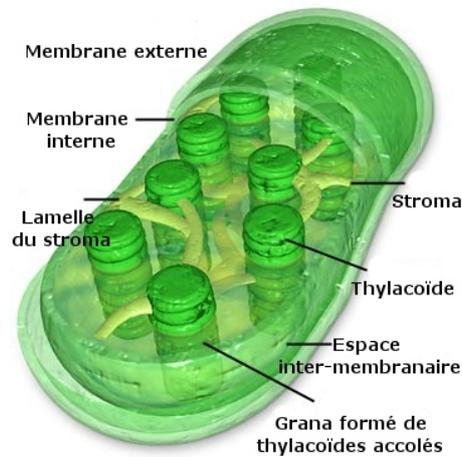


FIG. 1.2 – Représentation de la structure d'un chloroplaste. Image extraite de www.daviddarling.info/encyclopedia/C/chloroplasts.html.

- Le second photosystème (dit **photosystème I**) est lui aussi un complexe multiprotéique membranaire, mais il est disposé presque exclusivement dans les lamelles du *stroma*. Le centre réactionnel du photosystème I se compose d'une paire spéciale de molécules de chlorophylle *a* appelée P700 (absorbant de façon maximale la lumière de longueur d'onde 700 nm).

Les pigments qui sont au cœur de chacun de ces photosystèmes sont des molécules de chlorophylle *a* identiques, mais associées à des protéines différentes. La distribution de leurs électrons et leurs spectres d'absorption diffèrent donc légèrement. Les photosystèmes I et II sont connectés par une série de transporteurs d'électrons. Au cours des réactions photochimiques, ce transport peut se faire selon deux trajets : cyclique ou non cyclique (figures 1.3 et 1.4).

Transport cyclique des électrons

Le transport cyclique d'électrons est le trajet le plus simple. Il ne fait intervenir que le photosystème I et n'engendre que de l'ATP ; il ne produit ni NADPH ni oxygène. Cette voie est dite cyclique parce que les électrons excités qui quittent P700 du centre réactionnel finissent par y revenir. L'électron à haut potentiel est transféré par la ferrédoxine au cytochrome *b6f* plutôt qu'au NADP⁺. À mesure que les électrons excités sont transférés de potentiels croissants en potentiels croissants jusqu'au P700 *via* la chaîne de transport, la membrane des thylacoïdes exploite cette perte énergétique pour

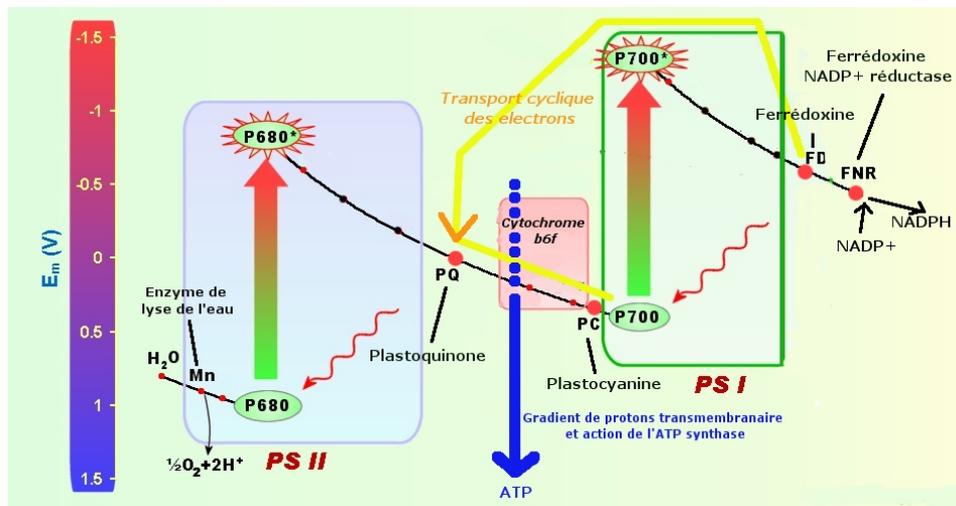


FIG. 1.3 – Schémas en Z de la chaîne non cyclique de transfert d'électron (en noir) et cyclique (en jaune) chez les cellules photosynthétiques. Les différences de potentiels peuvent dépendre des conditions expérimentales. Figure modifiée à partir de www.uqtr.ca/labcarpentier/images/Z-scheme13.jpg.

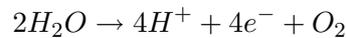
actionner la synthèse de l'ATP. La chaîne de transport d'électrons achemine des protons à travers la membrane des thylacoïdes, ce qui crée un gradient de pH. Une ATP synthase se sert de ce gradient pour produire de l'ATP. On emploie le terme **photophosphorylation cyclique** pour désigner la synthèse d'ATP dans les chloroplastes lors du transport cyclique.

Transport non cyclique d'électrons

Le transport non cyclique d'électrons, au cours duquel les électrons passent continuellement de l'eau au NADPH, fait intervenir les deux photosystèmes. Comme dans le transport cyclique, la lumière excite les électrons du P700, le centre réactionnel du photosystème I. Cependant, les électrons ne retournent pas au centre réactionnel : ils sont mis en réserve dans le NADPH. Le NADPH joue ensuite le rôle de réducteur dans le cycle de Calvin de réduction du dioxyde de carbone en glucide (figure 1.5). La chlorophylle oxydée devient elle-même un agent oxydant très puissant ; les « trous » laissés par ses électrons doivent être comblés. C'est ici que le photosystème II entre en jeu : il remplace les électrons du centre réactionnel du photosystème I. Quand l'antenne du photosystème II absorbe la lumière, la paire spéciale de chlorophylles a P680 du centre réactionnel est excitée. L'accepteur primaire d'électrons du photosystème II piège les électrons éjectés du P680* et les transfère à une chaîne de transport d'électrons. Par une suite de réactions d'oxydoréduction, les électrons sont transférés de potentiels croissants

en potentiels croissants jusqu'au centre P700*. À mesure que les électrons dérivent du photosystème II au photosystème I, la chaîne de transport achemine des protons à travers la membrane des thylacoïdes. L'ATP synthase se sert alors de ce gradient de proton pour actionner la synthèse de l'ATP. La production d'ATP au cours du transport non cyclique d'électrons est appelée **photophosphorylation non cyclique**.

Le transport non cyclique d'électrons a produit du NADPH et de l'ATP et a remplacé les électrons perdus dans le centre réactionnel du photosystème I. P680, la paire spéciale de chlorophylles du centre réactionnel du photosystème II, est dans son état oxydé. Elle est réduite en acceptant un électron provenant de la lyse de l'eau selon la réaction suivante :



Au final, la membrane des thylacoïdes convertit l'énergie lumineuse en énergie chimique emmagasinée dans le NADPH et dans l'ATP. L'oxygène constitue un sous-produit des réactions photochimiques.

Couplage entre les deux types de transport

Le transport cyclique constitue un court-circuit ; quand les électrons éjectés du P700 atteignent la ferrédoxine, ils sont dirigés vers la molécule de chlorophylle au lieu de servir à réduire le NADP⁺. Le transport non cyclique produit des quantités presque égales d'ATP et de NADPH, mais la phase obscure consomme plus d'ATP que de NADPH. La photophosphorylation cyclique comble la différence en produisant de l'ATP uniquement.

1.1.2 La phase obscure

La phase sombre de la photosynthèse est aussi appelée phase de carboxylation ou cycle de Calvin (figure 1.5). Elle a comme pré-requis la phase claire pendant laquelle deux composés énergétiques sont produits : l'ATP et le NADPH.

Le carbone entre dans le cycle de Calvin sous la forme de dioxyde de carbone, et il en sort sous la forme d'un glucide à trois atomes de carbone appelé phosphoglycéraldéhyde (PGAL). Pour synthétiser une mole de ce glucide, le cycle doit fixer trois moles de dioxyde de carbone et donc se dérouler trois fois.

Le cycle de Calvin fixe chaque mole de dioxyde de carbone sur une mole d'un glucide à cinq atomes de carbone appelé ribulose diphosphate (RuDP).

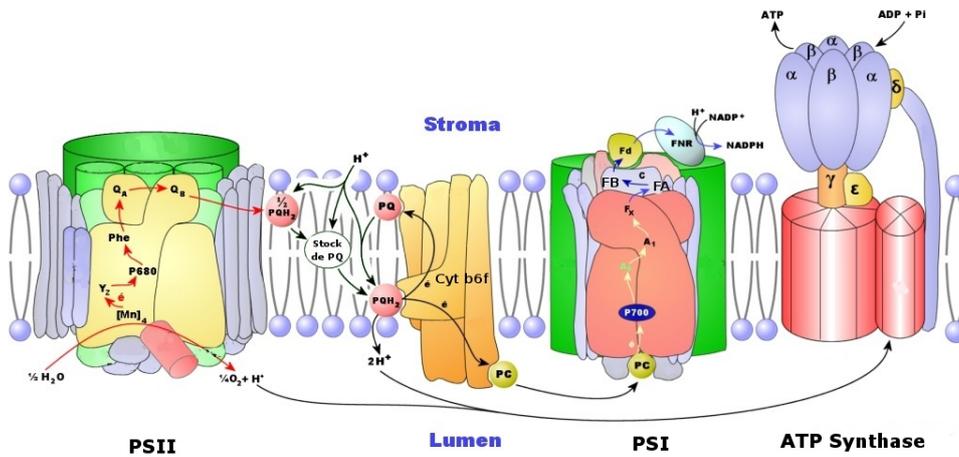


FIG. 1.4 – Représentation schématique d'un flux non cyclique d'électrons et des différentes protéines impliquées dans ce processus. Abréviations : Q_A et Q_B : molécules de plastoquinones fixes, PQH_2 (réduite) et PQ : molécules de plastoquinones mobiles, PC : molécule de plastocyanine, Fd : ferrédoxine, FNR : ferrédoxine NADP^+ réductase, Phe : phéophytine, Cyt b6f : complexe b6/f.

L'enzyme qui catalyse cette première étape est la RuDP carboxylase, la protéine la plus abondante dans les chloroplastes et probablement sur terre. La réaction donne un intermédiaire à six atomes de carbone, si instable qu'il se scinde aussitôt en deux moles de 3-phosphoglycérate. À l'étape suivante, chaque molécule de 3-phosphoglycérate reçoit un groupement phosphate supplémentaire prélevé à l'ATP par une enzyme, ce qui forme du 1,3 diphosphoglycérate. Les électrons du NADPH réduisent ensuite le groupement carboxyle du 1,3 diphosphoglycérate en groupement carbonyle pour former le PGAL.

Le cycle commence avec un capital de glucide valant 15 moles de carbone, c'est-à-dire avec trois moles de ribulose diphosphate à cinq atomes de carbone. Maintenant, on compte 18 moles de carbone sous la forme de six moles de PGAL. Cependant, une seule de ces moles compte pour un gain net en glucide. En effet, une mole sort du cycle pour être utilisée par la cellule végétale, mais les cinq autres doivent régénérer les trois moles de ribulose diphosphate. Au cours d'une série complexe de réactions, les dernières étapes du cycle réarrangent les chaînes de carbone des cinq moles de PGAL en trois moles de ribulose diphosphate. Pour ce faire, le cycle dépense trois autres moles d'ATP. Le ribulose diphosphate est alors de nouveau prêt à recevoir du dioxyde de carbone. Le cycle recommence.

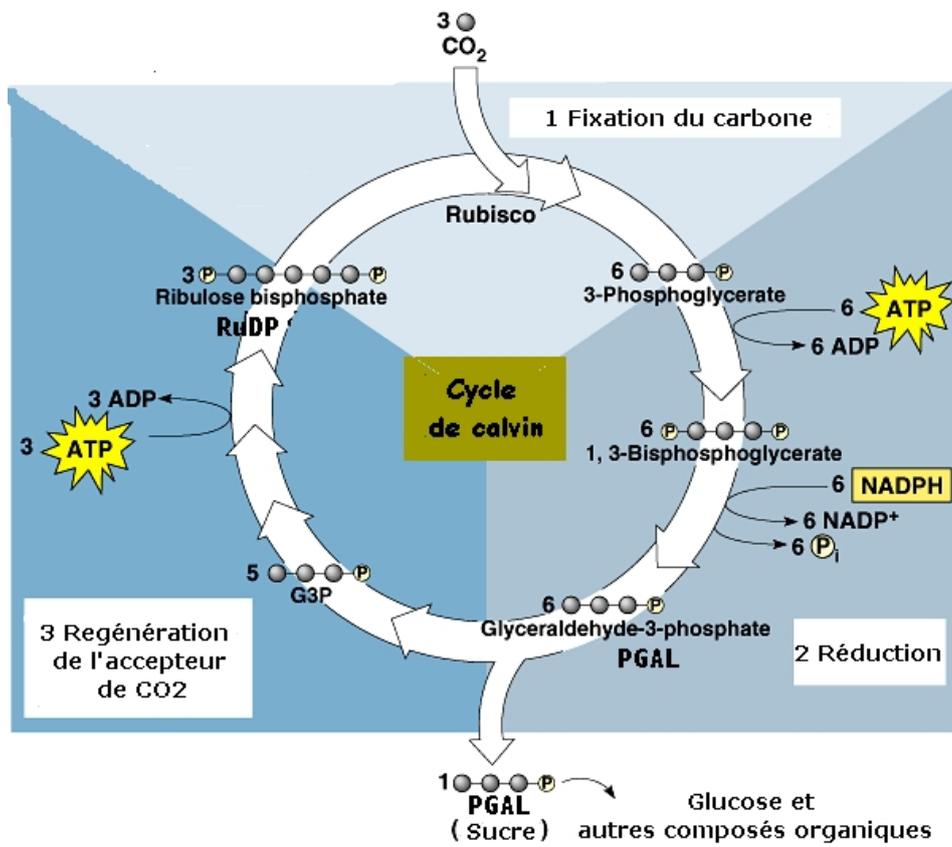


FIG. 1.5 – Représentation du cycle de Calvin. Figure modifiée à partir de www.ualr.edu/botany/calvincycle.gif.

Le PGAL issu du cycle de Calvin est la matière première de voies métaboliques qui synthétisent les autres composés organiques.

1.2 Biosynthèse de la chlorophylle

Les biosynthèses des hèmes et de la chlorophylle sont étudiées depuis de nombreuses années, et les mécanismes sont maintenant bien connus. Dès la fin des années 40, Granick identifie des tétrapyrroles, produits par des mutants de *Chlorella vulgaris* induits aux rayons X, comme des intermédiaires dans la biosynthèse de la chlorophylle. Et il montre que chlorophylle et hème dérivent directement de la protoporphyrine [Granick, 1950]. Les étapes conduisant à la protoporphyrine ont ensuite été déduites par des travaux utilisant des techniques de dégradation et de marquage isotopique [Shemin and Wittenberg, 1951].

Il est possible de discerner deux grandes phases dans la biosynthèse de la chlorophylle. Une première partie est commune avec la synthèse des hèmes et composée de 7 étapes principales jusqu'à la protoporphyrine IX. La seconde partie est spécifique à la chlorophylle : elle commence par la fixation d'un ion magnésium au coeur du cycle, alors que c'est un ion ferreux qui est fixé lors de la synthèse des hèmes, et conduit ensuite à la chlorophylle *a* en 6 nouvelles étapes.

Les porphyrines sont des pigments rouges, fluorescents, de structure cyclique, aromatique et tétrapyrrolique. Les noyaux pyrroles A, B, C, D sont liés entre eux par des ponts méthènes entre deux carbones. Les chaînes latérales des carbones définissent les différentes porphyrines et porphyrinogènes (uro : 4 acétyles et 4 propionyles, copro : 4 méthyles et 4 propionyles, proto : 4 méthyles, 2 vinyles, 2 propionyles). À noter que le suffixe « inogène » indique un état précurseur (ponts méthènes réduits), le suffixe « ine » un état oxydé.

1.2.1 Tronc commun aux biosynthèses des hèmes et de la chlorophylle

Cette partie de la réaction est présentée dans la figure 1.6.

De l'acide δ -aminolévulinique à la porphobilinogène

L'acide δ -aminolévulinique (ALA) est généralement considéré comme étant le précurseur universel des tétrapyrroles. Dans tous les organismes étudiés à l'heure actuelle, le mécanisme de formation de la protoporphyrine

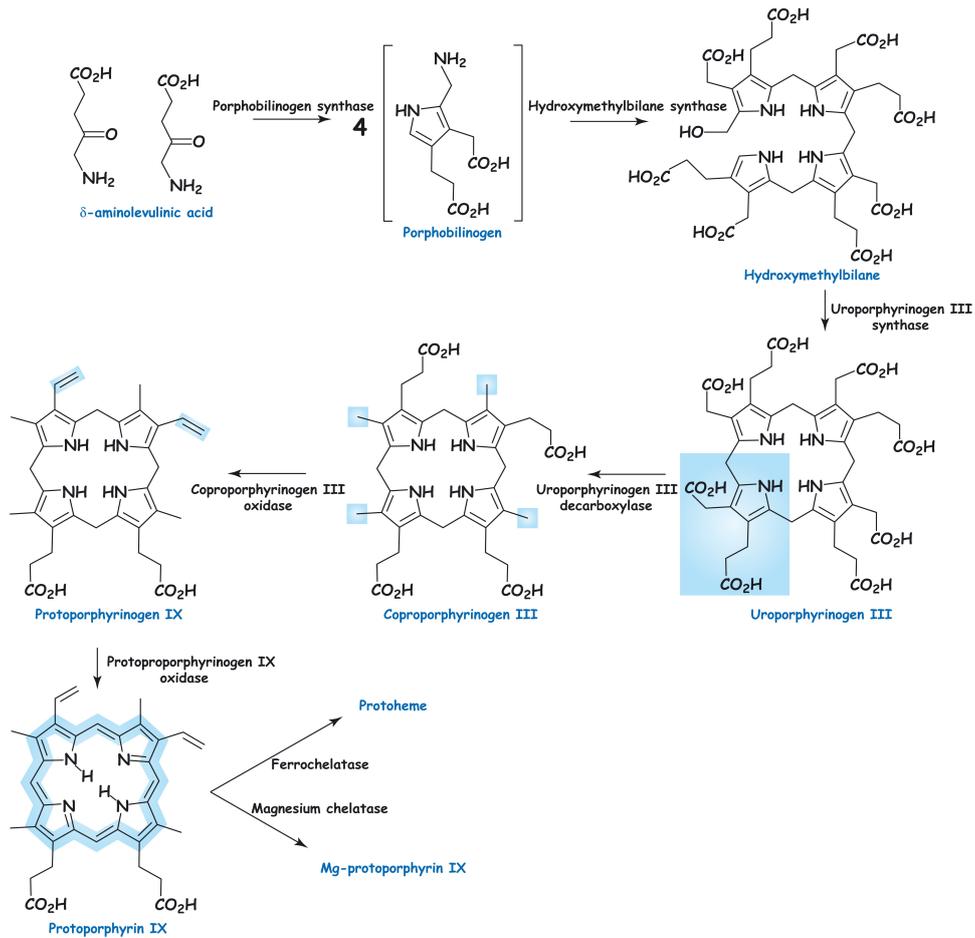


FIG. 1.6 – Étapes communes à la biosynthèse de chlorophylle et à la synthèse des hèmes. Les groupes modifiés à chaque étape sont indiqués en bleu.

IX depuis ALA est identique. La première étape consiste en la condensation asymétrique de deux molécules de ALA pour former de la porphobilinogène et deux molécules d'eau. Cette réaction est catalysée par la porphobilinogène synthase, aussi connue sous le nom de ALA déshydrase [Jordan, 1991]. La résolution de la structure de cette enzyme a permis de montrer qu'elle était active sous forme d'octamère et qu'elle possédait huit sites actifs [Erskine et al., 1997].

De la porphobilinogène à l'hydroxyméthylbilane

L'hydroxyméthylbilane synthase, aussi connue sous le nom de porphobilinogène désaminase, catalyse la condensation de quatre molécules de porphobilinogène. Cette étape donne naissance au premier tétrapyrrole, l'hydroxyméthylbilane, qui est une forme instable pouvant se replier spontanément et former un isomère biologiquement inactif, l'uroporphyrinogène I [Jordan and Seehra, 1979]. L'hydroxyméthylbilane synthase a été purifiée depuis une grande variété d'organismes et semble active sous la forme d'un monomère d'un poids moléculaire compris entre 33 et 44 kDa [Witty et al., 1996].

De l'hydroxyméthylbilane à l'uroporphyrinogène III

La cyclisation de l'hydroxyméthylbilane pour former le premier tétrapyrrole macrocyclique, l'uroporphyrinogène III, est catalysée par l'uroporphyrinogène synthase. Pour éviter la formation de l'isomère inactif uroporphyrinogène I, cette enzyme doit être présente concomitamment avec la formation de l'hydroxyméthylbilane.

De l'uroporphyrinogène III à la coproporphyrinogène III

L'uroporphyrinogène III décarboxylase catalyse la décarboxylation séquentielle des quatre groupements acide acétique de l'uroporphyrinogène pour donner les groupements méthyles de la coproporphyrinogène. Pour des concentrations physiologiques de substrat, elle commence par le groupement acide acétique du cycle D et procède ensuite dans un sens horaire jusqu'au cycle C.

Du coproporphyrinogène III à la protoporphyrinogène IX

La coproporphyrinogène III oxydase catalyse la décarboxylation oxydative des chaînes latérales des acides propioniques des cycles A et B pour

former les groupements vinyles de la protoporphyrinogène IX. La décarboxylation du cycle A précède celle du cycle B, générant l'accumulation d'un intermédiaire avec un seul cycle vinyl [Games et al., 1976].

De la protoporphyrinogène IX à la protoporphyrine IX

La protoporphyrinogène IX oxydase catalyse la formation de la protoporphyrine IX à partir de protoporphyrinogène IX en soustrayant 6 électrons et permettant la chélation de différents ions métalliques au centre de la molécule. Cette enzyme utilise l'oxygène comme accepteur d'électron de la réaction et contient un cofacteur de flavine non lié [Ferreira and Dailey, 1988].

L'embranchement entre les mécanismes réactionnels de formation de la chlorophylle et des hèmes

La formation de la protoporphyrine IX est l'étape où les chemins divergent entre la synthèse des hèmes et celle de la chlorophylle. L'insertion d'un ion ferreux Fe^{2+} par la ferrochélatase conduit à la formation d'un protohème, lequel est un précurseur dans la synthèse des hèmes *a*, *b*, *c* et *d*, etc. *A contrario*, l'insertion d'un ion magnésium Mg^{2+} conduit à la formation de la chlorophylle ou de la bactériochlorophylle. Les ferrochélatases, en plus de Fe^{2+} , peuvent aussi insérer d'autres ions métalliques comme Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} et Mn^{2+} dans la protoporphyrine IX [Dailey, 1997].

Bien que ce soit seulement à cette étape que les deux mécanismes divergent formellement, il est fort probable que chez les plantes, les deux mécanismes se déroulent entièrement dans des localisations différentes. Les chloroplastes requièrent à la fois des tétrapyrroles avec un atome de fer et de la chlorophylle, alors que ailleurs dans la cellule (notamment dans les mitochondries) seuls les hèmes sont utilisés. La synthèse de la chlorophylle peut être menée entièrement depuis ALA dans des chloroplastes isolés.

1.2.2 Chemin spécifique à la biosynthèse de la chlorophylle

Cette partie de la réaction est présentée dans la figure 1.7.

De la protoporphyrine IX à la protoporphyrine IX magnésium

La fixation d'un ion magnésium dans la protoporphyrine IX est la première étape propre lors de la synthèse de la chlorophylle, et l'enzyme qui catalyse cette réaction, la Mg-protoporphyrine chélatase a déjà été largement étudiée. L'insertion d'un ion Mg^{2+} dans le cycle de la porphyrine est

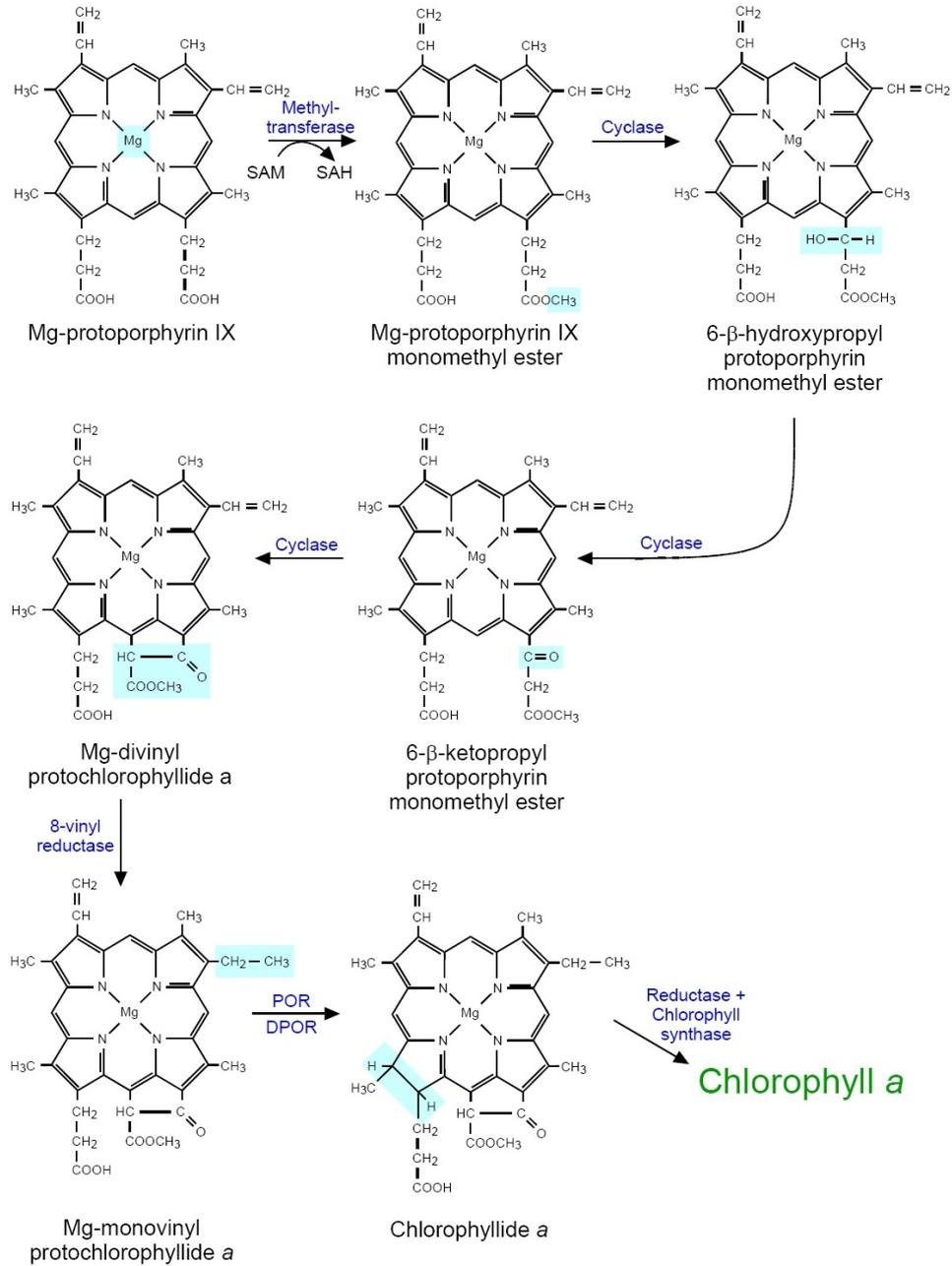


FIG. 1.7 – Le mécanisme spécifique de biosynthèse de la chlorophylle, depuis la Mg-protoporphyrine IX jusqu'à la chlorophylle *a*. Les groupes modifiés à chaque étape sont indiqués en bleu.

chimiquement très difficile, principalement à cause de la difficulté à retirer les molécules d'eau coordonnant Mg^{2+} . Dans tous les cas, l'ATP est essentiel pour l'activité. Chez les plantes, un mécanisme en deux étapes, dans lequel l'insertion du magnésium suit l'activation initiale des composés par l'ATP, est proposé [Walker and Weinstein, 1994].

De la protoporphyrine IX magnésium à la protoporphyrine IX magnésium monométhyle ester

L'enzyme Mg protoporphyrine IX méthyltransférase catalyse l'estérification de l'acide carboxylique situé sur la chaîne latérale du propionate du cycle C avec le groupe méthyle de la S-adenosyl-L-méthionine, formant la Mg protoporphyrine IX monoéthyle ester.

Formation du cycle isocyclique

Granick a suggéré en 1950 que la formation du cycle isocyclique (cycle E) pouvait procéder de manière similaire à celle de la β -oxydation des acides gras, *via* la formation des intermédiaires acrylates, β -hydroxy et β -ceto. Dans les organismes aérobies, la synthèse de la chlorophylle se déroule différemment, et elle ne nécessite pas la formation d'un intermédiaire acrylate. Toutes les chlorophylles fonctionnelles ont un groupement ceto- en position 13¹, issu de la fixation d'un atome d'oxygène dans la chaîne latérale de l'acide 13-méthyle propionique pendant la formation du cycle isocyclique. Cet oxygène provient de l'oxygène atmosphérique, expliquant la dépendance en O_2 de l'activité de la cyclase observée chez les plantes et les algues vertes. Chez les cyanobactéries, les deux chemins coexistent.

Réduction du groupe 8-vinyl

La 8-vinyl réductase catalyse la réduction de la divinyle protochlorophyllide en monovinyle. Beaucoup de précurseurs différents de la chlorophylle ont été détectés dans les cellules après cette étape, ce qui laisse supposer que plusieurs 8-vinyl réductases différentes pourraient coexister, et expliquer la réduction en différents intermédiaires divinyle. Comme lors de l'exposition à la lumière la protochlorophyllide oxydoréductase préfère la pchlde divinyle à la monovinyle, certains ont proposés que cette étape soit placée après la réduction de la pchlde, même si dans le noir un ordre inverse semble respecté. Ces propositions sont encore sujet à controverses [Parham and Rebeiz, 1992].

Réduction de la protochlorophyllide en chlorophyllide

La réduction de la double liaison C17-C18 du cycle D conduit à la formation de la chlorophyllide. Cette réaction peut être catalysée par deux enzymes complètement différentes, l'une requérant la lumière et l'autre non. L'enzyme lumière dépendante est la NADPH-protochlorophyllide oxydoréductase (EC 1.3.1.33, POR). Elle est présente dans tous les organismes contenant de la chlorophylle, alors que l'enzyme lumière indépendante, la protochlorophyllide réductase (DPOR) est présente dans tous les organismes exceptés les angiospermes (plantes à fleurs, et donc les végétaux qui portent des fruits). Les bactéries photosynthétiques contenant de la bactériochlorophylle possèdent uniquement de la DPOR. Le travail de cette thèse porte principalement sur la POR, et le chapitre suivant revient plus en détail sur la réaction de réduction catalysée par cette enzyme.

Estérification de la chlorophyllide en chlorophylle

La chlorophylle est une molécule lipophile, à cause de l'incorporation d'une longue chaîne alcoolique. Celle-ci est fixée sur la chaîne propionate latérale du cycle D dans le macrocycle de la porphyrine et constitue environ 30% du poids moléculaire final. Cette étape est généralement la dernière dans la synthèse de la chlorophylle, même si des modifications ultérieures peuvent avoir lieu sur les groupements du macrocycle, comme pour synthétiser la chlorophylle *b*. Le phytol est le plus commun de ces esters et est largement majoritaire dans le cas de la chlorophylle *a* [Scheer, 1991]. La réaction d'estérification est catalysée par la chlorophylle synthase. Elle peut avoir comme substrat aussi bien les chlorophylles *a* ou *b* et peut fixer soit du geranygeranyl-PP soit du phytyl-PP. Elle est localisée dans la membrane des thylacoïdes.

1.3 Réduction de la protochlorophyllide

La réduction de la protochlorophyllide (Pchlde) peut être catalysée par deux enzymes complètement distinctes, l'une requérant la lumière (« photoactivée ») et l'autre non.

1.3.1 Mécanisme lumière dépendant

Quand les angiospermes poussent dans le noir, de grandes quantités de Pchlde sont accumulées et c'est uniquement lors de l'exposition à la lumière que celle-ci est convertie en Chlide (au cours de la « de-étiolation »).

Cette réaction est catalysée par la NADPH-pchlode oxydoréductase ou POR, une des deux seules enzymes connues à ce jour avec l'ADN photolyase à requérir la lumière pour catalyser sa réaction [Begley, 1994]. La réduction lumière dépendante de la Pchlode a d'abord été observée dans les étio-plastes d'orge, où il fut montré qu'elle nécessitait le NADPH comme co-facteur [Lebedev and Timko, 1998]. Dans le noir, un complexe ternaire de NADPH-Pchlode-POR se forme. Lors de l'exposition à la lumière, il a été proposé qu'un rapide transfert d'un hydrure du NADPH à la Pchlode, suivi d'un transfert de proton à partir d'une tyrosine conservée forme un nouveau complexe NADP^+ -Chlode-POR, à partir duquel le produit et l'enzyme sont relargués. Pendant la réaction, la Pchlode a la fonction de photorécepteur. Cette réaction peut être suivie spectroscopiquement grâce aux propriétés distinctes de la Pchlode, des intermédiaires formés et de la Chlode.

Organisation moléculaire et localisation de la POR

Dans les organismes étioles (grandis dans le noir), les plastes ne se spécialisent pas en chloroplastes mais en étio-plastes, qui pourront devenir des chloroplastes après exposition à la lumière. Les étio-plastes contiennent un corps prolamellaire et quelques thylacoïdes. Le corps prolamellaire est un réseau très fortement organisé de membranes tubulaires, alors que les thylacoïdes sont des membranes planes qui se développent depuis les corps prolamellaires, même si il n'y a pas de frontière distincte entre eux (figure 1.8). La POR est principalement localisée sous forme de complexe ternaire dans les corps prolamellaires, même si une certaine activité a été mesurée dans les thylacoïdes [Lütz et al., 1981]. À l'heure actuelle, quatre formes spectroscopiquement distinctes de Pchlode ont été observées, avec des maximums de fluorescence respectifs à 633¹, 645, 657 et 670 nm [Schoefs and Franck, 2003]. Ces différences sont expliquées par les interactions entre le pigment et la POR, les réarrangements structuraux et les différents états d'agrégations possibles. Des études par fluorescence ont montré que c'est la forme F657 de la Pchlode qui caractérise les complexes ternaires photoactifs des corps prolamellaires. *In vivo*, il a aussi été montré une corrélation entre la formation des corps prolamellaires et l'apparition de la Pchlode F657, suggérant ainsi que leur formation était due à l'agrégation des complexes photoactivables de la POR et expliquant la structure en réseau tri-dimensionnel des corps prolamellaires [Lebedev et al., 1995, Boddi et al., 1990]. L'illumination de l'étio-plaste provoque la formation de la Chlode (accompagnée d'un décalage dans les spectres d'absorption et de fluorescence, connu comme le « Shibata shift » [Shibata, 1957]) et la dispersion du corps prolamellaire.

¹Ces longueurs d'ondes correspondent à celles mesurées *in vivo* dans les feuilles, et peuvent donc différer de celles obtenues dans la suite des travaux, *in vitro* et sur de la POR bactérienne

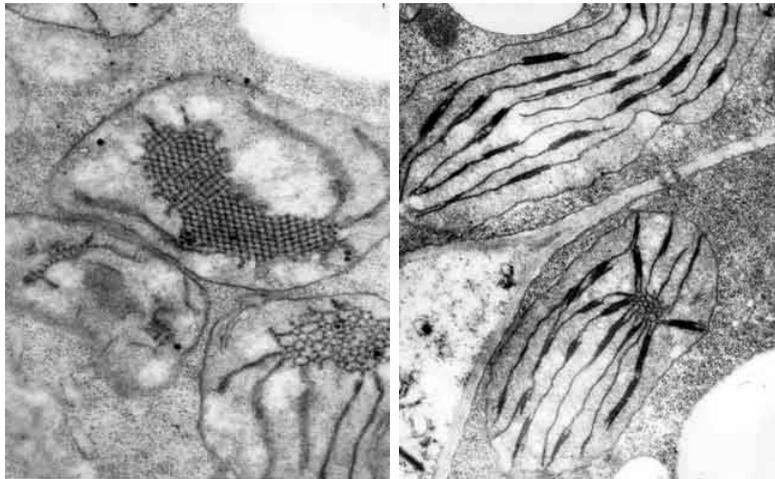


FIG. 1.8 – Plastes vus par microscopie électronique à transmission. À gauche un étioplaste et le corps prolamellaire à structure paracristalline. À droite, après exposition pendant 12 h à la lumière, le corps prolamellaire commence à disparaître et de nombreux thylacoïdes commencent à se réunir pour former des *grana*. Figure tirée de www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/.

Chez les étioplastes des plantes et des algues vertes, la POR et la Pchl_{ide} sont présentes à la fois dans la membrane des thylacoïdes et les corps prolamellaires. Le produit de la réduction, la Chl_{ide}, est cependant principalement localisé dans la membrane des thylacoïdes des chloroplastes [Siffel et al., 1987].

Existence de deux isoenzymes de POR

Chez les plantes supérieures et les algues, la POR est encodée dans le génome nucléaire. Le premier gène de POR à avoir été cloné est celui de la POR d'orge. Depuis, plusieurs gènes de POR ont été clonés à partir de différentes espèces taxonomiques : monocotylédons (par exemple avoine *Avena sativa* [Darrah et al., 1990]), dicotylédons (par exemple *Crocus sativus* [Kuroda et al., 2000]) et cyanobactéries (*Synechocystis* sp. PCC 6803 [Heyes et al., 2000], *Phormidium laminosum* [Rowe and Griffiths, 1995], *Plectonema boryanum*) [Fujita et al., 1998]. Le poids moléculaire de l'enzyme est généralement compris entre 35 et 38 kDa. Dans les organismes eucaryotes, la POR est synthétisée sous la forme d'une protéine précurseur, qui contient un peptide de transit en N-terminal pour l'import dans le plaste.

Les premières études ont montré que la quantité de POR dans les plantes étiolées est sensible à l'illumination. Dans les étioplastes, l'enzyme et le

substrat s'accumulent à des niveaux importants. Mais après quelques minutes d'exposition à la lumière, environ 90 % de l'activité de l'enzyme disparaît et la quantité de POR détectable a diminué de plus de 60% [Mapleston and Griffiths, 1980]. De plus l'ARN messenger (ARNm) qui code pour la POR disparaît lui aussi après la synthèse de la chlorophylle. Les effets inhibiteurs de la lumière sur la POR et son ARNm ont été observés dans différentes espèces de plantes à dicotylédons (chez le pois, la tomate, la moutarde, le haricot...) ou à monocotylédons (chez l'orge et le maïs).

Des effets différents ont pourtant été aussi observés chez d'autres espèces. Par exemple, chez le pois et *Arabidopsis thaliana*, la baisse du niveau de POR est observée indépendamment de celle de son ARNm, suggérant que l'expression du gène n'est pas l'unique processus gouvernant la quantité d'enzyme dans le plaste. Des résultats obtenus sur des pousses de concombre ont montrés un haut niveau d'ARNm après illumination. Chez la cyanobactérie *Phormidium maminosum*, aucun effet régulateur de la lumière n'a par contre été observé.

Certains de ces effets contrastés de la lumière sur l'expression du gène de la POR ont pu être expliqués par la découverte [Forreiter and Apel, 1993] de deux gènes distincts chez le pin (et depuis chez l'orge et *Arabidopsis thaliana*) appelés *porA* et *porB*. Leurs séquences présentent une identité importante, de l'ordre de 75 % et les deux enzymes sont actives. Chez les étiooplastes, PORA s'accumule dans le noir et disparaît lors de l'exposition à la lumière, alors que PORB reste à un niveau constant. De manière identique, l'ARNm de PORA est dégradé quand celui de PORB reste stable. Chez l'orge, une protéase contrôlée par la lumière dégrade spécifiquement PORA et pas PORB. La distribution des différentes POR est résumée dans le tableau 1.1.

En plus de leur sensibilité différente à la lumière, les deux isoenzymes présentent des différences dans leur mécanisme d'import dans le plaste. L'import du précurseur de la PORA est dépendant de la présence de Pchl_{ide}, et ne pourra donc être réalisé que dans des tissus grandis dans le noir. Celui de la PORB est, lui, indépendant de la présence de Pchl_{ide} [Reinbothe et al., 1995]. Les deux enzymes auraient ainsi deux rôles physiologiques différents, PORA étant nécessaire pour que les plantes verdissent, et PORB étant essentiel pour maintenir la biosynthèse de la chlorophylle chez les organismes déjà matures [Runge et al., 1996]. Certains organismes qui peuvent synthétiser la chlorophylle dans le noir (comme *Synechosystis* ou *Chlamydomonas reinhardtii*) ne possèdent qu'un seul gène de la POR. Chez *A. thaliana*, un troisième gène codant une PORC a même été identifié [Oosawa et al., 2000]. Celle-ci n'est présente qu'après illumination des étiooplastes et est surtout détectée dans les tissus matures.

Le rôle des PORA et PORB, et leur organisation moléculaire dans les étiooplastes sont encore discutés. L'hypothèse la plus récente concerne la for-

mation d'un complexe collecteur appelé LHPP impliquant PORA et PORB dans un rapport de 5 pour 1 [Reinbothe et al., 1999], ainsi que leurs substrats respectifs Pchl id e b et a (elles diffèrent par le groupement fixé sur le cycle B du macrocycle, méthyle pour la Pchl id e a , et formyle pour la Pchl id e b) et le NADPH. Ce complexe collecteur permet de synthétiser rapidement la chlorophylle a , le complexe NADPH-PORA-Pchl id e b assurant un office de régulateur : il transfère l'énergie lumineuse collectée nécessaire à la photoréduction, de la Pchl id e b à la Pchl id e a , ou la dissipe en fluorescence. La réduction de la Pchl id e b n'intervient qu'après dissociation de ce complexe et la transformation du corps prolamellaire en thylacoïdes. Le LHPP assure donc à la fois la de-étiolation et la photoprotection. Ces résultats ont été obtenus *in vitro* par reconstitution du complexe (en utilisant des analogues au zinc de la Pchl id e), uniquement avec la POR de l'orge. Même si ils ont été contestés [Scheumann et al., 1999, Armstrong et al., 2000], des expériences ultérieures comparant la taille des complexe *in vitro* et *in vivo*, ainsi que leurs propriétés spectrales [Reinbothe et al., 2003a] semblent les confirmer. La difficulté à détecter la Pchl id e b *in vivo* proviendrait de son instabilité métabolique, la 7-formyle réductase la convertissant en Pchl id e a , régulant le niveau de LHPP à l'équilibre [Reinbothe et al., 2003c].

Les derniers développements indiquent qu'il existe en fait une grande variété dans l'organisation des familles des gènes de la POR et dans les mécanismes lumière dépendants contrôlant la synthèse de la chlorophylle chez les angiospermes [Masuda et al., 2002]. Par exemple il existe deux gènes codant la POR du tabac, mais aucun des deux n'est régulé négativement par la lumière et les deux persistent dans les tissus matures. Dans le concombre, il existe un seul gène, régulé positivement par la lumière, tandis que chez le pois il existe aussi un seul gène, dont l'expression est plutôt indépendante de la lumière.

La POR et la famille des alcools déshydrogénases à chaîne courte

La comparaison des structures primaires et secondaires de la POR avec celles des autres protéines ayant le NADPH comme cofacteur (figure 1.9) a montré qu'elle appartenait à la famille des alcools déshydrogénases à chaîne courte, appelée SDR pour « Short-chain Dehydrogenase Reductases » [Labesse et al., 1994, Wilks and Timko, 1995], au sein de la super-famille des RED (Réductases, Epimérase, Déshydrogénases). Les enzymes de cette famille sont généralement des oxydoréductases ayant un unique site de liaison avec le NADPH et sont actives sous formes de tétramères ou de dimères (revue complète par Jönrvall [Jönrvall et al., 1995]). Elles partagent de nombreuses propriétés structurales et mécanistiques, comme un pentapeptide Tyr-X-X-X-Lys hautement conservé qui forme une partie du domaine du

		DPOR	POR	PORA et B et C
Euc.	Angiospermes	Non	Oui	Oui A, B et C (<i>A. thaliana</i>) Oui A et B (orge) Non (pois et concombre)
	Gymnospermes	Oui	Oui	Oui A et B (pin) Non
	Algues	Oui	Oui	Non (<i>C. reinhardtii</i>)
Pro.	Cyanobactéries	Oui	Oui	Non (<i>Synechocystis</i>)
	Bactéries b-Chl	Oui	Non	Non

TAB. 1.1 – Tableau récapitulatif de la distribution de la POR dans le vivant. DPOR : présence de POR active dans le noir, POR présence de POR photo-dépendante et dans le cas positif, existence ou non des différentes isoenzymes PORA, PORB et PORC. Euc. pour eucaryotes, Pro. pour procaryotes, bactéries b-chl pour bactéries photosynthétiques contenant de la bactériochlorophylle.

site catalytique et un domaine de fixation du cofacteur proche du N-terminal de la protéine. Celui-ci contient aussi un motif Gly-X-X-X-Gly-X-Gly très bien conservé et une mutation du premier résidu Gly a montré qu'il était crucial pour la fixation du NADPH.

Structure de la POR

La structure primaire de la POR a d'abord été déduite d'après l'ADN complémentaire (ADNc) du gène de la POR de l'orge. La séquence d'acide aminés compte 388 résidus, en incluant le peptide de transit, et le poids moléculaire est de 41.2 kDa [Schulz et al., 1989]. La comparaison des peptides de transit des différents organismes dans lesquels le gène de la POR est connu ne montre pas une grande similarité entre eux. Par contre, la comparaison de la partie des séquences correspondant à la protéine montre, elle, une grande similarité.

L'étude des séquences des POR des végétaux supérieurs permet de formuler plusieurs remarques. Elles sont caractérisées par une grande proportion d'acides aminés basiques et d'acides aminés hydrophobes. De plus, les séquences de POR des plantes contiennent quatre résidus cystéines conservés (aux positions 37, 89, 199 et 226 dans la séquence de la POR du pois²)

²Pour des raisons historiques, la littérature se réfère souvent à la séquence de la POR du pois pour indexer les acides aminés. Cependant, pour des raisons de cohérence du manuscrit, nous prendrons par la suite comme référence la séquence de la POR de *Synechocystis*.

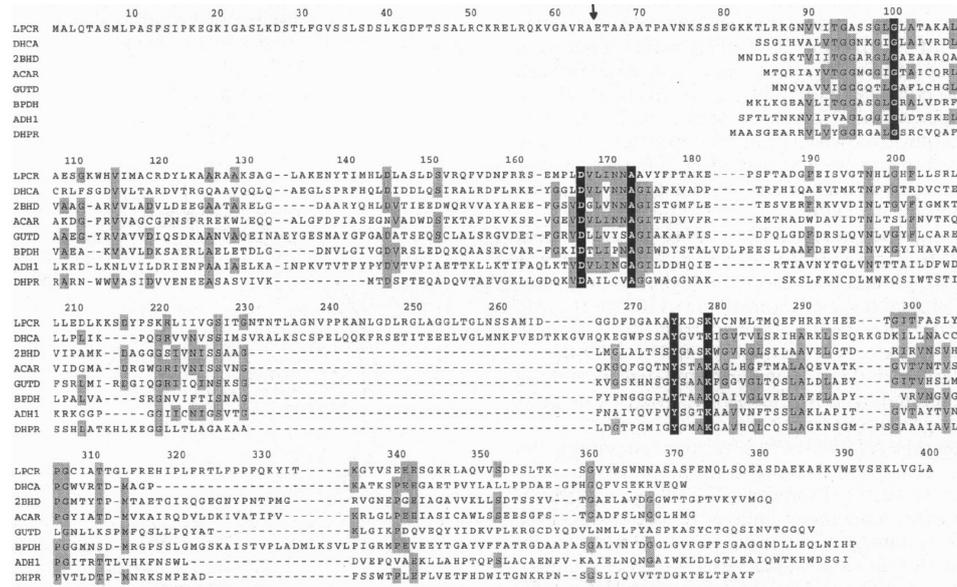


FIG. 1.9 – Alignements de séquences de protéines appartenant à la famille des SDR. LPOR : protochlorophyllide oxydoréductase du pois, DHCA : carbonyle réductase humaine, 2BHD : $3\alpha,20\beta$ -hydroxystéroïde oxydoréductase de levure, ACAR : acétoacétyle-coA réductase de *Alcaligenes eutrophus*, GUTD : glucitol-6-phosphate déshydrogénase de *Escherichia coli*, BPDH : biphényle-*cis*-diol déshydrogénase de *Pseudomonas pseudocaligenes*, ADH1 : alcool déshydrogénase de *Drosophila melanogaster*, DHPR : dihydropteridine réductase de rat. Figure extraite de [Wilks and Timko, 1995].

à l'exception de la séquence issue du pois dans laquelle la cystéine 89 est remplacée par une asparagine. Au moins une des cystéines, particulièrement la cystéine 226, pourrait être impliquée dans la fixation de la Pchl_{ide} [Oliver and Griffiths, 1981]. Les séquences issues des algues vertes et des cyanobactéries contiennent des cystéines supplémentaires mais non conservées.

La structure secondaire de la POR a été étudiée à partir de spectres de dichroïsme circulaire UV sur de la protéine pure et monomérique. La structure de la POR contient 33% d'hélices α , 19% de feuillets β , 20% de boucles et 28% de structures desordonnées. À partir de ces données, il a été proposé que la POR soit fixée dans la membrane par un segment amphiphile contenant les résidus tryptophane localisés près du C-terminal ou par une longue boucle hydrophobe située dans la même région [Birve et al., 1996]. La figure 1.10 présente un alignement des séquences primaires de POR de différents organismes, avec la structure secondaire de la POR de *Synechocystis*.

La structure tertiaire a été étudiée à partir des homologies entre la POR et les enzymes de la famille des SDR dont la structure est connue. À partir de la structure de la 7 α -hydroxystéroïde hydrogénase de *E. coli*, un modèle structural en trois dimensions de la POR a été proposé (figure 1.11)[Townley et al., 2001]. La structure présente un repliement de Rossmann typique, consistant en un centre de feuillets β (de βA à βF) entouré de 12 hélices α (de $\alpha 1$ à $\alpha 12$) et créant ainsi une poche pour la fixation du cofacteur. Les extensions de certaines des hélices centrales forment un espace pour fixer le substrat. Le motif catalytique hautement conservé Tyr-X-X-X-Lys est situé sur l'hélice $\alpha 8$ qui forme un des cotés du site actif, et où la tyrosine et la lysine peuvent interagir avec la Pchl_{ide}. Les alignements de séquence montrent une insertion de 33 résidus chez la POR, juste avant le motif Tyr-X-X-X-Lys. La séquence prédit une hélice α pour les trois derniers quarts de sa longueur et elle a été modélisée entre $\alpha 8$ et βD , formant une extension en face de l'espace de fixation du substrat. Une insertion d'un tel type est relativement classique dans la famille SDR, et il est en général admis qu'elle est utile aux interactions intermoléculaires. Dans le cas particulier de la POR eucaryote, elle semble indispensable pour l'assemblage du complexe collecteur de lumière LHPP [Reinbothe et al., 2003b]. Des études récentes, utilisant des mutations sur chacun des cycles de la Pchl_{ide} et étudiant l'activité de la POR pour chacun de ces mutants, ont permis de préciser la position du substrat par rapport à l'enzyme. Le tétrapyrrole se fixe de telle manière que les cycles C, D et E sont orientés vers l'intérieur de la poche de fixation, alors que les cycles A et B sont eux orientés vers l'extérieur de l'enzyme [Rüdiger et al., 2005].

Le modèle de la POR possède au final un noyau hydrophobe sans résidus chargés, alors que les composés hydrophiles et chargés sont situés à la surface de la protéine.

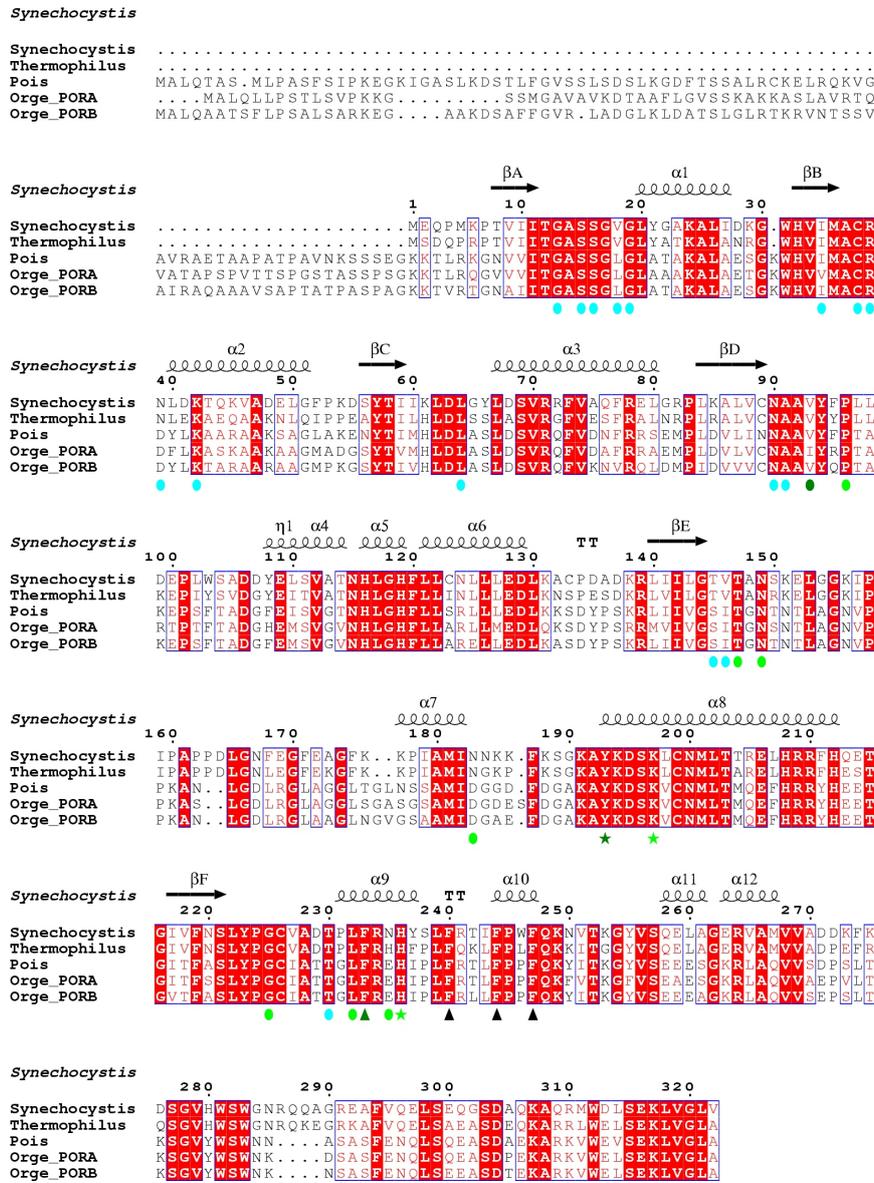


FIG. 1.10 – Alignement de séquences de POR de différents organismes avec visualisation de la prédiction des éléments de structure secondaire et de l'interaction avec le substrat Pchl_{ide} ou le cofacteur NADPH. Blanc sur fond rouge : résidus strictement conservés ; rouge sur fond blanc : résidus conservés par similarité ; cyan : résidus interagissant avec le NADPH ; vert clair : résidus interagissant avec la Pchl_{ide} ; vert foncé : résidus interagissant avec le NADPH et la Pchl_{ide}. Les étoiles indiquent les résidus impliqués dans le mécanisme de réduction (Tyr193 et Lys197) et dans la fixation de la Pchl_{ide} (His236). Les triangles représentent les sites de protéolyse identifiés par spectrométrie de masse et séquençage N-ter (voir dans le chapitre 2).

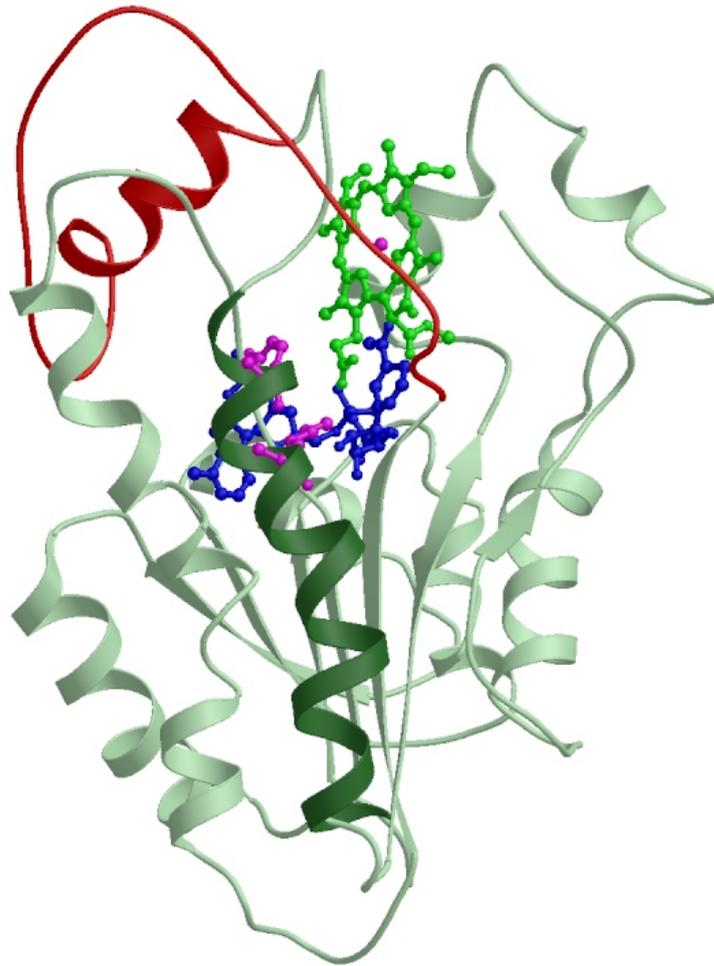


FIG. 1.11 – Représentation du modèle de la structure tertiaire de la POR obtenu par homologie avec les enzymes de la SDR. La Pchlde est verte avec l'ion Mg rose, le NADPH est en bleu, la tyrosine 193 et la lysine 197 sont en rose, l'hélice $\alpha 8$ est en vert foncé et l'insertion de 33 résidus est en rouge. Figure réalisée à partir des coordonnées communiquées par Townley [Townley et al., 2001].

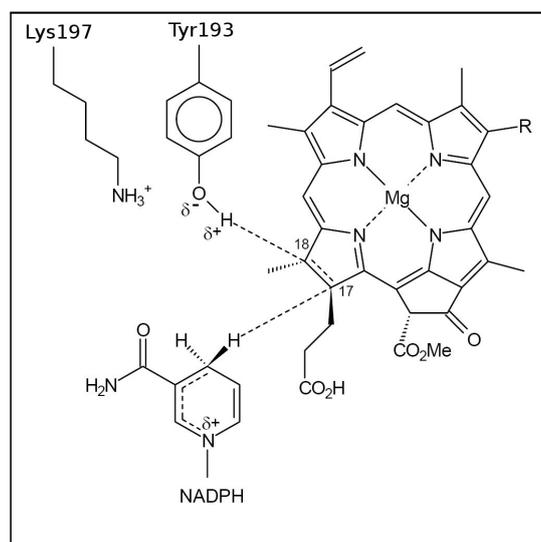


FIG. 1.12 – Modèle proposé pour le mécanisme catalytique de la POR, où la double liaison C17-C18 serait réduite par un proton fournit à C18 par la Tyr193 et un hydrure fournit à C17 par la face *pro-S* du NADPH.

Mécanisme de la réaction catalytique

La POR catalyse la réduction *trans* de la Pchl_{id}e en Chl_{id}e. Griffiths a montré en premier [Griffiths, 1974] en utilisant du NADPH marqué que de l'hydrogène était transféré du NADPH à la Pchl_{id}e pendant la réduction (figure 1.12). Des expériences de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont ensuite montré qu'un hydrure venant de la face *pro-S* du NADPH était transféré à la position C17 du pigment. L'origine de l'autre hydrogène est plus discutée. Il pourrait provenir du solvant ou d'un acide aminé situé à proximité du C18. La tyrosine 193 constitue le candidat le plus vraisemblable pour remplir cette fonction.

Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis l'identification de certaines des parties fonctionnelles importantes de la protéine. Elles ont montré que des mutations dans les feuillets βA - $\alpha 2$ - βB (contenant les sites de fixation supposés du NADPH), les hélices $\alpha 7$ ou $\alpha 8$ (constituant la poche de fixation de la Pchl_{id}e) ou encore l'hélice $\alpha 10$ empêchent la formation de la Chl_{id}e (revue dans [Schoefs and Franck, 2003]). Au contraire, des mutations entre l'hélice $\alpha 9$ et le feuillet $\alpha 12$ n'ont pas, ou très peu, d'effets sur l'activité de la POR. Deux acides aminés hautement conservés (Tyr193 et Lys197) sont essentiels à l'activité de la POR [Townley et al., 2001]. La tyrosine 193 est impliquée dans la fixation du NADPH. De même, le remplacement de la lysine 197 par une arginine, à l'occupation stérique plus importante, semble

suffisant pour exclure le NADPH de son site de fixation et donc pour inactiver la catalyse enzymatique (la figure 1.10 situe les résidus impliqués dans le mécanisme).

Les premières études sur le sujet avaient proposé que la POR possède deux sites de fixation pour son substrat. En fait, des résultats récents ont montré que le site catalytique de la POR pouvait fixer uniquement une molécule de Pchl_a. Cette différence est expliquée par la présence d'un second site de fixation, qui serait un site d'inhibition [Klement et al., 1999].

Le mécanisme moléculaire de la photoréduction de la Pchl_a n'est pas connu en détail, et plusieurs hypothèses coexistent [Heyes and Hunter, 2005]. Des études à basse température *in vitro* sur de la POR de cyanobactéries suggèrent qu'il comporterait au moins deux étapes.

Le premier état intermédiaire est stable en dessous de 180K [Heyes et al., 2003b]. Des mesures de Résonance Paramagnétique Électronique (RPE) et de spectroscopie UV-visible suggèrent que ce premier état intermédiaire, non fluorescent, correspond à une espèce radicalaire [Griffiths et al., 1996]. Mais un autre modèle dans lequel le premier intermédiaire non fluorescent représente un complexe de transfert de charge qui précède la formation de l'espèce paramagnétique est aussi soutenu [Raskin and Schwartz, 2002]. Cette problématique sera discutée plus précisément dans le chapitre 3.

Après la formation du premier intermédiaire, qui requiert la présence de NADPH et correspond au transfert au moins partiel de l'hydrure, il y a transfert d'un proton. Cette étape est indépendante de la lumière et a lieu spontanément au dessus de 180K. Le donneur pourrait alors être la tyrosine 193, la lysine 197 favorisant la déprotonation du groupe phénolique en diminuant le pKa. Pour appuyer cette hypothèse, il est intéressant de remarquer que la mutation de la tyrosine 193 n'empêche pas la formation de l'espèce paramagnétique mais bloque par contre sa transformation en Chl_a [Lebedev et al., 2001].

Parallèlement, des études à température ambiante ont été réalisées en utilisant un laser bleu femtoseconde pour déclencher la réaction. Ces études ont été menées sur de la POR purifiée et en solution. Elles ont montré que la catalyse était effectuée en moins de 400 ps. Ces études ont aussi permis de proposer l'existence simultanée de deux chemins réactionnels : un premier chemin qualifié de séquentiel, avec une première étape de fixation du proton réalisée en moins de 3 ps et une seconde étape de formation du produit de l'ordre de 400 ps (soit l'ordre inverse de celui communément proposé) ; un second chemin, qualifié de concerté, dans lequel le proton et l'hydrure seraient transférés en une seule étape de 3 ps [Heyes et al., 2003a]. La durée de vie inférieure à la nanoseconde des intermédiaires semble difficilement

conciliable avec les hypothèses proposées pour le mécanisme réactionnel à basse température. Ces résultats sont aussi en contradiction avec ceux mesurés sur de la POR dans les membranes d'étioplaste [Iwai et al., 1984], qui donnent une demie-vie du premier intermédiaire non fluorescent de l'ordre de 6-9 μ s. Ces considérations seront développées dans le chapitre 3, ainsi que l'influence d'un laser bleu sur le déroulement de la réaction.

L'évaluation du rendement quantique (nombre de molécules de Chlide produites divisée par le nombre de photons absorbés) de la photoréduction pour des complexes ternaires natifs montre que celui-ci est compris entre 0.4 et 0.6. Pour les complexes reconstitués à partir de protéine recombinante, le rendement est plus faible. Toutefois ce rendement prend en compte la réaction dans sa globalité et non pas uniquement l'étape photosensible. L'existence d'étapes réversibles pourrait donc conduire à sous estimer le rendement quantique.

1.3.2 Mécanisme lumière indépendant

La plupart des gymnospermes (espèces faisant partie d'un sous-branchement des plantes à graines, et qui inclut les plantes dont l'ovule est à nu et porté par une feuille fertile, typiquement les conifères) et toutes les mousses, algues vertes et cyanobactéries contiennent une Pchlde réductase lumière indépendante (DPOR) et peuvent donc produire de la Chlide même dans le noir. La même protéine est présente chez les organismes utilisant de la bactériochlorophylle. L'absence de DPOR chez les angiospermes explique leur blanchiment à l'abri de la lumière. Peu d'informations sur cette enzyme sont disponibles à l'heure actuelle, même si la récente surexpression de DPOR de *Rhodobacter capsulatus* a permis un début de caractérisation prometteur [Nomata et al., 2005]. Des alignements de séquences ont montrés que la DPOR appartenait à la famille des nitrogénases à fer et qu'elle présente très peu de similitudes avec la POR.

1.3.3 Choix évolutifs

Une étude de la distribution des POR et DPOR dans le royaume végétal montre que la POR est apparue il y a 2-3 milliards d'années, en même temps que la photosynthèse aérobie et que l'utilisation de la chlorophylle comme pigment, alors que l'existence de la DPOR est largement antérieure. Elle peut donc apparaître comme une réponse à de nouveaux problèmes :

Une insensibilité à l'oxygène : alors que la DPOR, comme les autres enzymes de la famille des nitrogénases, est inhibée en présence d'oxygène, la POR y est insensible. Chez les cyanobactéries possédant les deux enzymes,

la POR est la seule à synthétiser la chlorophylle sous de hautes intensités lumineuses. La régulation de la DPOR pourrait être alors indirectement liée à la lumière, *via* l'augmentation de la pression partielle en oxygène quand l'intensité lumineuse, et donc la photosynthèse, augmente.

La formation d'un complexe photoprotecteur : les pigments sont fortement sensibles à la photooxydation, et une des fonctions avérées des caroténoïdes est justement la photoprotection de la chlorophylle, dans des structures compactes et rigides comme les photosystèmes I et II. De même, la réduction du complexe ternaire POR- Pchl_a-NADPH pour former de la Chl_a sous exposition à la lumière entre en compétition avec la photooxydation. L'équilibre dans les membranes entre les pigments non liés et liés est déplacé en faveur de ces derniers, expliquant leur protection [Franck and Strzalka, 1992]. Les tétrapyrroles libres sont en effet sujets à la photooxydation et peuvent causer des dommages oxydatifs. Les états triplets de la (P)Chl_a réagissent facilement avec ceux de l'oxygène, produisant ainsi de l'oxygène singulet. Ce phénomène constitue le principe même des herbicides photodynamiques et l'on comprend donc aisément qu'il ne soit pas dans l'intérêt des plantes ! Les précurseurs de la Pchl_a sont alors les principaux pigments sensibles à la photooxydation. Nous reviendrons dans le chapitre 3 sur les dégâts causés par la photooxydation à basse température, et sur leur interprétation en terme de couplage entre l'activité de l'enzyme et sa flexibilité.

1.4 La cristallographie cinétique

Notre étude de la protochlorophyllide oxydoréductase s'inscrit dans la thématique de « cristallographie cinétique » développée au sein de l'équipe de Dominique Bourgeois. Les propriétés spectroscopiques et la photo-dépendance de la réaction enzymatique catalysée par la POR sont deux éléments clefs permettant d'envisager à terme des expériences de cristallographie cinétique sur cette enzyme. Nous présenterons d'abord les caractéristiques des études de cristallographie cinétique, puis les différentes méthodes disponibles pour les réaliser.

1.4.1 Présentation de la technique

Ce sont les mouvements des macromolécules au sein de leur paysage énergétique qui génèrent l'activité biologique. Ceux-ci peuvent être étudiés par RMN, diffusion de neutrons, dynamique moléculaire, spectroscopie UV-visible ou infrarouge et par des techniques utilisant les rayons X ou γ . La cristallographie aux rayons X fournit des informations sur la dynamique des

protéines *via* l'analyse des déplacements quadratiques des atomes ou bien quand une série de structures statiques prises le long du chemin réactionnel sont mises bout à bout pour donner un film de la réaction.

La « cristallographie cinétique des protéines » permet d'aller plus loin, en visualisant à haute résolution les changements conformationnels liés à la fonction des macromolécules. Il est ainsi possible de décrire avec une grande finesse les mécanismes réactionnels utilisés par les molécules du vivant, ce qui est d'une importance capitale dans le domaine des biotechnologies et de la santé, par exemple lorsqu'il s'agit de mettre au point de manière rationnelle un nouveau médicament.

De nombreuses protéines sont actives dans la phase cristalline. Il est donc en principe possible d'obtenir la structure à haute résolution d'états intermédiaires caractérisant un mécanisme réactionnel, et cela en faisant se dérouler la réaction dans le cristal. La majorité des quelques 10^{15} molécules le constituant doivent être amenées de concert dans l'état intermédiaire étudié. Des méthodes de déclenchement de la réaction dans le cristal doivent donc être mises au point, ainsi que des méthodes permettant de contrôler et d'agir sur l'avancement de cette réaction.

Dans un petit nombre de cas, concernant des protéines modèles naturellement photosensibles et formant des cristaux bien ordonnés et résistants aux dommages par radiation X, il est possible de « filmer » les changements conformationnels avec une résolution temporelle de l'ordre de la centaine de picosecondes, en utilisant des techniques de collecte de données de diffraction ultra-rapides (diffraction de Laue). Cette technique a permis d'obtenir des résultats remarquables sur des protéines comme la myoglobine [Bourgeois et al., 2003] ou PYP (photoactive yellow protein, protéine jaune photoactivable) [Ihee et al., 2005].

La figure 1.13 présente les résultats obtenus sur le mutant YQR de la myoglobine par diffraction de Laue. Ceux-ci montrent à l'échelle atomique les mouvements mis en jeu lors de la photolyse du monoxyde de carbone (CO). En moins de 3 ns, ce ligand est photolysé et migre vers le site de stockage Xe4, en même temps que l'hème subit un mouvement de « tilt ». Après 316 ns, le CO photolysé a migré vers le site de stockage Xe1, et les mouvements des structures secondaires comme l'hélice E et la boucle CD ont atteint leur maximum d'amplitude.

Malheureusement, ce type d'approche permettant de capturer en temps réel les intermédiaires ne fonctionne pas pour la majorité des protéines. Il est alors préférable de procéder par « piégeage », en agissant sur des paramètres physico-chimiques comme le pH, la viscosité du solvant ou encore la température. C'est principalement ce dernier paramètre qui est utilisé dans les protocoles de cristallographie cinétique (voir par exemple

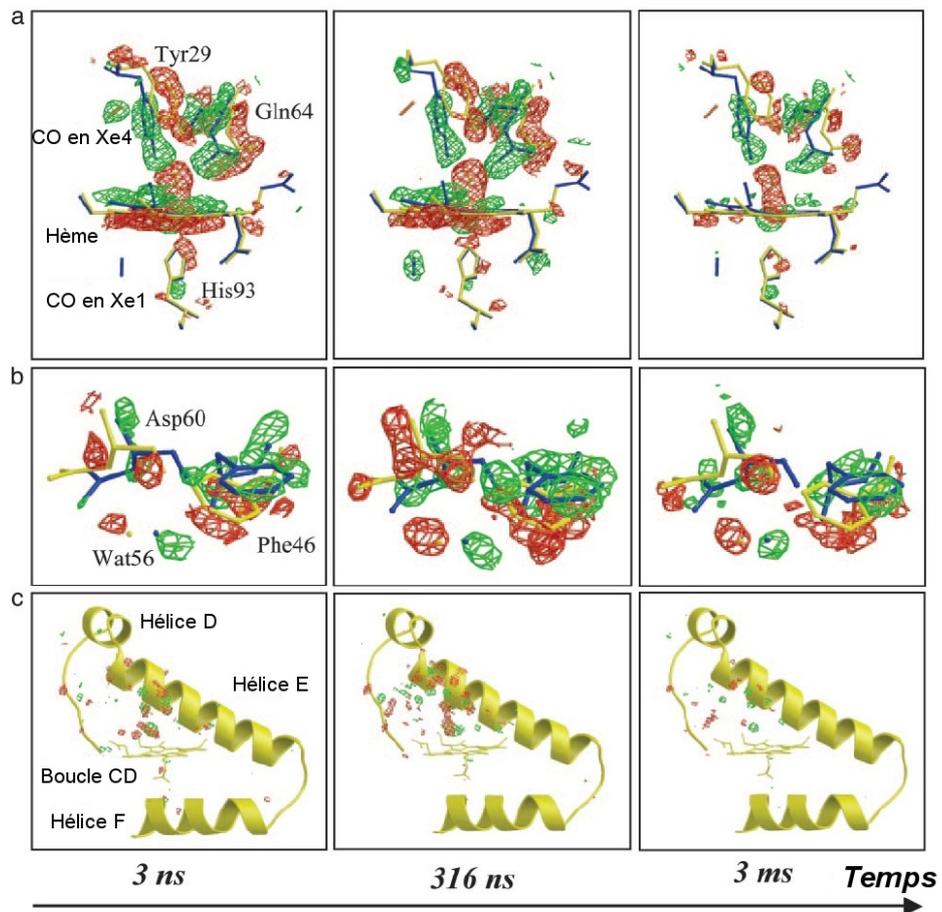


FIG. 1.13 – Cartes de densités électroniques différences vues en fonction du temps de déroulement de la réaction, superposées au modèle de la myoglobine. Les densités différences négatives sont en rouge, les positives sont en vert (figure extraite de [Bourgeois et al., 2003]).

[Schlichting et al., 2000, Bourgeois and Royant, 2005]). Les données cristallographiques correspondant à la conformation piégée sont alors collectées en utilisant les techniques classiques de diffraction monochromatique.

La figure 1.14 présente les différentes méthodes disponibles à l'heure actuelle pour réaliser des études de cristallographie cinétique.

1.4.2 Techniques de piégeage d'intermédiaires réactionnels

Les expériences basées sur le piégeage d'états intermédiaires sont plus communes que celles utilisant la diffraction de Laue, car moins exigeantes sur la qualité des cristaux et réalisables sur les lignes de lumière monochromatiques classiquement exploitées pour la cristallographie des protéines. Les cristaux peuvent être préparés à l'avance, sur un microspectrophotomètre (chapitre 1.6.1). Les résultats issus de telles techniques de piégeage à basse température doivent toutefois toujours être interprétés avec le plus grand soin : le paysage énergétique d'une molécule est susceptible de dépendre de la température, et des résultats artefactuels peuvent être obtenus aux températures cryogéniques. Le chapitre 3 traitera d'un exemple concret dans le cas du mécanisme catalytique de la POR.

Il est possible de différencier deux techniques permettant le piégeage d'états intermédiaires par le froid. Dans la première (« trigger-freeze »), la réaction se déroule à température ambiante, l'état intermédiaire est formé et ensuite seulement le cristal est refroidi. Dans la seconde (« freeze-trigger »), le cristal est d'abord refroidi, puis la réaction est déclenchée et l'intermédiaire se forme. La première méthode minimise les artefacts expérimentaux induits par les basses températures, mais nécessite par contre une réaction suffisamment lente (de l'ordre de 1 min^{-1} pour les résultats déjà publiés) à température ambiante (voire par exemple [Fedorov et al., 2003]). Un simple trempage des cristaux, par exemple dans une solution contenant le substrat, est en général utilisé pour initier la réaction.

Cependant, même si l'état cristallin ralentit souvent les réactions enzymatiques, des vitesses nettement supérieures à la min^{-1} sont courantes. De plus, même pour une réaction lente, la durée de vie des intermédiaires recherchés peut être de l'ordre de la nanoseconde. Dans de tels cas, même si un déclenchement synchrone a pu être réalisé, le temps de refroidissement quasi-instantané (« flash cooling »), de l'ordre de 0.1 s, peut devenir le facteur limitant lors du piégeage d'un état intermédiaire. Il est alors possible d'utiliser la seconde méthode de « freeze-trigger », consistant à refroidir l'échantillon avant de déclencher la réaction. Le déclenchement est alors réalisé à une température telle que la réaction ne puisse pas se dérouler. La formation des intermédiaires est rendue possible par l'application d'un profil

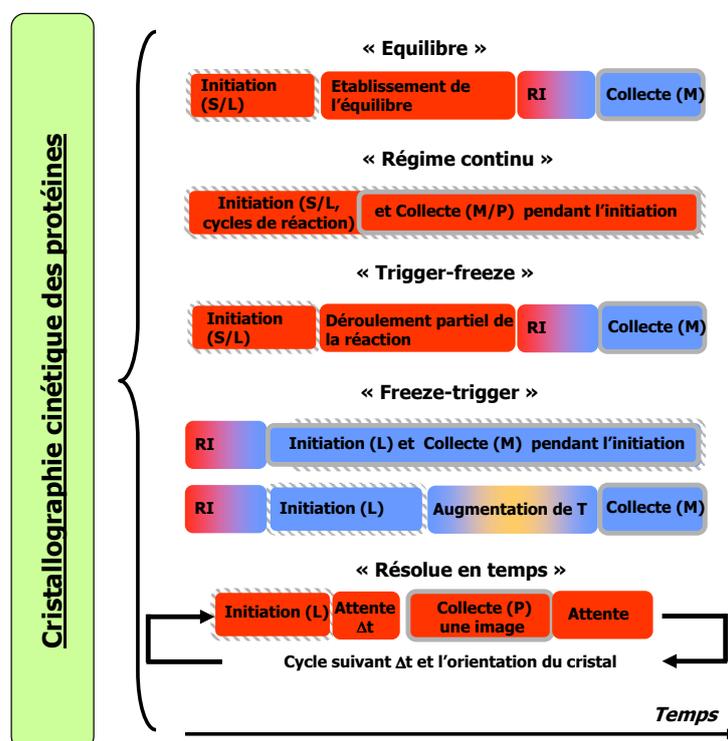


FIG. 1.14 – Schéma récapitulatif des différentes techniques de cristallographie cinétique. Abréviations : RI pour Refroidissement Instantané, S et L pour une initiation de la réaction par diffusion de Substrat ou par la Lumière dans le cas d'un système photosensible, M et P pour une diffraction exploitant une lumière Monochromatique ou Polychromatique (de Laue).

de température. Celui-ci permet d'augmenter transitoirement l'énergie thermique du système et de surmonter une barrière d'activation conduisant à un changement conformationnel caractéristique de la réaction enzymatique étudiée (figure 1.15). Le déclenchement de la réaction, puis le contrôle de son avancement sont les deux points clefs de la méthode.

À des températures de l'ordre de 100-150 K, il n'est pas possible de déclencher une réaction dans un cristal de protéine par diffusion d'un substrat ou cofacteur car le solvant, en phase vitreuse, est complètement figé. En revanche, la lumière peut être utilisée. C'est pourquoi les techniques de « freeze-trigger » sont exploitées principalement pour des systèmes ayant une photosensibilité endogène. Il est aussi possible d'avoir recours aux composés cagés. Ces composés sont des précurseurs photosensibles et biologiquement inertes de molécules qui, après irradiation par rayonnement UV, sont libérées sous leur forme active. Certains composés cagés peuvent être préalablement diffusés dans le cristal à température ambiante, puis, une fois à basse température, photolysés pour libérer le composé actif [Ursby et al., 2002]. Des résultats ont aussi été obtenus récemment en utilisant les photoélectrons issus de la radiolyse de l'eau par les rayons X comme agents réducteurs de la réaction [Adam et al., 2004, Berglund et al., 2002].

Le choix du profil de température adéquat pour accumuler un intermédiaire réactionnel dans le cristal est difficile. L'idée est de choisir une température, typiquement dans la gamme 150-250 K, supérieure à la température de transition vitreuse du solvant. Cette gamme de température est extrêmement intéressante, car le solvant se trouverait alors dans un état ultravisqueux, assimilable à un gel. Dans cet état permettant la diffusion des substrats à travers les canaux de solvant, une transition dynamique de la protéine, autorisée par une augmentation de sa flexibilité, est aussi attendue.

1.4.3 Expérience de « freeze-trigger »

La figure 1.15 représente une expérience « idéale » de cristallographie cinétique par piégeage de type « freeze-trigger ». Elle peut être décrite comme suit :

1. Refroidissement quasi instantané (« flash cooling ») du cristal à 100 K, qui fige toute réaction
2. Déclenchement (pas nécessairement synchrone) de la réaction dans toutes les molécules du cristal
3. Augmentation progressive de la température, et donc de l'énergie disponible pour la réaction
4. Franchissement d'un état de transition et formation d'un état intermédiaire réactionnel

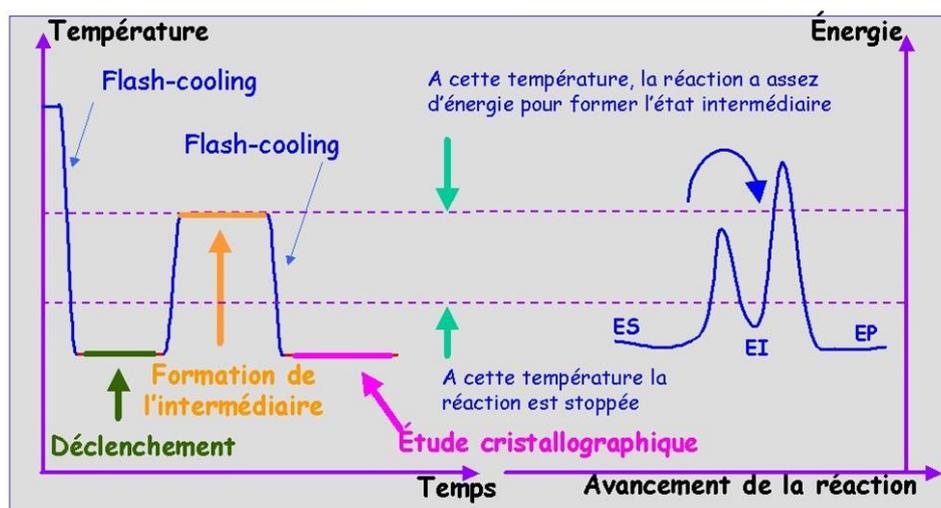


FIG. 1.15 – Schéma idéalisé représentant le déroulement d'une étude de cristallographie cinétique par piégeage d'états intermédiaires.

5. Re-descente à 100 K (pour stabiliser l'intermédiaire et protéger le cristal lors de l'exposition aux rayons X), et acquisition de la structure de l'état intermédiaire ainsi formé
6. Cette procédure peut être renouvelée pour tous les états intermédiaires que l'on réussit à isoler dans le cristal

Cette description de la méthode néglige des problèmes expérimentaux et fondamentaux pourtant bien réels, comme l'hétérogénéité conformationnelle dans les cristaux, et souligne les deux points clefs dans le déroulement d'une expérience : le déclenchement de la réaction dans toutes les molécules du cristal (initiation) et le suivi de la réaction en fonction de la température, en vue de caractériser la formation des états intermédiaires.

1.5 Activité à basse température

Les études par piégeage « freeze trigger » étant réalisées à basse température, la première étape consiste à valider la fonction du système biologique dans de telles conditions. On considère que tous les atomes du système sont globalement figés (seuls de très petits mouvements harmoniques sont permis) et que les protéines sont inactives à 100 K. Lors des protocoles de cristallographie cinétique, la température peut être augmentée jusqu'à atteindre une valeur à partir de laquelle les protéines deviennent partiellement ou pleinement actives.

À des températures proches de 200 K, les mouvements des atomes deviennent anharmoniques, permettant un plus grand choix de conformations dans le paysage énergétique de la protéine : on appelle cet événement **la transition dynamique**. La capacité d'une protéine à être fonctionnelle à des températures cryogéniques est aussi fortement liée à la liberté de mouvement permise par le solvant. Que ce soit sous forme cristalline, où les molécules sont irriguées par les canaux de solvant, ou en solution, l'étude des transitions de phase dans le solvant est donc cruciale. Au total, l'activité d'un système biologique à basse température dépend de plusieurs paramètres : du paysage énergétique, et en particulier des différentes conformations adoptées le long du chemin réactionnel, de l'existence éventuelle d'une transition dynamique, des fluctuations du solvant et surtout du couplage entre les trois. C'est leur étude qui sera au cœur de ce travail de thèse.

1.5.1 Le paysage énergétique des protéines

Les protéines sont des systèmes dynamiques et non pas statiques. Même une protéine monomérique simple comme la myoglobine peut réaliser un grand nombre de mouvements, et tous ne sont pas couplés à une fonction. Les molécules biologiques possèdent un grand nombre de conformations différentes, qui peuvent être décrites par les coordonnées des atomes et dont les énergies sont souvent très proches [Frauenfelder et al., 1991]. Dans des conditions expérimentales données, parmi toutes les molécules composant le système, plusieurs conformations peuvent exister simultanément. La plupart des techniques d'investigation décrivent le comportement moyen de molécules individuelles.

Le paysage énergétique est défini par l'énergie potentielle de la protéine en fonction de ses coordonnées ($3N$ pour N atomes). Les différentes conformations, appelées sous-états conformationnels, sont séparées par des barrières énergétiques. Le paysage énergétique est important parce qu'il décrit les différentes structures mais aussi parce qu'il gouverne la dynamique du système [Frauenfelder and Leeson, 1998]. Le paysage énergétique d'une protéine fonctionnelle est extrêmement complexe, comme l'ont montré des simulations numériques. Garcia a par exemple étudié la crambine, petite protéine de seulement 46 acides aminés [Garcia et al., 1997], dont le paysage énergétique est représenté en figure 1.16.

1.5.2 La transition dynamique des protéines

La transition dynamique a été définie comme la limite entre un régime harmonique et un régime anharmonique (qui offre à la protéine une bien plus grande flexibilité) dans les mouvements permis à la protéine. L'étude

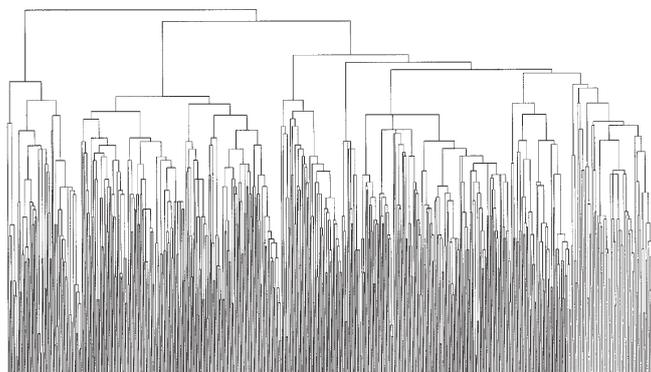


FIG. 1.16 – Arbre hiérarchique représentant le paysage énergétique de la crambine. La distance entre les différents états conformationnels possibles est proportionnelle à celle entre les noeuds sur l'axe horizontal (figure extraite de [Frauenfelder and Leeson, 1998]).

du couplage entre celle-ci et l'activité fonctionnelle de la protéine est très importante pour mieux caractériser et comprendre les études, en solution ou sur les cristaux, sur l'activité des protéines à basse température.

La transition dynamique

La notion de flexibilité est liée au domaine temporel et elle peut s'exprimer sur des échelles de temps bien différentes : de la femtoseconde (réarrangements électroniques), *via* la picoseconde (fluctuations thermiques), et jusqu'à la milliseconde (changements conformationnels impliqués dans la cinétique fonctionnelle) [Zaccai, 2000]. L'amplitude des mouvements associés est comprise entre la fraction d'angstroem et le nanomètre. La notion de dynamique est mieux définie, s'appliquant à un bilan des forces exercées sur le système. Celles qui s'exercent sur les structures biologiques et régissent leurs interactions sont bien connues : les liaisons hydrogènes, les interactions de Van der Waals et électrostatiques ainsi que les pseudo-forces résultant des interactions hydrophobes. Ce sont des interactions faibles, dans le sens où l'ordre de grandeur de leur énergie associée (quelques kcal/mol) est semblable à celui de l'énergie thermique disponible à température ambiante (600 cal/mol à 300 K). Ce sont ces liaisons faibles qui maintiennent les structures tertiaires et quaternaires des protéines. C'est pourquoi à température ambiante les échantillons biologiques sont mous, et non pas rigides comme quand les liaisons sont réalisées par des liaisons covalentes.

À des températures physiologiques, la flexibilité d'une protéine provient de ses fluctuations entre les différents états du paysage énergétique représen-

tants des minima d'énergie potentielle. À très basse température, ces fluctuations ne sont pas possibles, les mouvements thermiques des protéines se limitant à des vibrations harmoniques autour des positions d'équilibre. Au fur et à mesure que la température augmente, les atomes retrouvent l'énergie nécessaire pour visiter plusieurs positions d'équilibres différentes. Les mouvements thermiques deviennent anharmoniques car les atomes n'oscillent plus autour de leur position d'équilibre mais peuvent « sauter » entre différents minima énergétiques. Cette transition dynamique entre les régimes harmonique et anharmonique est observée autour de 200 K [Zaccai, 2000] chez la plupart des protéines. Plusieurs techniques sont disponibles pour réaliser une telle mesure : la spectroscopie Mössbauer, la diffusion de neutron et la spectroscopie de fluorescence (employée au laboratoire). Ces comportements ont aussi été simulés numériquement avec succès [Loncharich and Brooks, 1990]. Cette description de la transition dynamique est essentiellement phénoménologique. Il est probablement plus exact de se représenter non pas une mais plusieurs transitions, qui seraient associées à chacun des domaines temporels impliqués dans les mouvements de la protéine. Ces considérations seront développées plus précisément par la suite.

Exemple de mesure de la transition dynamique

La diffusion des neutrons est la technique privilégiée pour étudier quantitativement la flexibilité conformationnelle. L'énergie d'un neutron d'une longueur d'onde de 1 Å (1 kcal/mol) est en effet du même ordre de grandeur que celle des mouvements d'origine thermique des atomes. Ces mouvements étant fortement corrélés avec la possibilité pour une protéine de subir des changements conformationnels fonctionnels, ils peuvent être considérés comme le lubrifiant qui rend possible des déplacements ayant lieu sur une échelle de temps beaucoup plus longue.

La diffusion des neutrons peut être utilisée pour observer différents phénomènes physiques : la diffusion élastique, inélastique et quasiélastique. La diffusion élastique est la plus facile à utiliser, offrant un meilleur rapport signal sur bruit. Il est possible d'atteindre une résolution temporelle allant jusqu'à 0.1 ns (en concordance avec les temps caractéristiques des mouvements d'origine thermique). Les déplacements quadratiques moyens sont alors dominés par les mouvements des atomes d'hydrogène, dont la section efficace de diffusion incohérente est d'un ordre ou deux de grandeur supérieure à celle des autres atomes. Aux échelles de temps étudiées, ceux-ci sont représentatifs des mouvements de l'échantillon car ils bougent avec les groupes chimiques plus importants.

Des études ont été réalisées sur la myoglobine, protéine modèle dans bien des situations, en comparant l'évolution des déplacements quadratiques

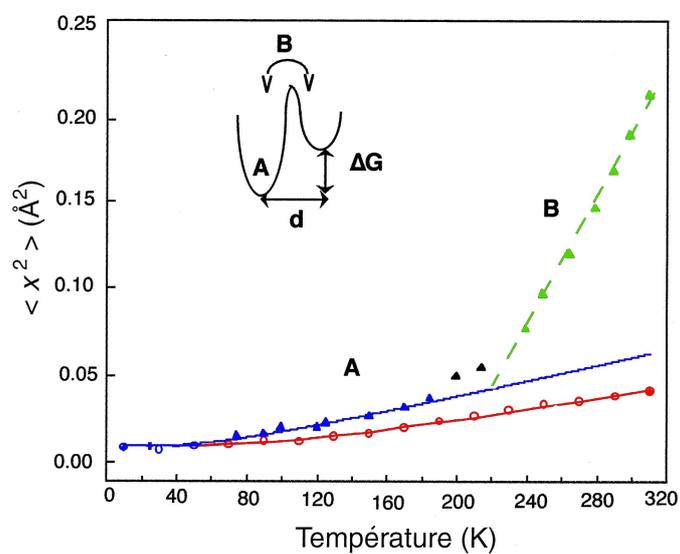


FIG. 1.17 – Déplacement quadratique moyen pour de la myoglobine en poudre hydratée dans de l'eau lourde (en bleu et vert) et dans le tréhalose (en rouge), vu par diffusion de neutron en fonction de la température. Les deux parties du graphique correspondent aux mouvements harmoniques et anharmoniques autour de la transition dynamique. Figure extraite de [Zaccai, 2000].

moyens en fonction de la température dans deux cas distincts. Dans le premier cas, la myoglobine est sous forme de poudre hydratée dans D_2O en présence d'un sucre, le tréhalose. La protéine est alors extrêmement stable et ne possède aucune liberté conformationnelle [Cordone et al., 1999]. Le tréhalose piège la protéine dans un état conformationnel, même à haute température. Dans le second cas, la myoglobine est sous forme de poudre hydratée dans D_2O en absence de tréhalose. La région A de la figure 1.17 correspond à la zone de température où les atomes conservent un mouvement harmonique, le déplacement quadratique moyen est proportionnel à la température. La transition dynamique est représentée par une rupture dans la pente de la courbe, et la région B correspond au régime anharmonique, fonction linéaire de la température [Doster et al., 1989]. Dans le cas de la myoglobine dans le tréhalose, il n'y a pas de transition, le déplacement quadratique moyen restant linéairement dépendant de la température sur toute la gamme. Ce résultat corrobore le fait que dans ce cas la myoglobine reste piégée dans un état conformationnel autour duquel seuls des mouvements harmoniques sont possibles, alors que dans des conditions normales, elle acquiert une liberté conformationnelle plus grande lors de la transition dynamique, lui permettant d'accéder à de nouveaux états conformationnels.

Plus généralement, l'étude des graphiques représentant les déplacements quadratiques moyens mesurés par diffusion des neutrons en fonction de la température révèle une rupture de linéarité, appelée transition dynamique à une température, fonction des protéines, située dans une gamme comprise entre 180 et 210 K.

Couplage entre l'activité fonctionnelle et la transition dynamique

La flexibilité d'une protéine, donc sa capacité à subir des changements conformationnels fonctionnels, est fortement corrélée avec la transition dynamique, en devenant significative seulement au delà. Ainsi, chez de nombreuses protéines, il a été suggéré que en deçà de la transition dynamique l'activité de la protéine soit totalement inhibée [Rasmussen et al., 1992, Ferrand et al., 1993, Lehnert et al., 1998].

La reconnaissance moléculaire dépend fortement de la flexibilité : en général les sites de liaisons des protéines ne sont pas parfaitement complémentaires pour chaque ligand, et des ajustements plus ou moins importants sont nécessaires pour permettre l'interaction entre la protéine et le ligand. En ce sens, la flexibilité de la protéine est cruciale pour son activité. Cette condition n'est toutefois pas toujours vérifiée. Des enzymes (comme la glutamate déshydrogénase) conservent une activité résiduelle en dessous de la transition dynamique [More et al., 1995, Daniel et al., 1998].

Débat actuel sur la transition dynamique

La notion de transition dynamique est actuellement discutée, et parfois remise en cause dans des publications récentes [Becker et al., 2004]. En diffusion de neutrons, le phénomène mesuré est en effet le déplacement quadratique moyen, mais cette valeur est fonction du rapport entre l'échelle de temps des mouvements observés et celle accessible à la résolution de l'instrument. En décrivant le système par un modèle de « frequency window », dans lequel il n'y aurait aucun changement brutal dans la dynamique global de la protéine, mais où la fréquence des mouvements protéiques évolue progressivement avec la température et entre soudainement en correspondance avec la fenêtre de détection, de simples comportement exponentiels pourraient alors se manifester expérimentalement par une transition dynamique. Ces résultats relativisent donc la pertinence des mesures de transition réalisées avec un instrument à la résolution énergétique trop étroite.

1.5.3 Les transitions de phase dans le solvant

Les études effectuées à très basse température (100 K), sur les cristaux ou en solution, sont réalisées après un refroidissement quasi-instantané (« flash cooling ») de l'échantillon. Lors de ce processus (figure 1.18), et par opposition à un refroidissement plus lent, l'eau forme une glace amorphe et non pas une glace cristalline. La formation de cette phase amorphe est primordiale pour toutes les études réalisées par la suite. En cristallographie des protéines, la glace cristalline pourrait détruire les cristaux par l'augmentation du volume du solvant et diffracte en polluant les clichés de diffraction. En phase amorphe transparente, elle évite que les lasers ne diffusent trop et surtout permet des mesures en absorption qui seraient impossibles en phase cristalline, où la DO (densité optique) de l'eau serait trop importante.

La phase amorphe ainsi formée est hors équilibre thermodynamique, son énergie libre à 100 K étant plus élevée que celle de l'eau en phase cristalline. Il est possible de se représenter l'eau en phase amorphe comme un liquide qui aurait perdu la capacité de s'écouler : structurellement cette phase est indifférentiable de la phase liquide.

Quand elle est chauffée, l'eau pure en phase amorphe subit une première transition vitreuse à 136 K. La température³ augmentant, elle cristallise autour de 150 K formant de la glace cubique, qui se transforme à son tour en glace hexagonale à 186 K. L'eau en phase amorphe dans la fenêtre de température entre la transition vitreuse et la cristallisation a été décrite comme étant dans un état ultravisqueux [Johari et al., 1987].

³Les valeurs des températures sont données pour de l'eau pure

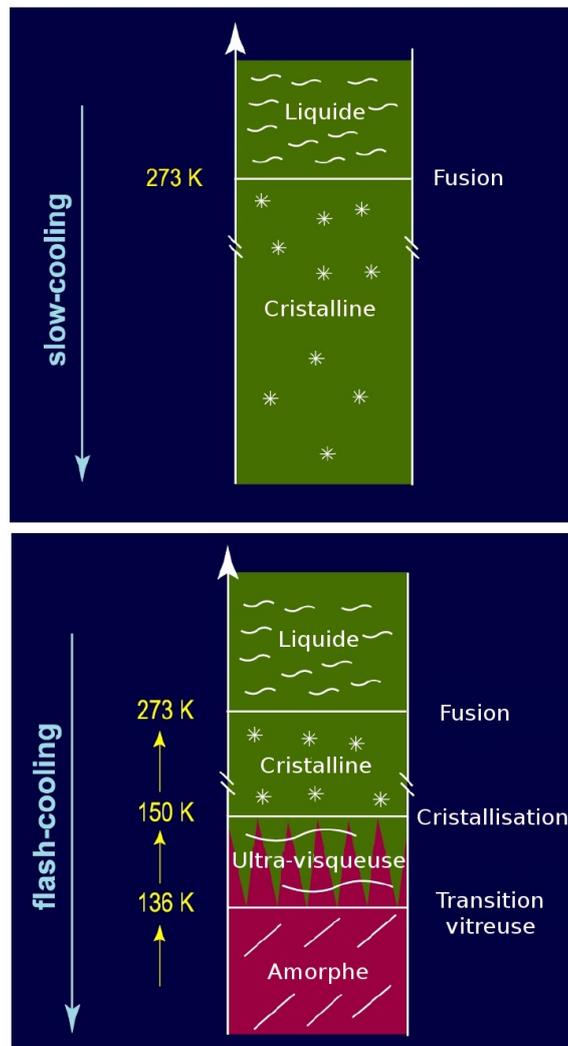


FIG. 1.18 – Diagrammes des changements de phase pour de l'eau pure, dans les cas d'un « flash-cooling » et d'un « slow cooling ». En rouge le liquide est hors équilibre thermodynamique, en vert il est en équilibre.

Cet état ultravisqueux, et son existence même, sont l'objet d'une âpre controverse. Les mesures de Johari, en 1987 puis en 2005, montrent un changement de la relaxation diélectrique de l'eau qui passe lors de la transition vitreuse à 136 K de 33 à 0.1 secondes [Johari, 2005] suggérant l'existence de l'eau sous forme quasi-liquide dans la fenêtre comprise entre 136 et 155 K. Cette phase ultravisqueuse pourrait alors être assimilée à une sorte de « gel » dans lequel les molécules auraient la possibilité de diffuser faiblement, et autorisant une large flexibilité conformationnelle chez le soluté (une protéine par exemple). Ces résultats sont contestés, d'autres auteurs proposant que la transition vitreuse à 136 K ne soit que « l'ombre » de la vraie transition qui se produit à plus haute température [Yue and Angell, 2004, Velikov et al., 2001].

1.5.4 Effets du solvant sur les mouvements des protéines

La plupart des protéines (non membranaires) sont largement solvatées. Leur surface est couverte par une couche de solvant, typiquement 2 ou 3 molécules d'eau ordonnées par résidu. Ces molécules d'eau peuvent être considérées comme parties intégrantes de la structure de la protéine, par opposition aux molécules désordonnées du solvant. On parle de **la sphère d'hydratation de la protéine** [Ringe and Petsko, 2003]. La question essentielle posée par l'observation d'une transition dans la dynamique des protéines est alors celle de son couplage avec la dynamique du solvant. Une telle transition est-elle due aux transitions du solvant, éventuellement relayées par la sphère d'hydratation, est-elle une propriété intrinsèque de la protéine où encore est-elle le produit d'une interaction entre les 3 ?

L'étude du couplage entre les mouvements dans le solvant et ceux de la protéine est donc cruciale. L'étude comparée des constantes diélectriques du solvant et des mouvements dans la myoglobine a montré qu'il existe deux types de mouvements : ceux dépendants du solvant et ceux indépendants [Fenimore et al., 2002]. Les premiers sont intimement couplés aux variations des propriétés physiques dans le solvant : leur dépendance en température est identique, et leur fréquence est proportionnelle à celle des fluctuations des molécules du solvant. Les seconds sont indépendants des changements physiques dans le solvant, et dépendent uniquement du paysage énergétique de la protéine.

Plus récemment, la notion même de transition dynamique dans les protéines a été nuancée en séparant l'influence des molécules d'eau de la sphère d'hydratation de celle des molécules du solvant (« bulk solvent ») [Fenimore et al., 2004]. Les résultats concernent les déplacements quadratiques moyens étudiés par diffusion de neutrons et spectroscopie Mössbauer dans la myoglobine. Trois types de mouvement ont été isolés dans la protéine (voir la figure 1.19) :

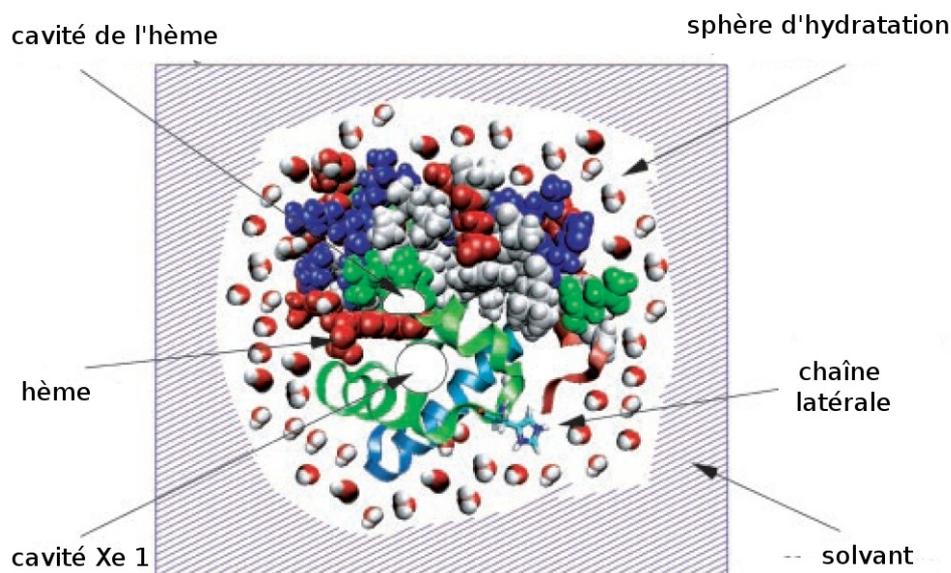


FIG. 1.19 – Vue stylisée de la myoglobine avec les parties impliquées dans la dynamique et la fonction. En bas, la structure présente 3 hélices α avec une chaîne latérale en exemple. En haut, une vue globulaire de la structure. L'hème est en rouge, les molécules d'eau sont en rouge et blanc. Les deux cavités qui peuvent stocker le ligand (Xe1 et hème) sont représentées en blanc. Figure extraire de [Fenimore et al., 2004].

1. Les mouvements dépendants du solvant (absents si la protéine est prisonnière d'un solide comme le tréhalose ou si elle est déshydratée), qui suivent les fluctuations diélectriques du solvant et gouvernent les mouvements de grande amplitude comme l'entrée et la sortie des ligands.
2. Les mouvements couplés avec la sphère d'hydratation de la protéine (encore présents si la protéine est prisonnière d'un solide, mais absents si elle est déshydratée). Ils impliquent les chaînes latérales pour des mouvements internes, comme la migration des ligands dans la myoglobine, et leur dépendance en température peut être approximée par une loi d'Arrhenius.
3. Les mouvements vibrationnels, qui ne dépendent pas du solvant et sont uniquement liés aux fluctuations thermiques.

L'existence de ces trois types de mouvements protéiques implique que l'environnement puisse contrôler la fonction de la protéine *via* différents paramètres et suggère que la transition dynamique telle qu'elle est mesurée autour de 200 K ne soit que la résultante de plusieurs phénomènes, plutôt qu'une propriété intrinsèque de la protéine.

Toutes ces considérations semblent directement applicables aux études en cristallographie cinétique des protéines, étant données les conditions de solvatation des cristaux, et apportent un nouvel éclairage sur le couplage transition vitreuse/ transition dynamique chez les protéines. Nous verrons que c'est avec ce type d'analyse que nous pouvons interpréter les résultats que nous avons obtenu sur la mécanisme catalytique de réduction de la Pchlide.

1.5.5 Activité dans les cristaux de protéine

Les expériences de cristallographie cinétique des protéines, en plus des considérations déjà développées sur les interactions entre la dynamique de la protéine et celle du solvant, nécessitent une connaissance de l'activité des protéines sous forme cristalline.

L'environnement cristallin

L'arrangement de protéines solubles dans une matrice cristalline nécessite des interactions intermoléculaires spécifiques, qui sont favorisées par l'utilisation d'agents de précipitation dans la solution de cristallisation, la liqueur mère. Ceux-ci sont classiquement des sels, des molécules organiques ou du polyéthylène glycol (PEG). Une grande partie du volume cristallin, entre 30% et 90%, est occupée par les canaux de solvant qui permettent la diffusion de petites molécules. Dans un cas limite, les molécules de cytochrome c (diamètre de 30 Å) diffusent dans les canaux de solvants large de 100 Å des cristaux de flavocytochrome b₂ tétramérique pour former un complexe actif et réversible [Tegoni et al., 1983]. Les contacts cristallins, qui représentent des interactions de faible énergie (typiquement équivalente à celle d'une liaison hydrogène, soit entre 2 et 10 kcal/mol) et la conservation de la couche de solvatation rendent la flexibilité conformationnelle théoriquement possible.

Les interactions spécifiques qui permettent d'obtenir un cristal de protéine dans la liqueur mère pourraient sélectionner certaines conformations préférentielles par rapport à toutes celles possibles en solution, et exercer des contraintes contraires à la fonction d'une protéine. Il est aussi envisageable que l'activité enzymatique induise des changements conformationnels tels qu'ils brisent l'arrangement cristallin entre les molécules et rendent donc impossible l'acquisition d'une structure par cristallographie aux rayons X [Mozzarelli and Rossi, 1996]. La liaison d'un substrat (ajustement induit) peut fournir l'énergie nécessaire pour stabiliser préférentiellement un conformère par rapport aux autres. Dans le cristal, ce sont les interactions créées par le réseau qui favorisent un état conformationnel par rapport aux autres, et fournissent une voie alternative de stabilisation potentiellement inconciliable avec une conformation fonctionnelle. C'est pour cela que l'étude de

l'activité des protéines sous forme cristalline est importante.

Plusieurs techniques permettent de comparer la liberté conformationnelle de la protéine dans un cristal à celle en solution, et ce sur différentes échelles de temps. Les plus courantes sont la spectroscopie Mössbauer [Parak, 1986], la RMN, la calorimétrie [Doster et al., 1986] et plus récemment la TDFM (Temperature Derivative Fluorescence Microspectrophotometry) [Weik et al., 2004].

Fonction dans l'environnement cristallin

L'activité biologique dans un cristal, décrite pour la première fois au début des années 1960, a été exploitée pour valider les structures obtenues par cristallographie aux rayons X. Les données sur l'activité fournissent une information importante, bien qu'indirecte, pour comparer la structure et la dynamique de la protéine sous forme cristalline et en solution. Les résultats obtenus ont été résumés comme suit [Richards, 1963] : les constantes d'équilibre de la réaction sont les mêmes dans les deux états, mais les constantes de vitesse sont modifiées, probablement à cause des restrictions conformationnelles induites par le réseau cristallin.

1.6 Méthodologies

La réaction catalysée par la POR est photosensible : le seul fait d'éclairer le complexe doit initier le déclenchement de la réaction. Cet événement est possible y compris à très basse température. La réaction présente aussi la propriété de posséder une signature spectroscopique (fluorescence et absorption) propre à chaque état intermédiaire.

Les études spectroscopiques réalisées à ce jour sur le mécanisme catalytique de réduction de la Pchl_a ont classiquement été réalisées en solution sur des échantillons de l'ordre du millilitre. Le contrôle en température a alors été réalisé grâce à l'utilisation d'un cryostat avec deux limitations principales : la nécessité d'utiliser une grande quantité de matériel biologique (protéine, etc) et la difficulté de réaliser un refroidissement quasi-instantané de l'échantillon (il faut pour cela un milieu très visqueux, et donc peu physiologique). Dans ce travail, nous avons utilisé un microspectrophotomètre. Celui-ci permet de travailler sur des échantillons d'un volume inférieur au microlitre, et aussi de contrôler finement la température. Le suivi de la réaction par un microspectrophotomètre permet donc de connaître précisément la température de formation de chaque état intermédiaire dans un milieu pas trop visqueux.

Parallèlement, les techniques mises au point au laboratoire, fondées sur la fluorescence des marqueurs exogènes nous ont permis d'accéder à la dynamique du solvant, et en particulier à ses transitions de phase.

Ainsi, la combinaison du matériel biologique choisi, des méthodologies et de l'instrument développé nous ont permis d'étudier plusieurs événements en parallèle : le suivi de la réaction, grâce aux propriétés spectroscopiques distinctes de chaque état intermédiaire, et la dynamique du solvant, grâce à l'utilisation d'un fluorophore exogène comme marqueur de la solution.

1.6.1 Le microspectrophotomètre

Suite à l'obtention des premières structures cristallographiques à haute résolution d'enzymes dans les années 1970, un certain nombre de mécanismes réactionnels ont pu être proposés, représentant un grand pas en avant pour l'enzymologie. La question centrale était alors de savoir si ces résultats obtenus à partir de cristaux de protéines étaient représentatifs des conditions physiologiques ou du moins comparables à ceux que l'on peut obtenir en solution. C'est alors que furent développées des techniques de microspectrophotométrie permettant de suivre dans un cristal les paramètres reliés à la fonction, afin de comparer l'activité biologique dans les deux états physiques (revue complète par Pearson [Pearson et al., 2004]). Le problème immédiat pour suivre les réactions dans un cristal est que les techniques classiques de spectroscopie sont difficilement transposables. En effet, il est nécessaire de caractériser la réaction à l'intérieur du cristal, qui correspond à un échantillon de quelques nanolitres au mieux dans lequel la protéine est très concentrée. L'acquisition des spectres est alors hors de portée d'un spectromètre classique, dont le faisceau a une section de l'ordre de quelques mm^2 , sauf à utiliser un grand nombre de cristaux en même temps. Ces techniques de microspectrophotométrie ont été remises au goût du jour et améliorées par les développements de la cristallographie cinétique et le besoin de pouvoir contrôler l'avancement d'une réaction dans un cristal, en utilisant le piégeage à basse température par exemple. Aujourd'hui, il est possible de combiner sur un même cristal la cristallographie avec des études spectroscopiques.

La microspectrophotométrie d'absorption est utilisable pour l'étude des protéines contenant des chromophores, des centres métalliques ou encore des substrats colorés. Celle de fluorescence pourra être appliquée dans les cas de fluorescence endogène ou exogène.

Il existe deux grandes familles de microspectrophotomètres, ceux montés sur les lignes de lumière synchrotron (« on line ») et ceux opérant dans un laboratoire (« off line »), même si de plus en plus les outils sont opérationnels dans les deux environnements. Les premiers [Sakai et al., 2002,

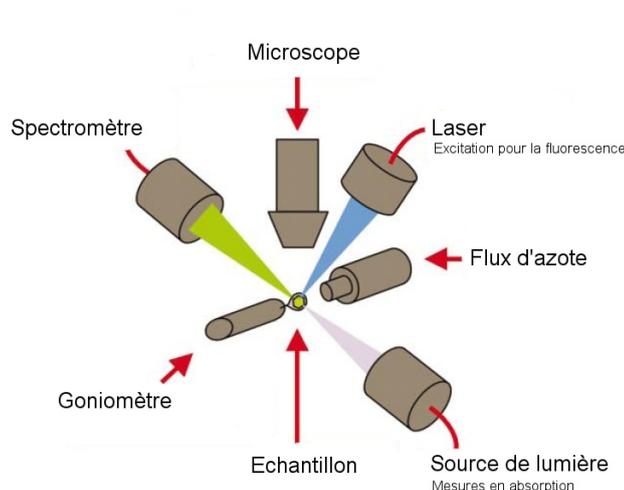


FIG. 1.20 – Vue schématique d'un microspectrophotomètre possédant trois objectifs, et pouvant donc simultanément opérer en fluorescence et en absorption.

[Hadfield and Hajdu, 1993, Chen et al., 1994] peuvent être utilisés pour suivre les modifications des propriétés spectroscopiques des cristaux lors de l'acquisition des jeux de données cristallographiques. Les seconds [Sakai et al., 2002, Bourgeois et al., 2002, Chen et al., 1994] permettent de préparer les cristaux avant la collecte, mais aussi de réaliser des expériences en solution afin de caractériser le système biologique étudié. C'est cette dernière propriété que nous avons exploitée dans le cadre de ce travail.

Nous avons réalisé nos études en solution au Cryobench, le microspectrophotomètre développé par l'équipe de Dominique Bourgeois à l'ESRF. Il est constitué d'une tête goniométrique située au centre de trois objectifs sur laquelle l'échantillon peut être placé (figure 1.20). Le premier objectif est utilisé pour illuminer l'échantillon avec une source de lumière, variable selon les desiderata de l'utilisateur lors de l'acquisition des spectres d'absorption. Le second est orienté à 90° du premier et sert pour acheminer la lumière excitatrice émise généralement par un laser lors de la mesure des spectres de fluorescence. Le troisième fait office de collecteur de lumière et est relié au spectromètre. L'échantillon est placé dans un flux d'azote, et la température peut donc être finement contrôlée dans la gamme [100-293 K]. Une dernière information est fournie par un microscope qui permet un contrôle visuel de l'expérience. Le système optique est dessiné de manière à rendre possible la

focalisation sur une petite surface, de l'ordre de quelques dizaines de μm^2 . Le système sera présenté plus en détail dans le paragraphe 3.1.

D'autres études spectroscopiques complémentaires peuvent être menées en utilisant un microspectrophotomètre, comme la spectroscopie Raman, ouvrant des perspectives intéressantes pour les échantillons non colorés.

1.6.2 Microspectrophotométrie dépendante en température

Étude de la dynamique du solvant

La microspectrophotométrie de fluorescence dépendante en température (Temperature Derivative Fluorescence Microspectrophotometry ou TDFM) est une technique récemment développée au sein de l'équipe et qui a pour objectif de mesurer la dynamique d'un système biologique par l'étude des spectres de fluorescence d'un fluorophore en général exogène [Weik et al., 2004]. Les relaxations dans l'état excité affectent les spectres de fluorescence et sont dépendantes du mouvement des molécules au contact du fluorophore, à travers le phénomène de relaxation dipolaire. Leurs variations se traduisent par des décalages dans les longueurs d'onde des spectres de fluorescence. L'étude de ces spectres nous renseigne sur les transitions de phase dans le solvant et nous permet donc d'accéder à l'un des paramètres susceptible de gouverner l'activité protéique.

Étude de l'activité d'une protéine

Le microspectrophotomètre est un instrument parfaitement adapté à l'étude des propriétés spectroscopiques de la POR. En refroidissant à 100 K un complexe ternaire POR-NADPH-Pchl_a formé dans le noir, et en utilisant ses propriétés de photo-activation, il est en effet possible de déclencher la réaction dans un échantillon de quelques microlitres, et de contrôler ensuite son déroulement en appliquant une rampe de température. Les états intermédiaires qui se forment sont tous caractérisés par un signal spectroscopique différent et l'avancement de la réaction est donc facile à suivre. C'est ce type de protocole (qui sera présenté plus en détail dans la partie 3.1) que nous avons appliqué à l'étude du mécanisme de réduction de la Pchl_a.

Ces résultats spectroscopiques nous donnent donc accès à l'activité fonctionnelle de la protéine. Leur comparaison avec les données sur la dynamique du solvant permet d'étudier les éventuels couplages et de sonder plus précisément la nature exacte des mouvements opérant dans la protéine. Ce sont ces travaux qui seront au cœur de mon travail.

Chapitre 2

Études biochimiques

L'objectif des études biochimiques sur la POR de *T. Elongatus* est la cristallisation de la protéine. Les difficultés rencontrées durant la phase de cristallogenèse nous ont conduit à mettre en cause la stabilité de la protéine purifiée. Nous avons alors réalisé des études sur les processus responsables de la dégradation de la POR .

2.1 Expression et purification de la POR

Nous avons réalisé la purification la semaine du 16 au 21 novembre 2003 au département de biologie moléculaire et de biotechnologie de l'université de Sheffield, en collaboration avec l'équipe du professeur Neil Hunter, en suivant le protocole établi par Derren Heyes .

2.1.1 Principe de biologie moléculaire et biochimie

Le gène codant la protochlorophyllide oxydoréductase est isolé à partir de l'ADN génomique de *Thermosynechococcus elongatus BP-1* et amplifié par PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase). Le produit de la PCR est inséré dans le vecteur d'expression (en ajoutant une étiquette polyhistidine en position N-terminale à la séquence). Une souche *Escherichia coli* est transformée par le plasmide résultant. La protéine est ensuite surexprimée dans cette souche.

Les cellules sont cultivées dans un milieu de croissance et sont ensuite lysées par sonication. L'extrait cellulaire soluble contenant la protéine est récupéré après centrifugation.

La protéine est d'abord passée sur une colonne d'affinité au nickel, qui fixe

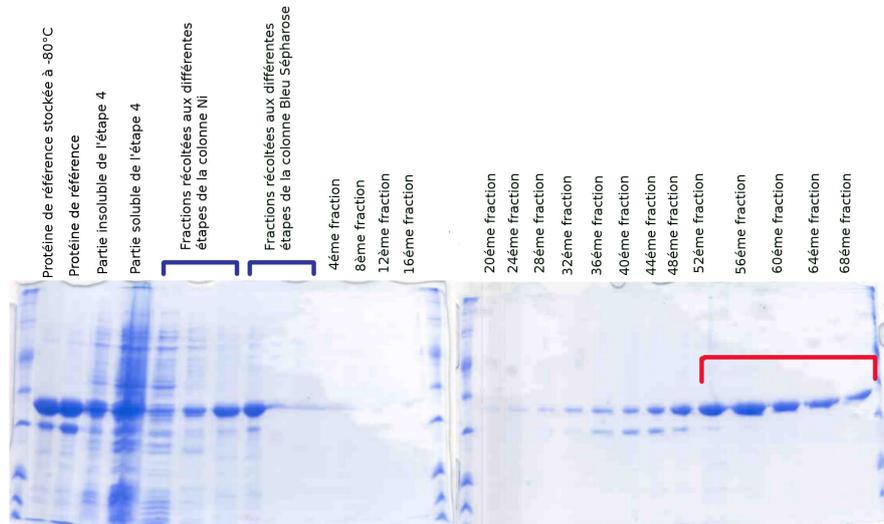


FIG. 2.1 – Gel SDS des fractions récoltées lors de la purification

l'étiquette polyhistidine des protéines marquées et laisse passer les autres. La solution éluée est ensuite passée dans une colonne bleu sépharose, dont la résine interagit avec le domaine de fixation du NADPH de la protéine, et enfin dans une colonne de gel filtration pour séparer les composantes de poids moléculaires différents. La concentration est effectuée par centrifugation.

Le protocole de purification est présenté en détail dans l'annexe B.

2.1.2 Résultats de la purification

La souche de POR utilisée est la POR de *T. elongatus*. En sortie de la colonne de gel filtration, la solution est récupérée par fractions de 5 ml. On fait ensuite migrer sur gel un échantillon de chacune d'entre elles afin de déterminer celles contenant la protéine pure (figure 2.1). On choisit alors de rassembler les fractions 49 à 69. Nous obtenons au final 30 mg de protéine purifiée (typiquement stockée à une concentration de 10 mg/ml).

2.1.3 Caractérisation de la protéine

En collaboration avec nos collaborateurs, nous avons vérifié et caractérisé l'activité de la protéine recombinante. Les expériences suivantes sont alors réalisées : absorption à basse température, fluorescence à basse température, activité en fonction de la concentration, activité en fonction de la température.

Spectroscopie à basse température

Les expériences sont effectuées entre 77 et 200 K. Les échantillons sont étudiés dans des cuvettes en plastique de 1 ml, plongées dans un cryostat refroidi à l'azote (Oxford Instrument, Oxford, UK) et la température est mesurée avec un thermocouple (Comark, Stevenage, UK). Pour initier l'activité de l'enzyme, le mélange est éclairé par une lampe blanche (Schott K11500, $1500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) pendant 10 minutes.

Les spectres d'absorption sont mesurés en utilisant un spectromètre Cary 500 Scan UV-visible-NIR (Varian) à 77 K et les spectres de fluorescence avec un spectromètre SPEX FluoroLog (SPEX Industries, Metuchen, NJ), sous une lumière d'excitation fournie par une lampe xénon montée avec un monochromateur sélectionnant une largeur spectrale de 4.5 nm centrée sur 450 nm.

À 77 K, avant illumination, il y a formation du complexe ternaire dans lequel le spectre de fluorescence de la Pchl_a est décalé à 644 nm contre 630 nm en solution dans le méthanol et le Genapol (figure 2.2). Le Genapol est un détergent qui solubilise la Pchl_a sous forme monomérique. Après illumination à température ambiante, la Pchl_a est réduite en Chl_a qui absorbe au maximum à 671 nm sous sa forme libre. En plus du pic à 671 nm, les spectres montrent un pic d'absorption prédominant à 685 nm : dans le cas de la POR de *T. elongatus*, l'espèce majoritaire à 293 K est un complexe entre la Chl_a, la POR et le NADPH (qui fluoresce à 689 nm et absorbe à 685 nm), la Chl_a libre étant libérée à plus haute température [Heyes and Hunter, 2004]. Ces tests spectroscopiques permettent cependant de valider l'activité de la protéine qui vient d'être purifiée.

Activité en fonction de la température

Les expériences sont réalisées dans le tampon d'activité avec la Pchl_a en excès (le K_m est de $8.6 \mu\text{M}$). Pour mesurer l'activité, on mesure la variation de la DO du pic de Chl_a entre le moment où la réaction est déclenchée (*via* l'illumination de l'échantillon) et la fin du régime linéaire de formation du

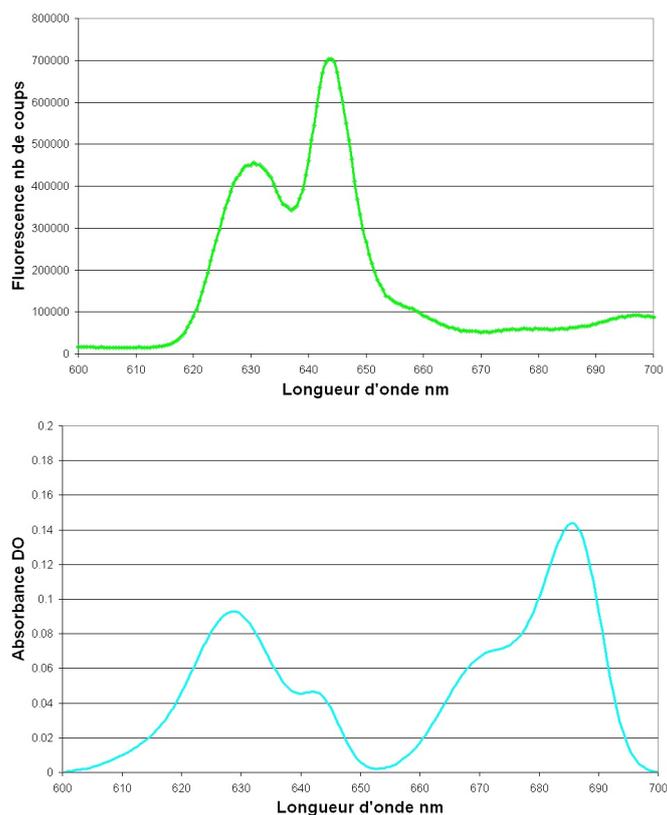


FIG. 2.2 – En haut, spectre de fluorescence de l'échantillon dans le noir à 293 K et refroidi à 77 K. En bas, spectre d'absorption après illumination à 293 K et refroidissement à 77 K. Chemin optique de 1 cm. Solution d'étude à basse température : 40% glycérol, 20% sucrose, POR 0.09 μM dans son tampon de cristallisation (30 mM Tris ph 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM DTT), Pchl ide 3.2 μM , NADPH 0.3 μM , Genapol 0.01% (vol/vol), β -mercaptoethanol 0.1% (vol/vol)

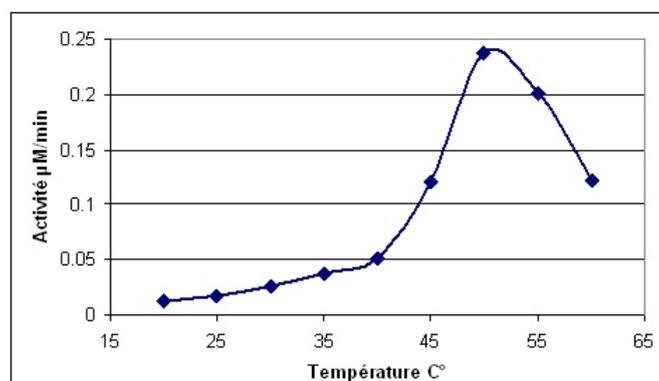


FIG. 2.3 – Activité de la POR de *T. elongatus* en fonction de la température. $\epsilon_{Chlide}=69.95 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 670 nm. Illumination actinique réalisée en continue avec la lampe Schott filtrée pour émettre uniquement dans le bleu. $15.5 \text{ }\mu\text{M}$ Pchl_{ide}, 66 nM POR, 0.1% (vol/vol) Genapol, 0.1% (vol/vol) β -mercaptoéthanol, $25 \text{ }\mu\text{M}$ NADPH.

produit.

La figure 2.3 présente la variation de l'activité en fonction de la température, le maximum étant obtenu à $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Ces résultats sont obtenus pour la POR de *T. elongatus*, le maximum d'activité pour la POR de *Synechocystis sp. PCC6803* étant situé vers $20 \text{ }^\circ\text{C}$. L'activité à température ambiante est toutefois suffisante pour que les expériences puissent être réalisées.

Activité en fonction de la concentration

Le même protocole est utilisé à $50 \text{ }^\circ\text{C}$ pour mesurer l'activité de la protéine en fonction de la concentration (figure 2.4). Comme précédemment, la Pchl_{ide} est en large excès. Même à concentration élevée, il n'y pas de phénomène de saturation de l'activité par rapport à la concentration. Ces expériences ont toutefois été réalisées à des valeurs de concentration nettement inférieures à celles employées lors de la cristallisation des protéines.

2.2 Stabilité de la protéine

Les essais de cristallisation ont montré que la POR refusait de cristalliser. Des gels SDS Page réalisés sur de la protéine incubée quelques jours ont montré qu'elle était dégradée, alors que ceux effectués juste après la purification montrent une protéine pure. Cette dégradation est révélée par

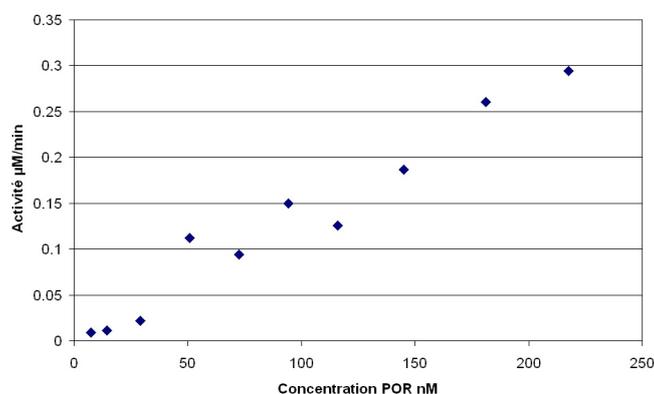


FIG. 2.4 – Activité de la POR de *T. elongatus* en fonction de sa concentration. Illumination actinique réalisée en continue avec la lampe Schott filtrée pour émettre uniquement dans le bleu. 15.5 μM Pchl \textit{a} , 0.1% (vol/vol) Genapol, 0.1% (vol/vol) β -mercaptoéthanol, 25 μM NADPH.

l'apparition d'une deuxième bande vers 28 kDa, en dessous de celle de la protéine pure située à 38 kDa. La première étape a donc été de caractériser cette dégradation. Nous avons d'abord réalisé des gels permettant de suivre le poids moléculaire de la protéine au cours de la dégradation et dans différents environnements (température, additifs ...). Les phénomènes de dégradation mieux cernés, des études utilisant des techniques quantitatives telles que la diffusion dynamique de la lumière, la spectrométrie de masse ou encore le séquençage N-terminal ont permis d'obtenir des informations précises sur l'origine de la dégradation et surtout d'envisager les moyens d'y remédier.

2.2.1 Migration sur gel SDS Page

Présentation de la technique

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) est une technique utilisant un gel fortement réticulé à travers lequel les protéines migrent. La taille des pores du gel est ajustée de façon à ce qu'elle soit assez petite pour retarder la migration. Les protéines sont dans une solution contenant du SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), un détergent puissant chargé négativement et du β -mercaptoéthanol, un réducteur fort. Le détergent se lie aux régions hydrophobes et, sous l'action conjointe de la chaleur, il débobine la protéine en une chaîne polypeptidique non structurée, le β -mercaptoéthanol réduisant les ponts disulfures éventuels.

Chaque protéine fixe un nombre de molécules de détergent chargées négativement.

tivement en moyenne proportionnel à sa masse moléculaire et une différence de potentiel provoque la migration vers l'électrode positive. Un mélange complexe de protéines est donc fractionné en une série de bandes disposées par ordre de poids moléculaire.

Expériences

Les premières expériences ont concerné la dégradation comparée de la POR de *T. elongatus* et de *Synechocystis*. Trois échantillons de POR de chaque espèce ont été incubés à 3 températures différentes (4 ° C, 20 ° C et 37 ° C), et des prélèvements ont été effectués régulièrement sur une durée de trois semaines (figure 2.5).

Les gels obtenus présentent le plus souvent deux bandes. La première, située vers 37 kDa, concerne la protéine non dégradée. La seconde, située vers 28 kDa, concerne la ou les bandes de dégradation principale(s). Les variations relatives de l'importance de ces deux bandes donnent des indications sur la dégradation de la protéine au cours du temps. Ces expériences réalisées à Sheffield ont permis de mettre en évidence plusieurs phénomènes :

- La POR se dégrade très vite, à $t=0$ elle l'est déjà en partie (alors que les fractions collectées après la purification sont pures). La congélation puis la décongélation fait donc sans doute partie du processus de dégradation et il est donc important d'essayer de minimiser au maximum ces étapes.
- À 37 ° C, en quelques jours et quelle que soit la souche, la protéine est entièrement dégradée.
- À 20 ° C, la POR de *Synechocystis* est complètement dégradée en 10 jours, alors qu'après 17 jours, celle de *T. elongatus* ne l'est que partiellement.
- La température optimale pour la conservation de la protéine est 4 ° C. La POR de *T. Elongatus* est lentement dégradée à cette température, dans des proportions moindres que celle de *Synechocystis*.

Une deuxième campagne d'expériences a concerné plus spécifiquement les facteurs de stabilisation de la POR de *T. elongatus*. Nous avons ainsi pu tester la dégradation, sur une durée d'un mois, de la POR en présence de différents additifs (figure 2.6). Toutes les expériences ont été réalisées à 4 ° C, pour ralentir les facteurs de dégradation. Les résultats amènent à plusieurs constatations :

- La formation du complexe ternaire qui est censé stabiliser la POR n'a pas un effet flagrant sur la réduction de la dégradation de la protéine.
- Le moyen le plus efficace de protéger la POR semble d'associer un cocktail d'antiprotéases avec de l'EDTA (un chélateur d'atomes dica-

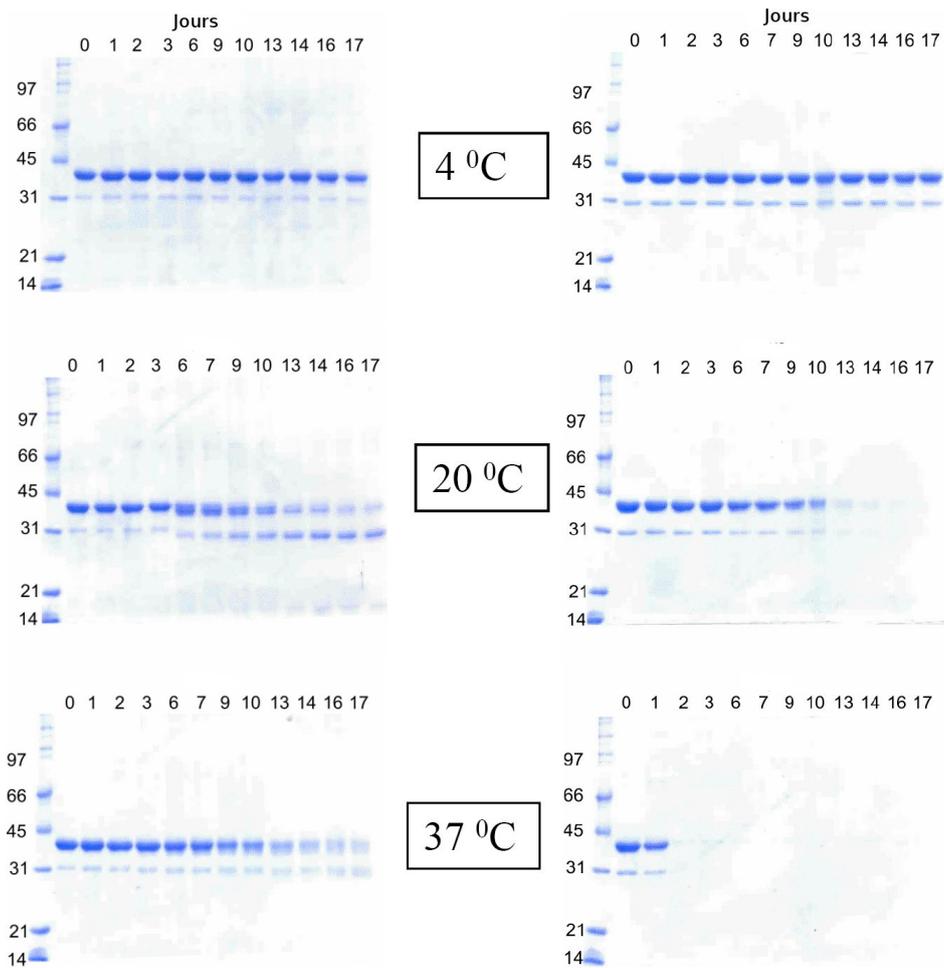


FIG. 2.5 – Gels de migrations SDS de POR de *T. elongatus* (à gauche) et de *Synechocystis* (à droite) en fonction de la température.

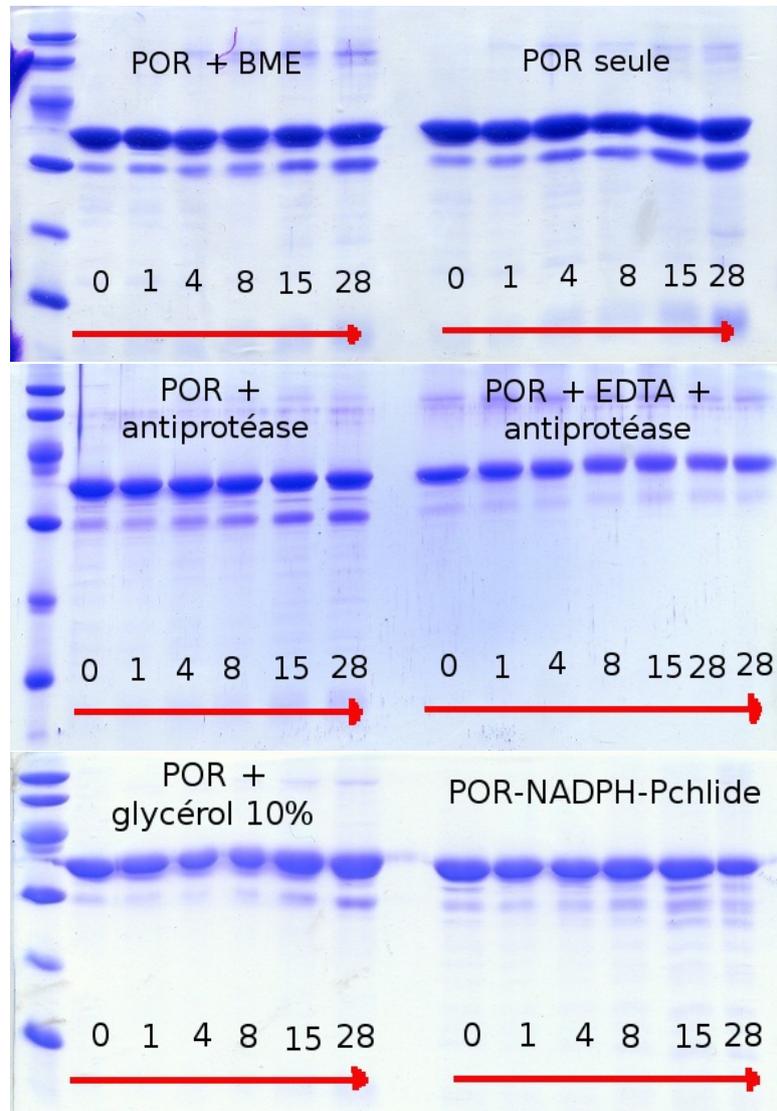


FIG. 2.6 – Gels de migrations SDS de POR de *T. elongatus*. La durée d'incubation est donnée en jours. BME : β -mercaptoéthanol, EDTA : acide éthylènediaminotétraacétique sel disodique, antiprotéases : cocktail d'antiprotéases Sigma

Rh (nm)	MW (kDa)	Cp (nm)	Cp/Rh (%)
4.7	125	0.68	14

TAB. 2.1 – Résultats obtenus par DLS

tioniques, et en particulier du zinc qui est présent dans de nombreuses protéases, l'EDTA a donc fonction d'antiprotéase). Le glycérol assure aussi une protection à la protéine, mais dans tous les cas une certaine dégradation subsiste.

2.2.2 Diffusion dynamique de la lumière

Présentation de la technique

La méthode de diffusion dynamique de la lumière (DLS ou Dynamic Light Scattering) est basée sur la théorie de la diffusion de la lumière par des particules colloïdales soumises à des mouvements thermiques aléatoires. Cette diffusion varie au cours du temps, et peut être reliée au coefficient de diffusion des particules dans un milieu donné et donc, par la suite, à un diamètre de particule.

La limite supérieure de la technique est fonction de la densité de l'échantillon car la DLS nécessite que les particules diffusent de façon aléatoire sans être entachées d'un mouvement principal de sédimentation. La limite inférieure dépend de la quantité de lumière diffusée par les particules par rapport à la lumière diffusée par le liquide porteur. Plusieurs facteurs contribuent à cette limite basse incluant la concentration de l'échantillon, l'indice de réfraction relatif, la puissance du laser, la longueur d'onde, la sensibilité du détecteur et la configuration optique de l'instrument.

Les études de DLS sont importantes avant les essais de cristallisation, car elles permettent de renseigner sur la polydispersité de la solution. Comme il est reconnu qu'une protéine monodisperse cristallise beaucoup plus facilement qu'une protéine polydisperse, cette information représente un préalable important avant de commencer les essais de cristallogénèse.

Expériences

Les expériences de DLS ont été menées à l'EMBL de Grenoble avec Wim Burmeister en mars 2004. La protéine étudiée est la POR de *Synechocystis*, dans son tampon de cristallisation, fraîchement décongelée après avoir été stockée à -80°C . Les résultats sont résumés dans le tableau 2.1.

Le rayon hydrodynamique (R_h) mesuré est de 4.8 nm, et le poids moléculaire calculé à partir de cette valeur est de 125 kDa. La dispersité du pic des poids moléculaires obtenus est donnée par le coefficient C_p , de 0.68 dans notre cas. Le rapport C_p/R_h définit l'indice de polydispersion.

Interprétation

En général, on admet qu'une protéine est monodisperse pour un indice de polydispersion inférieur à 15 %. La POR est donc sûrement monodisperse après sa décongélation. Le poids moléculaire est donné à partir de R_h dans le cadre de l'hypothèse d'une protéine de forme globulaire. Dans les faits, la forme de l'oligomère est plus complexe, et cette hypothèse tend à surévaluer le poids moléculaire de la protéine. Pour la POR, de masse 37.7 kDa, on peut proposer l'hypothèse d'un dimère comme étant la plus à même de concilier les faits expérimentaux. Nos résultats sont donc en accord avec une solution de POR dimérique et monodisperse, après décongélation de l'échantillon. Ces informations préliminaires sont encourageantes pour les essais de cristallogenèse.

2.2.3 Spectrométrie de masse

Présentation de la technique

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse de la matière en fonction de la masse de ses constituants. Elle offre trois fonctions principales : la séparation des constituants moléculaires, la mesure de leur abondance relative et la mesure précise des masses moléculaires. C'est la masse inertielle qui est déterminée à travers un processus d'ionisation de la matière dans des champs électrique et magnétique.

Expériences

L'objectif des expériences est de laisser se dégrader la protéine et de déterminer ensuite le poids moléculaire de la (ou des) chaîne(s) polypeptidique(s) alors obtenue(s). La comparaison entre ce poids, et le poids attendu pour une séquence d'acides aminés déterminée, permet alors d'identifier les « morceaux » de la protéine obtenus après dégradation et donc d'identifier les sites de coupure. On incube la protéine à 4 ° C et régulièrement on réalise un spectre de masse à des temps donnés (figure 2.7).

Les expériences ont été réalisées sur différents échantillons (avec ou sans étiquette polyhistidine) conservés à 4 et 21 ° C. Les mesures ont été effectuées

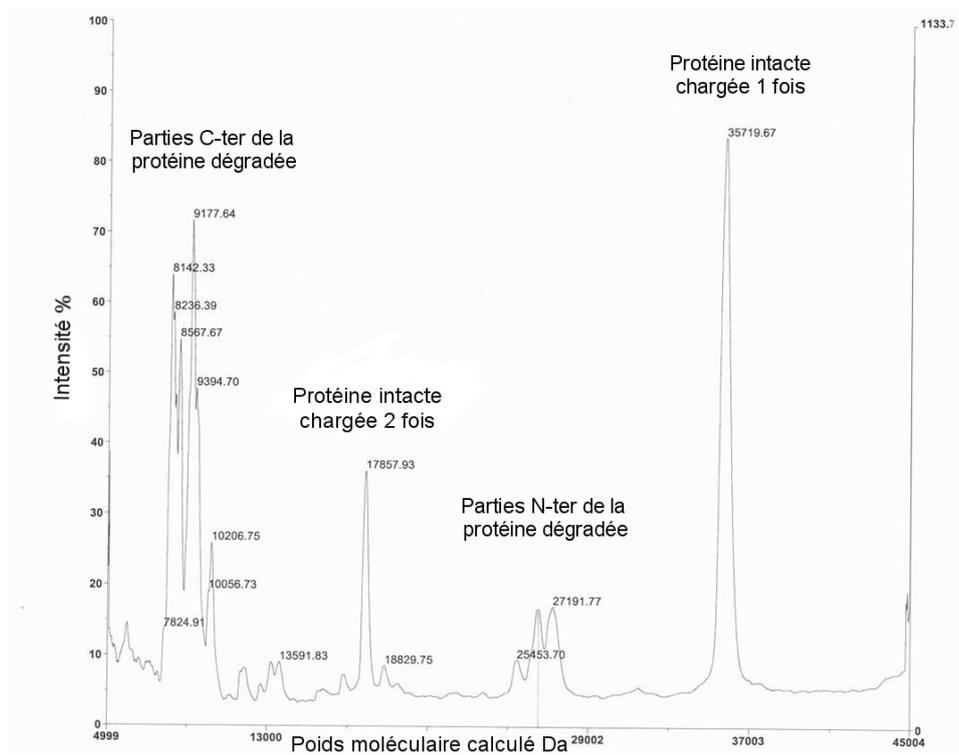


FIG. 2.7 – Spectre typique de la POR obtenu par spectrométrie de masse, en MALDI-TOF

Fragment	Avec étiquette His			Sans étiquette His			Moyenne
	J5 ₄	J12 ₂₁	J30 ₄	J5 ₄	J12 ₂₁	J30 ₄	
C-ter 1	8560	8787	8628	8530	bruit	8639	8622 +/-82
C-ter 2	9340	9374	9343	9219	9308	9406	9332 +/-64
C-ter 3	10205	10326	10258	10268	10336	10376	10287 +/-62

TAB. 2.2 – Résultats obtenus par spectrométrie de masse en MALDI-TOF. Les échantillons sont appelés JXX_{xx}, où XX correspond à la durée d'incubation (en jours) et xx à la température (en °C). Les poids moléculaires sont donnés en Da.

le jour de la décongélation puis 5, 12 et 30 jours après.

Résultats

Les résultats sont présentés dans le tableau 2.2. La protéine se dégrade plus vite avec la température (comme attendu et mesuré avec la migration sur gel). Trois pics de dégradation principaux apparaissent progressivement dans la zone 25-27 kDa pour la protéine sans l'étiquette polyhistidine et 26-29 kDa pour la protéine avec. Ces pics indiquent une dégradation C-terminale (puisque l'étiquette polyhistidine représente environ 2.3 kDa). Les pics complémentaires autour de 9 kDa correspondants à la partie C-terminale sont beaucoup plus nombreux, ce qui laisse supposer une dégradation ultérieure de ces fragments. La masse moléculaire des fragments C-terminaux clivés est calculée en soustrayant à la masse de la POR intacte chargée une fois la masse des fragments N-terminaux trouvée par spectrométrie de masse.

En rapportant les masses moléculaires des fragments C-terminaux trouvés à celle de la chaîne polypeptidique de la POR, et en l'alignant du côté C-terminal de la protéine, il est alors possible de déterminer les sites de coupures probables de la protéine (tableau 2.3).

En complément à nos mesures des sites de dégradation par spectrométrie de masse, Derren Heyes, notre collaborateur de l'université de Sheffield, a étudié par séquençage N-terminal la protéine dégradée. Il a obtenu trois sites de coupure (tableau 2.4), qui concernent tous trois un résidu phénylalanine hautement conservé.

L'examen du tableau 2.3 permet de suggérer que la POR subit une protéolyse après les résidus Phe233, Phe240 et Leu246 (éventuellement de Pro245). Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus par Derren Heyes par séquençage N-terminal (Phe240, Phe244 et Phe247). Toutefois, on observe que la bande correspondant au fragment C-ter1 est plus large que les deux autres (et l'incertitude de la mesure est également

Site de coupure	PM Da	Écart
Leu232	10414.8	+127.8/C-ter3
Phe233	10267.7	-19.3/C-ter3
Arg234	10111.5	-175.5/C-ter3
Leu239	9479.7	+147.7/C-ter2
Phe240	9332.6	+0.6/C-ter2
Gln241	9204.4	-127.6/C-ter2
Lys242	9076.3	-255.7/C-ter2
Leu243	8963.1	+341.1/C-ter1
Phe244	8815.9	+193.9/C-ter1
Pro245	8718.8	+96.8/C-ter1
Leu246	8605.5	-16.3/C-ter1
Phe247	8458.5	-163.5/C-ter1
Gln248	8330.3	-291.7/C-ter1

TAB. 2.3 – Poids moléculaire (PM dans le tableau) de différents fragments C-terminaux de la POR, avec l'écart en Da au poids moléculaire des fragments mesurés par spectrométrie de masse. Les masses indiquées correspondent à un fragment coupé après le site de coupure.

Sites de coupure		
Site1	Site2	Site3
Phe240	Phe244	Phe247

TAB. 2.4 – Sites de coupure obtenus par séquençage N-terminal



FIG. 2.8 – Alignement de séquence de différentes POR. La zone sensible au clivage est surlignée en vert. Les composés phénylalanine sont notés par F. Sur la dernière ligne, le symbole * signifie l’identité et le symbole : la similarité.

plus grande (82 Da contre 62 et 64 Da pour les fragments C-ter2 et C-ter3). Il est en fait probable que cette bande corresponde au mélange de deux fragments correspondant à une coupure après Phe244 (PM attendue 8815,9 Da) et Phe247 (Poids moléculaire attendu : 8458,5 Da). Un mélange des deux en proportions égales pourrait générer un signal en spectroscopie de masse correspondant à 8637,2 Da (soit 15,2 Da de plus que l’estimation de C-ter3).

2.2.4 Discussion

Les résultats obtenus par spectrométrie de masse et par séquençage N-terminal sont globalement cohérents et permettent d’identifier une zone de la protéine particulièrement sensible au clivage par les protéases. Les sites obtenus par séquençage N-terminal concernent des résidus phénylalanine conservés chez toutes les POR (figure 2.8).

L’analyse de la répartition des sites de coupure sur le modèle de la POR construit par homologie [Townley et al., 2001] conduit à formuler plusieurs hypothèses. La région clivée correspond aux hélices α -9 et α -10 (figure 2.9). La zone particulièrement sensible à la protéolyse est représentée en noir et contient quatre résidus phénylalanine (dont les chaînes latérales sont représentées en rouge) figurant les sites potentiels de coupure par la chymotrypsine. La partie représentée en vert correspond au fragment N-terminal de 25 à 29 kDa observé avec les gels SDS et la partie grisée au fragment C-terminal de 8 à 10 kDa. On notera que le site de fixation de la Pchl_{id}e est situé entre les parties vertes et noires, ce qui, si le modèle est juste, explique pourquoi la



FIG. 2.9 – Illustration des résultats obtenus par spectrométrie de masse sur le modèle tridimensionnel de la POR. Les quatre résidus phénylalanine (Phe233, 240, 244, 247) sont représentés en rouge, la zone sensible au clivage est en noir, la partie N-terminale est en vert et la partie C-terminale est en grisé. La Pchlde est en vert foncé et le NADPH en bleu. Les deux structures sont tournées de 135° . Structures construites avec le modèle proposé par Townley [Townley et al., 2001].

protéine est inactive après protéolyse. De même, les résidus phénylalanines cibles du clivage sont exposés au solvant en bordure de la protéine, et donc particulièrement sensibles aux agressions extérieures.

Ces positions de coupure des phénylalanines sont compatibles avec la séquence de reconnaissance de la chymotrypsine, une protéase à sérine relativement commune. Le clivage par la chymotrypsine constitue donc une hypothèse permettant d'expliquer la dégradation de la POR. Cette protéase ne contenant pas de zinc, il s'agirait donc d'un mécanisme protéolytique différent de celui mis en évidence lors des expériences de dégradation en présence d'EDTA. Une nouvelle expérience étudiant le phénomène de clivage de la POR en présence d'un inhibiteur de la chymotrypsine, la chymostatine, a donc été réalisée à Sheffield.

L'effet de l'inhibiteur de protéase est drastique, puisque il stoppe la dégradation en maintenant la bande correspondante à un niveau constant pendant le mois d'incubation. La bande de dégradation initiale résulte seulement de

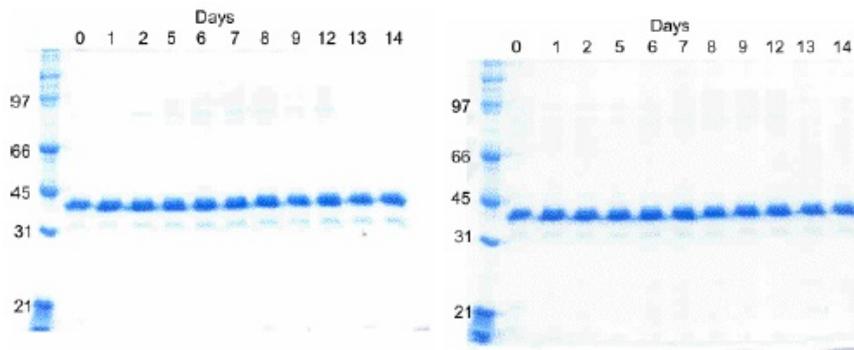


FIG. 2.10 – Gels de dégradation de la POR. De gauche à droite : POR seule, POR + chymostatine. Gels réalisés par Derren Heyes.

la période qui a suivie la purification et où la protéine a pu être attaquée par la protéase. Ce résultat mis en parallèle avec celui obtenu avec de l'EDTA semble donc montrer que la protéine peut être sujette à plusieurs mécanismes protéolytiques distincts.

Le mécanisme de dégradation de la POR semble être un mécanisme partagé entre plusieurs organismes, et plusieurs protocoles de purification différents. Des gels de POR de *Synechocystis* fusionnée avec une étiquette MBP [Townley et al., 1998], ou encore ceux de la PORA de l'orge (communication personnelle de S. Reinbothe et M. El bakouri) présentent eux aussi des bandes de dégradation situées aux alentours de 29 kDa.

2.2.5 Stratégie et perspectives

Nos collaborateurs de l'université de Sheffield ont produit une protéine mutée, où les trois résidus phénylalanines sensibles au clivage ont été remplacés par des isoleucines. La phénylalanine et l'isoleucine ont un encombrement stérique équivalent et sont deux acides aminés hydrophobes, mais l'isoleucine n'est pas sensible au clivage par la chymotrypsine. Cette protéine mutée s'est malheureusement révélée être inactive, et qui plus est sensible au même phénomène de dégradation que la POR native.

Les développements menés actuellement concernent la synthèse de la POR sous la forme d'une protéine de fusion. La fusion d'une protéine avec une étiquette d'affinité encombrante, comme la protéine affine du maltose (MBP, les résultats de Townley ne semblent toutefois pas concluants [Townley et al., 1998]), la thiorédoxine (TRX) ou la glutathione-*S*-transférase (GST) est avantageuse dans bien des cas. Elle permet d'augmenter l'expression dans les cas difficiles, de protéger contre la protéolyse ou encore de faciliter la purification grâce à la chromatographie d'affinité.

L'incorporation en C-terminal d'une étiquette de fusion pourrait donc stabiliser la POR et éviter l'étape de dégradation. Les premiers essais de purification ont été menés avec une étiquette GST. La cristallisation des protéines de fusion est rendue difficile par l'hétérogénéité introduite par l'étiquette, et il est souvent nécessaire de la cliver. Récemment, les premières structures de protéines de fusion avec leurs étiquettes ont été rapportées (revue par Smyth [Smyth et al., 2003]). Dans ces cas, une nouvelle stratégie utilisant une courte chaîne d'acides aminés a été utilisée pour rigidifier la liaison entre la protéine et l'étiquette. Une fois la protéine de fusion cristallisée, sa résolution structurale peut être facilitée en utilisant la structure de l'étiquette comme modèle de remplacement moléculaire. C'est le développement le plus prometteur à l'heure actuelle dans la cristallisation de la POR.

Nos collaborateurs anglais viennent de réussir à produire une protéine de fusion avec la GST, mais celle-ci s'est avérée être sensible aux mêmes sites de coupure. Les derniers développements visent à produire une protéine de fusion avec comme étiquette la MBP et la TRX.

2.3 Essais de cristallisation

Les essais de cristallisation de différentes préparations de protéine (*Synechocystis*, *T. elongatus*, avec ou sans étiquette polyhistidine) fournies par notre collaborateur ont été effectuées par la technique de diffusion de vapeur en gouttes suspendues.

2.3.1 Matériel et méthode

Principe de la cristallisation en goutte suspendue

Le principe de cristallisation d'une protéine est de porter progressivement une solution de la protéine dans un état de sursaturation, provoquant ainsi la nucléation, puis la croissance des cristaux. La solubilité d'une macromolécule est fonction de nombreux paramètres tels que sa concentration, le pH, la température, la force ionique, l'effet d'additifs, d'agents précipitants... La cristallisation est un compromis entre les facteurs thermodynamiques (solubilité) et cinétiques (nucléation et croissance cristalline). Lors de la cristallisation, la concentration de la macromolécule augmente jusqu'à atteindre la zone de nucléation favorable à l'obtention de cristaux [A-B]. Lors de la croissance des cristaux, la concentration de la solution diminue jusqu'à atteindre la limite de la courbe de solubilité [B-C] (figure 2.11).

La méthode la plus commune pour la cristallogénèse est celle de la goutte suspendue. Une solution réservoir (d'un volume de l'ordre du millilitre) conte-

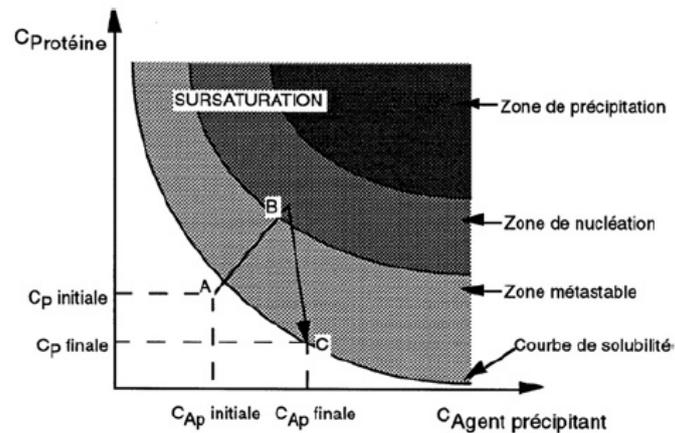


FIG. 2.11 – Diagramme de phase d'une protéine. Par diffusion de vapeur, de la goutte vers le réservoir, on se déplace du point A au point B. Après formation des cristaux, le reste de la solution se retrouve au point C.

nant un agent précipitant, un tampon et éventuellement des additifs est mise à équilibrer avec une goutte contenant de la protéine et les mêmes éléments que le réservoir mais moins concentrés (le plus souvent d'un facteur deux). La goutte (d'un volume de l'ordre du microlitre) est déposée sur une lamelle en verre siliconé et l'étanchéité du dispositif est assurée grâce à de la graisse de silicone (figure 2.12) (plaques Hampton) ou un joint en polymère (plaques Nextal).

Des échanges de vapeur ont lieu de la goutte vers le réservoir. La goutte étant initialement plus diluée en agent précipitant que le réservoir une évaporation progressive se produit par échange de vapeur d'eau, pour favori-

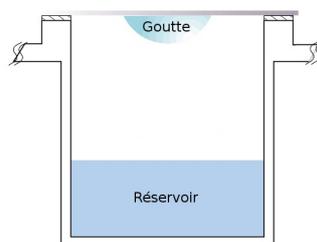


FIG. 2.12 – Schéma de principe de la cristallisation par la méthode de la goutte suspendue. L'équilibre se fait par diffusion des agents volatiles de la goutte vers le puits jusqu'à ce que la concentration du précipitant soit identique dans les deux.

ser l'établissement de l'équilibre thermodynamique. L'état de sursaturation s'établit donc progressivement en augmentant simultanément la concentration de la protéine et de l'agent précipitant, ce qui peut conduire à l'obtention de cristaux.

Techniques expérimentales

Les essais de cristallisation sont classiquement réalisés en utilisant des kits regroupant des conditions ayant montré leur efficacité pour d'autres protéines. Pour éviter cette tâche fastidieuse de recherche des premiers germes cristallins, des robots ont été mis au point qui automatisent la réalisation des boîtes de cristallisation. Deux types de robots existent. Les robots microgouttes (comme celui disponible à l'IBS, de type Tecan) mélangent 1 μl de protéine avec 1 μl de solution du puits. Les plaques utilisées sont des plaques Greiner comportant 96 puits, chacune pouvant servir à déposer 3 gouttes distinctes. Il est donc possible de tester 288 conditions par plaque. Les robots nanogouttes (comme celui disponible à l'EMBL, de type Cartesian) procèdent d'un principe similaire, mais avec des dépôts de protéine dix fois plus faibles (jusqu'à 200 nl).

2.3.2 Essais de cristallisation

Démarche expérimentale

Pour cristalliser la POR, j'ai d'abord essayé des conditions très ciblées, exploitant les résultats déjà obtenus sur les protéines les plus similaires en séquence. La deuxième phase a été beaucoup plus large, utilisant les kits de cristallisation disponibles sur le marché. La troisième phase a consisté à tenter de résoudre les problèmes posés par la dégradation de la protéine.

Les premiers essais de cristallisation ont été menés sur la POR de *Synechocystis*. En réalisant un alignement de séquences entre celle de la POR et toutes celles de la PDB¹ avec le logiciel FASTA [Pearson and Lipman, 1988], j'ai pu déterminer les protéines qui présentaient la plus grande homologie de séquence.

La carbonyle réductase du porc obtient un score de 44 dans FASTA, avec une identité de 26% et une similarité de 54% pour 288 acides aminés. Les cristaux ont été obtenus [Ghosh et al., 2001] avec 36% de sulfate d'ammo-

¹La Protein Data Bank (PDB) regroupe les fichiers des coordonnées atomiques des macromolécules biologiques dont la structure a été résolue par cristallographie aux rayons X, diffusion de neutrons ou d'électrons, RMN, ou encore proposée par modélisation de dynamique moléculaire.

nium saturé et 10 mM de MES à pH 6. La mannitol déshydrogénase (MtDH) de *Agaricus bisporus* obtient un score de 39 dans FASTA avec 28% d'identité et 57% de similarité pour 265 acides aminés. Les cristaux ont été obtenus [Hörer et al., 2001] pour une concentration de 10 mg/ml de protéine en présence de Tris à pH 7.5, de 18% de PEG 4000 et de 9% de 2-propanol, à partir des kits Hampton. J'ai donc réalisé des boîtes de cristallisation autour de ces conditions.

J'ai ensuite utilisé les facilités offertes par les robots de cristallisation et testé tous les kits de cristallisation classiques, à différentes concentrations de protéine et en présence ou en absence du cofacteur (NADPH), qui peut être un élément de stabilisation de la protéine et donc faciliter la cristallisation.

La troisième phase des essais de cristallisation a consisté à lutter contre la dégradation de la protéine que nous avons caractérisé parallèlement grâce à la migration sur gels et à la spectrométrie de masse. Plusieurs techniques ont été envisagées :

1. Une co-cristallisation en présence du substrat, pour stabiliser la protéine et ralentir sa dégradation. La Pchl_{ide} est classiquement soluble dans le méthanol, aussi connu pour être un excellent précipitant des protéines. Il a donc fallu solubiliser la Pchl_{ide} dans un nouveau solvant, le DMSO [Klement et al., 1999]. Les tentatives de cristallisation de la POR sous forme de complexe ternaire n'ont pas apportées d'amélioration substantielle aux résultats déjà obtenus.
2. La cristallisation à 4 ° C. L'étude de la dégradation par gel ou spectrométrie de masse a montré que la protéine était plus stable à 4 ° C. Tous les essais de cristallisation ont donc été par la suite menés en chambre froide.
3. L'utilisation d'une souche thermophile de la POR. Notre collaborateur Derren Heyes a purifié la POR à partir d'une cyanobactérie thermophile *T. elongatus*. Les études sur sa dégradation à température ambiante et à 4 ° C ont montrées que cette POR était moins sensible à la dégradation que celle de *Synechocystis*. Les essais de cristallisation ont donc exclusivement concerné cette souche par la suite.
4. La mutagenèse dirigée. Une première hypothèse concernant la dégradation de la POR situait la source d'hétérogénéité au niveau de la boucle supplémentaire qui la différencie des autres protéines appartenant à la famille des alcools déshydrogénases à chaîne courte. Nos collaborateurs anglais ont essayé de la purifier sans cette boucle, sachant que chez la POR de l'orge l'activité est conservée même en son absence [Reinbothe et al., 2003b]. Il a toutefois été impossible de solubiliser la POR mutée de *T. elongatus*.
5. Une cristallisation sans étiquette polyhistidine. Après la purification,

nous avons utilisé la thrombine pour cliver l'étiquette.

6. L'utilisation d'antiprotéases adaptées. Les expériences de spectrométrie de masse ayant permis d'établir que la zone dégradation correspondait à la séquence de reconnaissance d'une protéase, la chymotrypsine, des essais de cristallisations ont été réalisées en présence d'un inhibiteur de celle-ci, la chymostatine. D'autres expériences ont été menées en présence d'EDTA.

Résultats

Les résultats de ces essais n'ont pas conduit à des cristaux. Quelques pistes encourageantes ont bien pu être déterminées, mais l'affinement des conditions n'a jamais été concluant. Le phénomène de clivage de la protéine, et l'hétérogénéité moléculaire qui s'en-suit, prenant toujours le dessus et empêchant toute cristallisation.

2.3.3 Perspectives

Les développements ultérieurs semblent devoir provenir d'un meilleur contrôle du phénomène de clivage de la protéine. Les pistes explorées à l'heure actuelle passent toutes par une adaptation du processus de purification pour obtenir une protéine plus pure et plus stable, soit par une refonte complète du protocole de purification, soit par l'utilisation de protéines de fusion. Une autre solution pourrait provenir de la suppression de la phase de congélation/décongélation nécessaire pour le transport de l'enzyme depuis Sheffield. Deux solutions seraient envisageables : une précipitation au sulfate d'ammonium de la POR, ou la réalisation de la purification à Grenoble, les essais de cristallisation pouvant alors s'enchaîner directement après, sans stockage. Dans tous les cas la sensibilité à l'action des protéases de la POR nécessite le travail à 4 ° C et l'emploi d'un cocktail d'antiprotéases adapté.

Chapitre 3

Études biophysiques

3.1 Matériel et méthodes

Toutes les études spectroscopiques réalisées dans ce travail ont été conduites sur le microspectrophotomètre situé au laboratoire Cryobench (ESRF, Grenoble). Les microspectrophotomètres ont été développés pour répondre aux contraintes imposées par les études spectroscopiques sur les cristaux, particulièrement pour pouvoir suivre l'activité d'une protéine cristallisée. Les premiers à avoir développé un tel outil ont été Andrea Hadfield et Janos Hajdu [Hadfield and Hajdu, 1993], et c'est en s'inspirant de ce modèle qu'a été construit la première version du Cryobench [Bourgeois et al., 2002]. Depuis 2004 une nouvelle version aux capacités optimisées est opérationnelle au laboratoire (figure 3.1).

3.1.1 Spécifications du Cryobench

Le microspectrophotomètre est composé de trois objectifs (à des positions relatives de 0, 90 et 180 degrés) qui entourent une tête goniométrique. L'échantillon, monté sur un porte-boucle équivalent à ceux utilisés sur les lignes de lumière des synchrotrons utilisés en cristallographie des protéines, est placé sur cette tête goniométrique et centré pour les trois objectifs. Le complément de visualisation nécessaire au centrage est fourni par un microscope placé dans le même plan que les objectifs. Le fonctionnement correct du système impose donc une grande précision de centrage et de focalisation.

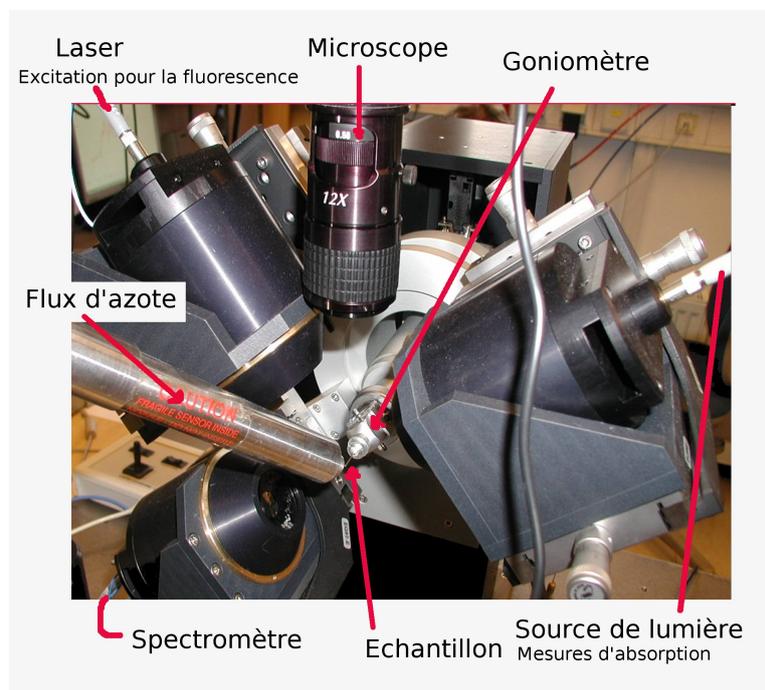


FIG. 3.1 – Photo du Cryobench.

Optique

Les objectifs sont constitués de deux miroirs réfléchissants montés en vis-à-vis, dans une disposition proche de celle utilisée pour les télescopes, qui minimise les aberrations sphériques et chromatiques. La distance libre entre chaque objectif et l'échantillon est de 50 mm. La lumière est collectée et acheminée aux objectifs par des fibres optiques (connectique SMA) dont le diamètre peut varier entre 10 et 800 μm de manière routinière. Le diamètre du point focal est environ égal au quart de celui de la fibre. Avec une fibre de 100 μm de diamètre en entrée, on obtient une transmittance locale supérieure à 90% à travers un trou d'un diamètre de 30 μm . Les objectifs sont montés sur des platines micrométriques (réglages en X, Y et Z indépendants à $\pm 5 \mu\text{m}$) permettant d'ajuster leur coaxialité.

Le microspectrophotomètre est conçu pour être fonctionnel sur un large spectre UV-visible [250-850 nm] en minimisant les aberrations chromatiques. La transmission globale est supérieure à 10% entre 250 et 400 nm, et à 20% entre 400 et 750 nm. En entrée de chaque objectif des porte-filtres sont disponibles, permettant d'adapter le spectre utile aux expériences réalisées.

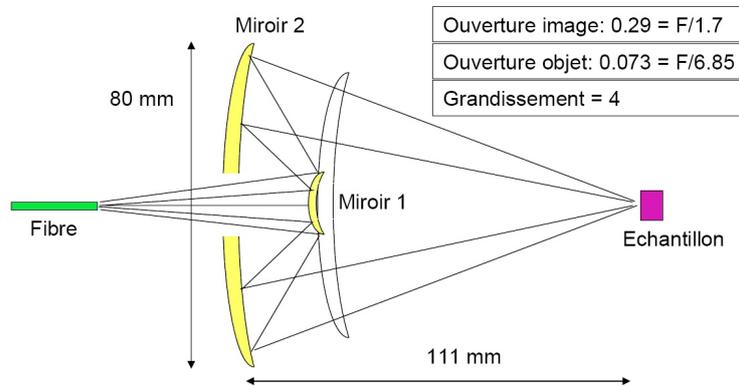


FIG. 3.2 – Schéma représentant les propriétés optiques des objectifs utilisés sur le Cryobench.

Mécanique

Le goniomètre est compatible avec les diffractomètres des lignes de lumière, permettant ainsi une interopérabilité entre les deux environnements. La sphère de confusion est très précise (évaluée à $12 \pm 3 \mu\text{m}$ pour une rotation de 360°).

L'axe Z et la rotation ϕ sont motorisés : course de 25 mm avec une précision meilleure que $1 \mu\text{m}$ en translation et vitesse jusqu'à 10 tours/s avec une précision supérieure à 0.2° (1 pas fait 0.18°) en rotation.

Visualisation

La visualisation est réalisée grâce à un microscope couplé à une caméra CCD couleur. La résolution spatiale est inférieure à $5 \mu\text{m}$. Les champs observables à l'écran sont respectivement de $5.5 * 4.1 \text{ mm}$ en zoom minimum et $450 * 340 \mu\text{m}$ en zoom maximum.

Spectromètre

C'est une carte d'acquisition placée dans un PC (PC-2000, Ocean Optics). Il est composé d'une fente de $50 \mu\text{m}$, d'un réseau de 600 lignes/mm et d'une cellule CCD de 2048 pixels. Le spectre couvert va de 200 à 850 nm, en assurant une résolution de 2.3 nm. Le signal est numérisé sur 12 bits et le rapport signal sur bruit est supérieur à 500 à saturation.

Contrôle en température

La température des échantillons placés sur la tête goniométrique peut être contrôlée finement avec une source de froid (Oxford Instruments, 600 series). Pratiquement, un flux d'azote gazeux à la température comprise entre 100 et 293 K est délivré sur l'échantillon. Le contrôle en température est réalisé sur le flux d'azote, et calibré de telle sorte que la température donnée par le contrôleur soit celle à 1 cm de la sortie de la buse. La cinétique maximale est de 360 K/heure, permettant de réaliser des rampes de température relativement rapides.

Contrôle général des expériences

Le contrôle des expériences est centralisé et synchronisé depuis un unique ordinateur PC. Une interface LabVIEW spécialement développée permet de contrôler efficacement tous les paramètres expérimentaux (mécanique, visualisation, spectromètre et température) et facilite par la suite le traitement des données en les sauvegardant sous une forme adaptée.

3.1.2 Études en solution

Le Cryobench est destiné aux études sur des cristaux de protéines. Dans le cadre de nos études sur le mécanisme catalytique à basse température de la POR, et sur le couplage entre l'activité et les transitions de phase dans le solvant, nous avons travaillé en solution. Ces études ont aussi pour objectif de reproduire au plus près les protocoles utilisés en cristallographie cinétique, afin de mieux connaître le système biologique et de préparer des études sur d'éventuels futurs cristaux. Une première étape a donc été d'adapter le Cryobench à ces études en solution, afin de tirer pour celles-ci tous les avantages d'un microspectrophotomètre.

Solubilité des composants

Les études sont réalisées sur de la POR dans son tampon d'activité à basse température. La Pchl_{id}e est peu soluble dans l'eau mais parfaitement dans le méthanol. Comme le méthanol est aussi connu pour faire précipiter les protéines, il faut minimiser sa concentration. Pour éviter que la Pchl_{id}e en solution ne forme des agrégats modifiant son affinité et ses propriétés spectroscopiques, on utilise un détergent, le Genapol. La figure 3.3 présente le spectre d'absorption de la Pchl_{id}e dans trois solvants différents. En pratique on choisit de solubiliser la Pchl_{id}e (typiquement à 1 mM) dans un mélange de méthanol (90%) et de Genapol (10 %). Le Genapol assure que même

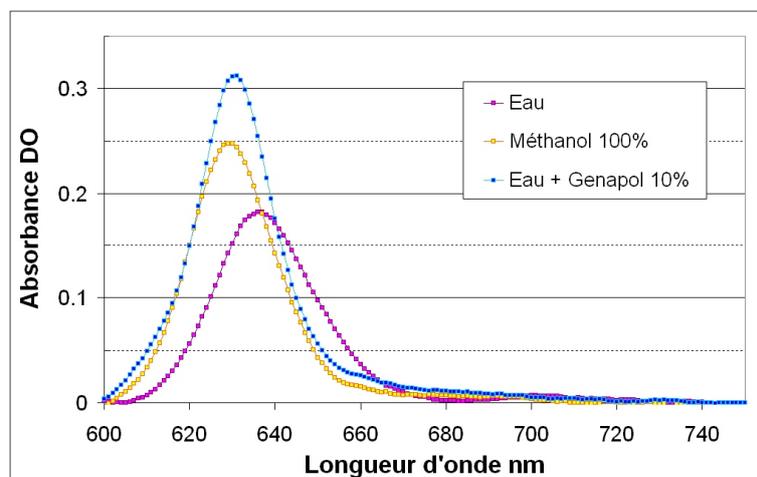


FIG. 3.3 – Spectres d'absorption de la Pchlride en fonction de son solvant. Chemin optique de 1 cm. Concentration de Pchlride de 0.011 mM.

en solution aqueuse la Pchlride restera soluble. Cette solution de Pchlride est suffisamment diluée quand on la mélange à la POR pour que le méthanol ne fasse pas précipiter la protéine.

Pour éviter la formation de glace cristalline lors du refroidissement quasi-instantané de la solution à 100 K, on augmente la viscosité de la solution avec un mélange de glycérol et de sucrose, le sucrose ayant un effet bénéfique sur l'activité de la protéine. La composition typique du **tampon d'activité basse température** est donc de :

- 50 mM Tris pH 7.5
- 0.1% (v/v) Genapol X-080
- 0.1% (v/v) β -mercaptoéthanol
- entre 25 et 40% de glycérol
- 12.5% de sucrose

Adaptation du Cryobench aux études en solution

Pour réaliser des études sur des échantillons en solution, nous avons adapté au microspectrophotomètre un protocole spécifique. La tête goniométrique a été initialement dessinée pour recevoir des cristaux montés dans des boucles. Celles-ci sont constituées par un support magnétique (Hampton Research) qui se fixe sur la tête goniométrique. Le cristal est monté à 18 mm du support au bout d'une tige, puis est placé au centre des trois objectifs.

Pour pouvoir travailler en solution, nous avons adapté les supports magnétiques pour qu'il soit possible de fixer des microcapillaires à la place des

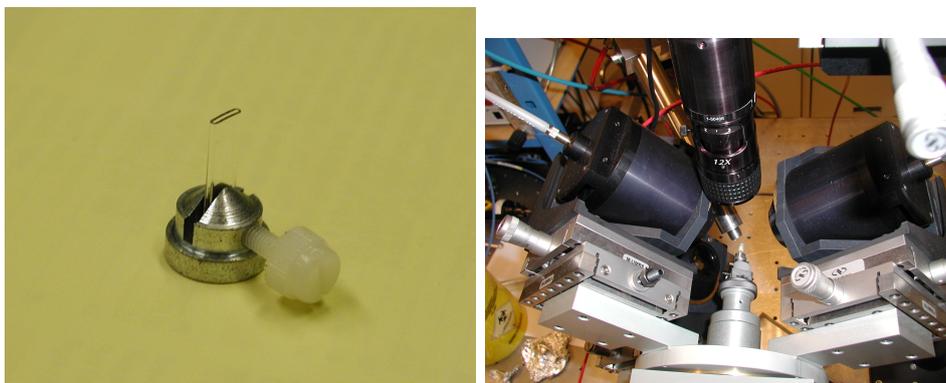


FIG. 3.4 – Montage pour les expériences d'absorption en capillaires. À gauche, le porte échantillon avec un capillaire monté. À droite, l'échantillon monté sur la tête goniométrique.

boucles et de leurs tiges. Ceux-ci (référence VD 2540-100, trajet optique de 0.4 mm, dimension extérieure de 1.2 * 4.8 mm, CAMLAB, UK) sont utilisables pour des volumes de l'ordre du microlitre. Il en existe de plus petite taille, mais, aux concentrations utilisées, le trajet optique est trop faible pour obtenir une densité optique (DO) suffisante. Les capillaires de plus petite taille peuvent par contre être utilisés pour la spectroscopie de fluorescence. Le support magnétique est usiné de manière à créer une fente dans laquelle le capillaire est glissé (figure 3.4). La solution initialement déposée sur une lamelle monte ensuite par capillarité dans celui-ci.

Les avantages procurés par l'utilisation du Cryobench, par rapport à l'utilisation d'un spectromètre classique et d'un cryostat, pour des études en solution sont les suivants :

- Le Cryobench permet de travailler sur de très petits échantillons (volumes nettement inférieurs au microlitre), et donc de consommer peu de protéine et de substrat. De plus, les faibles volumes permettent de mieux contrôler la cinétique à basse température, en réduisant l'inertie thermique du système. Cette question est très importante quand on veut réaliser le refroidissement quasi-instantané (« flash cooling ») d'un échantillon.
- Le Cryobench permet aussi un contrôle en température précis de l'échantillon, et donc du déroulement d'une réaction enzymatique en jouant sur l'énergie thermique disponible.
- Le Cryobench offre la possibilité d'exploiter toutes les sources de lumière disponibles au laboratoire qui possèdent des connections SMA : des lasers (266 nm et 5.2 mW, 355 nm et 6 mW, 440 nm et 11 mW, 532 nm et 25 mW) et des lampes blanches (xénon, halogène, deutérium)

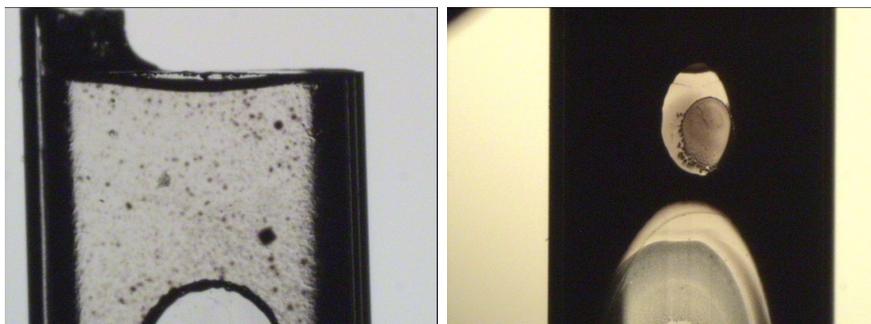


FIG. 3.5 – Capillaires à 100 K après le refroidissement quasi-instantané, à gauche en cas de formation de la glace amorphe, à droite en cas de formation de glace cristalline.

pour réaliser les spectres d'absorption, de fluorescence ou l'excitation des échantillons photoactivables.

3.1.3 Méthodologie pour les expériences en solution

Les expériences en solution suivent un protocole proche de celui décrit pour celles de cristallographie cinétique des protéines en « freeze-triggering ». Pour figer toute réaction, les capillaires sont rapidement montés sur la tête goniométrique dans un flux d'azote à 100 K. En contrôlant la viscosité de la solution, il est possible d'obtenir un état amorphe par refroidissement quasi-instantané (« flash cooling »). Si la viscosité est trop faible, ou la vitesse de refroidissement trop lente, on obtient de la glace cristalline dans les capillaires (figure 3.5). Le contrôle visuel de l'état de la solution est aisé.

Dans le cadre des études sur la réduction de la Pchl_d par la POR, un paramètre important est la photosensibilité de la réaction. Le mélange ternaire est réalisé à température ambiante dans le noir. La solution dans le capillaire est ensuite refroidie rapidement à 100 K, toujours dans le noir, dans le flux d'azote pour former un état amorphe, à cette température la réaction est bloquée. Il est alors possible de déclencher la réaction en éclairant l'échantillon et de mesurer son évolution par spectroscopie UV-visible.

Spectroscopie d'absorption

Deux objectifs sont utilisés, en vis-à-vis, de telle sorte que le faisceau lumineux soit perpendiculaire au plus grand côté du capillaire. Le spectre de référence est pris en décalant légèrement le point de focalisation, dans une zone du capillaire où il n'y a pas de solution. Différentes lampes poly-

chromatiques (xénon, deutérium ou halogène) sont utilisées comme sources de lumière. Les expériences peuvent être réalisées à toute température comprise entre 100 et 293 K. Pour déclencher la réaction pendant les mesures d'absorption et délivrer la lumière actinique, on utilise un porte fibre qui maintient la fibre à proximité du capillaire sans l'interface d'un objectif. Cette méthode permet d'éclairer un échantillon sur une large surface (le diamètre du faisceau incident est alors fonction de celui de la fibre et de sa distance à l'échantillon). Pour minimiser les hétérogénéités de densité lumineuse générées par la géométrie du système, on utilise une fibre de 600 μm pour acheminer la lumière sur l'échantillon, et une fibre de 100 μm pour la recueillir et la conduire jusqu'au spectromètre. Dans ce cas, la puissance délivrée sur l'échantillon par la source xénon de lumière blanche est d'environ $1 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$.

Spectroscopie de fluorescence

C'est le protocole le plus simple. En théorie, deux objectifs sont suffisants, à 90 ° l'un de l'autre, de telle sorte que le faisceau lumineux incident diffuse le moins possible vers l'objectif du spectromètre. Pratiquement, cette géométrie pose des problèmes de correspondance entre le volume sondé par le spectromètre et celui illuminé par le laser. On utilise donc souvent les deux objectifs en vis à vis, en protégeant l'objectif de réception avec un filtre coupant la longueur d'onde du laser utilisé. Ce dernier est adapté au spectre d'excitation de fluorescence de la protéine. Les expériences peuvent être réalisées à toute température comprise entre 100 et 293 K. Pour exciter la fluorescence on utilise un laser bleu à 440 nm atténué avec un filtre neutre, qui délivre une puissance de 1 mW en sortie d'une fibre de 600 μm . En prenant en compte la transmittance du système, cette puissance équivaut donc à $0.004 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$ sur l'échantillon.

TDAM (expériences d'absorption en fonction de la température)

Les expériences dérivées en température permettent de suivre l'évolution de la réaction, et donc la formation des différents états intermédiaires, en fonction de la température. On obtient une série de spectres, la résolution étant classiquement de 0.1 K entre chaque acquisition.

Pour l'étude de la réduction de la Pchl_a par la POR, on utilise les trois optiques simultanément. L'une d'entre elles (ou le porte fibre) sert à déclencher la réaction, avec un laser ou une lampe blanche. Les deux autres permettent, pendant la même période, d'acquérir un spectre d'absorption. Cependant, ces actions ne doivent pas se superposer exactement pour éviter une contamination du spectre d'absorption par les composantes diffusées

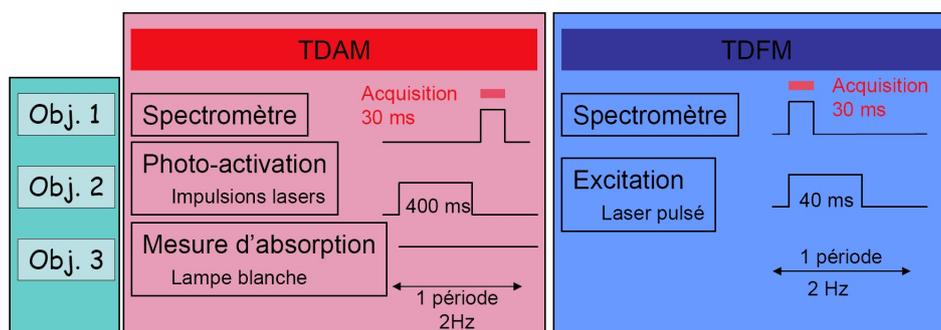


FIG. 3.6 – Protocoles d'études en TDFM et en TDAM, avec les différents composants branchés sur chaque objectif et la synchronisation appliquée.

de la source déclenchant la réaction. Le spectromètre et la source excitatrice sont donc synchronisés avec un ordinateur, alors que la lampe blanche utilisée pour les spectres d'absorption reste allumée en permanence (figure 3.6).

TDFM (expériences de fluorescence en fonction de la température)

Un autre type d'expérience peut être réalisé en spectroscopie de fluorescence. On utilise deux objectifs : l'un pour l'excitation de fluorescence, l'autre relié au spectromètre. Il importe de minimiser la durée d'exposition à la lumière excitatrice fournie par le laser (pour éviter les phénomènes de photo-blanchiment). Le temps d'acquisition du spectromètre en mode synchronisé est fixe (30 ms). On choisit toujours une durée d'excitation de fluorescence légèrement supérieure pour être sûr de recueillir tout le signal de fluorescence (figure 3.6). Ces spectres de fluorescence sont acquis au fur et à mesure qu'une rampe de température se déroule.

Pour l'étude de la réduction de la Pchl_a, la TDFM est limitée par le fait que le laser utilisé pour l'excitation de fluorescence déclenche aussi la réaction, malgré les précautions (exposition limitée à 30 ms, puissance limitée). Ce type de protocole est donc surtout utilisé pour les expériences sur les fluorophores exogènes, afin de suivre les transitions de phase dans un solvant.

3.1.4 Traitement des spectres

Les spectres de fluorescence et d'absorption sont obtenus avec le logiciel Ocean Optics Base32. Ils sont ensuite traités avec un logiciel de calcul scientifique (IDL). Lors de ce traitement, en plus d'une correction de la ligne

de base par interpolation polynomiale et d'un lissage, plusieurs opérations peuvent être réalisées pour mettre en évidence les phénomènes étudiés.

Calcul des centres de masse

Ce traitement est utilisé pour analyser les spectres obtenus par TDFM sur des fluorophores exogènes en solution. Il permet de suivre les décalages en longueur d'onde qui se produisent lorsque la température augmente, et qui accompagnent les changements de phase.

Le calcul du centre de masse, selon la formule 3.1, permet d'obtenir une valeur pondérée (et donc de réduire le bruit) de la longueur d'onde du maximum d'un spectre de fluorescence, entre deux bornes a et b . La fonction $f(\lambda)$ représente l'amplitude en fonction de la longueur d'onde.

$$cm = \frac{\sum_b^a \lambda i * f(\lambda i)}{\sum_b^a f(\lambda i)} \quad (3.1)$$

Sur les graphes de TDFM, cette valeur est représentée en fonction du temps, en parallèle avec une rampe de température. On obtient ainsi une information sur le décalage du maximum de fluorescence au cours de cette rampe. Empiriquement, on a constaté que ce décalage varie linéairement quand la solution reste dans la même phase, mais qu'une rupture de linéarité se produit lors d'un changement de phase. C'est donc en étudiant les ruptures de linéarité dans la courbe, et en les mettant en correspondance avec les températures auxquelles elles interviennent, que l'on peut déterminer la température des transitions de phase, et en particulier celle de la transition vitreuse (T_g).

Décomposition en valeurs singulières

Cette méthode de traitement des spectres est particulièrement adaptée aux expériences de TDAM telles que nous les pratiquons. Elle permet en effet de déconvoluer les spectres d'absorption résultant d'une superposition des différentes espèces intermédiaires qui apparaissent le long du chemin réactionnel de la POR lorsque l'on augmente la température. Elle permet par la même occasion d'obtenir la dépendance en température de chaque spectre déconvolué, et donc de chaque état intermédiaire associé.

Pour pouvoir utiliser la SVD (SVD pour Singular Value Decomposition, voir les explications en annexe C), il est nécessaire de proposer un modèle cinétique pour modéliser la dépendance temporelle des états intermédiaires. Lors des expériences de spectroscopie couplées avec une rampe de tempéra-

ture, deux phénomènes coexistent : une dépendance en température et une dépendance en temps. On suppose qu'une équation du type donné par la théorie de l'état de transition (équation de Eyring) donne la dépendance de la vitesse de réaction k en fonction de la température (équation 3.2).

$$k = k_0 T \exp \frac{-\Delta G^\#}{RT} \quad (3.2)$$

Pour simplifier les calculs, on postule une réaction de premier ordre non réversible (on néglige k_b par rapport à k_a , ce qui est confirmé par l'expérience) :



La cinétique de consommation de l'espèce A est alors déterminée par l'équation 3.3.

$$\frac{dA(t)}{dt} = -k_a(t)A(t) \quad (3.3)$$

Pour modéliser la disparition de A (ou l'apparition de B), il faut tenir compte du fait que la température est fonction linéaire du temps (avec G le gradient programmé sur le contrôleur de température Oxford).

$$T(t) = T_0 + Gt$$

L'équation différentielle obtenue est une forme non close, impossible à résoudre analytiquement.

$$\frac{dA}{A(t)} = -k_0 T(t) \exp \frac{-\Delta G^\#}{RT(t)} dt$$

On obtient pour la disparition de A en fonction de la température l'équation 3.4.

$$A(t) = A_0 \exp \left[-k_0 \int T(t) \exp \left(\frac{-\Delta G^\#}{RT(t)} \right) dt \right] \quad (3.4)$$

La valeur de $\Delta G^\#$ est le plus souvent fonction de la température car $\Delta G^\# = \Delta H^\# - T\Delta S^\#$. Le paramètre déterminé est donc l'énergie d'activation, le terme entropique étant alors contenu dans une constante pré-exponentielle κ , une constante proportionnelle à k_0 (équation 3.5).

$$A(t) = A_0 \exp \left[-\kappa \int T(t) \exp\left(\frac{-\Delta S^\#}{RT(t)}\right) dt \right] \quad (3.5)$$

Un ajustement des variables réalisé en aval de la SVD permet d'estimer les valeurs de $\Delta H^\#$ et de κ , et de tracer précisément la dépendance temporelle de chacun des états intermédiaires formés au cours de la réaction. Les résultats obtenus avec cette technique sont présentés dans la partie 3.3.

3.2 Mécanisme à basse température

Le premier objectif de ce travail a été de caractériser le mécanisme catalytique de réduction de la Pchl*ide* par la POR à basse température. La réaction est très rapide, de l'ordre de la nanoseconde à température ambiante [Heyes et al., 2003a], et les études sont donc réalisées à basse température pour ralentir la cinétique en utilisant les principes de la cryoenzymologie. Notre collaborateur Derren Heyes a déjà réalisé des études proches, d'abord sur la POR provenant de *Synechocystis* [Heyes et al., 2002, Heyes et al., 2003b] puis sur celle de *T. elongatus* [Heyes and Hunter, 2004].

Toutes nos expériences présentées par la suite ont été réalisées en solution, sur des volumes de l'ordre du microlitre, dans un capillaire et à très basse température sur la POR provenant de *T. elongatus*. Ces conditions expérimentales, outre l'avantage de consommer très peu de réactifs, permettent de reproduire au plus près les protocoles employés dans les expériences de cristallographie cinétique, où les structures sont enregistrées à 100 K et l'avancement de la réaction contrôlé par la température dans une gamme typiquement comprise entre 100 et 200 K. L'utilisation du microspectrophotomètre nous a permis de réaliser des études spectroscopiques en absorbance et en fluorescence. Plusieurs différences existent entre les protocoles que nous avons employés et ceux utilisés dans la littérature : les sources lumineuses utilisées pour déclencher la réaction sont différentes (lampe blanche pour Heyes, lasers de longueurs d'onde et de puissances variables dans notre cas), la température à laquelle l'étape de photo-activation est réalisée diffère elle aussi (160 ou 180 K pour Heyes, à partir de 100 K pour nous). Ces points distincts dans les protocoles expérimentaux permettent d'expliquer les résultats complémentaires et/ou différents obtenus par la suite.

3.2.1 Rappels spectroscopiques sur la réaction

La réduction de la Pchl*ide* en Chl*ide*, catalysée par la POR (figure 3.7), doit être initiée par la lumière. Les intermédiaires réactionnels peuvent être

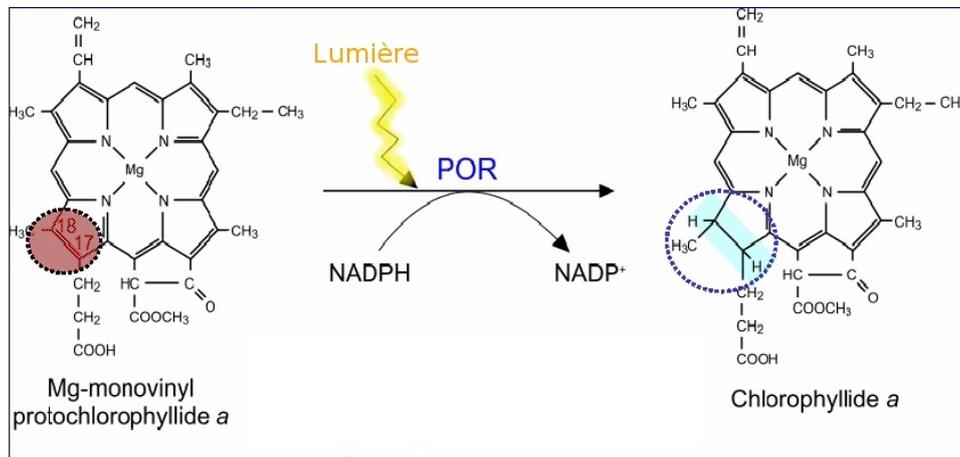


FIG. 3.7 – Réaction de réduction de la Pchlde par la POR.

observés après initiation de la réaction à basse température en contrôlant son déroulement avec une rampe de température.

On peut séparer les différents états spectroscopiques en deux groupes : ceux provenant de la formation d'un complexe entre les substrats ou les produits de la réaction et l'enzyme et ceux résultant d'une réaction chimique à l'intérieur de ce complexe. Le premier état spectroscopique qui se forme dans le noir est le complexe POR-NADPH-Pchlde. Il est caractérisé par un maximum de fluorescence à 644 nm et absorbe à 642 nm (F644/A642). Cet état est stable à toutes températures dans le noir. Au delà d'environ 150 K, et en présence d'une source de lumière blanche de puissance modérée, il est consommé pour former un état non fluorescent qui absorbe à 696 nm (NF/A696). Pour une température supérieure à 190 K, celui-ci donne un deuxième état intermédiaire qui fluoresce à 684 nm et absorbe à 681 nm (F684/A681).

À partir de cet état, les mécanismes divergent entre la POR de *Synechocystis* et celle de *T. elongatus* [Heyes and Hunter, 2004]. Pour *Synechocystis*, le produit est alors relâché sous forme de Chlide libre, dont le maximum de fluorescence est centré sur 674 nm (F674). Au contraire, chez *T. elongatus*, il existe des réarrangements entre les produits de la réaction et l'enzyme qui donnent lieu à la formation d'un nouvel état spectroscopique intermédiaire à une température supérieure à 270 K. Le produit n'est relâché qu'au-delà de 300 K. La figure 3.8 synthétise ces résultats pour la POR de *T. elongatus*.

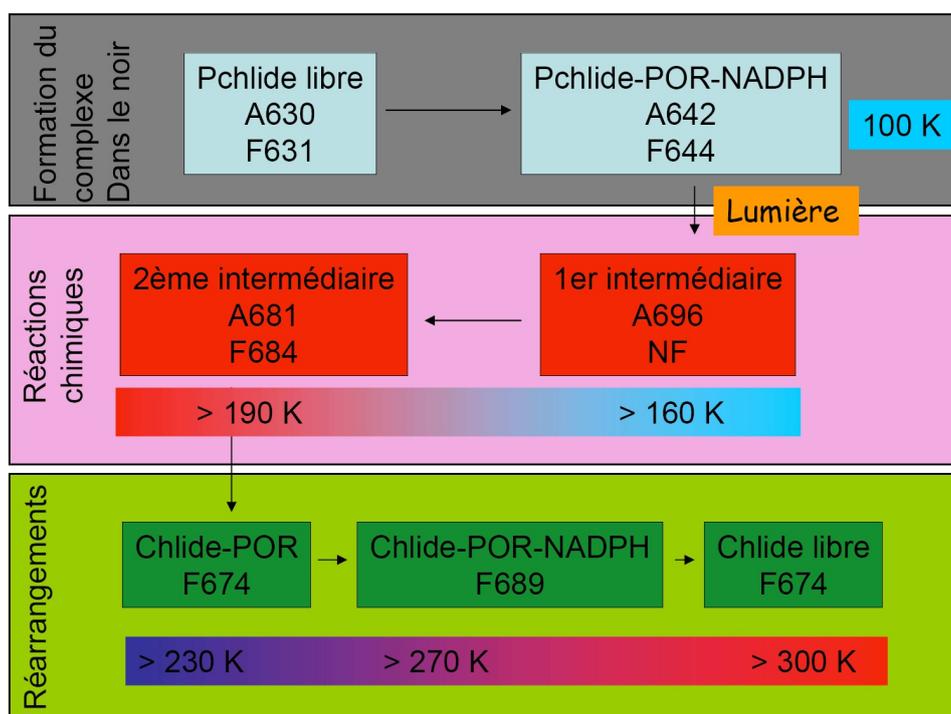


FIG. 3.8 – Détail des états intermédiaires et de leurs propriétés spectroscopiques lors de la réduction de la Pchl *a* par la POR de *T. elongatus*.

3.2.2 Photooxydation de la Pchl_{id}e libre

Les propriétés de fluorescence du complexe ternaire proviennent de la Pchl_{id}e, et des réarrangements de celle-ci quand elle se lie avec la POR et le NADPH. Dans les mélanges réalisés, la proportion entre Pchl_{id}e et POR est de 0,3 : 1, et ce afin de maximiser la quantité de POR complexée tout en minimisant la quantité de Pchl_{id}e libre. Cependant une fraction significative de Pchl_{id}e libre reste toujours présente. Notre première étude a consisté à suivre les propriétés spectroscopiques de la Pchl_{id}e seule dans le tampon d'activité à basse température.

La fluorescence de la Pchl_{id}e est excitée par le laser bleu (440 nm), et une rampe de température est appliquée entre 100 et 270 K.

Les résultats (figure 3.9) montrent que, au delà de 150 K, l'amplitude du pic de fluorescence de la Pchl_{id}e libre (F634) diminue très fortement, un pic de fluorescence à 684 nm (F684_p) apparaissant. L'amplitude de F684_p reste relativement stable au delà de 170 K et ce jusqu'à 270 K. Elle diminue lors d'un plateau de température à 270 K. L'amplitude de F684_p reste beaucoup plus faible que celle de F634 initiale.

La baisse de F634 révèle la consommation de la Pchl_{id}e libre, et la formation de F684_p la formation d'un nouvel état spectroscopiquement distinct. La formation de F684_p qui n'apparaît qu'au delà de 150 K, nécessite une certaine énergie d'activation. La quasi-disparition du pic à 270 K s'explique par le fait qu'à cette température la solution est liquide, permettant la diffusion des molécules. Comme le volume sondé par le spectromètre (moins de 1 nl) est très faible par rapport au volume de l'échantillon, on observe la dilution des molécules F684_p.

Cette expérience a pu être reproduite en lumière blanche et sous exposition à un laser rouge (632 nm). Dans tous les cas, lorsque l'exposition est suffisamment intense et prolongée, il y a formation d'un état de la Pchl_{id}e F684_p. Cet état correspond à un état photooxydé du pigment. Lebedev, confronté à un problème similaire de dégradation du substrat et du produit à température ambiante [Lebedev and Timko, 1999], a réalisé des expériences en atmosphère argon. Il a ainsi réduit drastiquement la disparition des pigments, montrant la dépendance en oxygène de leur dégradation. Il n'a pas noté lors de cette dégradation l'apparition d'un nouveau pic de fluorescence. Nos expériences réalisées à basse température, et l'impossibilité d'observer F684_p à 270 K, permettent donc de proposer que F684_p corresponde à une première étape dans la dégradation du pigment par l'oxygène.

F684_p est gênant pour le suivi des états intermédiaires lors de la réaction de réduction de la Pchl_{id}e par la POR. En effet, ce pic vient se superposer avec le second intermédiaire, qui fluoresce lui aussi à 684 nm. Des expériences

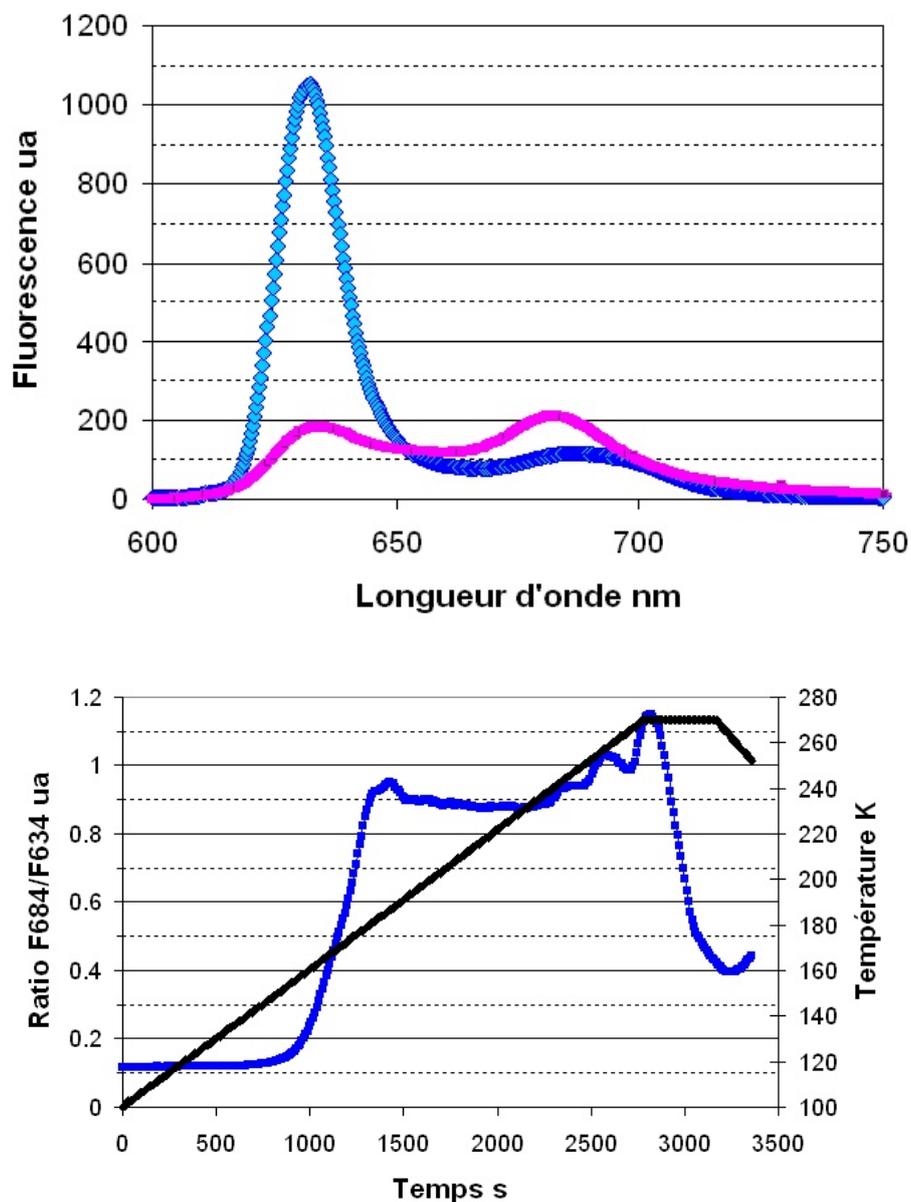


FIG. 3.9 – En haut : comparaison des spectres de fluorescence de la Pchl *a* libre à 100 K (en bleu) et à 270 K après la rampe de température et l'exposition au laser (en rouge). En bas : amplitude du pic F684_p normalisée sur celle du pic de Pchl *a* libre (bleu) et la rampe de température (noire) en fonction du temps. Le laser bleu pulsé (440 nm, 11 mW) assure 350 ms d'illumination pour 1 s d'expérience. Pchl *a* 95 μ M, glycérol 25% (v/v), sucre 12.5% (w/v), 0.1 % Genapol (v/v). Rampe de température à 180 K/h.

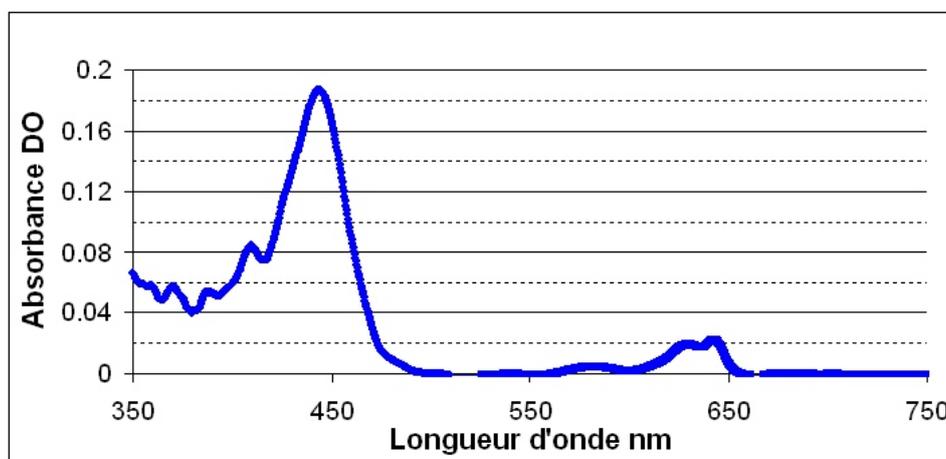


FIG. 3.10 – Spectre d’absorption complet du complexe ternaire à 100 K avant le déclenchement de l’étape photosensible. Pchl_{id} 0.04 mM, NADPH 0.3 mM, POR 0.12 mM, glycérol 25%, sucrose 12.5%.

complémentaires, avec des puissances et/ou fréquences d’illumination plus faibles montrent qu’il est possible de s’affranchir largement de ce phénomène, qui est dépendant de la quantité de lumière reçue. Pour toutes les expériences réalisées par la suite, en présence d’une illumination (avec un laser bleu, rouge ou avec une lampe blanche), et à des températures supérieures à 150 K, il est donc effectué préalablement un test sur de la Pchl_{id} seule dans le tampon d’activité basse température. Lors de celui-ci, on vérifie qu’il n’y a pas formation d’un état photooxydé du pigment qui masquerait les phénomènes étudiés.

3.2.3 Premier état intermédiaire

La première étape du mécanisme de réduction de la Pchl_{id} consiste à consommer le complexe ternaire formé dans le noir qui fluoresce à 644 nm (F644/A642) pour former une espèce non fluorescente et absorbante à 696 nm (NF/A696). Il s’agit de l’étape clef dans le mécanisme de catalyse puisque c’est elle qui nécessite l’énergie lumineuse et rend la réaction photosensible.

L’étude du spectre d’absorption complet (figure 3.10) du mélange ternaire apporte plusieurs informations. Il existe deux bandes d’absorption principales que l’on a nommées par analogie avec les protéines à hème. La première, située dans le bleu autour de 440 nm, est appelée la bande de Soret. La seconde, située dans le rouge, possède deux pics à 630 et 642 nm, et elle est appelée la bande q. Nous avons donc étudié la dépendance en longueur d’onde du déclenchement de l’étape photosensible.

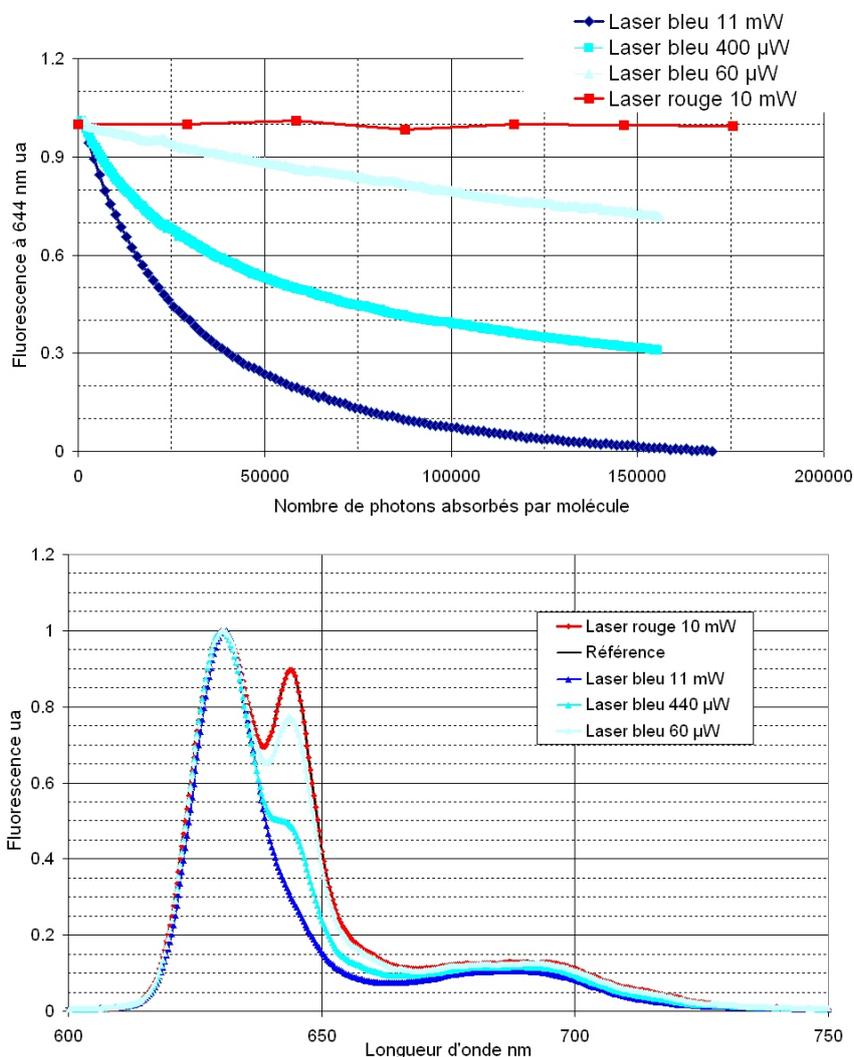


FIG. 3.11 – Consommation de F644 à 100 K, lors de l'illumination par différentes sources laser. En haut : consommation du F644 en fonction de la dose de photons absorbés pour différentes puissances de laser. La fluorescence de F644 est normalisée et correspond à celle du spectre mesuré auquel est soustrait un spectre du complexe ternaire dans lequel tout F644 a été consommé. En bas : spectres de fluorescence obtenus avec les différents lasers pour une dose de 150000 photons absorbés par molécule. Les puissances sont mesurées en sortie de la fibre optique de $600 \mu\text{m}$ connectée au laser. Temps correspondant à la durée du repos entre les pulses de 40 ms d'exposition à la lumière actinique émise par le laser bleu : 1 s à 11 mW, 200 ms à $400 \mu\text{W}$, 125 ms à $66 \mu\text{W}$. Le laser bleu excite à 440 nm et le rouge à 632 nm. Pchl a 0.04 mM, NADPH 0.3 mM, POR 0.12 mM, glycérol 25%, sucrose 12.5%.

La figure 3.11 présente la consommation de la Pchl_a du complexe ternaire en fonction du nombre de photons absorbés, pour différentes longueurs d'onde et puissances de laser, et à une température de 100 K. Le laser rouge à pleine puissance ne déclenche pas l'étape photosensible et la quantité de F644/A642 reste constante quelque soit le temps d'exposition. Le laser bleu permet lui de consommer F644/A642 à 100 K et donc de déclencher l'étape photosensible même à puissance réduite. La disparition de l'espèce fluorescente est fonction du nombre de photons absorbés mais aussi de la puissance utilisée. Pour un nombre de photons absorbés identique, la proportion de complexe consommé est beaucoup plus importante avec un laser de 11 mW qu'avec un laser atténué à 400 μ W. Le même phénomène est observé en comparant les résultats obtenus avec les lasers à 400 μ W et à 60 μ W.

L'espèce produite à 100 K lors de l'illumination au laser bleu n'est ni fluorescente ni absorbante (NF/NA) et correspond donc à un état différent de NF/A696.

Les phénomènes impliquant l'absorption d'un seul photon sont caractérisés par une dépendance linéaire entre le nombre de photons absorbés et l'avancement de la réaction, et cela indépendamment de la puissance de la source excitatrice. La dépendance en puissance de la consommation du complexe ternaire permet donc de proposer un phénomène multiphotonique, et plus probablement double-photon, lors de la formation de NF/NA à 100 K.

3.2.4 Mécanisme non-fonctionnel

Pour caractériser ce nouvel état intermédiaire, la première étape a consisté à déterminer les conditions dans lesquelles il pouvait se former, et en quoi elles se différenciaient des conditions utilisées dans les expériences précédentes sur la POR, qui elles conduisent à la formation de l'intermédiaire NF/A696 [Heyes and Hunter, 2004]. Cet intermédiaire est classiquement obtenu en éclairant le complexe ternaire en lumière blanche à une température de 185 K. La puissance délivrée par unité de volume par les lasers bleu (11 mW), rouge (10 mW) ou même par la lampe xénon est nettement plus importante que celle des expériences de la littérature (pour un échantillon de la taille du notre, la puissance utilisée par Belyaeva serait par exemple de 0.03 mW [Belyaeva et al., 1988]), et permet de déclencher la réaction à plus basse température. Après avoir testé différentes températures, il est apparu qu'avec les puissances lumineuses employées, les expériences à 160 K permettaient d'obtenir des résultats intéressants.

La figure 3.12 présente les spectres d'absorption obtenus après illumination du complexe ternaire sous différentes conditions à 160 K. Le laser bleu le plus intense forme une espèce absorbant à 690 nm et fluorescent à

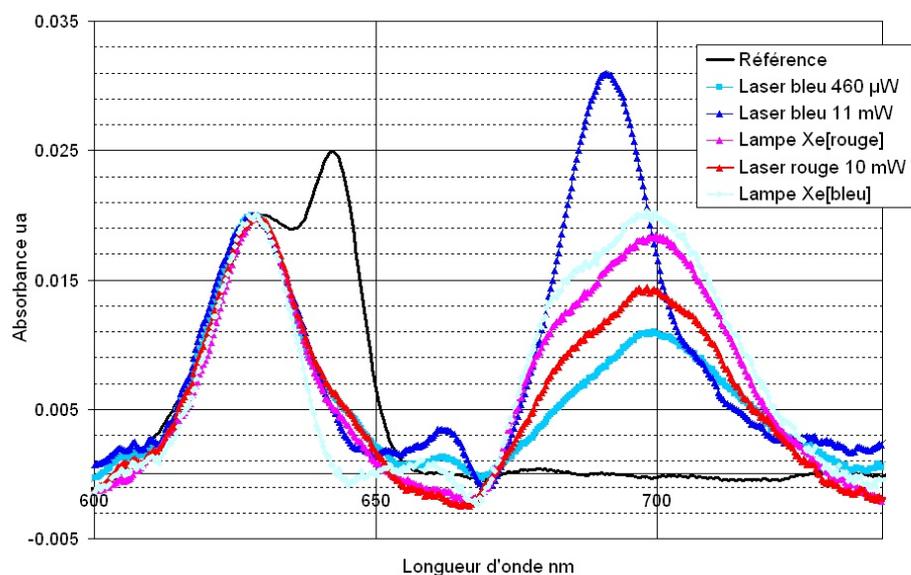


FIG. 3.12 – Spectres d'absorption après illumination pendant 10 min du complexe ternaire à 160 K avec différentes lumières actiniques. Les spectres sont enregistrés à 100 K. Le laser bleu émet à 440 nm, le rouge à 632 nm. La lampe xénon est filtrée avec un passe bas > 550 nm pour Xe[rouge] et un passe bande 385-450 nm pour Xe[bleu], la puissance est comparable dans les 2 cas. Pchl_a 0.04 mM, NADPH 0.3 mM, POR 0.12 mM, glycérol 25% (v/v), sucrose 12.5% (w/v), 0.1 % Genapol (v/v).

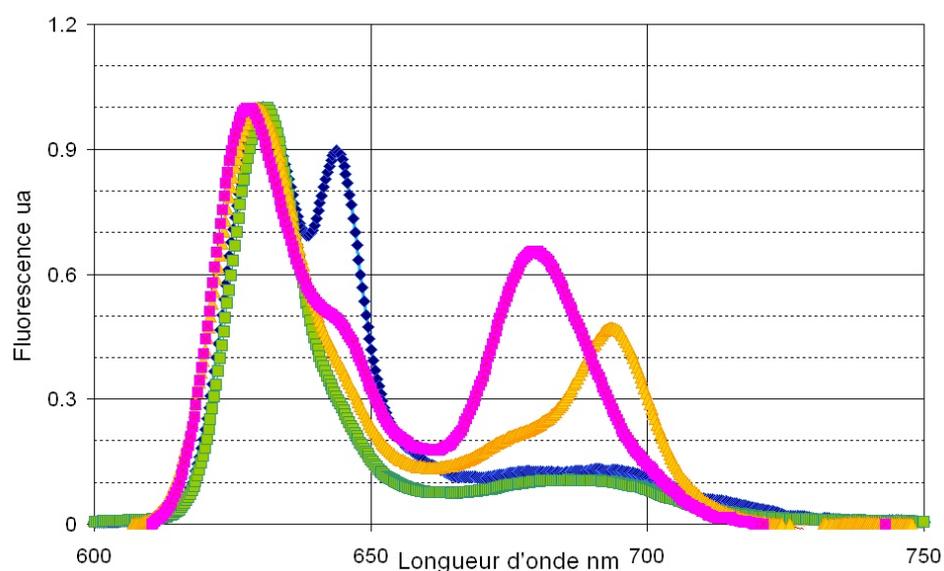


FIG. 3.13 – Spectres de fluorescence des différents états intermédiaires de la « branche morte » lors de la réduction de la Pchl *a* mesurés à 100 K. En bleu, le spectre référence dans l'obscurité à 100 K, en vert le spectre après consommation de F644/A642 à 100 K (lumière actinique émise par le laser bleu jusqu'à disparition du pic F644/A642), en orange le spectre du F694/A690 obtenu sur le même échantillon et après un plateau à 160 K de 10 min dans le noir, et en rouge le spectre du composé obtenu quand l'échantillon a été porté à température ambiante dans le noir. La POR de *T. elongatus* est dans son tampon d'activité basse température. Pchl *a* 0.04 mM, NADPH 0.3 mM, POR 0.12 mM, glycérol 25% (v/v), sucrose 12.5% (w/v), 0.1 % Genapol (v/v).

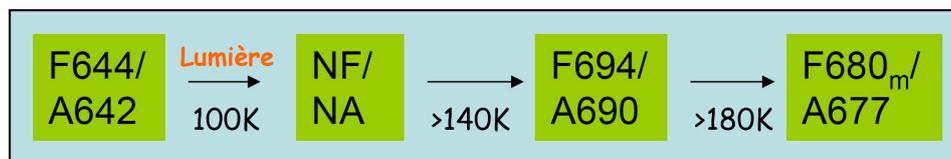


FIG. 3.14 – Description des propriétés spectroscopiques des états intermédiaires de la « branche morte » et de leur dépendance en température.

694 nm (F694/A690). Le laser bleu atténué ($460 \mu\text{W}$), le laser rouge et la lampe Xe (filtrée soit dans sa partie rouge soit dans sa partie bleu) produisent majoritairement le premier état intermédiaire classique absorbant à 696 nm. Il apparaît donc que deux chemins coexistent, le premier produisant F694/A690 et le second produisant NF/A696.

Des expériences supplémentaires ont permis de compléter les informations disponibles. F694/A690 apparaît au-dessus de 140 K, après illumination par une source intense délivrant de la lumière bleu. Quand l'illumination est réalisée en dessous de 140 K, le complexe ternaire est consommé sans produire F694/A690, mais une rampe de température réalisée par la suite, dans le noir, et jusqu'à une température supérieure à 140 K conduit à la formation de F694/A690. La voie produisant F694/A690 est en compétition avec celle produisant NF/A696, le laser bleu de puissance plus faible produisant préférentiellement F694/A690 à 140 K et NF/A696 à 160 K. Les deux espèces peuvent coexister, ce qui est le cas le plus général à des températures autour de 160 K.

La formation de F694/A690 est donc dépendante de la longueur d'onde de la source d'illumination, de sa puissance et de la température, expliquant que le laser bleu de $460 \mu\text{W}$ produise F694/A690 à 140 K et NF/A696 à 160 K. Le laser rouge, et la lampe Xe[rouge], produisent uniquement l'intermédiaire NF/A696.

L'étape suivante a consisté à étudier le produit formé quand la réaction passe par la formation de F694/A690, et à le comparer au produit normalement attendu, la Chlide. Pour ce faire, nous avons suivi le déroulement de la réaction, en contrôlant la température de l'échantillon jusqu'à 293 K.

Les résultats sont représentés à la figure 3.13. À partir de 140 K, l'état F694/A690 se forme, puis quand la température augmente encore, au delà de 190 K, un nouvel état spectroscopique apparaît, qui fluoresce à 680 nm (F680_m/A677). Cet état F680_m/A677 reste stable jusqu'à température ambiante, sans subir aucun changement spectroscopique. Le spectre de fluorescence de la Chlide à 293 K présente un pic vers 674 nm (qui peut varier selon les souches de POR et les réarrangements du produit avec l'enzyme et le substrat). Le produit formé ici n'est donc pas de la Chlide, mais un

complexe « dead end » qui diffère aussi de la Pchl_{id}e photooxydée (F684_p) et que nous avons seulement pu caractériser spectroscopiquement.

Il est donc possible de faire emprunter à la POR un chemin réactionnel qui n'est pas fonctionnel (voir la figure 3.14 pour la synthèse) et ne produit pas la Chl_{id}e. Cette réaction n'est prédominante qu'à basse température (en dessous de 160 K) et sous certaines conditions d'illumination. Dans le rouge (en cas d'illumination dans la bande q du spectre d'absorption), il est impossible d'initier ce mécanisme non-fonctionnel et ce quelle que soit la puissance de la source. Dans le bleu, ce mécanisme non-fonctionnel est le seul possible à 100 K. À plus haute température, autour de 160 K, il existe un équilibre entre les deux mécanismes réactionnels. Cet équilibre dépend de la puissance de la source de lumière bleu et de la température.

3.2.5 Mécanisme fonctionnel

Les résultats précédents ont montré que la formation du produit fonctionnel de la réaction nécessitait des conditions d'illumination et de température bien contrôlées. Pour être sûr de ne pas emprunter le mauvais chemin réactionnel (« la branche morte »), les expériences suivantes ont été réalisées en déclenchant la réaction avec de la lumière rouge ou avec un laser bleu atténué.

La figure 3.15 présente les spectres d'absorption des différents états intermédiaires du mécanisme de réduction de la Pchl_{id}e. Après consommation du complexe F644/A642, le premier intermédiaire est l'état NF/A696. Il se forme à partir de 140 K et reste stable jusqu'à 190 K. Au delà, un premier état intermédiaire fluorescent (F684/A681) se forme. En coupant le flux d'azote qui refroidit l'échantillon, on dépasse les 0 ° C, et on forme la Chl_{id}e (F674/A670). Ces résultats sont comparables avec ceux déjà obtenus sur la POR de *T. elongatus* [Heyes and Hunter, 2004]. Il est difficile d'observer les états intermédiaires ultérieurs résultant des réarrangements du produit avec le cofacteur et la POR. En effet, la solution en phase liquide diffuse en dehors du point focal du microspectrophotomètre. L'information sur les complexes photoactivés qui diffusent est donc perdue.

3.3 Couplage activité/ transition vitreuse

L'étude du mécanisme catalytique à basse température de la POR a permis de mettre en évidence deux comportements distincts : le mécanisme fonctionnel (qui passe par la formation séquentielle des deux intermédiaires NF/A696 et F684/A681, et qui précède la formation de la Chl_{id}e) et une « branche morte » qui passe par la formation de F694/A690. NF/A696 et

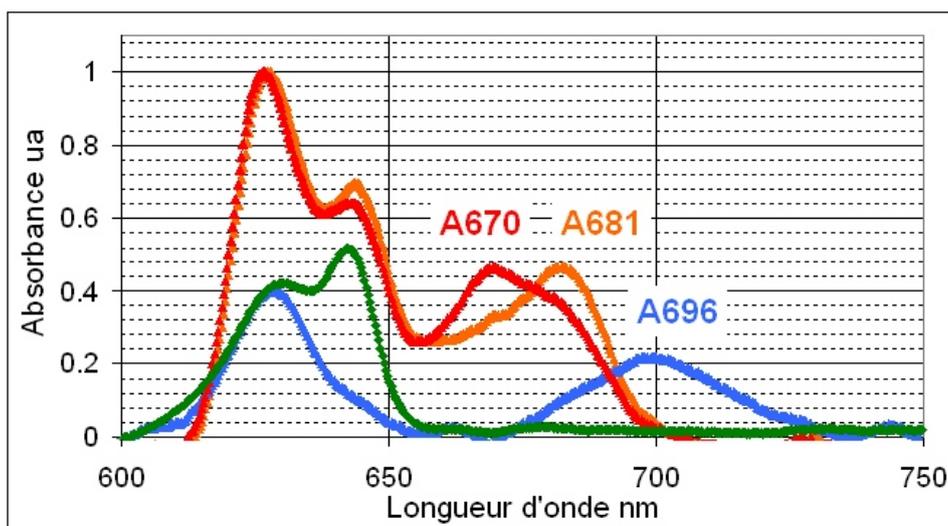


FIG. 3.15 – Spectres d'absorption des différents états intermédiaires du mécanisme fonctionnel de réduction de la Pchlide, mesurés à 100 K. En vert, dans le noir avant illumination, en bleu le spectre après consommation de F644/A642 à 160 K par la lumière actinique émise par un laser bleu atténué à $460 \mu\text{W}$ en sortie de fibre $600 \mu\text{m}$, en orange le spectre de l'état intermédiaire obtenu après un plateau de température à 210 K dans le noir, et en rouge le spectre du produit (la Chlide) obtenu quand l'échantillon est porté à température ambiante dans le noir. Les spectres sont normalisés sur deux amplitudes différentes pour rendre plus lisible le graphe. La POR est dans son tampon d'activité basse température. Pchlide 0.04 mM, NADPH 0.3 mM, POR 0.12 mM, glycérol 25% (v/v), sucrose 12.5% (w/v), 0.1 % Genapol (v/v).

F694/A690 apparaissent tous deux autour de 160 K. Or pour des solutions ayant une viscosité semblable à la nôtre, la température de la transition vitreuse (T_g) est située autour de cette valeur. Il est donc intéressant d'étudier l'influence de T_g sur le choix du chemin réactionnel suivi par l'enzyme. Ces informations devraient nous permettre d'étudier l'influence des transitions dans le solvant sur le mécanisme de la réaction, et de les corrélérer avec l'activité de la POR.

3.3.1 Mesure de la transition vitreuse

Pour étudier le couplage entre l'activité de la protéine et l'état du solvant, il faut dans un premier temps caractériser les états de phase de celui-ci en fonction de la température. Pour cela, nous utilisons la TDFM. Cette technique nous apporte des informations sur les changements de phase du solvant à partir du décalage en longueur d'onde du spectre de fluorescence d'un fluorophore solubilisé.

État de l'art : étude d'un mélange binaire

Nous présentons ici la technique de la TDFM à partir de l'exemple d'un mélange binaire de glycérol et d'eau auquel 0.3 mM de fluorescéine a été ajouté. La donnée suivie est le centre de masse d'un spectre de fluorescence du fluorophore, c'est à dire la longueur d'onde correspondant au maximum de fluorescence pondérée sur une certaine largeur spectrale. Trois domaines principaux de température sont d'un intérêt particulier. Pour une solution contenant 40% de Glycérol (figure 3.16), ils sont respectivement de [100-158 K], [158-179 K] et [179-220 K] [Weik et al., 2004].

Dans le premier domaine, la longueur d'onde se décale continuellement vers le rouge et l'échantillon reste transparent. À 158 K, on observe une rupture de linéarité, constituée d'abord par un décalage vers le bleu puis par un décalage vers le rouge beaucoup plus important du centre de masse. Cette température est très proche de celle de la transition vitreuse déterminée par calorimétrie et pour des conditions de solvant identiques [Harran, 1978]. Le décalage vers le rouge entre 165 et 179 K peut être attribué à l'augmentation de la mobilité du solvant au moment de la transition vitreuse. En effet, les molécules du solvant acquièrent une plus grande liberté rotationnelle lors de celle-ci et la vitesse de relaxation dipolaire des fluorophores excités augmente donc, en produisant un décalage vers le rouge des longueurs d'onde en accord avec l'équation 3.6.

$$\lambda_{cg}(T) = \lambda_{\infty} + \frac{(\lambda_0 - \lambda_{\infty})\tau_S(T)}{\tau_S(T) + \tau(T)} \quad (3.6)$$

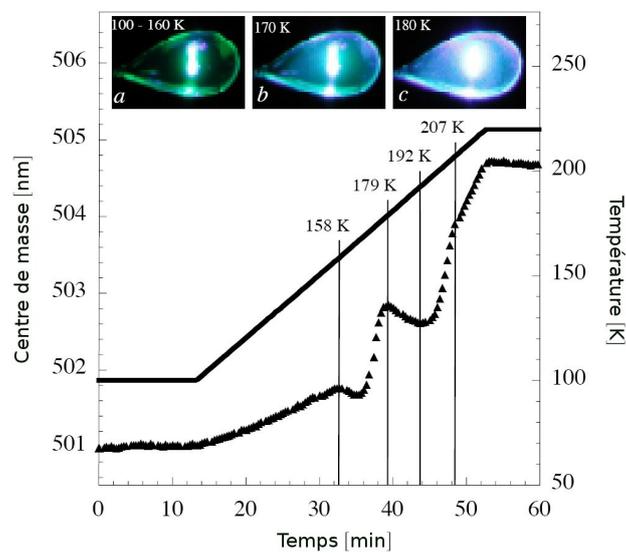


FIG. 3.16 – Transitions de phase dans un mélange binaire eau/glycérol (40% v/v) vues par TDFM. Le centre de masse du spectre de fluorescence de la fluorescéine à 0.3 mM (triangles) est donné en fonction du temps. En encadré des photos de l'échantillon à différentes températures. Le volume est d'environ 1 nL (figure extraite de [Weik et al., 2004]).

Où $\lambda_{cg}(T)$ correspond à la longueur d'onde du centre de masse du spectre observé à une température T donnée, λ_0 et λ_∞ sont respectivement les centres de masses en absence et à la fin de la relaxation du solvant, et $\tau_S(T)$ et $\tau(T)$ sont respectivement les temps de vie des processus de relaxation du solvant et de fluorescence. La diminution de τ_S conduit alors à une augmentation de λ_{cg} à T donnée. Le décalage transitoire des longueurs d'onde vers le bleu entre 158 et 165 K est compatible avec une augmentation temporaire de la rigidité de l'échantillon, accompagnant le processus de relaxation d'enthalpie qui a lieu autour de la transition vitreuse [Mayer, 1991]. L'amplitude de ce décalage est toutefois difficilement reproductible entre plusieurs expériences, car sûrement très sensible aux variations du volume de l'échantillon sondé.

L'apparition du second décalage vers le bleu est le signe de la formation de glace cristalline. Cela est confirmée par l'opacification de l'échantillon, que l'on peut constater visuellement au-delà de 180 K. Les points de nucléation diffusent en effet la lumière quand, en grossissant, ils atteignent une taille de l'ordre de grandeur de celle de la longueur d'onde de la lumière visible. Lors de la cristallisation, la relaxation dipolaire est ralentie à cause de l'augmentation de la rigidité des molécules du solvant, ce qui décale la longueur d'onde du centre de masse du spectre observé vers le bleu. Toutefois, la glace cristalline « ré-absorbe » aussi la lumière émise par fluorescence (à cause de sa structure poly-cristalline). Cette ré-absorption est plus importante aux longueurs d'onde les plus faibles, générant un phénomène concurrent de décalage vers le rouge du spectre de fluorescence. C'est ce dernier effet qui devient prédominant au delà de 192 K, expliquant ainsi le décalage vers le rouge. Le retour à un phénomène linéaire vers 207 K est le signe que la formation de la glace cristalline est terminée.

Ces résultats sont donc cohérents avec ceux obtenus sur l'existence de la phase ultraviscueuse [Mishima and Stanley, 1998]. Toutefois, dans le cas des expériences de TDFM, il semble que cette dernière coexiste avec la présence de germes cristallins qui grossissent lentement avec l'augmentation de la température.

Étude du tampon d'activité basse température de la POR

Dans notre cas, nous utilisons comme fluorophore l'Oregon Green (Molecular Probes), un dérivé de la fluorescéine dont le spectre de fluorescence présente l'intérêt de ne pas se superposer avec celui du complexe ternaire de la POR, tout en pouvant être excité par le même laser bleu. Par rapport à la fluorescéine (que nous aurions pu utiliser), l'Oregon Green possède une plus grande stabilité de ses propriétés de fluorescence.

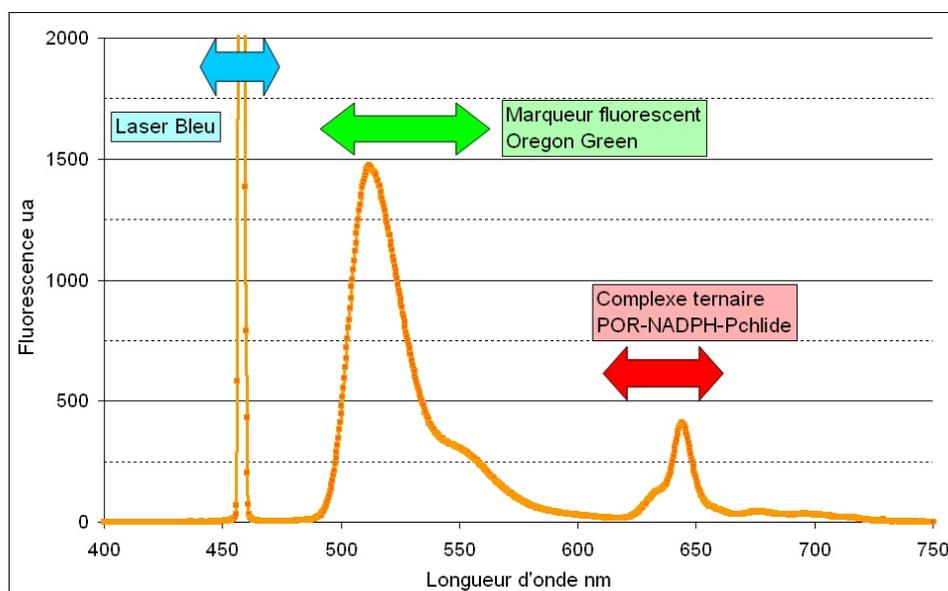


FIG. 3.17 – Spectres de fluorescence dans le noir et à 100 K d'une solution contenant le mélange ternaire et le marqueur de fluorescence Oregon Green à 0.4 mM. Pchlide 0.04 mM, NADPH 0.3 mM, POR 0.12 mM, glycérol 25% (v/v), sucrose 12.5% (w/v), 0.1 % Genapol (v/v).

Une unique source de lumière pourrait servir à la fois à exciter le marqueur et à déclencher la réaction. Cependant nous avons vu dans le chapitre précédent que déclencher la réaction avec le laser bleu à 100 K conduit la POR à suivre un mécanisme non-fonctionnel. Un protocole combinant le suivi de l'activité de la POR et celui du spectre de fluorescence du marqueur n'a donc de sens que pour l'étude de ce chemin en particulier. Pour l'étude des changements de phase du tampon d'activité basse température utilisé dans les expériences où le chemin fonctionnel est suivi, la TDFM est donc réalisée en absence de POR. La figure 3.17 présente le spectre de fluorescence complet d'une solution contenant le complexe ternaire non illuminé, l'Oregon Green et la composante diffusée du laser. Ces trois composantes ne se chevauchent pas en première approximation et permettent donc de décorrélérer les informations qu'elles fournissent en absence de problèmes de transfert de fluorescence.

Pour déterminer la température de transition vitreuse d'une solution, et donc l'entrée dans la phase ultravisqueuse, on suit la fluorescence du marqueur dans le tampon d'activité basse température de la POR. Les températures des changements de phase dépendent de la viscosité de la solution. Ainsi, une modification du pourcentage du mélange glycérol/ sucrose employé modifie directement ces températures. Les études de TDFM sont donc

glycérol/sucrose	25/ 12.5%	32/ 16%	35/ 17.5%	40/ 20%
Tg moy	158 +/-1 K	160 +/-2 K	167 +/-2 K	172 +/-3 K

TAB. 3.1 – Résultats moyens obtenus par TDFM sur la température de transition vitreuse (Tg) d’une solution de tampon d’activité basse température de la POR, pour différents pourcentages de glycérol et de sucrose.

réalisées pour plusieurs solutions de tampon d’activité, avec un pourcentage de mélange glycérol/ sucrose variant entre 20 et 45%. La limite inférieure de 20% est fixée par la cinétique de refroidissement de l’échantillon : le glycérol abaisse la température de nucléation et permet la formation de la glace amorphe dans nos conditions expérimentales. En dessous de 20%, il y a formation de glace cristalline. Au delà de 40% de glycérol, il y a une trop grande dilution du complexe ternaire de la POR pour obtenir des spectres ayant un rapport signal sur bruit acceptable.

La figure 3.18 présente deux graphes de TDFM, obtenus pour deux solutions de viscosités distinctes. La température de transition vitreuse est donnée par la première rupture de linéarité dans la courbe. La solution à 25% de glycérol présente une nette rupture de pente à 158 K, signe de la transition vitreuse. À 207 K, la transition est caractéristique de la formation massive de glace cristalline et s’accompagne d’une opacification de la solution observable *de visu*. Entre ces deux températures, il y a une nucléation progressive des molécules d’eau. La solution à 40% présente une première rupture de linéarité autour de 170 K moins nette (en règle générale l’augmentation de la viscosité rend les transitions moins marquées).

Le tableau 3.1 synthétise les résultats obtenus pour quatre pourcentages de glycérol différents (avec plusieurs expériences à chaque pourcentage). Les mesures sont affectées d’une erreur liée à la difficulté de prélever précisément du glycérol très visqueux, ainsi qu’à d’autres paramètres tels les variations entre les volumes de chaque échantillon et le temps effectif du refroidissement quasi-instantané. Pour les études comparant l’activité de la protéine dans des solutions possédant des températures de transitions vitreuses différentes, nous avons donc toujours choisi de maximiser la différence de température de la transition vitreuse en utilisant des tampons d’activité avec respectivement 25 et 40% de glycérol.

3.3.2 Couplage entre activité fonctionnelle et dynamique du solvant

Ces expériences ont pour but de suivre l’évolution de la formation des différents état intermédiaires du mécanisme fonctionnel de réduction de la

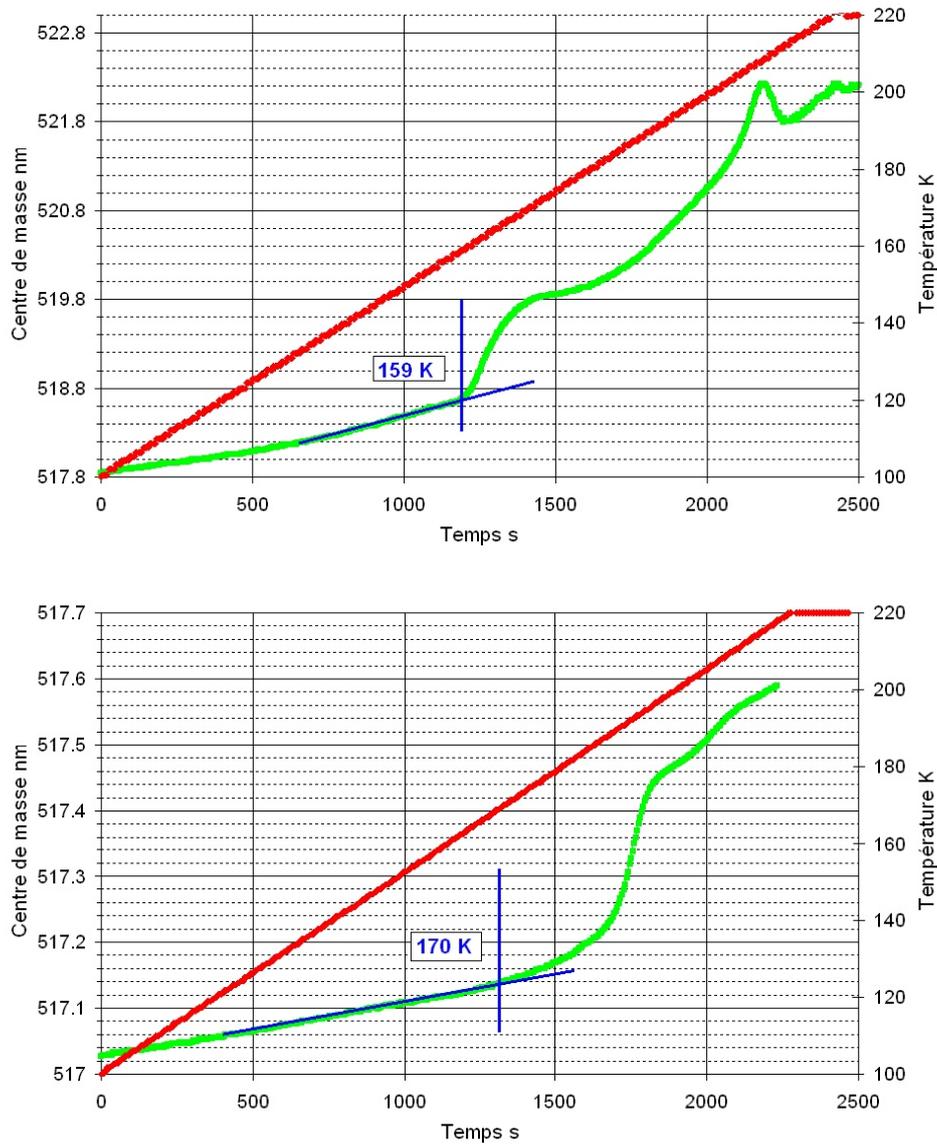


FIG. 3.18 – Spectres de TDFM sur deux solutions contenant le tampon d'activité basse température avec respectivement 25/ 12.5% (en haut) et 40/ 20% de glucérol/sucrose (en bas). Oregon Green à 0.4 mM.

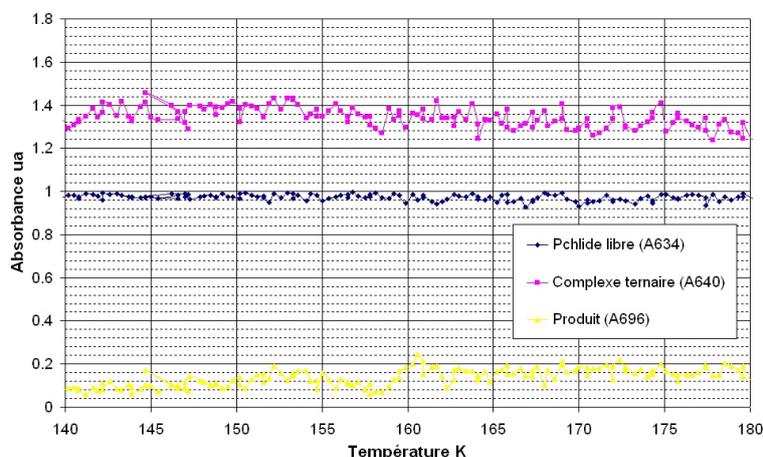


FIG. 3.19 – Expérience de contrôle, mélange ternaire exposé à la lampe blanche utilisé pour les spectres d'absorption pendant une rampe de température à 100 K/h. On suit l'absorbance aux longueurs d'onde correspondant au pic de Pchlde libre, au complexe ternaire et au produit. Tampon d'activité basse température avec 25% de glycérol et 12.5% de sucrose. Pchlde 0.04 mM, NADPH 0.3 mM, POR 0.12 mM.

Pchlde en fonction de la température de la transition vitreuse du solvant.

Protocole

Il faut faire attention à s'affranchir des artefacts expérimentaux mis en évidence au paragraphe 3.2. Il faut ainsi éviter la spectroscopie de fluorescence, car le laser bleu utilisé dans ce cas déclencherait le mécanisme non-fonctionnel. Nous utilisons donc la technique de la TDAM, le laser rouge étant choisi pour initier la réaction et les mesures d'absorbance étant faites avec une lampe blanche. Il est important de vérifier que la lumière blanche utilisée pour réaliser les spectres d'absorption n'induit pas d'excitation active significative (figure 3.19).

Les spectres d'acquisition sont acquis régulièrement (tous les 0.5 K) avec une rampe de température qui dure 72 minutes (à 100 K/h). L'illumination avec le laser rouge est pulsée, afin de permettre de synchroniser l'acquisition des spectres d'absorption avec une période pendant laquelle l'échantillon reste dans le noir. Nous avons en outre vérifié sur plusieurs expériences que la fréquence des impulsions lumineuses, et le rapport cyclique d'exposition au laser, n'avaient pas d'influence sur la cinétique, excluant ainsi un phénomène de réaction inverse.

Une expérience de contrôle est nécessaire pour vérifier que le laser rouge n'induit pas un réchauffement de l'échantillon. Il a été montré qu'un laser Nd :YAG de 532 nm à 150 mW pouvait produire un échauffement de plus de 30 K sur un cristal de myoglobine [Nienhaus et al., 2005]. Une expérience identique à celles de TDFM du chapitre 3.3.1 a donc été réalisée sur un capillaire contenant 1 μ l de complexe ternaire (Pchlde 0.04 mM, NADPH 0.3 mM, POR 0.12 mM) dans le tampon d'activité basse température, et sous illumination continue du laser rouge de 632 nm à 10 mW. Les résultats montrent que les températures caractéristiques des transitions dans le solvant sont identiques en présence et en absence de laser. Ce dernier n'implique donc pas un réchauffement significatif de l'échantillon, et la température du flux d'azote correspond bien à celle de la solution dans le capillaire. Il serait toutefois nécessaire de reproduire ce type de contrôle dans le cas de la lumière bleu, la DO de la Pchlde est en effet beaucoup plus importante dans ce domaine spectral (environ un facteur 10) et l'échauffement pourrait être plus important. Pour minimiser ce réchauffement, nous avons pris soin de toujours travailler avec le laser en mode pulsé, avec un rapport cyclique (laser on/off) faible (40 ms/ 1 s pour 11 mW).

Résultats

Les expériences sont réalisées pour deux pourcentages différents de glycérol dans le tampon d'activité basse température. Lors de l'acquisition des données, entre 100 et 220 K, on suit la formation de tous les états intermédiaires du mécanisme catalytique de la POR. Au delà de 140 K, NF/A696 commence à apparaître. Puis nous suivons la formation de F684/A681 à partir de 180 K.

Pour suivre indépendamment la dépendance temporelle, et donc en température, de chaque état intermédiaire, il faut déconvoluer les spectres d'absorption mesurés. Pour cela, on utilise la méthode de décomposition en valeurs singulières (SVD, voir l'annexe C). Pour simplifier les calculs, nous avons réalisé deux traitements différents en séparant le domaine spectral en deux zones où seuls deux événements se déroulent : [600 - 660 nm] et [660 - 740 nm]. On modélise le chemin réactionnel suivant :



Notons que k_1 étant représentative de l'étape de photo-activation, elle dépend forcément de la puissance de la source de lumière actinique et elle sera nulle dans le noir. Il est donc important pour obtenir des résultats comparables de réaliser des expériences avec des puissances de lumière actinique identiques.

Entre 600 et 660 nm, on suit F644/A642 et F634/A630. Notons que tous les spectres sont normalisés sur le pic de Pchl_{id}e libre. Ce qui donne le système d'équations suivant :

$$\begin{cases} A630(t) = Cte \\ \frac{dA642(t)}{dt} = -k_1 A642(t) \end{cases}$$

Pendant la rampe de température, et sous exposition à la lumière rouge, F634/A630 reste constant alors que F644/A642 est consommé. Notre modèle cinétique est donc le suivant : A630(t) est une constante, A642(t) représente la consommation d'une espèce dans une réaction de premier ordre, combinée avec une dépendance en température contrôlée par une loi de type théorie de l'état de transition (voir le paragraphe 1.6.2). Les paramètres thermodynamiques à ajuster sont donc κ_1 et ΔH_1^\ddagger .

$$\begin{cases} A630(t) = Cte \\ A642(t) = A_0 \exp \left[-\kappa_1 \int T(t) \exp\left(\frac{-\Delta H_1^\ddagger}{RT(t)}\right) dt \right] \end{cases}$$

Dans la fenêtre [660 - 740 nm], on suit NF/A696 et F684/A681. Les spectres ne sont pas normalisés sur celui de Pchl_{id}e libre. Dans ce cas, il est préférable de ne pas normaliser les spectres sur celui de la Pchl_{id}e libre du fait de la photooxydation de cette espèce qui apparaît en même temps que A681_m. Ce qui donne le système d'équations suivant :

$$\begin{cases} \frac{dA642(t)}{dt} = -k_1 A642(t) \\ \frac{dA696(t)}{dt} = -k_2 A696(t) + k_1 A642(t) \\ A681(t) = A642(t=0) - A642(t) - A696(t) \end{cases}$$

Notre modèle cinétique est donc le suivant : A696(t) représente la formation d'une espèce à partir de A642 dans une réaction de premier ordre, suivie par sa consommation pour former A681(t). Les dépendances en température de A642(t), A696(t) et A681(t) sont contrôlées par des lois représentant la théorie de l'état de transition (voir le paragraphe 1.6.2).

Comme il n'est pas possible de proposer des solutions analytiques, on résout le système de manière discrète, avec k de la forme $k^i(T^i) = \kappa T^i \exp \frac{-\Delta H^\ddagger}{RT^i}$, $T(i)$ étant la température de chaque spectre i . Les paramètres thermodynamiques à ajuster sont donc κ_1 , ΔH_1^\ddagger et κ_2 , ΔH_2^\ddagger .

$$\begin{cases} A642^i = A642^{i-1} + (t^i - t^{i-1})(-k_1^i A642^{i-1}) \\ A696^i = A696^{i-1} + (t^i - t^{i-1})(k_1^i A642^{i-1}) + (t^i - t^{i-1})(-k_2^i A696^{i-1}) \\ A681^i = A642^0 - A642^i - A696^i \end{cases}$$

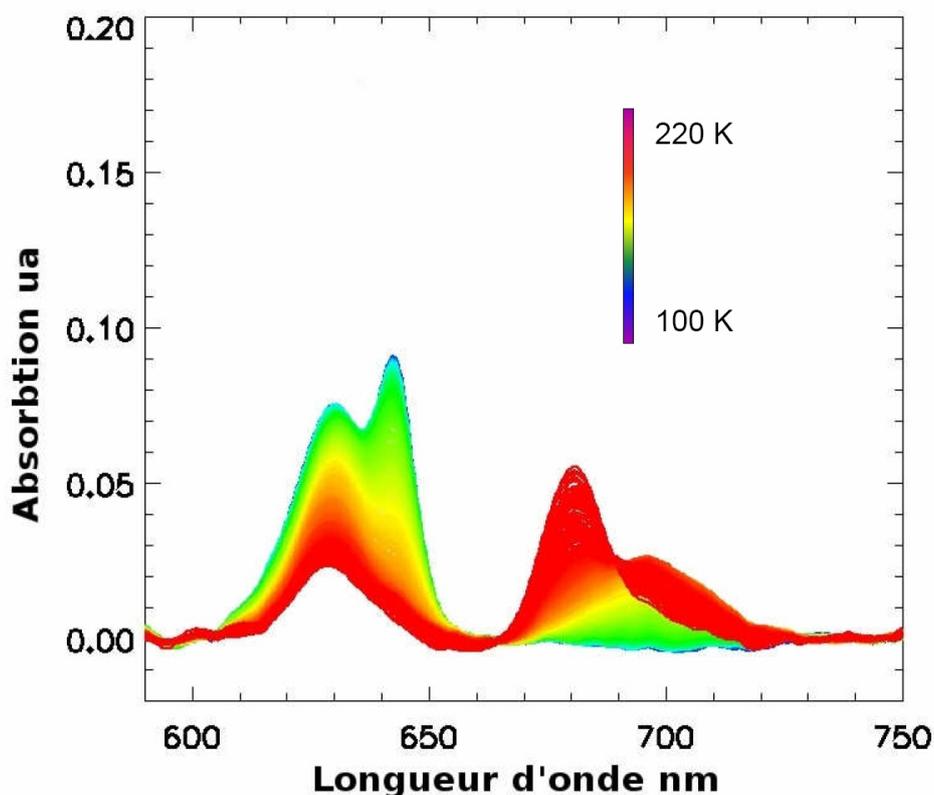


FIG. 3.20 – Spectres bruts d’absorbance obtenus lors d’une expériences de TDAM suivant le mécanisme fonctionnel. Illumination actinique avec un laser rouge pulsé (80 s d’exposition pour 100 s d’expérience) de 10 mW en sortie de fibre 600 μm . La fibre est directement fixée à 1 cm de l’échantillon, assurant une puissance d’environ 10 mW/cm^2 sur l’échantillon. Rampe de température à 100 K/h. Pchl ide 0.04 mM, NADPH 0.3 mM, POR 0.12 mM, glycérol 25% (v/v), sucrose 12.5% (w/v), 0.1 % Genapol (v/v).

Le traitement par SVD est suivi par l’ajustement global des différents paramètres contenus dans les équations. Dans le premier cas (A630(t) et A642(t)), il y a 6 variables à ajuster : 2 locales (κ_1 et $\Delta H_1^\#$) et 4 globales (α , β , χ et δ). Dans le second cas (t(A696) et t(A681)), il y a 8 variables à ajuster (voir annexe C) : 4 locales (κ_1 , $\Delta H_1^\#$, κ_2 et $\Delta H_2^\#$) et 4 globales (α , β , χ et δ).

La figure 3.20 représente une superposition des spectres bruts obtenus lors de l’expérience de TDAM. On peut suivre la consommation de F644/A642, suivie par NF/A696 et par la formation de F684/A680.

Les figures 3.21 et 3.21 présentent les résultats obtenus sur les deux domaines spectraux pour une solution dans un tampon d’activité à basse tem-

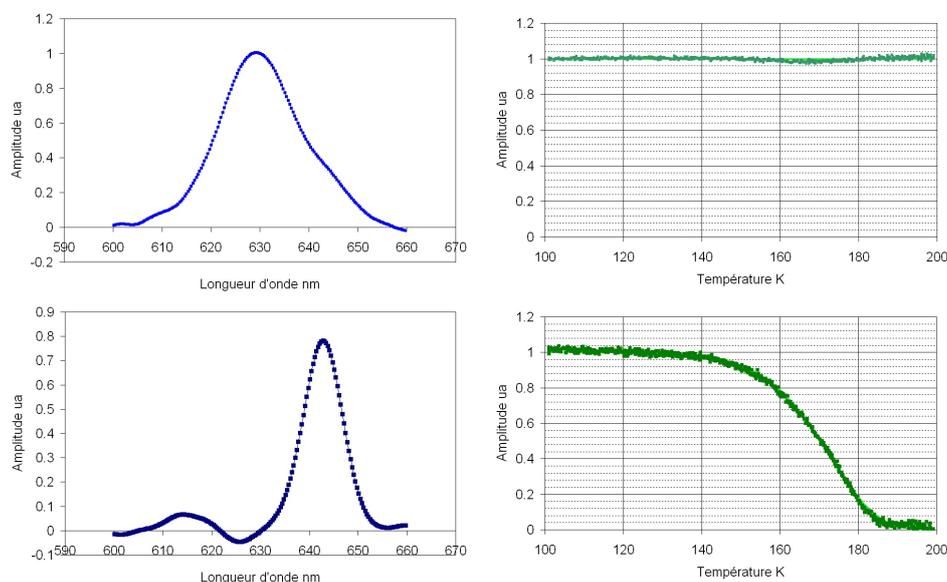


FIG. 3.21 – Spectres déconvolués par SVD (à gauche) mesurés lors de la consommation du complexe ternaire, et leur dépendance en température (à droite) dans la gamme [600 - 660 nm] (normalisation sur le pic de Pchlide libre). Mêmes conditions expérimentales que la figure 3.20.

pérature contenant 25% de glycérol, et pour une température comprise entre 100 et 200 K. Les modèles calculés par SVD sont superposés aux résultats expérimentaux.

Dans la gamme [600 - 660 nm], le pic de Pchlide libre reste d'amplitude constante, ce qui est attendu. En ce qui concerne la consommation de F644/A642, on obtient pour l'énergie d'activation de la réaction $\Delta H_1^\# = 19.5 \text{ kJ.mol}^{-1}$ et pour la constante cinétique $\kappa_1 = 13 \text{ K}^{-1}\text{s}^{-1}$. La température à laquelle la consommation de F644/A642 devient détectable est située vers 140 K.

Dans la gamme [660 - 740 nm], les résultats issus de la déconvolution sont légèrement moins bons que dans la gamme [600 - 660 nm], laissant supposer que dans ce cas les hypothèses (réaction de premier ordre non réversible directe à partir de F644/A642) ne sont pas complètement vérifiées. Il est impossible de faire converger le modèle cinétique décrivant la formation de NF/A696 en utilisant les paramètres (κ_1 et $\Delta H_1^\#$) obtenus lors de l'étude de la consommation de F644/A642 entre 600 et 660 nm.

Les spectres déconvolués sont toutefois cohérents avec ceux attendus. Les résultats sont donc qualitativement valables, même si les données numériques (les paramètres thermodynamiques ajustés) sont probablement en-

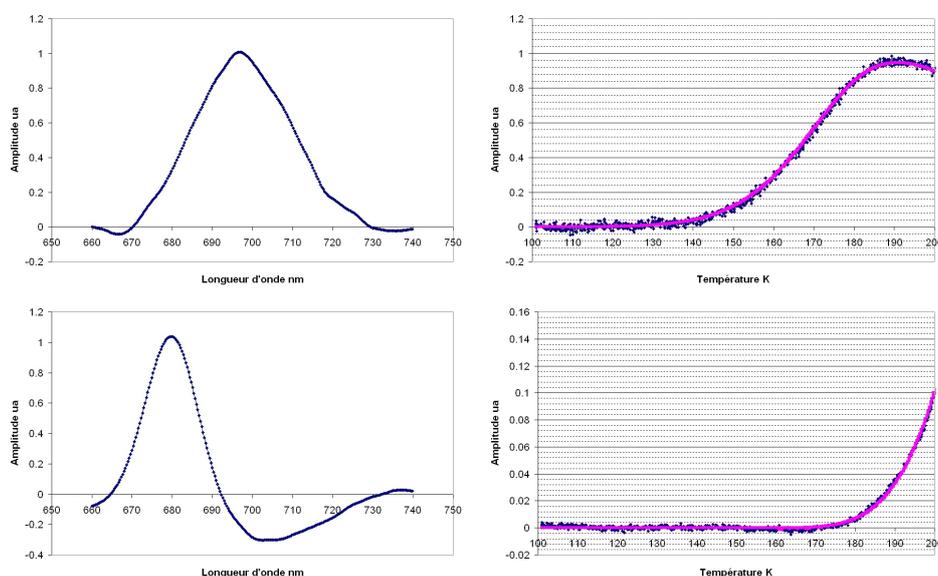


FIG. 3.22 – Spectres déconvolués par SVD (à gauche) mesurés lors de la consommation du complexe ternaire, et leur dépendance en température (à droite) dans la gamme [660 - 740] (sans normalisation sur le pic de Pchlide libre). Mêmes conditions expérimentales que la figure 3.20.

tachées d'erreurs. Pour NF/A696, on obtient : $\Delta H_1^\# = 16.3 \text{ kJ.mol}^{-1}$ et $\kappa_1 = 1.6 \text{ K}^{-1}\text{s}^{-1}$. La température à partir de laquelle NF/A696 commence à se former est d'environ 145 K. Pour F684/A681, on obtient : $\Delta H_2^\# = 25 \text{ kJ.mol}^{-1}$ et $\kappa_2 = 6.9 \text{ K}^{-1}\text{s}^{-1}$. La température à partir de laquelle F684/A681 commence à se former est d'environ 170 K.

Ces résultats permettent de montrer que la consommation de F644/A642 (elle-même liée avec la formation de NF/A696) devient significative dans une gamme de température semblable à celle de la transition vitreuse du solvant (qui est de 158 K dans ces conditions de viscosité). Pour comprendre les éventuels couplages entre l'état du solvant et la capacité de la POR à catalyser la réaction, il est intéressant d'étudier plus précisément la consommation de F644/A642 lorsque la température de la transition vitreuse du solvant est modifiée. On répète donc la même expérience pour un pourcentage de glycérol de 40% donnant une température de transition vitreuse de 172 K.

La figure 3.23 présente la superposition des courbes de consommation de F644/A642 pour les deux tampons d'activité basse température de viscosités différentes. Les cinétiques sont équivalentes dans les deux cas, décalées de 10 K. En modélisant les deux phénomènes avec un modèle identique, on obtient : $\Delta H_{25}^\# = 19.5 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta H_{40}^\# = 20 \text{ kJ.mol}^{-1}$ et $\kappa_{25} = 13 \text{ K}^{-1}\text{s}^{-1}$, $\kappa_{40} = 9.3 \text{ K}^{-1}\text{s}^{-1}$. Cette expérience met donc en évidence un couplage entre

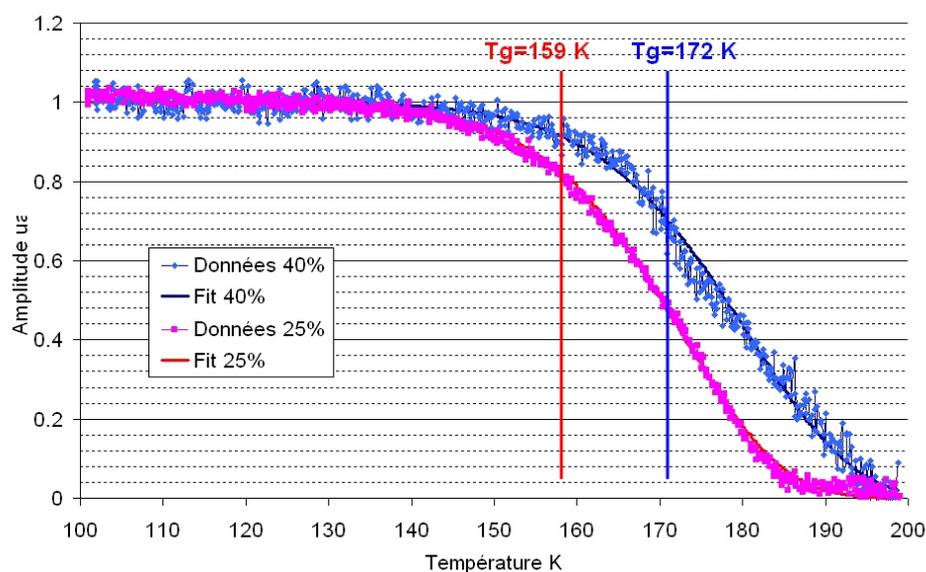


FIG. 3.23 – Disparition de F644/A642 en fonction de la température pour deux solutions de viscosités différentes, superposition du modèle théorique aux données obtenues après traitement SVD. En bleu, 40% de glycérol et 12.5% de sucrose, en rose 25% de glycérol et 12.5% de sucrose. Illumination actinique avec le laser rouge pulsé (80 s d'exposition pour 100 s d'expérience) de 10 mW en sortie de fibre 600 μm . La fibre est directement fixée à 1 cm de l'échantillon, assurant une puissance d'environ 10 mW/cm² sur l'échantillon. Rampe de température à 100 K/h. Pchlde 0.04 mM, NADPH 0.3 mM, POR 0.12 mM.

la viscosité du tampon d'activité basse température (et donc la température de la transition vitreuse) et la consommation de F644/A642. Le décalage de 10 K entre les deux phénomènes dans les tampons à 25 et 40 % de glycérol est équivalent à celui entre les températures de la transition vitreuse dans ces deux solutions. De même, les températures de formation de NF/A696 sont décalées de 10 K.

3.3.3 Couplage entre activité non-fonctionnelle et dynamique du solvant

L'objectif est ici de suivre la formation des premiers intermédiaires de la « branche morte » non-fonctionnelle. Les états successivement formés sont le complexe ternaire (F644/A642), le premier état intermédiaire non absorbant et non fluorescent (NF/NA), le second état intermédiaire fluorescent (F694/A690) et le produit non-fonctionnel (F681_m). Ces études ont aussi

été réalisées pour deux solutions possédant des températures de transition vitreuse différentes.

Protocole

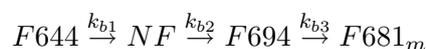
Les expériences sont réalisées en illuminant le complexe ternaire avec de la lumière bleue, fournie par un laser à 440 nm atténué à 0.7 mW. Les données recueillies sont les spectres de fluorescence. Le laser bleu a donc un double rôle dans ces expériences, assurant à la fois la fonction de déclencher la réaction et celle de sonder l'avancement de cette même réaction. Le protocole expérimental suivi est proche de celui d'une expérience de TDFM : une rampe de température est appliquée à la vitesse de 180 K/h, et en même temps le laser bleu fonctionne en mode pulsé, permettant à la fois l'acquisition à intervalles réguliers des spectres de fluorescence et le déclenchement de l'étape photosensible. Le choix de la longueur d'onde du laser, de sa puissance et de la gamme de température dans laquelle l'expérience est réalisée (entre 100 et 180 K) permet de s'assurer que le mécanisme suivi est le mécanisme non-fonctionnel passant par la formation de l'intermédiaire F694/A690.

Cette expérience est reproduite pour deux tampons d'activité basse température de viscosités différentes, avec respectivement 25 et 40% de glycérol.

Résultats

Le complexe ternaire F644/A642 est consommé à 100 K pour former un état intermédiaire non fluorescent et non absorbant. Cette consommation est réalisable complètement à 100 K, donc avant la transition vitreuse. Il est ensuite intéressant de suivre l'apparition du premier intermédiaire fluorescent F694/A690 suivie par la formation de F681_m. Pour suivre la dépendance en température de l'apparition de cet intermédiaire, nous avons décomposé les spectres obtenus en utilisant la SVD.

On modélise le chemin réactionnel suivant :



Nous travaillons dans la fenêtre [660 - 740 nm]. Pour simplifier le modèle cinétique, on postule que dès le début tout le F644/A642 a été consommé et que le stock de départ est donc constitué uniquement par l'espèce NF/NA, ce qui est vérifié. On obtient :

$$\begin{cases} \frac{dNF}{dt} = -k_{b2}NF(t) \\ \frac{dF694}{dt} = -k_{b3}F694(t) + k_{b2}NF(t) \\ F681_m(t) = NF(t=0) - F694(t) - NF(t) \end{cases}$$

F694(t) représente la formation d'une espèce à partir de NF dans une réaction de premier ordre, suivie par sa consommation pour former F681_m(t). Les dépendances en température de NF(t), F694(t) et F681_m(t) sont contrôlées par des lois de type théorie de l'état de transition (voir le paragraphe 1.6.2).

Comme il n'est pas possible de proposer des solutions analytiques, on résout le système de manière discrète, avec k de la forme $k^i(T^i) = \kappa T^i \exp \frac{-\Delta H^\#}{RT^i}$ et $T(i)$ donnant la température de chaque spectre i. Les paramètres thermodynamiques à ajuster sont donc κ_{b2} , $\Delta H_{b2}^\#$ et κ_{b3} , $\Delta H_{b3}^\#$.

$$\begin{cases} NF^i = NF^{i-1} + (t^i - t^{i-1})(-k_{b2}^i NF^{i-1}) \\ F694^i = F694^{i-1} + (t^i - t^{i-1})(-k_{b3}^i F694^{i-1}) + (t^i - t^{i-1})(k_{b2}^i NF^{i-1}) \\ F681_m^i = NF^0 - NF^i - F694^i \end{cases}$$

La figure 3.24 représente une superposition des spectres bruts obtenus lors de l'expérience de TDFM. On peut suivre la consommation de F644/A642, suivie par l'état NF/NA et par la formation de F694/A690.

Le spectre de l'état intermédiaire F694/A690 obtenu après déconvolution est représenté en figure 3.25. Comme dans le cas de NF/A696, le modèle utilisé ne décrit pas parfaitement les résultats, particulièrement la formation de F681_m : comme celle-ci intervient au-delà de T_g, elle est combinée avec des phénomènes tels que la photooxydation partielle de la Pchl_a libre, et sa déconvolution est quasi-impossible avec notre modèle simplifié. Par contre le spectre déconvolué obtenu pour F694/A690 est bien celui d'un pic centré sur 694 nm, et l'évolution temporelle représentée pour F694/A690 semble donc qualitativement correcte.

La figure 3.25 représente l'évolution de l'état intermédiaire F694/A690 au cours de la réaction, pour les deux viscosités différentes. Le modèle théorique est superposé aux données expérimentales. Celles-ci sont quasiment superposables dans les solutions à 25 et à 40 % de glycérol. Elles suggèrent que la formation de ce premier intermédiaire fluorescent est indépendante de la viscosité du solvant, et uniquement fonction de la température du système. Cet état commence à apparaître à 140 K, valeur identique pour les deux expériences. L'énergie d'activation ($\Delta H^\#$) calculée à partir des courbes théoriques est la même dans les deux cas, d'une valeur de 12 kJ.mol⁻¹ alors que la valeur de κ varie entre 0.4 et 0.7 K⁻¹s⁻¹ (pour 25 et 40%). Ces valeurs

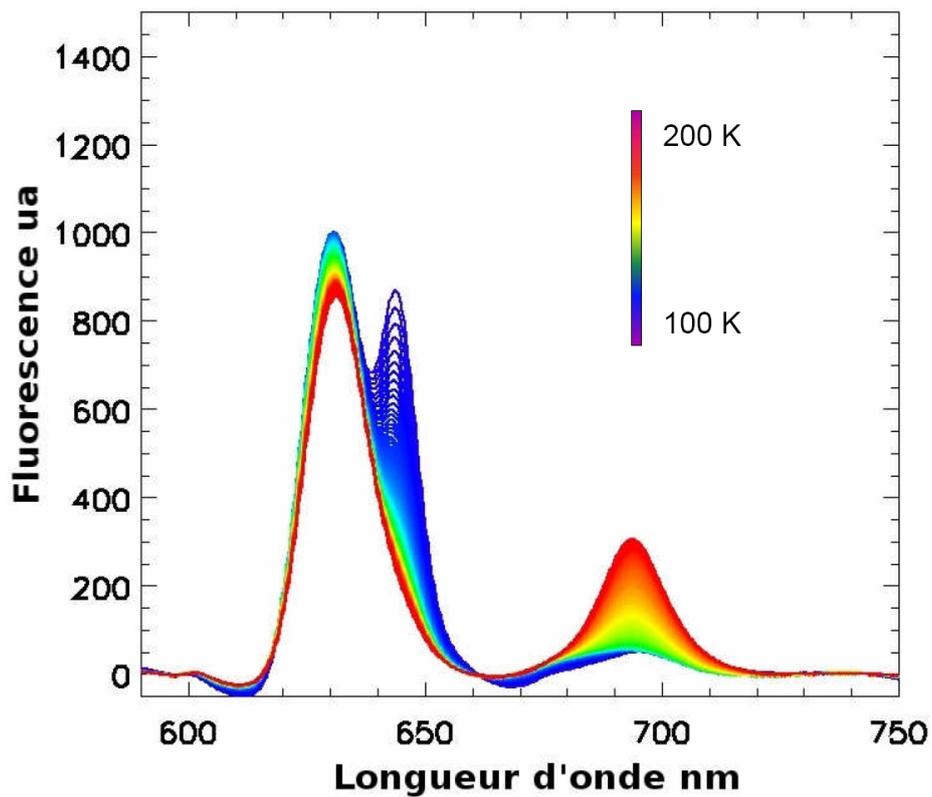


FIG. 3.24 – Spectres bruts de fluorescence obtenus lors d'une expériences de TDFM suivant le mécanisme non-fonctionnel. Illumination actinique avec un laser bleu à 440 nm de 0.7 mW en sortie de fibre 600 μm et 40 ms d'exposition pour 1 s d'expérience. Rampe à 180 K/h. Pchl ide 0.04 mM, NADPH 0.3 mM, POR 0.12 mM, 25% de glycérol, 12.5% de sucrose.

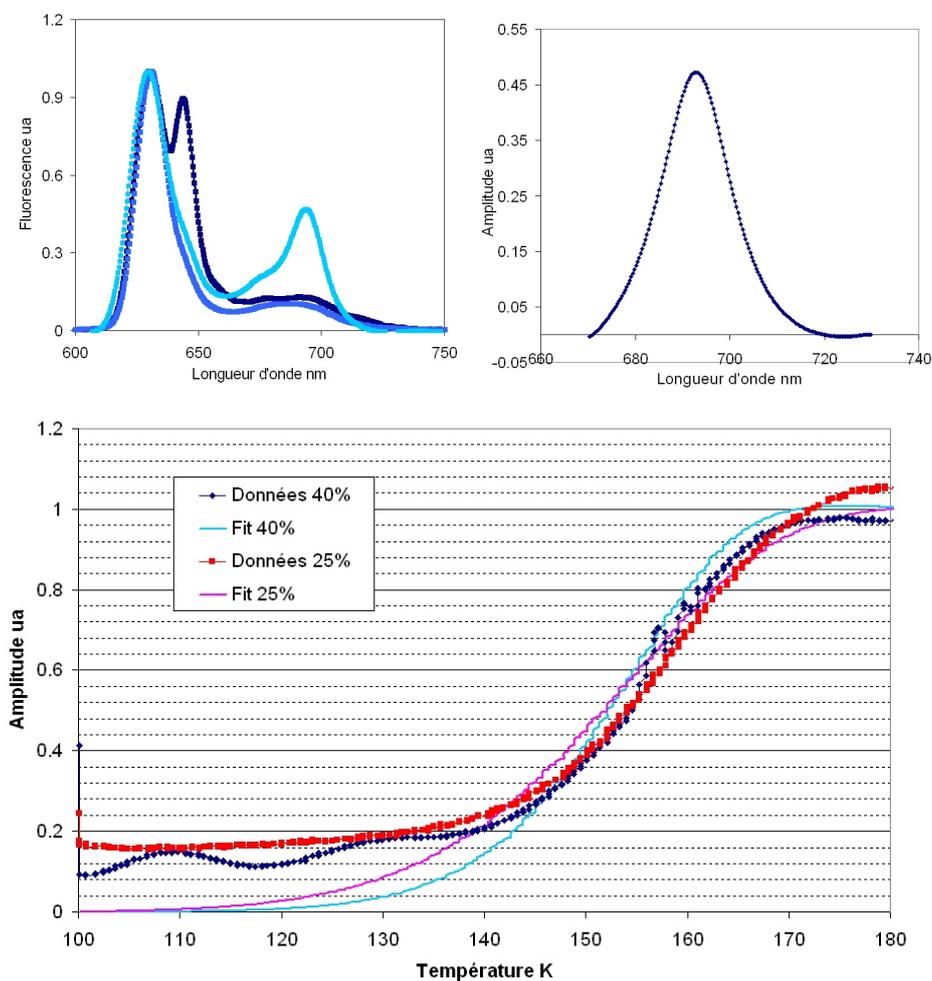


FIG. 3.25 – Spectres de fluorescence obtenus lors d’une expériences de TDFM suivant le mécanisme non-fonctionnel. En haut à gauche, les spectres des trois états étudiés (F644/A642, NF/A696 et F694/A690). En haut à droite, le spectre de F694 déconvolué obtenu par SVD. En bas, la dépendance en température de la formation de F694/A690 pour deux viscosités différentes obtenue par traitement SVD (12.5% de sucrose avec 25% (rouge) et 40% (bleu) de glycérol), superposée avec les modèles utilisés. Illumination actinique avec un laser bleu à 440 nm de 0.7 mW et 40 ms d’exposition pour 1 s d’expérience. Rampe à 180 K/h. Pchl_{id} 0.04 mM, NADPH 0.3 mM, POR 0.12 mM.

numériques sont à considérer avec précautions au vu de l'accord imparfait entre le modèle et les données expérimentales.

3.4 Discussion

Nos expériences sur le mécanisme réactionnel de la POR, et sur le couplage entre son activité fonctionnelle et la transition vitreuse du solvant, nous ont permis d'obtenir différents résultats :

- Il existe deux chemins réactionnels : l'un fonctionnel, qui a lieu au-dessus de la transition vitreuse et l'autre non-fonctionnel, impliquant un processus multiphotonique en lumière bleue et qui a lieu en dessous de T_g .
- Le couplage entre la formation des états intermédiaires et T_g est « doux », dans le sens où il peut être décrit par des lois de type Arrhenius.
- La consommation de F644/A642 est couplée aux transitions de phase du solvant désorganisé (« bulk solvent ») qui entoure la protéine.
- La formation de F694 n'est pas couplée aux transitions de phase de ce solvant.

Nous allons d'abord discuter du couplage entre l'activité de la POR et la dynamique du solvant, puis, après avoir présenté un état de l'art en la matière, nous allons exploiter nos résultats pour essayer de décrire les mécanismes catalytiques mis en jeu lors de la réduction de la Pchl_a.

3.4.1 Couplage entre l'activité de la POR et la dynamique du solvant

Nos expériences nous ont permis d'étudier l'activité de la POR, lors des mécanismes fonctionnel et non-fonctionnel, dans des conditions de viscosité et de température identiques, et de la relier à la température de la transition vitreuse du solvant.

Cas du mécanisme fonctionnel

Dépendance en fonction de la viscosité du solvant La dépendance en température de l'étape de photo-activation du complexe ternaire est fonction de la viscosité du solvant. Le décalage entre les deux courbes représentant la consommation de F644/A642 dans des tampons d'activité basse température de viscosités différentes (avec respectivement 25 et 40% de glycérol) est de 10 K (figure 3.23). Elle est du même ordre de grandeur que l'écart entre les

températures de la transition vitreuse dans ces deux solutions (environ 14 K).

Pour le tampon à 25% de glycérol, les deux phénomènes suivis, à savoir la consommation du F644/A642 et la transition vitreuse du solvant, sont centrés sur les mêmes températures. La disparition du F644/A642 commence avant la transition vitreuse, vers 140 K, signe d'un système qui n'est pas complètement figé même avant Tg. Le phénomène devient toutefois significatif seulement autour de Tg. Le même phénomène se reproduit à l'identique pour la solution à 40% de glycérol, mais avec une température de transition vitreuse à 172 K et une consommation significative de F644/A642 à partir de cette température.

Si l'on accepte que le passage au-dessus de la transition vitreuse d'un solvant corresponde à son entrée dans une phase où il acquiert des propriétés équivalentes à celles d'un « gel » permettant aux protéines une grande flexibilité [Johari, 2005], ces résultats sont cohérents avec la nécessité pour le complexe de subir un changement conformationnel significatif pour former l'état intermédiaire NF/A696. Ces résultats suggèrent aussi que la transition vitreuse soit un événement « doux », qui peut être modélisé par une loi exponentielle (théorie de l'état de transition dans notre modélisation), et donc que ce n'est pas une transition de phase au sens thermodynamique strict du terme. La mesure de Tg dépend par exemple grandement de l'échelle de temps à laquelle on la regarde. Dans notre cas elle est de l'ordre de la nanoseconde (temps de vie de fluorescence de l'Oregon Green).

Les clefs proposées par Fenimore pour expliquer les mouvements dans les protéines (détaillées dans le paragraphe 1.5.4) [Fenimore et al., 2004] permettent d'éclairer ce couplage entre l'activité enzymatique et la température de transition vitreuse du solvant. Il propose en effet trois types de mouvements chez les protéines (ceux dépendant du solvant désorganisé (« bulk solvent »), ceux dépendant du solvant organisé contenu dans la sphère d'hydratation et ceux indépendant du solvant). Les premiers sont couplés avec les fluctuations diélectriques du solvant désorganisé qui entoure la protéine. Ces mouvements correspondent principalement à des changements conformationnels à grande amplitude. Ils sont différents de ceux couplés avec le solvant organisé composant la sphère d'hydratation de la protéine. Par définition, celui-ci est étroitement lié par des liaisons hydrogènes en surface de la protéine, et existe sous la forme d'une couche de 2-3 molécules d'épaisseur. La dynamique de ce solvant n'est pas accessible aux études sur les transitions de phase telles que nous les réalisons avec la TDFM, les informations la concernant étant noyées dans celles du solvant désorganisé.

Les résultats que nous avons obtenus, couplant des mesures de transition vitreuse par TDFM sur le solvant et des mesures sur l'activité de la POR (*via* la consommation du complexe ternaire F644/A642) suggèrent donc que

les mouvements impliqués dans la formation du premier état intermédiaire du mécanisme de réduction de la Pchlide par la POR sont du premier type défini par Fenimore, dépendant du solvant désorganisé (« bulk solvent »).

Paramètres thermodynamiques Les modèles cinétiques proposés nous ont permis de calculer différents paramètres thermodynamiques de la réaction. Pour une solution à 25% de glycérol, on ajuste le modèle avec : $\kappa_1 = 13 \text{ K}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $\Delta H_1^\# = 19.5 \text{ kJ.mol}^{-1}$ pour la consommation de F644/A642. Cette valeur est en bon accord avec celle calculée par Heyes pour une solution avec 60% de sucrose ($\Delta H^\# = 18.8 \text{ kJ.mol}^{-1}$) [Heyes et al., 2002].

Si la consommation de F644/A642 correspondait directement à la formation de NF/A696, les valeurs obtenues pour l'énergie d'activation (et celles de κ) devraient être voisines. La valeur calculée pour la formation de NF/A696 est de $\Delta H_1^\# = 16.3 \text{ kJ.mol}^{-1}$ et l'écart entre les valeurs des κ est encore plus grand. La différence observée peut s'expliquer par une modélisation insuffisante de la formation de NF/A696. Nous avons en projet de réaliser une déconvolution sur la gamme spectrale complète [600 - 740 nm] et de suivre ainsi toutes les espèces avec un seul modèle cinétique pour essayer de résoudre ce problème. Une explication pourrait aussi être l'existence d'état(s) intermédiaire(s) invisible(s) entre F644/A642 et NF/A696.

Le comportement distinct lors de la consommation de F644/A642 entre les solutions de viscosités différentes provient essentiellement d'une différence dans le paramètre κ , en effet : $\kappa_{25} = 13 \text{ K}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $\kappa_{40} = 9.3 \text{ K}^{-1}\text{s}^{-1}$, alors que les valeurs de l'énergie d'activation sont presque identiques dans les deux cas : avec respectivement 19.5 et 20 kJ.mol^{-1} . Il est possible de modéliser la fréquence d'événement (« attempt frequency ») k par l'équation 3.7, où γ représente un coefficient en $\text{cP.s}^{-1}\text{K}^{-1}$, η la viscosité du solvant, ξ un terme représentant les frictions internes de la protéine [Plaxco and Baker, 1998]. Cette fréquence d'événements est directement proportionnelle à κ (qui intègre en plus différentes constantes issues de l'équation 3.4, comme la variation d'entropie).

$$k = \frac{\gamma}{\eta + \xi} T \quad (3.7)$$

Dans nos études en fonction de la viscosité du solvant, l'énergie d'activation est conservée, suggérant qu'il n'y a pas de modifications dans le paysage énergétique du complexe. Par contre, le paramètre κ diminue inversement à l'augmentation de la viscosité du solvant, conformément à l'équation 3.7.

Cas du mécanisme non-fonctionnel

Dans une gamme de températures identique à celle dans laquelle F644/A642 est consommé dans le mécanisme fonctionnel, un état intermédiaire F694/A690 se forme dans le mécanisme non-fonctionnel, et sa formation est indépendante de la viscosité du solvant.

Il n'existe pas de différence significative entre les deux courbes représentant la formation de F694/A690 dans les tampons d'activité de viscosités différentes (avec 25 et 40% de glycérol). Dans les deux cas, cette formation débute aux alentours de 135 K pour devenir significative au-delà de 150 K. L'écart entre les températures de transition vitreuse dans ces deux solutions est d'environ 14 K. La formation de F694/A690 semble donc indépendante de la viscosité du tampon d'activité employé.

En reprenant les définitions proposées par Fenimore (voir le paragraphe 1.5.4), la flexibilité impliquée dans la formation de F694/A690 pourrait avoir deux origines : les mouvements harmoniques des atomes, autorisés par l'augmentation de la température, ou un couplage avec les mouvements du solvant formant la sphère d'hydratation et dont la dynamique ne nous est pas accessible avec la technique de la TDFM. Il est toutefois très probable que la sphère d'hydratation soit influencée par la viscosité du solvant désorganisé et donc dépendante de sa température de transition vitreuse.

La formation de F694/A690 est donc sans doute une fonction intrinsèque de la protéine, possible par les seuls mouvements harmoniques contrôlés par l'énergie thermique (et donc du troisième type proposé par Fenimore).

3.4.2 Mécanisme catalytique : état de l'art

De nombreuses techniques (spectroscopies d'absorption, de fluorescence, RPE...) ont été employées, sur des échantillons *in vivo* ou *in vitro* et à des températures comprises entre 298 et 4 K pour étudier le mécanisme catalytique de la POR. Nous présenterons d'abord les données (souvent contradictoires) produites par ces études, avant de les comparer avec nos résultats.

Nous nous focalisons sur l'étude des premiers états intermédiaires du mécanisme catalytique, observés à basse température. Nous allons d'abord présenter les résultats obtenus *in vivo*, qui sont les plus nombreux, et ceux obtenus historiquement. Ils diffèrent notablement de ceux obtenus *in vitro*.

Les premières études sur le mécanisme catalytique de la POR (du haricot principalement) ont concerné des membranes d'étioplastes [Griffiths, 1991]. La Pchl_a, quand elle forme dans ces structures le complexe ternaire avec le NADPH et la POR, possède un spectre de fluorescence avec un maximum

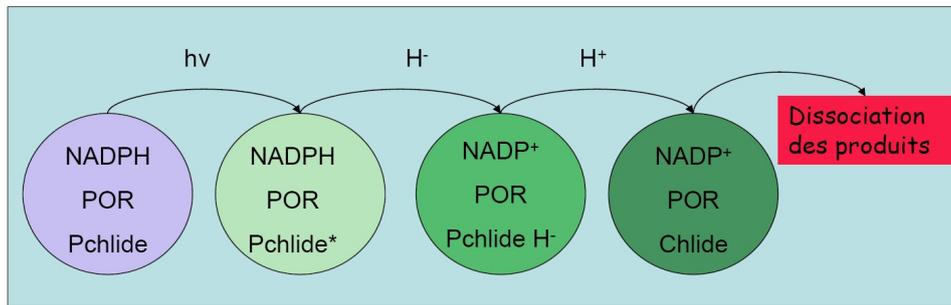
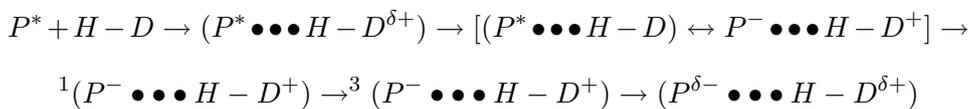


FIG. 3.26 – Mécanisme biochimique proposé pour le mécanisme réactionnel.

à 657 nm (F657). Ces études ont permis d'identifier deux espèces non fluorescentes formées après illumination. La première (R) est stable à 77 K et a le même spectre d'absorption que le complexe initial formé dans le noir, mais elle ne fluoresce pas. Le temps de vie à température ambiante de cet état est de l'ordre de la nanoseconde [Iwai et al., 1984]. La deuxième (X690) absorbe autour de 690 nm et apparaît au delà de 153 K. Son temps de vie à température ambiante est compris entre 35 et 250 ns [Iwai et al., 1984]. L'augmentation de la température après illumination conduit à la formation séquentielle de tous les états intermédiaires jusqu'à la Chlide (F678).

R et X690 sont des espèces paramagnétiques [Belyaeva et al., 1988]. Il a été proposé que X690 représente soit un état radicalaire neutre du complexe à moitié réduit (PH \cdot), soit le complexe [NADP $^+$ POR PchlidoH $^-$] [Griffiths, 1991] (figure 3.26). Cette seconde hypothèse serait toutefois en contradiction avec les résultats de RPE qui mesurent un signal doublet compatible avec un électron non apparié.

Plus récemment, il a été proposé un mécanisme impliquant un complexe de transfert de charge comme intermédiaire dans la synthèse de la Chlide [Raskin and Schwartz, 2002]. La réaction suivante résume le mécanisme proposé où P représente la Pchlido et D le NADPH.



L'état d'équilibre [(P $^* \bullet \bullet \bullet H - D) \leftrightarrow P^- \bullet \bullet \bullet H - D^+$] aurait alors une durée de vie comprise entre 1 et 2 ns. L'existence d'un état triplet ${}^3(P^- \bullet \bullet \bullet H - D^+)$ permet d'expliquer la durée comprise entre 35 et 250 ns qui sépare l'état d'équilibre du complexe de transfert de charge (CTC). Dans le cadre de cette hypothèse, X690 serait le CTC dans son état fondamental. La compréhension du mécanisme reste donc très partielle.

Lebedev et Heyes ont travaillé sur des protéines de POR purifiées et les ont étudié sous forme monomérique *in vitro* [Lebedev and Timko, 1999, Heyes et al., 2002]. Heyes a travaillé sur les POR de *Synechocystis* puis de *T. elongatus*, deux cyanobactéries. En éclairant le complexe ternaire à 160 K en lumière blanche, il a mis en évidence un état intermédiaire non fluorescent (le pic caractéristique F644/A642 est consommé) mais qui absorbe au maximum à 696 nm (NF/A696). Cet état est ensuite consommé pour former F684/A680 au delà de 190 K. Les auteurs proposent, sans études RPE, que NF/A696 soit la Pchl_a sous forme radicalaire. L'état suivant F684/A681 serait alors de la Chl_a sous forme de complexe avec la POR et le NADP⁺. Pour justifier cette hypothèse, ils rappellent que de la Chl_a fluoresçant à 684 nm a déjà été observée [Boddi and Franck, 1997].

Lebedev a travaillé sur la PORB de l'orge. En déclenchant la réaction à 220 K, et en acquérant un spectre à cette température, il a isolé un état intermédiaire qui fluoresce à 682 nm (F682). Des expériences complémentaires ont montré qu'il était possible de former cet intermédiaire même après la mutation de la tyrosine 193. Cet état est donc antérieur au transfert du proton censé être réalisé par la tyrosine. Ces résultats ont été obtenus en travaillant sur de la PORB. Ils ne semblent toutefois pas dépendant de la nature de la POR étudiée. Cet état F682 est à rapprocher du F684/A681 observé par Heyes.

Les résultats observés *in vivo* et *in vitro* conduiraient à proposer des mécanismes différents dans les deux environnements, mais ils pourraient aussi provenir de réarrangements différents des pigments selon qu'ils soient associés à une protéine soluble ou associée à la membrane d'un étioplaste. Il a déjà été rapporté une réaction avec des propriétés spectroscopiques identiques à celles observées *in vitro*, qui se déroulerait sous forme minoritaire dans les membranes des étioplastides [Boddi and Franck, 1997].

3.4.3 Mécanismes catalytiques : interprétation des résultats

Les sources de lumière que nous avons utilisées, les gammes de températures que nous avons explorées et les protocoles que nous avons employés, nous ont conduit à obtenir des résultats parfois différents de ceux décrits dans la littérature. Il est alors intéressant de les comparer, d'essayer d'interpréter les différences et de proposer des hypothèses en s'appuyant sur les résultats obtenus concernant le couplage entre l'activité de la POR et la dynamique du solvant.

Mécanisme fonctionnel

La mécanisme fonctionnel conduisant à la Chlide que nous avons observé est similaire à celui proposé par Heyes [Heyes and Hunter, 2004] pour la POR de *T. elongatus*. Il passe par la formation de NF/A696 vers 150 K, puis de F684/A681 au-delà de 190 K avant de former la Chlide.

La nature de l'état NF/A696 n'est pas élucidée. Toutes les études de RPE réalisées sur les intermédiaires formés à des températures comparables (autour de 140 K) ont toutefois montré que ces états présentaient un signal RPE caractéristique d'espèces radicalaires. NF/A696 correspond donc probablement à un état où la double liaison C17-C18 du cycle D de la Pchlde est cassée suite à l'absorption d'un photon, avant la fixation de l'hydrure et/ou du proton. Il est possible d'envisager que les états non-fluorescents NF/A696 (mesuré sur la POR monomérique de cyanobactérie) et X690 (mesuré sur la POR de haricot dans des membranes d'étioplastes) représentent le même état d'avancement de la réaction. Il serait alors possible de proposer que NF/A696 représente un CTC dans son état fondamental, hypothèse qui concilie tous les faits expérimentaux déjà obtenus [Raskin and Schwartz, 2002].

Pour expliquer la formation des premiers intermédiaires, Lebedev propose un mécanisme qui s'inspire du phénomène de photoisomérisation observé chez d'autres protéines photosensibles comme la PYP [Genick et al., 1997, Kort et al., 1996]. Dans ce scénario, l'absorption d'un photon par le complexe ternaire entraîne la formation d'un état électronique excité et l'isomérisation du pigment. Les changements conformationnels induits permettent au complexe d'atteindre un nouveau minimum énergétique favorisant le transfert d'un proton et d'un hydrure. Le retour à l'état initial dépend de la température, mais la première étape de photoisomérisation est possible même à basse température et serait nécessaire pour former le premier intermédiaire NF/A696.

Nous avons observé que la consommation de F644/A642 est fortement dépendante de la viscosité du solvant et donc de sa température de transition vitreuse. Elle est couplée avec le solvant désorganisé (« bulk solvent ») et implique donc des réarrangements conformationnels relativement importants. Ces remarques renforcent donc l'hypothèse selon laquelle NF/A696 serait un état intermédiaire résultant d'une photoisomérisation.

Les deux hypothèses de photoisomérisation et de formation d'un CTC représentent le mécanisme le plus probable à ce jour pour expliquer la formation des premiers intermédiaires dans le mécanisme réactionnel de la POR. Dans ce cas, NF/A696 serait le CTC dans son état fondamental, dans lequel le pigment aurait subi une isomérisation.

Mécanisme non-fonctionnel

À 100 K, il est possible de faire suivre à la réaction un mécanisme non-fonctionnel qui ne produise pas la Chlide F674 mais conduise à une « branche morte » de la réaction. Le nouvel état qui accompagne la consommation du pic F644/A642 du complexe ternaire est non fluorescent et non absorbant, à la différence des résultats de Belyaeva obtenus *in vivo*, dans lesquels la consommation à 77 K du complexe ternaire conduit à un état non fluorescent mais absorbant.

Nous avons pu montrer que ce mécanisme était dépendant de la longueur d'onde (il ne se produit que pour une illumination dans le bleu) et de la puissance utilisée (pour une dose de photon constante, la consommation de F644/A642 pour former NF/NA est dépendante de la puissance de la source). Il implique donc probablement un processus multiphotonique. Il est nécessaire que le temps de vie de l'état formé lors de l'absorption du premier photon soit assez long pour ensuite permettre l'absorption d'un second photon avant la relaxation. Des calculs réalisés en prenant en compte la puissance de la source lumineuse, la DO de l'échantillon et son volume ont montré que le temps moyen entre l'absorption de deux photons était légèrement inférieur à 100 μ s. L'hypothèse d'un état triplet semble donc plausible.

La suite du mécanisme réactionnel de cette « branche morte » peut se dérouler dans le noir. Elle passe par la formation d'un second état (F694/A690) au-dessus de 150 K et forme un produit F680_m/A677_m au-delà de 190 K. La dépendance en température de la formation de ces intermédiaires traduit leur énergie d'activation croissante.

Le découplage entre la formation de F694/A690 et les transitions de phase du solvant suggère que les mouvements atomiques impliqués soient de faible amplitude. Ces résultats sont donc cohérents avec l'hypothèse selon laquelle la formation du second intermédiaire du mécanisme non-fonctionnel (F694/A690) n'implique pas de changement conformationnel important et que cet état est uniquement le produit de réarrangements électroniques.

L'étude d'un diagramme énergétique représentant les états électroniques de la chlorophylle (figure 3.27) permet de proposer une nouvelle hypothèse (aimablement suggérée par Klaus Brettel). Les porphyrines possèdent deux bandes d'absorption, l'une dans le bleu et l'autre dans le rouge, correspondant à deux niveaux d'excitation électronique S1 et S2. Les photons bleus sont absorbés et excitent la Pchlde vers le niveau S2. La desexcitation radiative qui induit la fluorescence est précédée par une desexcitation non radiative qui ramène l'état énergétique de la molécule au niveau S1, qui est celui atteint après excitation par des photons rouges de moindre énergie. Dans le cas de la chlorophylle, l'excitation du niveau S1 peut entraîner (avec

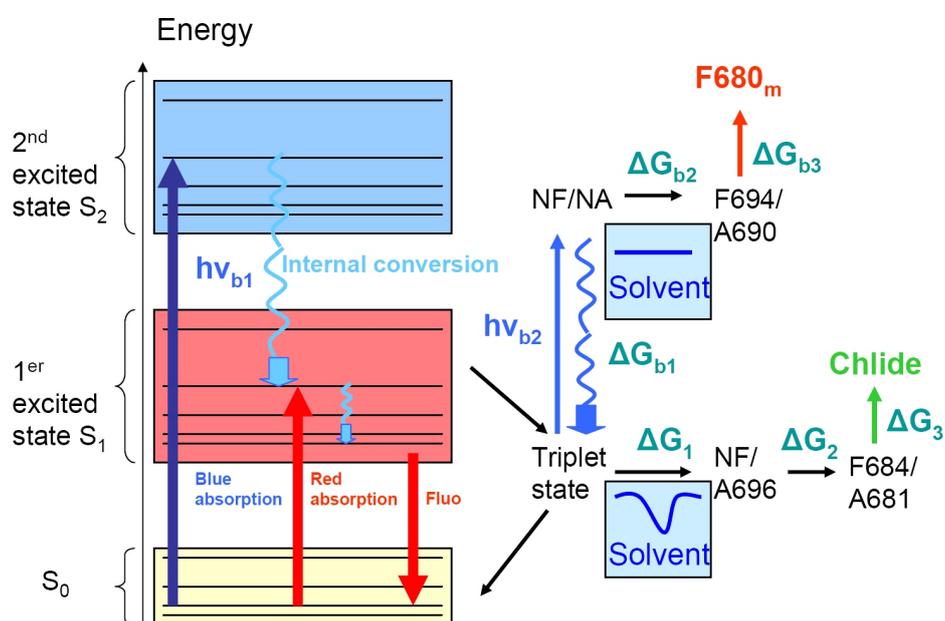


FIG. 3.27 – Diagramme énergétique représentant les différents états électroniques de la chlorophylle. $h\nu_{b1}$ représente le premier photon du chemin bleu, $h\nu_{b2}$ le second. Les cases indiquées solvant représente l'absence, ou non, de couplage entre la réaction et l'état du solvant.

une faible probabilité) à la formation d'un état triplet (avec une durée de vie de l'ordre de la ms), qui est blanchit dans le rouge et pas dans le bleu [Angerhofer, 1991, Livingstone and Fujimori, 1958].

À 100 K il est impossible de déclencher la réaction en lumière rouge, alors que cela est possible en lumière bleue. Nous proposons qu'à cette température l'absorption d'un premier photon bleu, suivi de sa desexcitation à S1, entraîne la formation d'un état triplet à partir du niveau S1. L'absorption d'un deuxième photon bleu conduirait alors à la formation de NF/NA. La formation de NF/NA est impossible dans le rouge car l'état triplet n'absorbe pas de photon de cette longueur d'onde. Il peut donc se desexciter vers l'état fondamental. A plus haute température, lorsque les mouvements du solvant sont possibles, l'état triplet pourrait évoluer vers A696. La formation de NF/NA (dont le rendement est très faible) deviendrait alors très minoritaire par rapport à la formation de A696. Aussi, selon l'état du solvant, soit le chemin fonctionnel, soit le chemin non-fonctionnel serait favorisé.

Ce mécanisme concilie les faits expérimentaux que nous avons pu constater, et renforce l'hypothèse selon laquelle il existe un état triplet dans le mécanisme fonctionnel (étape intermédiaire dans la formation du CTC). Cet état précède la formation de NF/A696 et sa formation est indépendante de l'état du solvant.

Les puissances lumineuses employées pour déclencher le mécanisme réactionnel sont sans commune mesure avec celles auxquelles peuvent être exposés les organismes photosynthétiques sur terre. Il est donc difficile de proposer que le mécanisme non-fonctionnel corresponde à un processus de photoprotection.

3.4.4 Conclusions

Couplages entre activité fonctionnelle et dynamique du solvant

Les mécanismes non-fonctionnel et fonctionnel de consommation du complexe ternaire se déroulent dans des gammes de températures sensiblement identiques (entre 140 et 180 K), mais dépendent différemment de la viscosité du solvant. La formation de l'intermédiaire F694/A690 du mécanisme non-fonctionnel est indépendante de la température de la transition vitreuse. Au contraire, la consommation de F644/A642 pour former NF/A696 est fonction de cette température de transition. Cette constatation confirme que les deux mécanismes impliqués sont distincts.

L'étude comparée du déroulement en fonction de la viscosité des deux mécanismes possibles à partir de 100 K pour consommer le complexe ternaire photoactivable par la POR fournit donc un outil exceptionnel pour mettre

en évidence les différents mouvements régissant l'activité des protéines (tels qu'ils ont pu être présentés par Fenimore [Fenimore et al., 2004]). À partir d'un même état initial, le suivi de deux chemins réactionnels différents permet de mettre en évidence que l'un est dépendant du solvant désorganisé (« bulk solvent ») qui entoure la protéine, alors que l'autre est indépendant des mouvements permis par celui-ci et uniquement couplé avec les mouvements harmoniques contrôlés par la température (ou ceux permis par le solvant de la sphère d'hydratation).

Ces résultats soulignent donc l'importance du solvant pour l'activité fonctionnelle d'une protéine. Plusieurs auteurs ont déjà souligné cet aspect de la dynamique des protéines [Lubchenko et al., 2005]. Nos résultats montrent que la POR doit être lubrifiée par son solvant pour que le mécanisme fonctionnel puisse se dérouler.

Implications pour la cristallographie cinétique des protéines

« Protein function is significantly altered below this transition temperature ; a fact that can be exploited to trap normally unstable intermediates in enzyme catalyzed reaction and stabilize them for periods long enough to permit their characterization by high-resolution protein crystallography »

Extraite d'un article de D. Ringe et G.A. Petsko, cette phrase représente l'état de l'art actuel en cristallographie cinétique des protéines [Ringe and Petsko, 2003]. Nos résultats ont des implications directes sur ces protocoles. En effet, le premier intermédiaire non fluorescent à 100 K, et la formation d'un produit non-fonctionnel qu'il implique, montre le danger de la méthode de « freeze-triggering ». Le déclenchement de la réaction à basse température peut conduire à un artefact expérimental, illustrant l'incompatibilité potentielle entre le déclenchement à basse température de la réaction et le bon déroulement du mécanisme réactionnel.

Chapitre 4

Conclusions & Perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse constituent une contribution biophysique à la compréhension des phénomènes de couplage entre l'activité fonctionnelle de la POR et la dynamique du solvant.

4.1 Rappels des conclusions

La cristallisation de la POR est un projet difficile, la protéine étant sensible à de nombreux facteurs conduisant à sa dégradation. Nos études quantitatives sur les sites de dégradation ont permis de mettre en évidence les acides aminés cibles dans la séquence de la protéine, et de commencer à remédier à ce phénomène de clivage. Ces résultats n'ont pas été suffisants pour stopper complètement la dégradation de la protéine et permettre des essais de cristallogenèse concluants. Le clivage de la protéine débute immédiatement après la purification, lors de la congélation. La réussite de la cristallisation de la POR passe donc par une modification du protocole de purification, ou par la suppression de la phase de congélation/ décongélation (avec par exemple la réalisation de la purification à Grenoble, suivie immédiatement après par les essais de cristallisation).

Le mécanisme de réduction de la Pchl_a reste un problème sujet à controverses, nos travaux ont permis d'apporter des informations supplémentaires, et sur sa dépendance en longueur d'onde, et sur la nature des états intermédiaires, révélant en plus l'existence d'un branche non-fonctionnelle dans le mécanisme catalytique.

Nos études sur le mécanisme catalytique de la POR nous ont permis d'aborder la thématique plus générale du couplage entre l'activité fonctionnelle des protéines et la dynamique du solvant. Elles ont mis en évidence que le mécanisme fonctionnel de réduction de la Pchl_a était dépendant du

solvant désorganisé (« bulk solvent »), alors que celui non-fonctionnel était lui indépendant des propriétés de ce solvant, et donc probablement une fonction intrinsèque de la protéine, contrôlée uniquement par l'énergie thermique disponible. Ces résultats soulignent donc l'importance du solvant pour l'activité fonctionnelle de la POR et vont dans le sens des travaux les plus récents décrivant les différents mouvements régissant l'activité des protéines, ainsi que leurs couplages avec la dynamique du solvant.

4.2 Perspectives

Indépendamment des études fondamentales sur les couplages entre l'activité fonctionnelle de la POR et la dynamique du solvant, le mécanisme catalytique de réduction de la Pchl_a reste l'objectif majeur des études sur la POR. Des études complémentaires (RPE) sur les états intermédiaires qui ont été isolés semblent nécessaires, mais la voie la plus directe serait la cristallisation de la POR.

Une fois cette étape franchie, il serait possible d'appliquer à l'étude de la POR un protocole de cristallographie cinétique « freeze triggering ». Tous nos résultats constituent des études préliminaires indispensables à une telle étude de cristallographie cinétique des protéines. Ils apportent une description spectroscopique de chaque état intermédiaire, et de sa dépendance en température, mais ont aussi montré qu'il fallait utiliser ce protocole avec précaution. Nos études ont en effet souligné l'existence de chemins catalytiques artefactuels aux basses températures, dont il est toutefois possible de s'affranchir en choisissant avec soin puissance et longueur d'onde de la lumière photoexcitatrice.

Des résultats de cristallographie cinétique sur le mécanisme catalysé par la POR apporteraient une connaissance approfondie du mécanisme, et permettraient sûrement d'affiner les différentes hypothèses concernant la nature chimique des intermédiaires réactionnels.

Annexe A

Glossaire d'enzymologie

A.1 Définitions

Enzyme : Protéine permettant de catalyser spécifiquement une réaction chimique.

Substrat : Molécule qui entre dans une réaction pour y être transformée grâce à l'action catalytique d'une enzyme.

Produit : Molécule qui apparaît au cours d'une réaction catalysée par une enzyme

Cofacteur : Molécule supplémentaire éventuellement nécessaire à une réaction enzymatique.

Site actif : Dans une enzyme, le site actif est l'endroit de fixation du substrat et où la catalyse a lieu.

Complexe enzyme substrat : Intermédiaire initial formé lors d'une catalyse enzymatique, dans lequel le substrat se lie au site actif de l'enzyme.

A.2 Aspects énergétiques

Le substrat et le produit d'une réaction enzymatique sont caractérisés par des liaisons chimiques. Au cours d'une réaction, des échanges d'énergie avec le milieu environnant ont lieu : certaines liaisons du substrat sont rompues en absorbant de l'énergie et les liaisons du produit sont formées en libérant de l'énergie (figure A.1).

Énergie libre d'activation : C'est l'énergie requise pour que la réaction ait lieu (l'énergie nécessaire pour que les liaisons du substrat soient rompues).

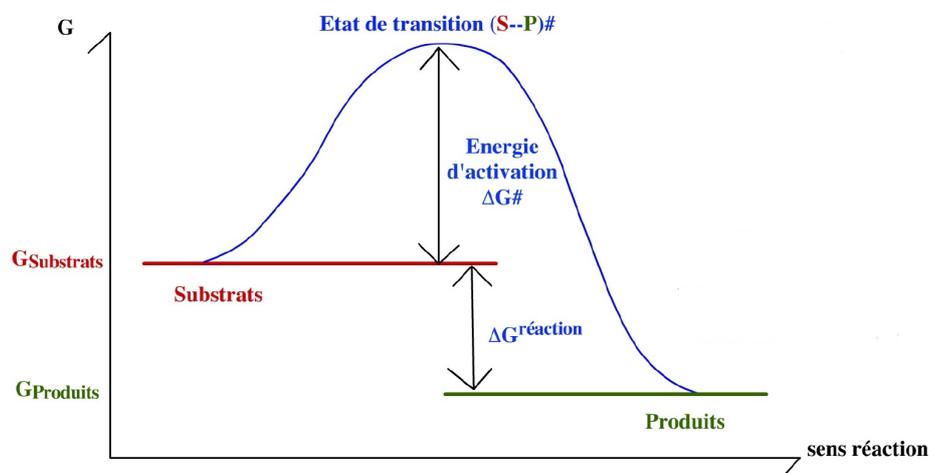


FIG. A.1 – Mécanisme catalytique, déroulement en fonction des coordonnées de réaction.

On la note $\Delta G^\#$.

État de transition : C'est l'état atteint quand l'énergie d'activation est absorbée. C'est l'état le plus énergétique, donc le plus instable. La réaction évolue spontanément vers un état énergétique plus faible, la formation du produit de la réaction.

Énergie libre de la réaction : C'est la variation d'énergie libre de Gibbs entre les produits et les substrats. Les enzymes augmentent la vitesse à laquelle un équilibre est atteint mais elles ne modifient pas $\Delta G_{\text{réaction}}$ (la constante d'équilibre de dissociation n'est pas modifiée).

État intermédiaire : Alors qu'un état de transition représente une phase très instable de la réaction, correspondant à un maximum énergétique le long des coordonnées de réaction, un état intermédiaire est beaucoup plus stable et correspond à un minimum énergétique local.

A.3 Aspects cinétiques

L'équation A.1 représente une réaction de catalyse enzymatique, avec E l'enzyme, S le substrat, ES le complexe enzyme-substrat et P le produit.



Constante de Michaelis : Concentration du substrat pour laquelle la vitesse initiale d'une réaction enzymatique atteint la moitié de la vitesse maximum. Elle peut s'exprimer en fonction des concentrations en enzyme [E], substrat [S] et complexe enzyme-substrat [ES] (équation A.2).

$$K_M = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (\text{A.2})$$

Vitesse maximale : Vitesse atteinte lorsque les sites de l'enzyme sont saturés par la substrat ($[S] \gg [K_M]$). Avec $[E_T]$ concentration totale de l'enzyme, on obtient :

$$V_{max} = k_3[E_T]$$

Vitesse catalytique : La vitesse catalytique maximale à concentration saturante de substrat est notée k_{cat} . Dans le cas de notre modèle enzymatique simplifié, elle est égale à k_3 . Le paramètre important est le rapport k_{cat}/K_M . Celui-ci est nécessairement inférieur à k_1 , vitesse de formation du complexe. La diffusion limite la valeur de k_1 , qui ne peut donc être supérieure à $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Pour des valeurs de k_{cat}/K_M de cet ordre de grandeur, on dit que l'enzyme a atteint la perfection cinétique.

Annexe B

Protocole de purification

1. *Croissance* Ajouter dans 12 erlen remplis de 500 ml de LB (milieu de culture) 5 ml de la culture d'une nuit de BL21 (une souche de *Escherichia coli*) dans laquelle le plasmide d'expression [pET9HIS + *por*] est inséré. Faire pousser à 30 ° C pendant 4-5 heures, jusqu'à atteindre une DO de 0.6 à 600 nm.
2. *Induction* Ajouter 2 ml d'IPTG (isopropyl β D-thiogalactopyranoside) à 100 mM à chaque flacon et faire pousser pendant trois heures supplémentaires.
3. *Récolte* Centrifuger les cellules à 4200 tr/min pendant 20 minutes, puis les stocker à -80 ° C.
4. A chaque étape, prélever des aliquots de 1 ml de cellules induites et non induites. Re-suspendre ces solutions dans le tampon de chargement du gel SDS-PAGE pour pouvoir lancer un gel plus tard.
5. Décongeler les cellules et les re-suspendre dans 100 ml de **tampon de fixation** (50 ml de Tris pH 7.5, 500 ml de chlorure de sodium NaCl, 5 mM d'imidazole) contenant 400 μ l d'inhibiteur de protéases (Sigma P8849).
6. *Lyse* Séparer les cellules en 4 aliquots de 25 ml chacun, et les soniquer pendant 4 fois 20 secondes.
7. Centrifuger les débris à 14000 tr/min pendant 1 heure et garder le surnageant pour lancer la colonne Ni²⁺.
8. *Début de la purification* Passer 100 ml de **tampon de chargement** (50 mM de sulfate de nickel) dans la colonne de fixation sépharose (volume de 50 ml, à 2 ml/min) pour faire une colonne d'affinité nickel.
9. Équilibrer la colonne avec 150 ml de **tampon de fixation** à 2 ml/min.
10. *Colonne d'affinité nickel* Faire passer le surnageant de l'étape 7 dans la colonne à 2 ml/min.

11. Laver la colonne avec 250 ml de **tampon de fixation** à 2 ml/min.
12. Laver la colonne avec 250 ml de **tampon de lavage** (tampon de fixation + 100 mM d'imidazole).
13. Éluer His-POR avec 150 ml de **tampon d'élution** (tampon de fixation + 250 mM d'imidazole).
14. Après chaque étape, prendre des aliquots de 7.5 μ l pour lancer plus tard un gel.
15. Faire précipiter la protéine au sulfate d'ammonium (3.6 M) par un mélange 1 :1, puis centrifuger à 12000 tr/min pendant 30 minutes.
16. Re-suspendre la protéine dans 150 ml de **tampon bleu de départ** (50 mM de Tris pH 7.5, 20 mM de NaCl, 1 mM DTT).
17. Centrifuger pendant 15 minutes à 12000 tr/min.
18. *Colonne d'affinité bleu sépharose* Passer la solution dans une colonne bleu sépharose (modèle 6 fast Flow, Pharmacia Biotech) de 20 ml, pré-équilibrée avec le **tampon de départ**, à 1 ml/min, puis laver la colonne avec environ 50 ml de **tampon de départ**.
19. Laver ensuite la colonne avec 80% de **tampon bleu de départ** et 20% de **tampon bleu d'élution** (50 mM Tris pH 7.5, 2.5 M NaCl, 1 mM DTT)
20. Pour éluer la POR de la colonne, on utilise 250 ml de **tampon bleu d'élution** en gradient de 20% à 50%. On fait ensuite passer 125 ml de **tampon bleu d'élution** à 100% dans la colonne. Collecte par fraction de 5 ml.
21. Faire un gel SDS PAGE avec une fraction sur 3 collectée, et mélanger les fractions contenant le plus de protéine.
22. Précipiter la protéine en la mélangeant en proportion 1 :1 à du sulfate d'ammonium (3.6 M), et centrifuger à 12000 tr/min pendant 30 minutes.
23. Re-suspendre la protéine dans le plus petit volume possible de **tampon de cristallisation** (30 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM DTT)
24. *Gel filtration* Passer la protéine dans une colonne de dessalage de 100 ml (Bio-Gel P-6DG, BioRad) pour enlever le sulfate d'ammonium.
25. Diluer avec 150 ml de **tampon de cristallisation**, et concentrer à la valeur souhaitée avec un concentrateur Vivaspin.

Annexe C

Décomposition par valeurs singulières (SVD)

C.1 Principes de la SVD

En algèbre linéaire, la SVD est la décomposition d'une matrice A de taille $M \times N$ en trois matrices ayant chacune des propriétés particulières.

$$A = USV^T$$

S est une matrice diagonale de taille $N \times N$ dont les valeurs propres sont classées par ordre croissant ($vp_1 > vp_2 > \dots > vp_N$).

$$S = \begin{pmatrix} vp_1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & vp_2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \ddots & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \ddots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & vp_N \end{pmatrix}$$

U et V sont deux matrices de tailles respectives $M \times N$ et $N \times N$. Les vecteurs de U et de V^T forment chacun une base orthonormale.

C.2 Application au traitement des spectres

Pendant la rampe de température d'une expérience de TDAM, on acquiert M spectres comportant chacun N points. Ces données sont rassemblées dans la matrice A de taille $M \times N$.

$$A = \begin{pmatrix} \lambda_{1,t_0} & \lambda_{1,t_1} & \lambda_{1,t_2} & \cdots & \lambda_{1,t_N} \\ \lambda_{2,t_0} & \lambda_{2,t_1} & \lambda_{2,t_2} & \cdots & \lambda_{2,t_N} \\ \lambda_{3,t_0} & \lambda_{3,t_1} & \lambda_{3,t_2} & \cdots & \lambda_{3,t_N} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \lambda_{M,t_0} & \lambda_{M,t_1} & \lambda_{M,t_2} & \cdots & \lambda_{M,t_N} \end{pmatrix}$$

U est appelée la matrice LSV (L pour « left »), elle comprend les vecteurs $LSV_1 \dots LSV_N$ qui forment une base orthonormale. Les vecteurs de la matrice LSV sont une combinaison linéaire des spectres déconvolués.

$$LSV_1 = \begin{pmatrix} LSV_{11} \\ \vdots \\ LSV_{1M} \end{pmatrix}$$

V^T est appelée la matrice RSV (R pour « right »), elle comprend les vecteurs $RSV_1 \dots RSV_N$ qui forment aussi une base orthonormale. De même, les vecteurs RSV sont des combinaisons linéaires des vecteurs représentant la dépendance temporelle des spectres déconvolués.

$$RSV_1 = (RSV_{11} \quad \dots \quad RSV_{1,N})$$

Physiquement, les vecteurs de RSV représentent une base « temporelle » sur laquelle les différents spectres représentés par les vecteurs de LSV sont projetés. On obtient ainsi la projection sur une base représentant le temps (RSV_1, RSV_2, \dots) d'une base représentant les différents spectres formant une autre base (LSV_1, LSV_2, \dots).

La puissance de la SVD est de pouvoir séparer les spectres déconvolués du bruit. Le nombre de valeurs propres de S significatives est équivalent aux nombre de spectres qu'il est possible de déconvoluer à partir des données initiales.

C.3 Application au traitement d'un cas particulier

Pour simplifier les calculs, on se placera dans des conditions où seuls deux spectres sont à déconvoluer à partir des données initiales. On appelle $f_1(\lambda)$ et $f_2(\lambda)$ les spectres déconvolués et t_1 et t_2 leurs dépendances temporelles respectives. Seules les deux premières valeurs propres de la matrice diagonale sont alors significatives. Les deux premiers vecteurs de la LSV sont une combinaison linéaire des deux spectres à déconvoluer, alors que

ceux de la RSV sont une combinaison linéaire de leurs dépendances temporelles. Les paramètres α, β, χ et δ exprimant la combinaison linéaire entre les événements physiques et les vecteurs propres sont les même pour les dépendances temporelle et spatiale. On peut donc écrire deux systèmes d'équation [Henry and Hofrichter, 1992].

$$\begin{pmatrix} LSV_1 \\ LSV_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha & \beta \\ \chi & \delta \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} f1(\lambda) \\ f2(\lambda) \end{pmatrix}$$

et

$$\begin{pmatrix} RSV_1 \\ RSV_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha v p_1 & \chi v p_2 \\ \beta v p_1 & \delta v p_2 \end{pmatrix}^{-1} \times \begin{pmatrix} t1 \\ t2 \end{pmatrix}$$

Pour résoudre ces deux systèmes, de nouvelles hypothèses sont nécessaires. Dans notre cas, il est nécessaire de proposer un modèle cinétique permettant de modéliser la dépendance temporelle des spectres déconvolués. On propose donc $t_1(a,b\dots)$ et $t_2(c,d\dots)$. Il reste à réaliser un ajustement global de toutes les variables des deux systèmes d'équation. α, β, χ et δ représentent des variables globales, conservées dans les deux systèmes, alors que $a,b,c,d\dots$ associées uniquement soit à t_1 soit à t_2 , sont des variables locales.

Le premier système résolu est celui décrivant la dépendance temporelle des spectres déconvolués, on détermine alors les coefficients α, β, χ et δ et les paramètres des fonctions t_1 et t_2 . A partir de ceux ci, on peut ensuite calculer les fonctions $f_1(\lambda)$ et $f_1(\lambda)$ représentant les spectres déconvolués.

Bibliographie

- [Adam et al., 2004] Adam, V., Royant, A., Nivière, V., Molina-Heredia, F. P., and Bourgeois, D. (2004). Structure of superoxide reductase bound to ferrocyanide and active site expansion upon X-ray-induced photo-reduction. *Structure (Camb)*, **12**(9), 1729–40.
- [Angerhofer, 1991] Angerhofer, A. (1991). *Chlorophylls*, chapter Chlorophyll triplets and radical pairs, pages 945–91. CRC Press Inc, Cleveland.
- [Armstrong et al., 2000] Armstrong, G. A., Apel, K., and Rüdiger, W. (2000). Does a light-harvesting protochlorophyllide a/b-binding protein complex exist? *Trends Plant Sci*, **5**(1), 40–4.
- [Becker et al., 2004] Becker, T., Hayward, J. A., Finney, J. L., Daniel, R. M., and Smith, J. C. (2004). Neutron frequency windows and the protein dynamical transition. *Biophys J*, **87**(3), 1436–44.
- [Begley, 1994] Begley, T. (1994). Photoenzymes : A novel class of biological catalyts. *Acc. Chem. Res.*, **27**, 394–401.
- [Belyaeva et al., 1988] Belyaeva, O., Timofeev, K., and Litivin, F. (1988). The primary reactions in the protochlorophyll(ide) photoreduction as investigated by optical and esr spectroscopy. *Photosynth Res*, **15**, 247–56.
- [Berglund et al., 2002] Berglund, G. I., Carlsson, G. H., Smith, A. T., Szöke, H., Henriksen, A., and Hajdu, J. (2002). The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, **417**(6887), 463–8.
- [Birve et al., 1996] Birve, S., Selstam, E., and Johansson, L. (1996). Secondary structure of NADPH : protochlorophyllide oxidoreductase examined by circular dichroism and prediction methods. *Biochem J*, **317** (Pt 2), 549–55.
- [Boddi and Franck, 1997] Boddi, B. and Franck, F. (1997). Room temperature fluorescence spectra of protochlorophyllide and chlorophyllide forms in etiolated bean leaves. *J Photochem Photobiol*, **B 41**, 73–82.
- [Boddi et al., 1990] Boddi, B., Lindsten, A., Ryberg, M., and Sundqvist, C. (1990). Phototransformation of aggregated forms of protochlorophyllide in isolated etioplast inner membranes. *Photochem. Photobiol.*, **52**, 83–87.

- [Bourgeois and Royant, 2005] Bourgeois, D. and Royant, A. (2005). Advances in kinetic protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol*, **15**(5), 538–47.
- [Bourgeois et al., 2003] Bourgeois, D., Vallone, B., Schotte, F., Arcovito, A., Miele, A. E., Sciara, G., Wulff, M., Anfirud, P., and Brunori, M. (2003). Complex landscape of protein structural dynamics unveiled by nanosecond Laue crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(15), 8704–9.
- [Bourgeois et al., 2002] Bourgeois, D., Vernede, X., Adam, V., Fioravanti, E., and Ursby, T. (2002). A microspectrophotometer for uv-visible absorption and fluorescence studies of protein crystals. *J Appl Crystallogr*, **35**, 319–26.
- [Chen et al., 1994] Chen, Y., Srajer, V., Ng, K., Legrand, A., and Moffat, K. (1994). Optical monitoring of protein crystals in time-resolved x-ray experiments : microspectrophotometer design and performance. *Rev Sci Instrum*, **65**, 1506–11.
- [Cordone et al., 1999] Cordone, L., Ferrand, M., Vitrano, E., and Zaccai, G. (1999). Harmonic behavior of trehalose-coated carbon-monooxy-myoglobin at high temperature. *Biophys J*, **76**(2), 1043–7.
- [Dailey, 1997] Dailey, H. (1997). Enzymes of heme biosynthesis. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2**, 411–417.
- [Daniel et al., 1998] Daniel, R. M., Smith, J. C., Ferrand, M., Héry, S., Dunn, R., and Finney, J. L. (1998). Enzyme activity below the dynamical transition at 220 K. *Biophys J*, **75**(5), 2504–7.
- [Darrah et al., 1990] Darrah, P., Kay, S., Teakle, G., and Griffiths, W. (1990). Cloning and sequencing of protochlorophyllide reductase. *Biochem J*, **265**(3), 789–98.
- [Doster et al., 1986] Doster, W., Bachleitner, A., Dunau, R., Hiebl, M., and Lüscher, E. (1986). Thermal properties of water in myoglobin crystals and solutions at subzero temperatures. *Biophys J*, **50**(2), 213–9.
- [Doster et al., 1989] Doster, W., Cusack, S., and Petry, W. (1989). Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering. *Nature*, **337**(6209), 754–6.
- [Erskine et al., 1997] Erskine, P., Senior, N., Awan, S., Lambert, R., Lewis, G., Tickle, I., Sarwar, M., Spencer, P., Thomas, P., Warren, M., Shoolingin-Jordan, P., Wood, S., and Cooper, J. (1997). X-ray structure of 5-aminolaevulinatase dehydratase, a hybrid aldolase. *Nat Struct Biol*, **4**(12), 1025–31.
- [Fedorov et al., 2003] Fedorov, R., Schlichting, I., Hartmann, E., Domratheva, T., Fuhrmann, M., and Hegemann, P. (2003). Crystal structures and molecular mechanism of a light-induced signaling switch : The Phot-LOV1 domain from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys J*, **84**(4), 2474–82.

- [Fenimore et al., 2002] Fenimore, P. W., Frauenfelder, H., McMahon, B. H., and Parak, F. G. (2002). Slaving : solvent fluctuations dominate protein dynamics and functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(25), 16047–51.
- [Fenimore et al., 2004] Fenimore, P. W., Frauenfelder, H., McMahon, B. H., and Young, R. D. (2004). Bulk-solvent and hydration-shell fluctuations, similar to alpha- and beta-fluctuations in glasses, control protein motions and functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(40), 14408–13.
- [Ferrand et al., 1993] Ferrand, M., Dianoux, A. J., Petry, W., and Zaccaï, G. (1993). Thermal motions and function of bacteriorhodopsin in purple membranes : effects of temperature and hydration studied by neutron scattering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(20), 9668–72.
- [Ferreira and Dailey, 1988] Ferreira, G. and Dailey, H. (1988). Mouse protoporphyrinogen oxidase. Kinetic parameters and demonstration of inhibition by bilirubin. *Biochem J*, **250**(2), 597–603.
- [Forreiter and Apel, 1993] Forreiter, C. and Apel, K. (1993). Light-independent and light-dependent protochlorophyllide-reducing activities and two distinct NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase polypeptides in mountain pine (*Pinus mugo*). *Planta*, **190**(4), 536–45.
- [Franck and Strzalka, 1992] Franck, F. and Strzalka, K. (1992). Detection of the photoactive protochlorophyllide-protein complex in the light during the greening of barley. *FEBS Lett*, **309**(1), 73–7.
- [Frauenfelder and Leeson, 1998] Frauenfelder, H. and Leeson, D. T. (1998). The energy landscape in non-biological and biological molecules. *Nat Struct Biol*, **5**(9), 757–9.
- [Frauenfelder et al., 1991] Frauenfelder, H., Sligar, S. G., and Wolynes, P. G. (1991). The energy landscapes and motions of proteins. *Science*, **254**(5038), 1598–603.
- [Fujita et al., 1998] Fujita, Y., Takagi, H., and Hase, T. (1998). Cloning of the gene encoding a protochlorophyllide reductase : the physiological significance of the co-existence of light-dependent and -independent protochlorophyllide reduction systems in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Cell Physiol*, **39**(2), 177–85.
- [Games et al., 1976] Games, D., Jackson, A., Jackson, J., Belcher, R., and Smith, S. (1976). Biosynthesis of protoporphyrin ix from coproporphyrinogen iii. *J. Chem. Soc. -Chem. Commun*, pages 187–188.
- [Garcia et al., 1997] Garcia, A. E., Blumenfeld, R., Hummer, G., and Krumhansl, J. (1997). Multi-basin dynamics of a protein in a crystal environment. *Physica D*, **107**, 225–239.
- [Genick et al., 1997] Genick, U. K., Borgstahl, G. E., Ng, K., Ren, Z., Pradervand, C., Burke, P. M., Srajer, V., Teng, T. Y., Schildkamp, W., McRee,

- D. E., Moffat, K., and Getzoff, E. D. (1997). Structure of a protein photo-cycle intermediate by millisecond time-resolved crystallography. *Science*, **275**(5305), 1471–5.
- [Ghosh et al., 2001] Ghosh, D., Sawicki, M., Pletnev, V., Erman, M., Ohno, S., Nakajin, S., and Duax, W. L. (2001). Porcine carbonyl reductase. structural basis for a functional monomer in short chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem*, **276**(21), 18457–63.
- [Granick, 1950] Granick, S. (1950). The structural and functional relationships between heme and chlorophyll. *Harvey Lectures*, **44**, 220–245.
- [Griffiths, 1974] Griffiths, W. (1974). Source of reducing equivalents for the in vitro synthesis of chlorophyll from protochlorophyll. *FEBS Lett*, **46**(1), 301–4.
- [Griffiths, 1991] Griffiths, W. (1991). *Chlorophylls*, chapter Protochlorophyllide photoreduction, pages 433–49. H Scheer.
- [Griffiths et al., 1996] Griffiths, W., McHugh, T., and Blankenship, R. (1996). The light intensity dependence of protochlorophyllide photoconversion and its significance to the catalytic mechanism of protochlorophyllide reductase. *FEBS Lett*, **398**(2-3), 235–8.
- [Hadfield and Hajdu, 1993] Hadfield, A. and Hajdu, J. (1993). A fast and portable microspectrophotometer for protein crystallography. *J Appl Crystallogr*, **26**, 839–42.
- [Harran, 1978] Harran, D. (1978). Thermal behavior and glass transition curve of glycerol-water binary mixture. *Bull. Soc. Chim. Fr*, **1-2**, 40–44.
- [Henry and Hofrichter, 1992] Henry, E. and Hofrichter, J. (1992). Singular value decomposition - application to analysis of experimental data. *Methods in Enzymology*, **210**, 129–192.
- [Heyes et al., 2000] Heyes, D., Martin, G., Reid, R., Hunter, C., and Wilks, H. (2000). NADPH :protochlorophyllide oxidoreductase from *Synechocystis* : overexpression, purification and preliminary characterisation. *FEBS Lett*, **483**(1), 47–51.
- [Heyes and Hunter, 2004] Heyes, D. J. and Hunter, C. N. (2004). Identification and characterization of the product release steps within the catalytic cycle of protochlorophyllide oxidoreductase. *Biochemistry*, **43**(25), 8265–71.
- [Heyes and Hunter, 2005] Heyes, D. J. and Hunter, C. N. (2005). Making light work of enzyme catalysis : protochlorophyllide oxidoreductase. *Trends in Biochemical Sciences*, **Sous presse**.
- [Heyes et al., 2003a] Heyes, D. J., Hunter, C. N., van Stokkum, I. H. M., van Grondelle, R., and Groot, M. L. (2003a). Ultrafast enzymatic reaction dynamics in protochlorophyllide oxidoreductase. *Nat Struct Biol*, **10**(6), 491–2.

- [Heyes et al., 2003b] Heyes, D. J., Ruban, A. V., and Hunter, C. N. (2003b). Protochlorophyllide oxidoreductase : "dark" reactions of a light-driven enzyme. *Biochemistry*, **42**(2), 523–8.
- [Heyes et al., 2002] Heyes, D. J., Ruban, A. V., Wilks, H. M., and Hunter, C. N. (2002). Enzymology below 200 K : the kinetics and thermodynamics of the photochemistry catalyzed by protochlorophyllide oxidoreductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(17), 11145–50.
- [Hörer et al., 2001] Hörer, S., Stoop, J., Mooibroek, H., Baumann, U., and Sassoon, J. (2001). The crystallographic structure of the mannitol 2-dehydrogenase NADP⁺ binary complex from *Agaricus bisporus*. *J Biol Chem*, **276**(29), 27555–61.
- [Ihee et al., 2005] Ihee, H., Rajagopal, S., Srajer, V., Pahl, R., Anderson, S., Schmidt, M., Schotte, F., Anfinrud, P. A., Wulff, M., and Moffat, K. (2005). Visualizing reaction pathways in photoactive yellow protein from nanoseconds to seconds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(20), 7145–50.
- [Iwai et al., 1984] Iwai, J., Ikeuchi, M., and Kobayashi, Y. I. T. (1984). *Protochlorophyllide Reduction and Greening*, chapter Early processes of protochlorophyllide oxydoreduction as measured by nanosecond and picosecond spectrophotometry, pages 99–112. Martinus Nijhoff and W Junk.
- [Johari et al., 1987] Johari, Hallbrucker, and Mayer (1987). The glass ?liquid transition of hyperquenched water. *Nature*, **330**, 552–553.
- [Johari, 2005] Johari, G. P. (2005). Dielectric relaxation time of bulk water at 136-140 K, background loss and crystallization effects. *J Chem Phys*, **122**(14), 144508.
- [Jordan and Seehra, 1979] Jordan, P. and Seehra, J. (1979). The biosynthesis of uroporphyrinogen III : order of assembly of the four porphobilinogen molecules in the formation of the tetrapyrrole ring. *FEBS Lett*, **104**(2), 364–6.
- [Jordan, 1991] Jordan, P. M. (1991). *Biosynthesis of Tetrapyrroles*, chapter The biosynthesis of 5-aminolevulinic acid and its transformation into uroporphyrinogen III, pages 1–66. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- [Jörnvall et al., 1995] Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., González-Duarte, R., Jeffery, J., and Ghosh, D. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, **34**(18), 6003–13.
- [Klement et al., 1999] Klement, H., Helfrich, M., Oster, U., Schoch, S., and Rüdiger, W. (1999). Pigment-free NADPH :protochlorophyllide oxidoreductase from *Avena sativa* L. Purification and substrate specificity. *Eur J Biochem*, **265**(3), 862–74.
- [Kort et al., 1996] Kort, R., Vonk, H., Xu, X., Hoff, W. D., Crielgaard, W., and Hellingwerf, K. J. (1996). Evidence for trans-cis isomerization of the p-coumaric acid chromophore as the photochemical basis of the photocycle of photoactive yellow protein. *FEBS Lett*, **382**(1-2), 73–8.

- [Kuroda et al., 2000] Kuroda, H., Masuda, T., Fusada, N., Ohta, H., and Takamiya, K. (2000). Expression of NADPH-Protochlorophyllide oxidoreductase gene in fully green leaves of cucumber. *Plant Cell Physiol*, **41**(2), 226–9.
- [Labesse et al., 1994] Labesse, G., Vidal-Cros, A., Chomilier, J., Gaudry, M., and Mornon, J. (1994). Structural comparisons lead to the definition of a new superfamily of NAD(P)(H)-accepting oxidoreductases : the single-domain reductases/epimerases/dehydrogenases (the 'RED' family). *Biochem J*, **304** (Pt 1), 95–9.
- [Lebedev et al., 1995] Lebedev, N., Cleve, B. V., Armstrong, G., and Apel, K. (1995). Chlorophyll Synthesis in a Deetiolated (det340) Mutant of Arabidopsis without NADPH-Protochlorophyllide (PChlide) Oxidoreductase (POR) A and Photoactive PChlide-F655. *Plant Cell*, **7**(12), 2081–2090.
- [Lebedev et al., 2001] Lebedev, N., Karginova, O., McIvor, W., and Timko, M. (2001). Tyr275 and Lys279 stabilize NADPH within the catalytic site of NADPH :protochlorophyllide oxidoreductase and are involved in the formation of the enzyme photoactive state. *Biochemistry*, **40**(42), 12562–74.
- [Lebedev and Timko, 1998] Lebedev, N. and Timko, M. P. (1998). Protochlorophyllide photoreduction. *Photosynth Res*, **58**, 5–23.
- [Lebedev and Timko, 1999] Lebedev, N. and Timko, M. P. (1999). Protochlorophyllide oxidoreductase B-catalyzed protochlorophyllide photoreduction in vitro : insight into the mechanism of chlorophyll formation in light-adapted plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(17), 9954–9.
- [Lehnert et al., 1998] Lehnert, U., Réat, V., Weik, M., Zaccai, G., and Pfister, C. (1998). Thermal motions in bacteriorhodopsin at different hydration levels studied by neutron scattering : correlation with kinetics and light-induced conformational changes. *Biophys J*, **75**(4), 1945–52.
- [Livingstone and Fujimori, 1958] Livingstone, R. and Fujimori, E. (1958). Some properties of the ground triplet state of chlorophyll and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5610–13.
- [Loncharich and Brooks, 1990] Loncharich, R. J. and Brooks, B. R. (1990). Temperature dependence of dynamics of hydrated myoglobin. Comparison of force field calculations with neutron scattering data. *J Mol Biol*, **215**(3), 439–55.
- [Lütz et al., 1981] Lütz, C., Röper, U., Beer, N., and Griffiths, T. (1981). Sub-etioplast localization of the enzyme NADPH : protochlorophyllide oxidoreductase. *Eur J Biochem*, **118**(2), 347–53.
- [Lubchenko et al., 2005] Lubchenko, V., Wolynes, P., and Frauenfelder, H. (2005). Mosaic energy landscapes of liquids and the control of protein conformational dynamics by glass-forming solvents. *J. Phy. Chem. B*, **109**, 7488–99.

- [Mapleston and Griffiths, 1980] Mapleston, R. E. and Griffiths, W. T. (1980). Light modulation of the activity of protochlorophyllide reductase. *Biochem J*, **189**(1), 125–33.
- [Masuda et al., 2002] Masuda, T., Fusada, N., Shiraishi, T., Kuroda, H., Awai, K., Shimada, K., Ohta, H., and Takamiya, K. (2002). Identification of two differentially regulated isoforms of protochlorophyllide oxydoreductase (por) from tobacco revealed a wide variety of light- and development-dependent regulation of por gene expression among angiosperms. *Photosynth. Res.*, **74**, 165–172.
- [Mayer, 1991] Mayer, E. (1991). Calorimetric glass transition in the amorphous forms of water : a comparison. *J. Mol. Struct.*, **250**, 403–11.
- [Mishima and Stanley, 1998] Mishima, O. and Stanley, H. E. (1998). The relationship between liquid, supercooled and glassy water. *Nature*, **396**, 329–335.
- [More et al., 1995] More, N., Daniel, R. M., and Petach, H. H. (1995). The effect of low temperatures on enzyme activity. *Biochem J*, **305** (Pt 1), 17–20.
- [Mozzarelli and Rossi, 1996] Mozzarelli, A. and Rossi, G. L. (1996). Protein function in the crystal. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **25**, 343–65.
- [Nienhaus et al., 2005] Nienhaus, K., Ostermann, A., Nienhaus, G. U., Parak, F. G., and Schmidt, M. (2005). Ligand migration and protein fluctuations in myoglobin mutant L29W. *Biochemistry*, **44**(13), 5095–105.
- [Nomata et al., 2005] Nomata, J., Swem, L. R., Bauer, C. E., and Fujita, Y. (2005). Overexpression and characterization of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim Biophys Acta*, **1708**(2), 229–37.
- [Oliver and Griffiths, 1981] Oliver, R. and Griffiths, W. (1981). Covalent labelling of the NADPH : protochlorophyllide oxidoreductase from etioplast membranes with [³H]N-phenylmaleimide. *Biochem J*, **195**(1), 93–101.
- [Oosawa et al., 2000] Oosawa, N., Masuda, T., Awai, K., Fusada, N., Shimada, H., Ohta, H., and Takamiya, K. (2000). Identification and light-induced expression of a novel gene of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*, **474**(2-3), 133–6.
- [Parak, 1986] Parak, F. (1986). Correlation of protein dynamics with water mobility : Mossbauer spectroscopy and microwave absorption methods. *Methods Enzymol*, **127**, 196–206.
- [Parham and Rebeiz, 1992] Parham, R. and Rebeiz, C. A. (1992). Chloroplast biogenesis : [4-vinyl] chlorophyllide a reductase is a divinyl chlorophyllide a-specific, NADPH-dependent enzyme. *Biochemistry*, **31**(36), 8460–4.

- [Pearson et al., 2004] Pearson, A. R., Mozzarelli, A., and Rossi, G. L. (2004). Microspectrophotometry for structural enzymology. *Curr Opin Struct Biol*, **14**(6), 656–62.
- [Pearson and Lipman, 1988] Pearson, W. R. and Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**(8), 2444–8.
- [Plaxco and Baker, 1998] Plaxco, K. W. and Baker, D. (1998). Limited internal friction in the rate-limiting step of a two-state protein folding reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(23), 13591–6.
- [Raskin and Schwartz, 2002] Raskin, V. and Schwartz, A. (2002). The charge-transfer complex between protochlorophyllide and nadph : an intermediate in protochlorophyllide photoreduction. *Photosynth. res.*, **74**, 181–186.
- [Rasmussen et al., 1992] Rasmussen, B. F., Stock, A. M., Ringe, D., and Petsko, G. A. (1992). Crystalline ribonuclease A loses function below the dynamical transition at 220 K. *Nature*, **357**(6377), 423–4.
- [Rüdiger et al., 2005] Rüdiger, W., Böhm, S., Helfrich, M., Schulz, S., and Schoch, S. (2005). Enzymes of the last steps of chlorophyll biosynthesis : modification of the substrate structure helps to understand the topology of the active centers. *Biochemistry*, **44**(32), 10864–72.
- [Reinbothe et al., 2003a] Reinbothe, C., Buhr, F., Pollmann, S., and Reinbothe, S. (2003a). In vitro reconstitution of light-harvesting POR-protochlorophyllide complex with protochlorophyllides a and b. *J Biol Chem*, **278**(2), 807–15.
- [Reinbothe et al., 1999] Reinbothe, C., Lebedev, N., and Reinbothe, S. (1999). A protochlorophyllide light-harvesting complex involved in de-etiolation of higher plant. *Nature*, **397**, 80–84.
- [Reinbothe et al., 2003b] Reinbothe, C., Lepinat, A., Deckers, M., Beck, E., and Reinbothe, S. (2003b). The extra loop distinguishing POR from the structurally related short-chain alcohol dehydrogenases is dispensable for pigment binding but needed for the assembly of light-harvesting POR-protochlorophyllide complex. *J Biol Chem*, **278**(2), 816–22.
- [Reinbothe et al., 2003c] Reinbothe, S., Pollmann, S., and Reinbothe, C. (2003c). In situ conversion of protochlorophyllide b to protochlorophyllide a in barley. Evidence for a novel role of 7-formyl reductase in the prolamellar body of etioplasts. *J Biol Chem*, **278**(2), 800–6.
- [Reinbothe et al., 1995] Reinbothe, S., Reinbothe, C., Holtorf, H., and Apel, K. (1995). Two NADPH :Protochlorophyllide Oxidoreductases in Barley : Evidence for the Selective Disappearance of PORA during the Light-Induced Greening of Etiolated Seedlings. *Plant Cell*, **7**(11), 1933–1940.
- [Richards, 1963] Richards, F. M. (1963). Structure of proteins. *Annu Rev Biochem*, **32**, 269–300.

- [Ringe and Petsko, 2003] Ringe, D. and Petsko, G. A. (2003). The 'glass transition' in protein dynamics : what it is, why it occurs, and how to exploit it. *Biophys Chem*, **105**(2-3), 667–80.
- [Rowe and Griffiths, 1995] Rowe, J. and Griffiths, W. (1995). Protochlorophyllide reductase in photosynthetic prokaryotes and its role in chlorophyll synthesis. *Biochem J*, **311** (Pt 2), 417–24.
- [Runge et al., 1996] Runge, S., Sperling, U., Frick, G., Apel, K., and Armstrong, G. A. (1996). Distinct roles for light-dependent NADPH :protochlorophyllide oxidoreductases (POR) A and B during greening in higher plants. *Plant J*, **9**(4), 513–23.
- [Sakai et al., 2002] Sakai, K., Matsui, Y., Kouyama, T., Shiro, Y., and Adachi, S. (2002). Optical monitoring of freeze-trapped reaction intermediates in protein crystals : a microspectrophotometer for cryogenic protein crystallography. *J Appl Crystallogr*, **35**, 270–3.
- [Scheer, 1991] Scheer, H. (1991). *Chlorophylls*, chapter Structure and occurrence of chlorophylls, pages 3–30. CRC Press Inc, Cleveland.
- [Scheumann et al., 1999] Scheumann, V., Klement, H., Helfrich, M., Oster, U., Schoch, S., and Rüdiger, W. (1999). Protochlorophyllide b does not occur in barley etioplasts. *FEBS Lett*, **445**(2-3), 445–8.
- [Schlichting et al., 2000] Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A. M., Maves, S. A., Benson, D. E., Sweet, R. M., Ringe, D., Petsko, G. A., and Sligar, S. G. (2000). The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. *Science*, **287**(5458), 1615–22.
- [Schoefs and Franck, 2003] Schoefs, B. and Franck, F. (2003). Protochlorophyllide reduction : mechanisms and evolutions. *Photochem Photobiol*, **78**(6), 543–57.
- [Schulz et al., 1989] Schulz, R., Steinmüller, K., Klaas, M., Forreiter, C., Rasmussen, S., Hiller, C., and Apel, K. (1989). Nucleotide sequence of a cDNA coding for the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (PCR) of barley (*Hordeum vulgare* L.) and its expression in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, **217**(2-3), 355–61.
- [Shemin and Wittenberg, 1951] Shemin, D. and Wittenberg, J. (1951). The mechanism of porphyrin formation ; the role of the tricarboxylic acid cycle. *J Biol Chem*, **192**(1), 315–34.
- [Shibata, 1957] Shibata, K. (1957). Spectroscopic studies on chlorophyll formation in intact leaves. *J Biochem*, **44**, 147–173.
- [Siffel et al., 1987] Siffel, P., Lebedev, N., and Krasnovskii, A. (1987). Detection of short-wavelength chlorophyll a emission in green leaves. *Photosynthetica*, **21**, 23–28.
- [Smyth et al., 2003] Smyth, D. R., Mrozkiewicz, M. K., McGrath, W. J., Listwan, P., and Kobe, B. (2003). Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. *Protein Sci*, **12**(7), 1313–22.

- [Tegoni et al., 1983] Tegoni, M., Mozzarelli, A., Rossi, G. L., and Labeyrie, F. (1983). Complex formation and intermolecular electron transfer between flavocytochrome b2 in the crystal and cytochrome c. *J Biol Chem*, **258**(9), 5424–7.
- [Townley et al., 2001] Townley, H., Sessions, R., Clarke, A., Dafforn, T., and Griffiths, W. (2001). Protochlorophyllide oxidoreductase : a homology model examined by site-directed mutagenesis. *Proteins*, **44**(3), 329–35.
- [Townley et al., 1998] Townley, H. E., Griffiths, W. T., and Nugent, J. P. (1998). A reappraisal of the mechanism of the photoenzyme protochlorophyllide reductase based on studies with the heterologously expressed protein. *FEBS Lett*, **422**(1), 19–22.
- [Ursby et al., 2002] Ursby, T., Weik, M., Fioravanti, E., Delarue, M., Goeldner, M., and Bourgeois, D. (2002). Cryophotolysis of caged compounds : a technique for trapping intermediate states in protein crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**(Pt 4), 607–14.
- [Velikov et al., 2001] Velikov, V., Borick, S., and Angell, C. A. (2001). The glass transition of water, based on hyperquenching experiments. *Science*, **294**(5550), 2335–8.
- [Walker and Weinstein, 1994] Walker, C. J. and Weinstein, J. D. (1994). The magnesium-insertion step of chlorophyll biosynthesis is a two-stage reaction. *Biochem J*, **299** (Pt 1), 277–84.
- [Weik et al., 2004] Weik, M., Vernede, X., Royant, A., and Bourgeois, D. (2004). Temperature derivative fluorescence spectroscopy as a tool to study dynamical changes in protein crystals. *Biophys J*, **86**(5), 3176–85.
- [Wilks and Timko, 1995] Wilks, H. and Timko, M. (1995). A light-dependent complementation system for analysis of NADPH :protochlorophyllide oxidoreductase : identification and mutagenesis of two conserved residues that are essential for enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(3), 724–8.
- [Witty et al., 1996] Witty, M., Jones, R., Robb, M., Jordan, P., and Smith, A. (1996). Subcellular location of the tetrapyrrole synthesis enzyme porphobilinogen deaminase in higher plants : an immunological investigation. *Planta*, **199**(4), 557–64.
- [Yue and Angell, 2004] Yue, Y. and Angell, C. A. (2004). Clarifying the glass-transition behaviour of water by comparison with hyperquenched inorganic glasses. *Nature*, **427**(6976), 717–20.
- [Zaccai, 2000] Zaccai, G. (2000). How soft is a protein ? A protein dynamics force constant measured by neutron scattering. *Science*, **288**(5471), 1604–7.