

Technologie du vivant

Biotechnologie

Diplôme 2008

Ariane

Kull

**Recherche des cytochromes
de type *c* liés à la
respiration anaérobie de
Desulfitobacterium
hafniense TCE1**

Professeur

Fabian Fischer

Expert

Julien Maillard

Ariane Kull

Travail de diplôme

Septembre 08-Janvier 09

Objectif

Le but de ce travail de diplôme est de déterminer le profil des cytochromes c présents dans la membrane cytoplasmique de *Desulfitobacterium hafniense* TCE1 selon le type de respiration anaérobie. En finalité, l'objectif est d'acquérir des connaissances plus approfondies sur le mode de respiration anaérobie de cette bactérie, et plus particulièrement sur la participation des cytochromes. Un intérêt particulier est porté aux cultures croissant sur tétra- (PCE) et trichloroéthène (TCE), afin de déterminer si ce mode particulier de respiration anaérobie, appelé déhalorespiration, implique un ou plusieurs cytochromes spécifiques au sein de la chaîne respiratoire.

Résultats

Cinq cytochromes de type c majoritaires ont été mis en évidence. Il en ressort qu'aucun n'est associé spécifiquement aux conditions de déhalorespiration (PCE ou TCE comme accepteur final d'électrons). La population en cytochromes d'une culture semble plutôt influencée par l'accepteur d'électron plutôt que par le donneur, indiquant que les cytochromes c interviennent principalement dans la deuxième partie de la chaîne respiratoire. Malgré quelques biais liés à la méthodologie, la concentration en cytochromes pour chaque mode respiratoire a pu être estimée. Quoiqu'encore préliminaires, les résultats d'identification par spectrométrie de masse ont révélé un cytochrome c d'une taille de 50 kDa, correspondant à la protéine DSY3065 dans le génome de *D. hafniense* Y51, annotée à ce jour comme étant une sous-unité d'une nitrite réductase.

Mots-clés

Desulfitobacterium hafniense TCE1, cytochrome c, respiration anaérobie, déhalorespiration.

Ziel

Das Ziel dieser Diplomarbeit besteht darin, das Profil der Cytochrome c zu bestimmen, die in der zytoplasmatischen Membran von *Desulfitobacterium hafniense* TCE1 nach der anaeroben Atmungsmoden tätig sind. Die Zielsetzung besteht darin, ausführlichere Kenntnisse auf der Mode der anaeroben Atmung dieser Bakterie, und auf der Teilnahme der Cytochrome besonders zu erwerben. Ein besonderes Interesse wird den Kulturen entgegengebracht, die auf Tetra-(PCE) und trichloroethene (TCE) wachsen, um zu bestimmen, ob diese besondere Mode anaerober Atmung, mit der Bezeichnung Dehalorespiration, ein oder mehrere spezifische Cytochrome innerhalb der Atmungskette impliziert.

Resultate

Fünf Cytochrome c sind mehrheitlich nachgewiesen worden. Es geht daraus hervor, dass keiner spezifisch mit den Dehalorespirations-Bedingungen verbunden ist (PCE oder TCE als endgültiger Elektronempfänger). Die angebende Bevölkerung in Cytochrome einer Kultur scheint eher vom Elektronempfänger eher als vom Geber eher beeinflusst, als die Cytochrome c treten hauptsächlich im zweiten Teil der Atmungskette auf. Trotz einiger Schrägungen, die mit der Methodologie zusammenhängen, konnte die Konzentration in Cytochrome für jede Atmungsmoden geschätzt werden. Obwohl noch vorläufig haben die Identifikationsergebnisse durch Massenspektrometer einen Cytochrom c von einer Grösse von 50 kDa enthüllt, der dem Protein DSY3065 im Genom von *D. hafniense* Y51 entspricht, und bis zum heutigen Tag als einer Nitritreduktase galt.

Schlüsselwörter

Desulfitobacterium hafniense TCE1, Zellfarbstoff c, anaerobe Atmung, dehalorespiration

Table des matières

1 Introduction	1
1.1 <i>Desulfitobacterium hafniense</i> TCE1	5
1.2 La respiration et déhalorespiration	6
1.3 Les cytochromes c	9
1.4 Plan de déroulement du travail de diplôme	11
2 Matériel et Méthodes	12
2.1 Préparation du milieu de base pour les cultures anaérobies	12
2.2 Préparation des milieux spécifiques anaérobies	14
2.3 Récolte des cultures et lavage des cellules	16
2.4 Extraction des protéines membranaires	17
2.5 Séparation des protéines par gel-électrophorèse	18
2.6 Détection des protéines	20
3 Résultats	26
3.1 Optimisation des techniques utilisées	26
3.2 Rendement des cultures	30
3.3 Analyse des extraits membranaires issus des cultures	31
4 Discussion	38
5 Conclusions et perspectives	44
6 Bibliographies	45
7 Annexes	47

1 Introduction

1.1 *Desulfitobacterium hafniense* TCE1

Le genre *Desulfitobacterium* spp. comporte des bactéries anaérobies strictes initialement isolées d'environnements contaminés par des composés organiques halogénés. Il se retrouve dans les nappes phréatiques et autres sédiments en milieux anoxiques.

La souche utilisée dans ce travail est *Desulfitobacterium hafniense* TCE1 dont la phylogénie est la suivante : règne : *Bactéria*, embranchement : *Firmicutes*, et classe : *Clostridia*.

Très versatiles, les bactéries appartenant au genre *Desulfitobacterium* sont capables d'utiliser une grande variété d'accepteurs d'électrons tels que le nitrate, le sulfite, le thiosulfate ainsi que le PCE (tetrachloroéthène) et le TCE (trichloroéthène) pour ce qui est des composés chlorés [1]. Gram-positive, au génome à bas pourcentage de bases GC et d'une taille de 2 à 4 sur 0.6 à 0.8 μm , ces bactéries possèdent approximativement six flagelles latérales. Leur croissance est optimale à 35°C et à pH 7.2. Anciennement nommée *Desulfitobacterium frappieri* TCE1, la souche utilisée ici porte la référence DSMZ 12704 [2].

Grâce à leur champ d'action très étendu, les *desulfitobacteria* peuvent être d'excellentes candidates pour le développement de procédés de bio-remédiation en anaérobie.

Le séquençage complet de la souche *Desulfitobacterium hafniense* Y51, souche très proche de TCE1, a permis de mettre en évidence nombres de fonctionnalités de ce genre. Son génome circulaire de 5'727'534 pb code pour 5'060 protéines. Bien que deux gènes aient été annotés comme étant une déhalogénase réductrice, un seul code véritablement pour une enzyme possédant les caractéristiques typiques de cette famille de protéines, ce qui représente bien moins que dans la plupart des autres souches déhalorespirantes (de 5 à 32 gènes) [3].

Dans le même genre, la bactérie *Desulfitobacterium dehalorespirans* est capable de dégrader des composés chlorés aromatiques. Toutes ces souches fonctionnent sur un procédé de dégradation de produits organiques chlorés par un mécanisme de déhalogénéation réductrice.

1.2 La respiration et déhalorespiration

Lors du processus de respiration anaérobie, les électrons du donneur sont transportés le long de la chaîne respiratoire jusqu'à l'accepteur final d'électrons. Les protons sont déplacés au travers de la membrane cellulaire de l'intérieur vers l'extérieur. Ceci crée un gradient de protons de part et d'autre de la membrane. Cette dernière stocke alors temporairement de l'énergie. Cette énergie peut ensuite être transformée en ATP par l'ATP synthase.

Le terme de respiration anaérobie signifie l'oxydation d'une molécule en absence d'oxygène pour produire de l'énergie. Ce processus de respiration anaérobie requiert un accepteur d'électrons autre que l'oxygène. Pour certains organismes tels que *Desulfitobacterium hafniense*, la présence d'oxygène est létale. Ces organismes sont nommés anaérobies strictes. Ceci est probablement dû à la toxicité de molécules dérivées de l'oxygène telles que l'ion super oxyde (O_2^-) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'autres molécules nocives.

Desulfitobacterium peut, grâce à sa grande flexibilité de respiration anaérobie évoluer en présence de nombreux donneurs et accepteurs d'électrons.

Dans le cadre de ce projet, les donneurs d'électrons choisis sont l'hydrogène, le lactate, le formate, l'éthanol, le butyrate et le vanillate. En tant qu'accepteurs d'électrons le PCE (tetrachloroéthène), le TCE (trichloroéthène), le fumarate, le nitrate, le sulfite et le thiosulfate ont été sélectionnés. [4]

La déhalorespiration est un phénomène lors duquel les bactéries utilisent des composés chlorés comme accepteur final d'électrons. *Desulfitobacterium hafniense* TCE1 est une souche capable d'effectuer cette déhalorespiration. Cette capacité lui est procurée par la tetrachloroéthène déhalogénase réductrice dont le gène est situé sur un transposon, un élément d'ADN mobile, suggérant que cette information génétique puisse être acquise par transfert horizontal de gène.

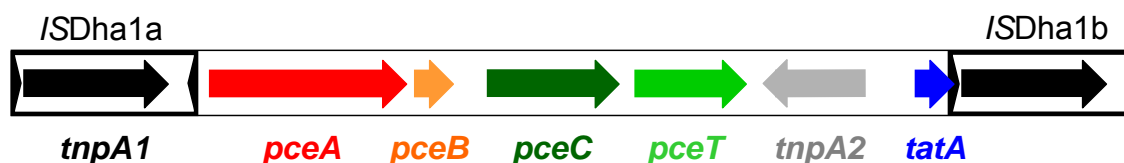


Figure 1 : schéma du transposon impliqué dans la déhalorespiration

TnpA1 : transposase

TnpA2 : transposase non fonctionnelle

PceA : déhalogénase réductrice

PceB : protéine membranaire qui retient PceA dans la membrane (fonction non démontrée)

PceC : régulateur de transcription (fonction non démontrée)

PceT : chaperon moléculaire

TatA : sert à l'export de la protéine au travers de la membrane (fonction non démontrée)

/SDha1 : séquence d'insertion, confère la mobilité

Voici un modèle de chaîne respiratoire susceptible de promouvoir la déhalorespiration. Il ne s'agit ici que d'une ébauche dont il reste à prouver certains points.

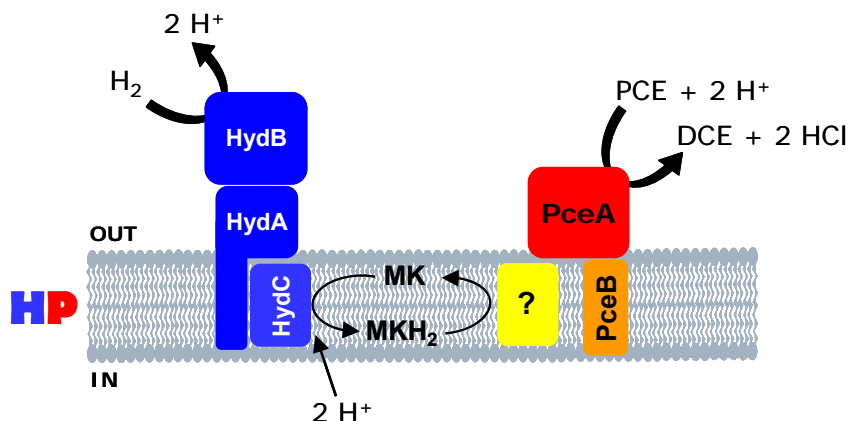


Figure 3 : Culture poussant sur hydrogène et PCE (tetrachloroéthène).
Hyd : hydrogénase ; PceA : déhalogénase réductrice ; PceB : protéine membranaire ;
MK : ménaquinone ; MKH₂ : ménaquinole.

Le carré jaune qui sert de transfert d'électrons entre le pool de quinones et la déhalogénase réductrice est pressenti comme étant un cytochrome c. Le projet présenté ici tentera d'y répondre.

La combinaison des différents donneurs et accepteurs d'électrons vise à obtenir un profil de cytochrome c lié à chaque type de culture. Enfin, un des buts consiste à mettre en évidence un ou plusieurs cytochromes c qui pourraient être impliqués uniquement lorsqu'il y a déhalorespiration, c'est-à-dire dégradation de PCE ou TCE.

1.3 Les cytochromes *c*

Les cytochromes *c*, abrégés cyt *c* sont des protéines associées aux membranes bactériennes et mitochondriales. Découvertes dans les années 1930, elles consistent en un assemblage de sous-unités protéiques au sein desquelles sont logées une ou plusieurs molécules d'hème, et souvent aussi, des complexes fer-soufre. Ces protéines sont d'importants acteurs de la chaîne de transports d'électrons. Les hèmes transfèrent les électrons un à un d'un complexe au suivant. L'atome de fer est donc alternativement oxydé et réduit, passant de l'état ferrique à l'état ferreux et inversement, chaque fois qu'un électron est transféré [5].

Les cytochromes *c* sont des protéines hautement conservées à travers les espèces. Ils se retrouvent dans les plantes, les animaux et chez bon nombre d'organismes unicellulaires.

Ces protéines sont capables de catalyser plusieurs réactions telles que des hydroxylations, des oxydations et révèlent une activité peroxydase suite à l'oxydation de nombreux donneurs d'électrons. Cette propriété peroxydase sera utilisée dans ce projet, notamment dans la méthode de détection basée sur la 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, appelée « TMBZ » [6].



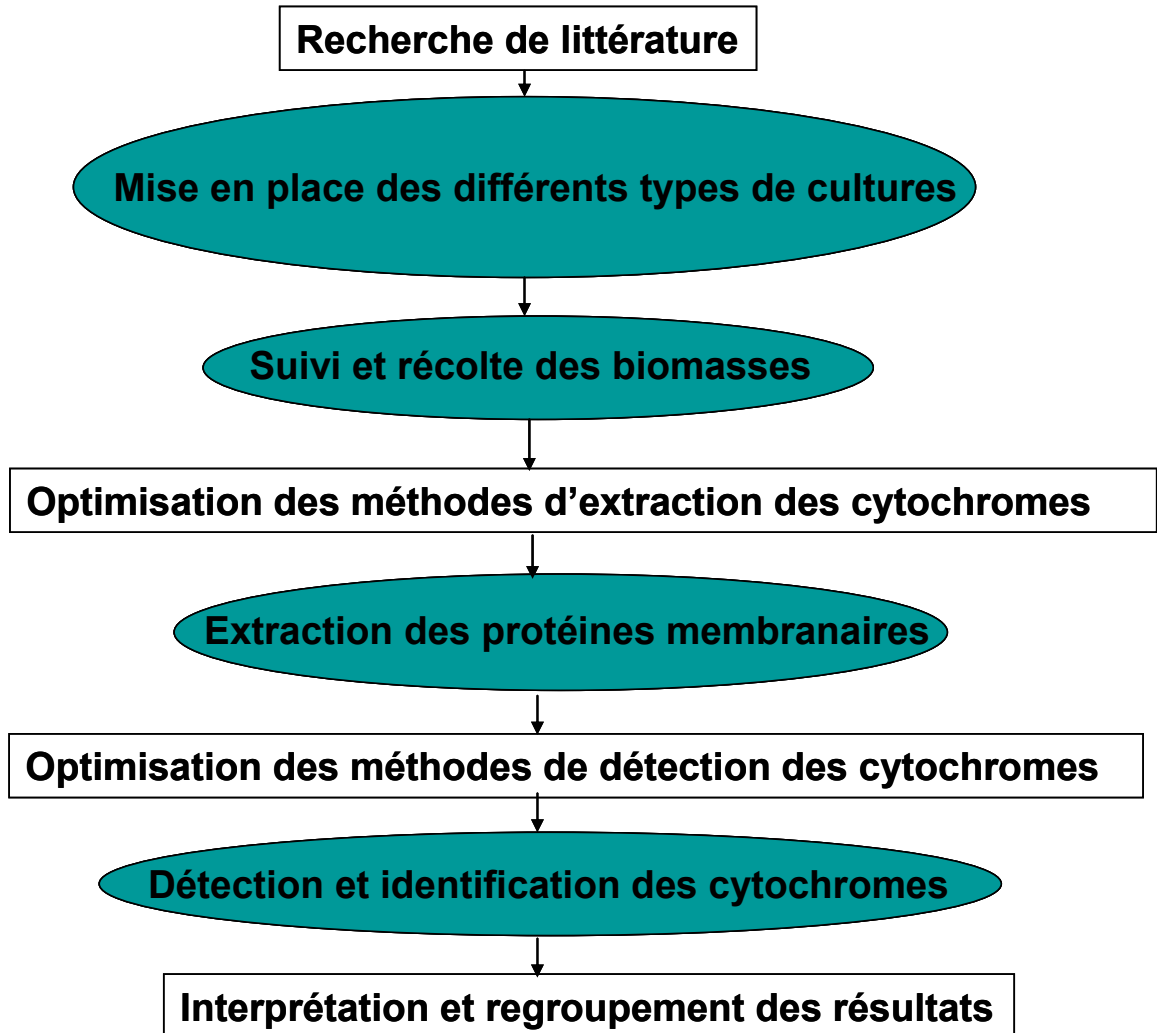
Figure 4 : Représentation d'un cytochrome *c* avec son hème.

Les cytochromes de type *c* sont distingués des autres protéines hémiques par la liaison covalente de deux groupes vinyl-hème à deux résidus cystéines sur l'apoprotéine [5, 6]. Cette propriété sera utilisée dans ce projet pour différencier les cytochromes *c* des cytochromes *a* et *b* par gel-électrophorèse. En effet la liaison covalente de l'hème au cytochrome *c* lui permet de conserver la partie hémique, qui est perdue dans les cas des cytochromes *a* et *b* lors de la migration à travers le gel.

Dans le génome de *Desulfitobacterium hafniense* Y51, au moins six cytochromes de types c ont été mis en évidence. Afin de vérifier cela, une analyse basée sur une approche bioinformatique sera réalisée sur ce génome. Lors de ce projet, une analyse par spectrométrie de masse des cytochromes c issus des cultures sera faite. Ces résultats pratiques seront alors confrontés aux résultats obtenus par bioinformatique.

Des recherches portées sur *Desulfomonile tiedjei*, une souche également capable de dégrader des composés halogénés, ont déjà prouvé la présence de cytochromes de type c dans le processus de déhalorespiration [7]. Ceci encourage à penser qu'il pourrait en être de même pour *Desulfitobacterium hafniense* TCE1.

1.4 Plan de déroulement du travail de diplôme



2 Matériel et Méthodes

2.1 Préparation du milieu de base pour les cultures anaérobies

L'eau utilisée pour la préparation du milieu de base est de l'eau milliQ (eau filtrée à 0.2 µm). La résazurine est utilisée comme indicateur d'oxygène et de pH à une concentration d'environ 5 mg/L.

Des bouteilles dites anaérobies, à fermeture étanche sont utilisées pour la cultivation de *Desulfitobacterium*. Les bouteilles sont préalablement lavées à l'acide citrique afin qu'aucun résidu de détergent ne puisse entraver la croissance.



Figure 5
Cultures anaérobies.

Pour 4.8 L de milieu :

- Dans deux Erlenmeyers de 2 L, faire chauffer de l'eau milliQ (il est nécessaire de mettre un peu plus de 2 L par Erlenmeyer pour obtenir un volume final de 4.8 L après l'ébullition).
- Ajouter 2 mL de colorant résazurine par Erlenmeyer et porter le tout à ébullition. La résazurine, au départ violet vire au rose si le pH ou le potentiel redox de la solution n'est pas adéquat. Il permet un contrôle visuel du milieu de culture.
- Une fois l'eau bouillie, laisser refroidir en dégazant à l'azote à l'aide de buses. Durant ce temps, préparer la solution de sels. Dans 200 mL d'eau miliQ ajouter :

Tableau 1 :
Recette de solution de sels pour le milieu de base.

$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$	13.8 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.48 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	0.24 g
Solution ST *	4.8 mL

* : la composition de la solution ST est présentée en **Annexe 7.2**.

- Une fois le mélange eau-résazurine tiède, retirer les buses de dégazage. Le contenu des deux Erlenmeyers peut alors être réuni dans un récipient pouvant contenir 4.8 L à raison de 4.6 L auxquels sont ajoutés les 200 mL de solution de sels.
- Le milieu est alors distribué dans des bouteilles anaérobies soit à raison de 100 mL, 600 mL ou de 800 mL en fonction du volume de culture souhaité.

Les cultures de première et deuxième génération sont menées dans 100 mL. Pour les troisièmes générations, chaque culture est menée à double (série a et b) dans un volume de 800 mL. Cela dit, pour les cultures ayant l'hydrogène comme donneur d'électron, le volume de liquide est abaissé à 600 mL afin d'avoir une phase gazeuse (source d'hydrogène) plus importante.

- Fermer les bouteilles à l'aide d'un bouchon en butyle et d'un anneau d'acier assurant l'étanchéité.
- Dégazer les bouteilles à l' N_2 et CO_2 ou à l' H_2 et CO_2 (mélange respectif 80:20%). Ici, l'azote sert à remplacer l'oxygène nuisible aux bactéries et le dioxyde de carbone est nécessaire à la stabilisation du pH dans le milieu tamponné par le bicarbonate. L'hydrogène, quant à lui est utilisé comme donneur d'électrons.
- Autoclaver les bouteilles.

Remarque :

A partir de ce point, toutes les manipulations de cultures sont à faire de manière anaérobie.

- Avant d'inoculer les milieux de bases avec des bactéries, il est nécessaire de le compléter avec différents éléments nécessaires à leur croissance. Les volumes suivants sont à introduire de manière anaérobie et stérile.

Tableau 2 : Recette pour compléter le milieu de base.

Produit	Volume [mL]
Eléments traces *	0.15
$NaHCO_3$ (5%, w/v) (N_2 + CO_2)	5.0
KOH (10%, w/v) (N_2)	1.5
Solution de vitamines * ¹	0.15
Solution d'acides aminés* ²	1.0
$Na_2S \times 9 H_2O$ (3%, w/v) (N_2)	0.5

*: Les éléments traces ont été filtrés (0.2 μm). Leur composition est présentée à l'**Annexe 7.3**.












*¹ :La composition de la solution est présentée à l'**Annexe 7.4**.

*² :La composition de la solution est présentée à l'**Annexe 7.5**.

2.2 Préparation des milieux spécifiques anaérobies

Le milieu de base peut alors être complété avec les substrats adéquats.

Tableau 3: Référence des produits utilisés comme donneur ou accepteur d'électrons.

Nom du produit	Molécule	Référence	Fournisseur	Pays
Acide lactique (lactate)		250300010	Acros	Belgique
Formate de sodium (formate)		207594 480	Fluka	Allemagne
Ethanol		1.00983.2500	Merck	Allemagne
Acide butyrique (butyrate)		820236	Merck	Allemagne
Vanillate: 4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid		121351000	Acros	Belgique
PCE: tetrachloroéthylène		138010010	Acros	Belgique
TCE: trichloroéthylène		150310010	Acros	Belgique
Acide fumarique (fumarate)		8.20584.1000	Merck	Allemagne
Nitrate		09891	Fluka	Allemagne
Sulfite		621A96017	Merck	Allemagne
Thiosulfate		20285000	Acros	Belgique

Pour ce projet, 36 combinaisons de donneurs et accepteurs d'électrons ont été testées. Elles sont représentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4 : Combinaisons de donneur et d'accepteur d'électrons testées.

	P	T	Fu	Ni	Su	Th
H	1	2	3	4	5	6
La	7	8	9	10	11	12
Fo	13	14	15	16	17	18
Et	19	20	21	22	23	24
Bu	25	26	27	28	29	30
Va	31	32	33	34	35	36

Tout au long du projet, les abréviations suivantes ont été utilisées pour décrire les cultures. Le donneur est toujours cité en premier et suivi de l'accepteur d'électrons, et le couple est précédé du numéro de culture tel que présenté dans le **Tableau 4**.

Donneurs d'électrons :

H : Hydrogène
La : Lactate
Fo : Formate
Et : Ethanol
Bu : Butyrate
Va : Vanillate

Accepteurs d'électrons :

P : PCE = Tetrachloroéthène
T : TCE = Trichloroéthène
Fu : Fumarate
Ni : Nitrate
Su : Sulfite
Th : Thiosulfate

-Ajouter ces substrats au milieu de base selon le type et le volume de culture :

Tableau 5 : Volumes de substrats à ajoutés au milieu de base.

Produit	100 mL	800 mL
Hydrogène *	-	-
Lactate 3.2 M	1.25	10
Formate 0.5 M *	8	64
Ethanol 1M	4	32
Butyrate 1 M	4	32
Vanillate 0.5 M	4	32
PCE 2 M (dans hexadécane)	1	8
TCE 2 M (dans hexadécane)	1	8
Fumarate 1M	2	16
Nitrate 1 M	2	16
Sulfite 1 M	2	16
Thiosulfate 1 M	2	16

* : ces cultures nécessitent l'ajout de 1, 6 ou 8 mL d'acétate (10 mM final) qui servira de source de carbone

Les volumes présentés dans le **Tableau 5** permettent d'atteindre une concentration finale dans le milieu de 40 mM pour les donneurs d'électrons (en bleu) et de 20 mM pour les accepteurs d'électrons (en vert). Une exception est faite pour le vanillate pour lequel il est nécessaire d'avoir l'accepteur en excès. Le vanillate est donc à 20 mM final et l'accepteur respectif est ajusté à 40 mM [8]. Les cultures avec l'hydrogène comme donneur d'électrons sont menées dans 600 mL en conservant les mêmes proportions pour chaque élément du milieu.

Les solutions-mères de PCE et le TCE sont préparées à 2M dans de l'hexadécane. Cette phase organique va permettre au PCE ou au TCE de diffuser dans la phase aqueuse de la culture petit à petit. La concentration de saturation théorique de ces substances dans le milieu de culture est de 1 mM. Cela dit, grâce à ce système de diffusion, et au coefficient de partition du PCE (org/aq) de 5000/1, la concentration finale dans le milieu est estimée à 400 μ M. Il est nécessaire de maintenir cette faible concentration dans la phase aqueuse pour éviter un effet toxique de ces produits sur les cultures.

Les milieux sont ensuite inoculés à raison de 1 mL/100 mL de culture. Pour certaines cultures dont la mesure d'absorbance est faible, cette proportion peut être augmentée afin d'être certain que la génération suivante se développe normalement.

Chaque jour, 1 mL de chaque culture est prélevé et mesuré par spectrophotométrie à 600 nm. Une fois que la culture se trouve dans la phase de croissance, cette dernière est récoltée. En général, cela se produit autour d'une valeur d'absorbance entre 0.07 et 0.10.

2.3 Récolte des cultures et lavage des cellules

Tampon Tris-HCl pH 8.0, 20 mM

Centrifugeuse : Avanti Centrifuge J-26 XPI BECKMAN COULTER

Centrifugeuse : Centrifuge eppendorf 5403, Eppendorf

Chaque culture (série a et b) est récupérée séparément. Les cultures n'ayant plus besoin d'être sous conditions anaérobies, les bouteilles peuvent être ouvertes (sous une hotte de ventilation).

- Transférer la totalité de la culture dans un pot à centrifugation
- Centrifuger 20 min à 4°C à 7000 rpm = 12200 x g
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot de cellules avec 2 mL de tampon à l'aide de l'homogénéisateur
- Transférer le tout dans un tube préalablement taré et centrifuger 15 min à 4°C, vitesse 5000 rpm = 4137 x g
- Eliminer le surnageant et peser le tube afin de connaître la biomasse humide
- S'il n'est pas utilisé immédiatement, congeler le tube à -80°C.

2.4 Extraction des protéines membranaires

L'information utile à la mise au point du protocole d'extraction a été trouvée dans les références suivantes : [9-11].

Inhibiteurs de protéases : réf. 11777500 (Roche)

DNase : réf. 11284 932 001 (Roche)

Tableau 6 : Références des produits utilisés pour la préparation de la solution d'extraction.

Nom du produit	Référence	Fournisseur	Pays
Urée	165866A	BIO RAD	Suisse
Thio-urée	9000032	Merck	Allemagne
Triton x-100	93420	Fluka	Allemagne

Ultracentrifugeuse : Optima TLX Ultracentrifuge BECKMAN

Pour les cultures où la sonication n'a pas suffi à la lyse des cellules, une solution de lysozyme (réf. 62971; Fluka) a été ajoutée afin d'obtenir une concentration finale dans l'échantillon de 2 mg/mL. Les volumes de solutions ajoutés sont présentés en **Annexe 7.7**.

Cette manipulation doit se faire en maintenant la température de l'échantillon la plus basse possible. Travailler sur glace.

- Ajouter au culot de cellules dégelées du tampon Tris 20 mM à raison de trois volumes par gramme de biomasse humide.
- Ajouter également des inhibiteurs de protéases (1 pastille/10 mL de tampon).
- Vortexer le tube
- Homogénéiser le mélange
- Soniquer le mélange : (aux ultrasons)

Amplitude 50%

Pulseur 1 seconde

10 séries de 10 pulses ; après 5 séries, ajouter quelques mg de DNase

Entre chaque série, placer le tube dans la glace et attendre que le mélange ait atteint la température de 7°C ou en-dessous. Ceci permet de prévenir la dénaturation des protéines. Les inhibiteurs de protéases contrent l'effet des protéases libérées lors de la lyse des cellules. La DNase, quant à elle détruit l'ADN issu des cellules, et réduit ainsi la viscosité de l'échantillon.

- Centrifuger afin d'éliminer les débris cellulaires : 5 min à 4°C, vitesse 3300 rpm = 1802 x g
- Le surnageant est récupéré et représente la fraction dite cellulaire (CF) ; il est distribué dans des petits tubes pour être ultracentrifugé 1 h à 4°C, 200'000 x g
- Le surnageant ainsi obtenu représente alors la fraction des protéines solubles (SF)
- Resuspendre le culot dans la solution d'extraction avec un volume en mL correspondant à 1.5 x la biomasse en g. Ces volumes pour chaque culture sont présentés en **Annexe 7.7**.
- Ultracentrifuger 1 h à 4°C, 200'000 x g

Le surnageant représente alors la fraction des protéines membranaires (MF). Le culot quant à lui représente les restes membranaires (MR).

2.5 Séparation des protéines par gel-électrophorèse

Gel acrylamide 12%

Lors de la première série de tests, les gels ont été fabriqués au laboratoire selon la recette suivante : pour des gels acrylamide 12%

Le gel est fabriqué en deux phases ; la première phase dite de séparation (resolving) permet la migration des différentes protéines au travers du gel. Au dessus de cette phase est ajoutée la phase dite de concentration (stacking) permettant aux protéines d'être rassembler à la même hauteur avant le début de la migration, ceci pour réduire le phénomène de diffusion.

Le gel est coulé entre deux plaques en verre prévues à cet effet, préalablement nettoyées à l'éthanol.

Solution pour 5 mL de gel de séparation :

H ₂ O	1.600 mL
40% acrylamide	0.250 mL
1.5 M Tris (pH 6.8)	1.300 mL
10% SDS	0.050 mL
10% ammonium persulfate	0.050 mL
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	0.002 mL

Solution pour 2 mL de gel de concentration :

H ₂ O	1.400 mL
40% acrylamide	0.250 mL
1.5 M Tris (pH 6.8)	0.250 mL
10% SDS	0.020 mL
10% ammonium persulfate	0.020 mL
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	0.002 mL

Couler la première phase (séparation) entre les deux plaques en verre à hauteur des $\frac{3}{4}$. Ajouter une couche d'isopropanol qui permet un tassement du gel. Une fois cette partie du gel polymérisée (environ 30 min), retirer l'isopropanol et couler la deuxième phase (concentration) par-dessus. Placer le peigne au dessus du gel et laisser polymériser (environ 30 min). Le peigne peut alors être retiré, et le gel placé dans la cuve de migration avec le tampon d'électrophorèse. Faire migrer les protéines préalablement chargées dans le gel à 80 V.

Tampon d'électrophorèse

Ce tampon est utilisé pour la migration des gels d'acrylamide, pour 1L :

30.25 g de Tris base (250 mM)

144.08 g Glycine (1.92 M)

10 g SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (1%)

Bleu de charge

Ajouté à l'échantillon afin de charger ce dernier sur gel et visionner sa migration à travers le gel :

Tris-HCl: 125 mM pH 6.8

Glycérol 20%

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 4%

Bleu de bromophénol 0.04%

Sur tous les gels, le marqueur utilisé est le Precision Plus Protein Standards BioRad, (réf.1610374). Il y sera fait référence dans ce rapport avec un « M » sur les gels. Le cytochrome c commercial utilisé porte la référence : cytochrome c horse heart muscle, 90%. Réf.147531000 Acros.

Ces gels fabriqués en laboratoire n'offrant qu'une résolution moyenne et dont la reproductibilité n'est pas garantie, il a ensuite été décidé de n'utiliser que des gels commerciaux à gradient d'acrylamide, et ceci après que différents tests aient été effectués. (Gels BioRad à gradient 8-16%, référence 161-1222).

Concentration des échantillons de protéines

Kit Microcon de Millipore.

Cut-off de 3 KDa

Réf. 42403

Ce kit permet de charger l'extrait de protéines dans une colonne délimitée par un filtre et placer dans un tube Eppendorf. Grâce à une centrifugation, le liquide et autres molécules de taille inférieure à 3kDa passent au travers de la membrane alors que les autres molécules y restent attachées. Puis, en retournant la colonne, les protéines sont récupérées dans un tube propre après une seconde étape de centrifugation.

2.5.1 Fixation au TCA des protéines dans le gel

Lors de la détection des protéines dans le gel, ces dernières ont tendance à diffuser au travers du gel, rendant les bandes moins nettes et de ce fait, l'identification plus ardue. Afin d'obtenir des gels dont les bandes apparaissent de manière plus propre, le gel est incubé en présence d'une solution d'acide trichloroacétique (TCA) 10% durant dix minutes [12].

2.6 Détection des protéines

2.6.1 Détection des hèmes par spectrophotométrie UV-vis

Lors de cette analyse, les ligands azotés de l'hème de la protéine sont remplacés par de la pyridine. L'hémochrome résultant est quantifié grâce à une différence de spectre entre la forme oxydée et la forme réduite. Cette méthode spectrophotométrique permet alors de repérer les différents cytochromes. Selon la longueur d'onde à laquelle les pics caractéristiques des cytochromes apparaissent, il est possible de déterminer de quel cytochrome il s'agit. Pour ce faire, le spectre d'absorbance est mesuré entre 400 et 600 nm [13].

Dû à la haute toxicité de la pyridine, la préparation des échantillons doit être menée sous flux laminaire et les cuvettes utilisées fermées avec soin.

- Extrait de culture : 50 µL de protéines membranaires
- Spectrophotomètre : Hitachi U-3010

Des essais ont été effectués dans un volume de réaction de 2 mL. Puis, remarquant que les résultats étaient plus propres en réduisant de 10x le volume de travail (donc 200 µL) mais en maintenant le volume d'échantillon (50 µL) cette solution a été appliquée pour l'analyse des échantillons.

- Aux 50 µL d'échantillon de protéines, ajouter 150 µL de tampon Tris-HCl 20 mM
- Ajouter 25 µL de NaOH 0.5 M et 25 µL de pyridine
- Pipeter 100 µL de ce mélange dans deux cuvettes
- Dans la cuvette servant de mesure de l'échantillon réduit, ajouter quelques milligrammes de dithionite
- Couvrir les cuvettes à l'aide de paraffine
- Placer les deux cuvettes dans le spectrophotomètre et débiter la mesure sous forme de scan s'étendant de 400 à 600 nm.

La concentration en cytochromes est mesurée grâce à valeurs d'absorbance. Selon le type de cytochrome, le pic se situera à 550 nm (cytochrome c) ou à 555 nm (cytochrome b). A l'intensité de ce pic est soustraite la valeur d'absorbance à 535 nm. Puis, à l'aide de la formule de Lambert-Beer mettant en relation l'absorbance, le coefficient d'extinction molaire et la concentration, il est possible d'estimer la concentration totale en cytochrome de l'échantillon.

Lambert-Beer : $\Delta A = c \cdot \epsilon \cdot d$, où ΔA représente la différence d'absorbance, c la concentration recherchée ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), ϵ le coefficient d'extinction molaire ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et d la longueur du chemin optique, dans le cas présent, 1 cm.

2.6.2 Mesure du signal TMBZ sur microplaque

La mesure se fait sur les extraits des protéines membranaires bouillis durant 15 minutes.

- Extrait de protéines 10 μ L

Les solutions utilisées sont les mêmes que celles citées sous «Détection des hémoprotéines par TMBZ »

Mix TMBZ :

Acétate de sodium	2088 μ L
TMBZ (1mg/mL)	894 μ L
Peroxyde d'hydrogène	18 μ L

Spectrophotomètre : Microplate Reader ELx808 BioTek

Les cytochromes *c* présents dans les extraits sont détectés lorsqu'ils sont mis en présence du mix TMBZ dans le puit de la microplaque. Puis, la plaque est scannée et le contenu des puits analysé. L'absorbance à 340 nm est mesurée à différents intervalles de temps.

Marche à suivre :

- Pipeter 100 μ L du mix TMBZ dans un puit
- Ajouter 40 μ L d'eau mili Q
- Ajouter 10 μ L d'extrait
- Placer la microplaque dans l'appareil et lancer la mesure

Après différents tests de détection, il se trouve que la mesure effectuée après 2 minutes 20 présente la plus haute valeur d'absorbance. C'est donc cet intervalle de temps qui a été retenu pour l'analyse des échantillons.

2.6.3 Détection des hémoprotéines par TMBZ

Cette méthode est à appliquer sur le gel, post migration. Elle permet de détecter les cytochromes c grâce à l'hème qui leur est attaché de manière covalente. Les cytochromes d'un autre type (a, b) ne sont pas détectés par ce test, car ils perdent leur(s) hème(s) durant la migration dans le gel. La molécule de TMBZ sert de donneur d'électrons pour la réduction d'O₂, alors que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sert d'accepteur des électrons libérés.

TMBZ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine): Réf. 229990010 (Acros)

La solution TMBZ est composée de 30 mg de poudre TMBZ dissolue dans 30 mL de méthanol. Elle est à préparer juste avant son utilisation et à garder à l'abri de la lumière. La suite de la réaction se fait à l'aide de peroxyde d'hydrogène 35% (réf.202465000, Acros).

Pour nettoyer le gel des restes de TMBZ, il est nécessaire de le rincer dans la solution de rinçage :

70 mL d'acétate de sodium 250mM, pH 5.0

30 mL d'isopropanol.

Marche à suivre : [14]

- Rincer le gel dans de l'eau milliQ
- Placer le gel dans un récipient et ajouter 70 mL d'acétate de sodium 250 mM pH 5.0 ; incuber 20 minutes à l'abri de la lumière
- A ceci, ajouter 30 mL de la solution TMBZ; incuber 20 minutes à l'abri de la lumière
- Ajouter 500 µL de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 35% ; incuber jusqu'à l'apparition des bandes
- Vider les solutions et laver le gel trois fois avec la solution de rinçage
- Certaines bandes peuvent être découpées pour analyse ou alors, le gel peut être séché pour sa conservation

2.6.4 Identification des cytochromes par spectrométrie de masse

Cette méthode vise à identifier les cytochromes présents dans les échantillons traités. Une fois l'échantillon passé sur gel d'acrylamide, les bandes révélées peuvent être directement découpées du gel et analysées. Cette technique commence par la séparation des protéines du reste de l'échantillon. Puis grâce à la trypsine, les protéines sont digérées au niveau des résidus arginine et lysine pour l'obtention des peptides qui pourront être analysés et identifiés grâce à leur masse. Pour cette analyse, les échantillons ont été passés en parallèle sur deux moitiés de gel. La première moitié est révélée par TMBZ et la deuxième par Coomassie. Les deux moitiés possédant leur propre marqueur, il est ensuite possible de superposer ces derniers. De là, la bande correspondant à un signal TMBZ peut être découpée du gel traité au Coomassie.

2.6.5 Purification des cytochromes par chromatographie et détection par Dot Blot

Suite à l'extraction des protéines membranaires d'une culture HP, un essai de purification a été tenté afin d'isoler les cytochromes présents et de les analyser. Cette manipulation est effectuée à partir d'extraits de protéines membranaires. Deux essais ont été menés, l'un à l'aide d'une colonne échangeuse anionique et l'autre sur une colonne d'exclusion de taille. La fraction membranaire extraite a été diluée 10x dans la solution de tampon de base puis passée sur HPLC. Les fractions sont récoltées à raison de 500 µL toutes les 30 secondes à partir du démarrage du gradient de sel. Ce gradient est fait de manière croissante entre 0 et 100% de solution saline d'élution. Les fractions sont alors déposées sur une membrane afin d'être détectées (Dot Blot, méthode de transfert sur membrane). Les « Dots » contenant des cytochromes peuvent ensuite être détectés par un réactif nommé 3-Amino-9-ethylcarbozole et qui détecte spécifiquement les cytochromes présents.

Matériel :

HPLC : KNAUER

Colonne 1 : résine Q HP HiTrap (échangeuse anionique)

Colonne 2 : Superose 6, 17-0537-01 (exclusion de taille)

Membrane: Immobilon Transfer Membrane (lot K8JN6291Q, Millipore)

Solutions :

Tampon de base : sert à équilibrer la colonne de chromatographie.

Tris 20 mM pH 8.0; Triton x-100 0.05%. Filtrer à 0.45 µm

Solution saline d'élution :

Tampon de base ; 1 M NaCl. Filtrer à 0.45 µm

Solution de transfert pour Dot Blot:

Tris-HCl 25 mM

glycine 200 mM

SDS 0.02%

méthanol 20%

Solution de détection pour Dot Blot:

40 mg 3-Amino-9-ethylcarbozole (réf. 14787008, Acros)

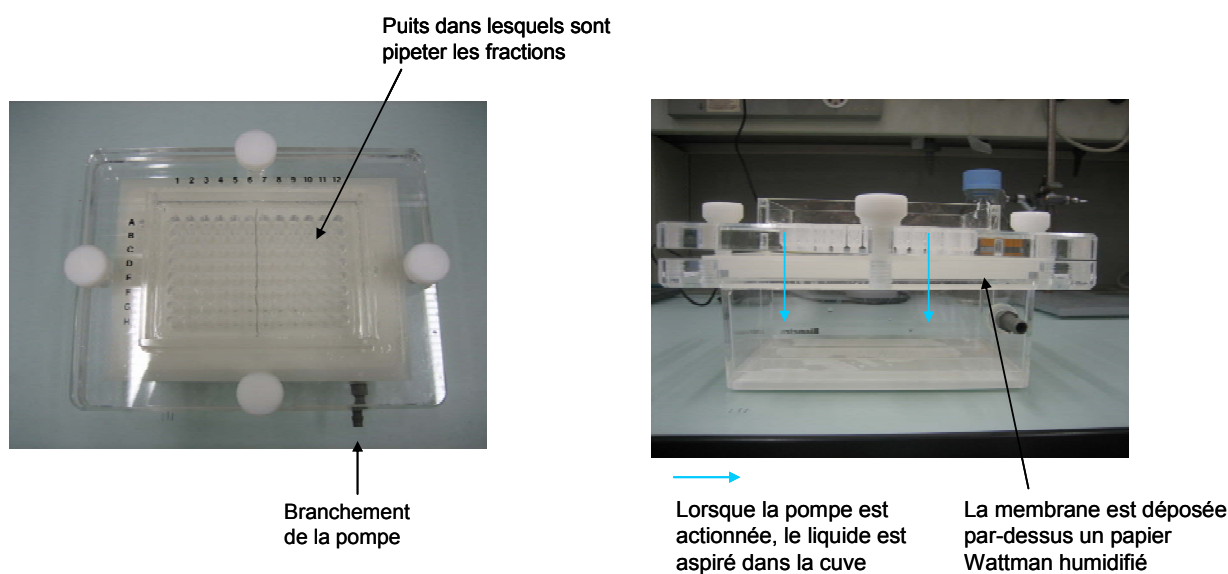
4 mL d'acétone

100 mL d'acétate de sodium

50 µL de peroxyde d'hydrogène 35%

Préparation de la membrane pour le Dot Blot

- Découper un morceau de membrane de manière à couvrir la zone de travail (environ 12 x 8 cm)
- Placer cette dernière dans un bac de méthanol durant 30 secondes, puis 2 minutes dans un bac d'eau milliQ et enfin placer la membrane dans un bac contenant de la solution de transfert pendant au moins 10 minutes.
- Sur l'installation prévue à cet effet, placer tout d'abord un papier Wattman de la même taille que la membrane humidifié avec la solution de transfert.
- Placer la membrane par-dessus le papier Wattman et fermer l'installation, brancher la pompe.



Figures 6 : Appareil pour le Dot Blot.

Pour les fractions issues de l'essai fait sur colonne échangeuse anionique

- Rincer les puits en ajoutant 150 μ L de solution de transfert et aspirer (attention à ne pas dépasser 150 mbar au risque de déchirer la membrane !)
- Ajouter 150 μ L de solution de transfert et pipeter 50 μ L de fraction dans le puit, aspirer
- Rincer les puits avec 150 μ L de solution de transfert, aspirer
- Démontez l'installation et placez la membrane dans un bac
- Ajouter la solution de détection 3-Amino-9-ethylcarbozole par-dessus la membrane et incubez à l'abri de la lumière jusqu'à l'apparition d'un signal

Pour les fractions issues de l'essai sur colonne d'exclusion de taille

Lors de cet essai, après le rinçage des puits avec la solution de transfert, toute la fraction récoltée est mise sur la membrane du Dot Blot et ce dans l'espoir d'observer un signal plus important.

Le reste de la manipulation est identique.

2.6.6 Coloration des protéines au bleu de Coomassie

Le gel est incubé dans la solution de bleu de Coomassie suivante :

10% acide acétique

0.025% Coomassie Brilliant Blue R250

Une fois le gel bien coloré, l'excès de colorant est éliminé à l'aide d'une solution de décoloration (acide acétique 10%).

Cette méthode est à appliquer sur le gel, post migration. Il permet de détecter toutes les protéines qui ont migré à travers le gel.

Marche à suivre :

- Rincer le gel à l'eau milliQ
- Placer le gel dans un bac et le couvrir de solution de bleu de Coomassie
- Incuber avec une légère agitation jusqu'à voir apparaître les bandes (le gel peut être laissé dans la solution toute la nuit si nécessaire)
- Rincer le gel durant deux à trois heures dans la solution de décoloration.

3 Résultats

L'objectif de ce projet était de mettre en évidence des cytochromes propres à un type de culture. L'approche a consisté en l'analyse d'un panel de cultures ayant différents donneurs et accepteur d'électrons. Différentes méthodes de détection et d'identification ont servi de moyen de comparaison.

Toutes les cultures n'ont pas pu être menées à terme. La série de six cultures avec le butyrate comme donneur d'électrons n'a pas poussé. Les cultures Fo+Ni, Fo+Su, Et+T et Et+Su n'ont pas non plus abouti à une biomasse suffisante pour être exploitables. Les protéines membranaires des cultures H+P (a), H+T (a et b), H+Su (a), Fo+T (b), Et+Th (a et b), Va+P (a et b), Va+T (a et b) et Va+Ni (a) n'ont pas pu être extraites, et ce malgré l'ajout de lysozyme à la solution d'extraction. Les analyses ont donc été faites sur 21 cultures, parmi lesquelles 18 en duplicatas.

3.1 Optimisation des techniques utilisées

Afin de mettre en place les différentes méthodes utilisées lors de ce projet, certaines optimisations ont dû être faites. Concernant la méthode d'extraction des protéines membranaires, plusieurs essais comparant différentes combinaisons de détergents ont été réalisés. La combinaison d'urée 7M, thiourée 2M et de Tritonx-100 2% s'est avérée donner les meilleurs résultats en matière d'extraction. Un test effectué parallèlement a révélé que cette combinaison était également celle induisant le moins de biais lors des analyses à venir. Pour finir, un test déterminant le ratio entre la biomasse et le volume de solution d'extraction a été réalisé. Il en ressort que pour une bonne extraction des protéines membranaires, un ratio de 1:1.5 doit être utilisé. Cela signifie que la valeur de biomasse humide en g doit être multipliée par 1.5 afin d'obtenir le volume de solution de d'extraction à lui ajouter en mL. Les données chiffrées concernant l'ensemble des échantillons sont présentées en **Annexe 7.6**.

Suite à l'optimisation de l'extraction des protéines membranaires, les efforts se sont portés sur l'amélioration de la lisibilité des gels d'acrylamides souvent utilisés lors de ce projet. En effet, les bandes des gels n'étant pas toujours des plus nettes, un travail restait à faire de ce côté-là. Pour commencer, une technique a été mise au point afin d'éliminer la rhodanèse, protéine non-hémique mais qui présente l'inconvénient de réagir au test TMBZ et qui apparaît donc sur gel. Afin d'éliminer cette réactivité, il a été observé que lorsque l'échantillon de protéines membranaires est bouilli durant 10 min, le signal provenant de la rhodanèse est éliminé, et ce sans entraver le signal lié au cytochrome c.

Une technique permettant de fixer les protéines dans le gel d'acrylamide a également été mise au point et ce afin que ces dernières ne diffusent pas au travers du gel lors des différentes détections. Ainsi, le gel incubé durant 10 minutes dans une solution d'acide trichloroacétique 10% offre une lisibilité grandement améliorée de par la netteté des bandes. Le détail de ces résultats est présenté en **Annexe 7.6**.

L'idée de précipiter les protéines avant de les faire migrer sur gel avait été émise. Lors de cet essai, les protéines ont été précipitées à l'aide d'acide trichloroacétique puis chargées sur gel. Malheureusement, suite à cette précipitation, les protéines n'ont pas migrés de manière optimale. Les cytochromes c semblent détruits par la précipitation. Cette technique n'a donc pas été appliquée par la suite.

Un test visant à améliorer la qualité de détection des protéines sur gel grâce à une dilution de l'échantillon a été fait. Ce test a démontré que dans le cas d'un gel révélé par Coomassie, la dilution de 5x de l'échantillon pouvait être bénéfique car elle évite un phénomène de saturation. Cependant, dans le cas d'une révélation au TMBZ, la dilution est à proscrire. En effet, dans ce cas, la dilution ne fait qu'appauvrir le signal, rendant l'interprétation encore plus ardue. Ce résultat est également présenté en **Annexe 7.6**.

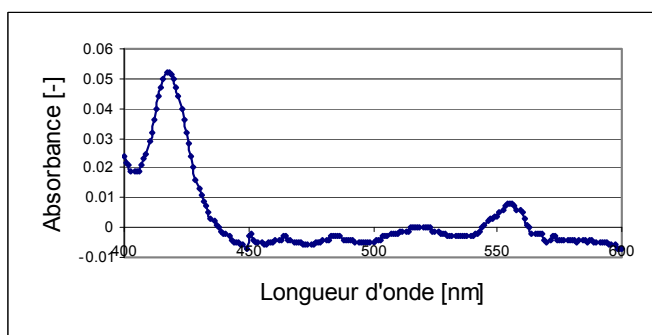
Pour finir, un essai a été fait à l'aide du kit Microcon afin de concentrer les protéines extraites avant de les mettre sur gel. Bien qu'il soit possible de concentrer les protéines, l'inconvénient de ce kit réside dans l'impossibilité de maîtriser le volume d'élution. Puisque le but dans ce projet est de maintenir des volumes normalisés à chaque étape, cette technique n'a donc pas été utilisée par la suite. Les résultats relatifs à cet essai sont présentés en **Annexe 7.6**.

Une fois ces techniques élaborées, les méthodes de détection et d'identification des cytochromes c ont également été améliorées.

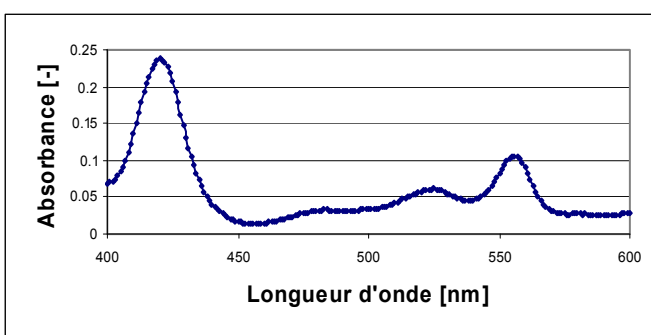
3.1.1 Optimisation de la méthode d'analyse des hémochromes par UV-Vis

L'analyse des hémochromes à l'aide de la pyridine permet d'obtenir un spectre révélant les différents types de cytochromes présents dans l'échantillon. Afin d'optimiser la méthode, un échantillon de cytochrome c commercial a été analysé, ceci afin de connaître la sensibilité du test et d'obtenir un spectre référence. Le spectre effectué s'étend de 400 à 600 nm.

Un test visant à améliorer la résolution du spectre en concentrant l'échantillon a été effectué. En effet, certains essais non présentés ici révélèrent un bruit de fond important lorsque le test est mené dans un volume de réaction total de 2 mL. Un essai a donc été fait afin de comparer le signal obtenu avec 2 mL et 0.2 mL, sans changer le volume d'échantillon de protéines (0.085 mL).



Graphique 1 : Spectre de l'extrait dans un volume total d'échantillon de 2 mL.



Graphique 2 : Spectre de l'extrait dans un volume total d'échantillon de 0.2 mL.

Les spectres différentiels mesurés (réduit-oxydé) sont présentés dans les **Graphiques 1 et 2**, et permettent de remarquer une nette diminution du bruit de fond lorsque l'échantillon est plus concentré. En effet, si la réaction est effectuée dans un volume de 0.2 mL, le ratio signal/bruit de fond est très nettement amélioré.

Suite à cet essai, tous les échantillons issus des cultures ont été traités dans un volume de 0.2 mL. Après chaque extraction de protéines membranaires, 0.05 mL de l'extrait a été directement analysé selon la procédure d'analyse des hémochromes présentée dans la partie *Matériel et Méthodes*.

3.1.2 Choix des gels d'acrylamide

Afin d'améliorer la résolution des protéines dans les gels d'acrylamide, des essais ont été faits avec différents gels commerciaux : gel à concentration fixe d'acrylamide (15%), et gels à gradient (10-20% ; 8-16%).

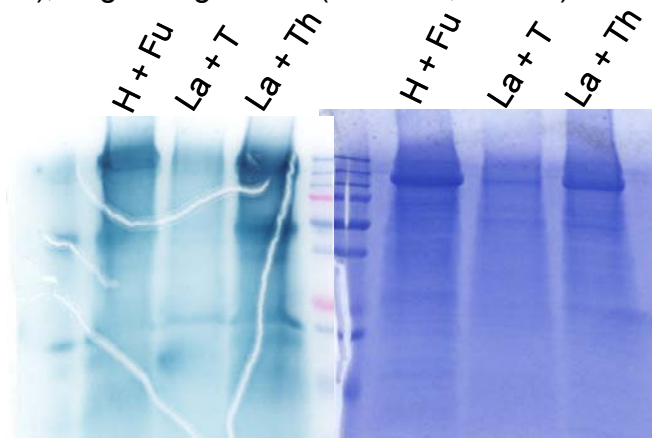


Figure 7 : Gels 15% révélés par TMBZ et Coomassie.

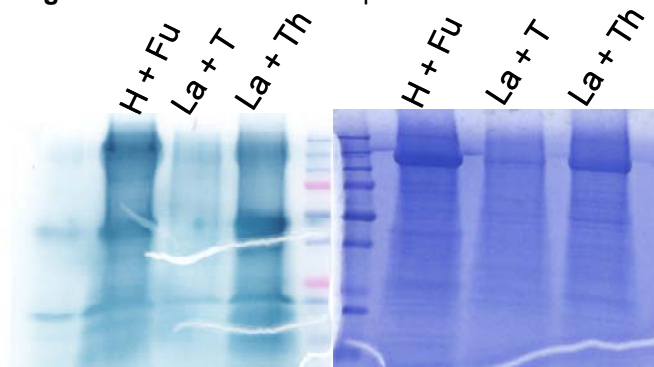


Figure 8 : Gels à gradient 10-20% révélés par TMBZ et Coomassie.

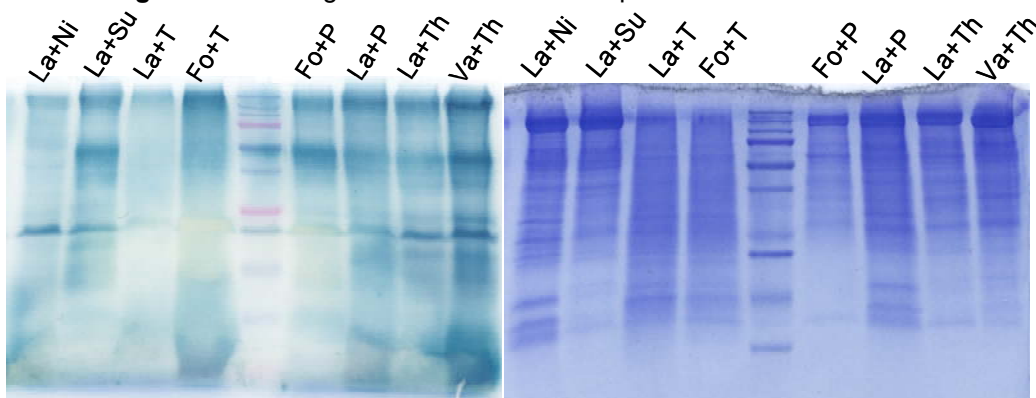


Figure 9: Gels à gradient 8-16% révélés par TMBZ et Coomassie.

L'analyse de ces gels a permis le choix d'un gel à gradient 8-16%. Ceci car le gel en **Figure 9** présente une meilleure lisibilité que le gel sans gradient en **Figure 7** et l'avantage de bien cadrer les protéines d'intérêt (20 à 70 kDa [kilo Dalton]) contrairement au gel à gradient plus large en **Figure 8**.

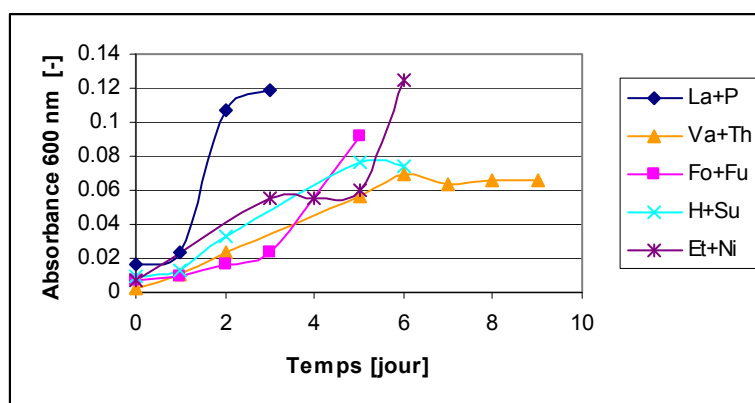
3.2 Rendement des cultures

L'absorbance des cultures a été suivie puis chaque bouteille a été récoltée. Voici représentées les valeurs d'absorbances des cultures juste avant leur récolte ainsi que la quantité de biomasse humide résultante en mg. Chaque type de culture est présenté avec le résultat pour les duplicatas « a / b » avec l'absorbance sur la première ligne et la biomasse sur la deuxième ligne.

Tableau 7 : Valeurs des absorbances et des biomasses humides des cultures.

	P	T	Fu	Ni	Su	Th
H	0.041 / 0.05 250 / 170	0.028 / 0.02 170	0.082 / 0.072 320 / 280	0.076 / 0.111 300 / 200	0.061 / 0.074 210 / 280	0.067 / 0.063 410 / 100
La	0.119 / 0.108 620 / 620	0.069 / 0.093 400 / 500	0.059 / 0.055 440 / 480	0.083 / 0.095 440 / 450	0.078 / 0.079 550 / 650	0.082 / 0.072 610 / 320
Fo	0.038 / 0.047 200 / 220	0.083 / 0.031 370 / 150	0.088 / 0.092 390 / 290			0.038 / 0.037 270 / 250
Et	0.058 / 0.049 220 / 230		0.056 / - 660 / -	0.125 / 0.083 260 / 230		0.076 / 0.046 390 / 270
Va	0.037 / 0.037 180 / 140	0.023 / 0.018 230	0.027 / 0.024 160 / 110	0.014 / 0.13 120 / 400	0.094 / 0.055 330 / 230	0.063 / 0.066 210 / 230

De manière générale, les cultures poussant sur lactate ont tendance à croître plus rapidement et à mener à une biomasse plus importante. Les cases grises représentent les cultures qui n'ont pas poussé malgré trois essais. Le duplicata « b » de la culture Et+Fu n'a lui non plus pas poussé. Les cultures H+T et Va+T n'ont qu'une valeur de biomasse. Ceci est dû au fait que les duplicatas ont été récoltés ensemble à fin d'avoir plus de matériel. Le **Graphique 3** présente l'évolution de certaine culture. Il permet de remarquer clairement les différences de vitesse de croissance. Ce graphique démontre que la culture ayant le lactate comme donneur d'électron croît le plus rapidement et que, au contraire, la culture sur vanillate nécessite plus de temps.



Graphique 3: Evolution de la croissance de la biomasse.

3.3 Analyse des extraits membranaires issus des cultures

Les protéines membranaires de toutes les cultures récoltées ont été extraites et analysées. L'extraction s'est faite pour chaque culture dans un volume de solution d'extraction proportionnel à la biomasse humide suivant le ratio 1.5 mL/g. Les biomasses ainsi que les volumes d'extraction correspondants sont présentés en **Annexe 7.7**.

Suite à l'extraction, l'échantillon est aliquoté en vue des analyses diverses : 50 µL pour la mesure des hémochromes, 50 µL pour des tests TMBZ et Coomassie préliminaires et le reste de l'échantillon pour l'analyse finale sur gels à gradient.

Des analyses complémentaires ont également été réalisées sur les échantillons de protéines membranaires, notamment une mesure spectrophotométrique de la détection au TMBZ en milieu liquide, afin de confirmer les résultats obtenus par la méthode des hémochromes. De plus, une purification des cytochromes par HPLC a également été tentée. Pour finir, l'identification de certains cytochromes par spectrométrie de masse a été confiée au laboratoire PCF (Protein Core Facility) de l'EPFL.

3.3.1 Détection des hémochromes par spectrophotométrie UV-vis

La mesure spectrophotométrique des échantillons de protéines membranaires a permis une estimation de la concentration en hémoprotéines totales. Les échantillons ayant une majorité de cytochromes de type *b* possèdent un pic alpha à 555 nm et ceux avec une majorité de cytochromes de type *c* à 550 nm.

La plupart des échantillons présentent une majorité de cytochromes de type *c*. Seul l'échantillon Lactate + PCE semble être dominé par des cytochromes de type *b*. Les résultats détaillés obtenus pour cette analyse sont présentés en **Annexe 7.8**. Les duplicatas ne présentent pas systématiquement des résultats identiques, même si la tendance est plutôt respectée.

Les cases grisées représentent les échantillons n'ayant pas pu être analysés car la culture n'a pas fourni assez de biomasse. Les cases vides correspondent aux échantillons trop pauvres en protéines pour fournir un résultat à l'aide de cette technique. La valeur la plus élevée survient pour l'échantillon Va+Su et la plus faible pour l'ensemble des échantillons sur Nitrate. La répartition des résultats en cinq catégories permet la comparaison avec les résultats de mesure par TMBZ sur microplaque au **Tableau 9** et les résultats de gels TMBZ aux **Tableaux 10 et 11** présentés sous la même forme.

Tableau 8 : Concentration moyenne en hémoprotéines pour chaque échantillon en $\mu\text{mol/L}$.

	P	T	Fu	Ni	Su	Th	
H			5.85	0.20	6.15	2.00	Non détecté
La	4.50		2.60	0.75	2.90	3.95	0-1.6
Fo	2.50	1.65	4.15			4.05	1.6-3.2
Et	1.90			0.20			3.2-4.8
Va			1.05		7.80	6.70	4.8-6.4
							6.4-8

Les valeurs calculées sont données en μmol d'hémoprotéines par litre d'extrait.

3.3.2 Mesure TMBZ sur microplaque

Cette manipulation sert à corréliser les résultats obtenus par la méthode de détection des hémochromes par spectrophotométrie et la détection spécifique des hèmes par TMBZ. Elle est basée sur l'activité peroxydase des hèmes en présence de TMBZ et de peroxyde d'hydrogène.

Tableau 9 : Résultats d'absorbance pour la mesure TMBZ en microplaque.

	P	T	Fu	Ni	Su	Th	
H	0.71		0.78	0.52	0.89	0.24	0.1-0.3
La	0.65	0.51	0.24	0.50	0.44	0.41	0.3-0.5
Fo	0.26	0.56	0.45			0.52	0.5-0.7
Et	0.24			0.52			0.7-0.9
Va			0.20	0.12	0.98	0.81	0.9-1.1

Tout d'abord, un spectre mesurant le maximum d'absorbance de la coloration au TMBZ a été effectué, révélant un signal dominant entre 300 et 400 nm. Puisque l'appareil servant à mesurer la microplaque ne propose de mesurer qu'à 340 ou 410 nm, la première valeur a été choisie. Aux valeurs mesurées pour les échantillons est soustraite le bruit de fond correspondant au mix réactionnel contenant les protéines, mais sans peroxyde d'hydrogène. Cette mesure atteint une valeur moyenne d'absorbance de 0.683. Après environ cinq minutes de temps de réaction, des précipités ont été observés, ainsi que la disparition de la coloration bleue du TMBZ. Dès lors, la mesure a été systématiquement faite après 2 min 20 sec. Ici, seul le duplicata ayant donné le meilleur résultat en détection des hémochromes a été mesuré (**Tableau 9**).

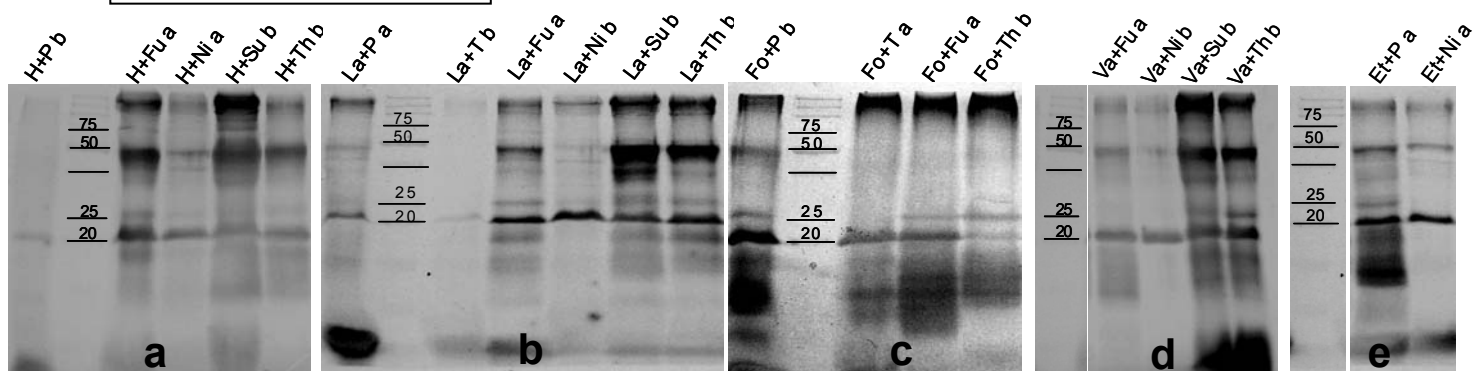
La valeur la plus élevée est atteinte pour l'échantillon Vanillate+Sulfite et la plus basse pour Vanillate+Nitrate. La répartition des résultats en cinq catégories permet la comparaison avec les résultats des hémochromes au **Tableau 8** présenté sous la même forme. Les cases grisées représentent les échantillons n'ayant pas pu être analysés faute d'une culture ou d'extraction menées à terme. Les **Tableaux 10** et **11** permettent de remarquer la même tendance entre les échantillons, c'est-à-dire que les échantillons pour lesquels une haute concentration en hémochromes a été mesurée présentent également une valeur plus importante en mesure TMBZ. Cependant, les échantillons H+P et La+T révèlent une forte activité lors de la mesure TMBZ mais sont indétectables en analyse des hémochromes.

3.3.3 Analyse des cytochromes de type c par TMBZ

Suite à la mise sur gel préliminaire des échantillons extraits, ces derniers ont été passés sur des gels commerciaux à gradient 8-16% d'acrylamide. Les échantillons ont été analysés par séries, tout d'abord selon le donneur d'électron puis selon l'accepteur utilisés dans les cultures.

Légende série donneur

a : Hydrogène
b : Lactate
c : Formate
d : Vanillate
e : Ethanol



Légende série accepteur

f : Nitrate
g : Fumarate
h : Thiosulfate
i : Sulfite
j : PCE

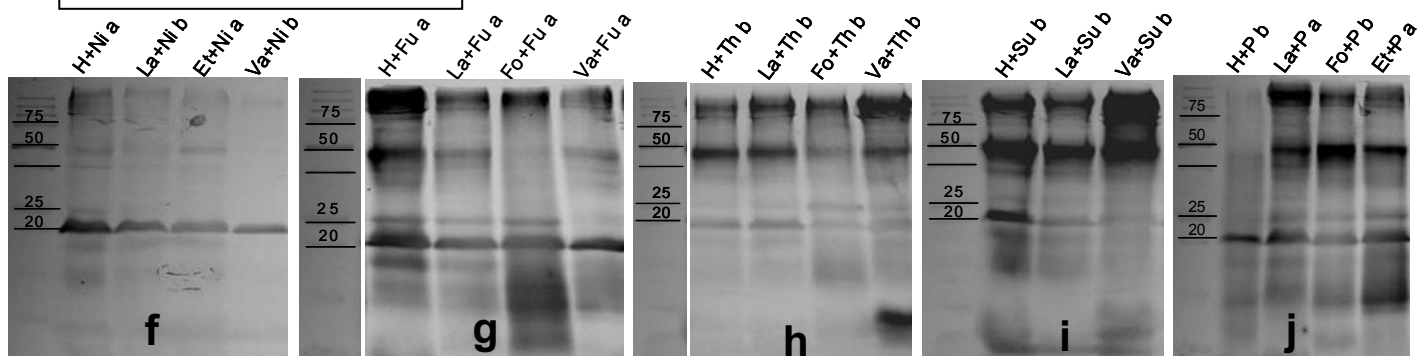


Figure 10 : Gels TMBZ série donneurs et série accepteurs d'électrons

L'intensité des bandes détectées par TMBZ varie en fonction de la nature de l'échantillon, mais également d'un gel à l'autre, ce qui biaise sensiblement la reproductibilité de l'analyse. Cependant, le profil des bandes observées est conservé pour un même échantillon, permettant ainsi une analyse qualitative. De manière générale il a été constaté que les profils au sein des séries d'échantillons ayant le même accepteur d'électrons sont nettement plus conservés que sur les séries de donneurs d'électrons (séries a à e). Les cultures qui ont respiré les chloroéthènes (PCE, TCE) en particulier ne possèdent pas un profil spécifique, ni un cytochrome qui leur est propre.

Afin de schématiser l'ensemble des résultats obtenus pour la détection des cytochromes c dans les gels, un profil type a été élaboré, qui contient les bandes correspondants à des cytochromes c de tailles suivantes : 50, 37, 25, 20, et 18. Le signal apparaissant tout au sommet des gels n'a pas été considéré, car il s'agit probablement de cytochromes de taille variable agrégés et qui ont été retenus à l'entrée du gel de séparation.

Les **Tableaux 10** et **11** représentent ces résultats sous forme d'intensité de bandes. Comme la bande ayant la plus forte intensité n'est pas la même pour tous les échantillons, ces tableaux permettent de se rendre compte de la distribution du nombre et de l'intensité des bandes pour chaque combinaison. Le code de couleur également utilisé précédemment pour la visualisation des résultats des hémochromes et de TMBZ sur microplaques permet une vue d'ensemble rapide et simple. Les cases blanches représentent des bandes qui n'apparaissent pas sur gel. La couleur la plus foncée (bleu) représente ainsi la bande la plus intense sur le gel. Cette visualisation d'ensemble tend également à montrer une similitude des profils bien plus marquée lors de la comparaison des échantillons de la série accepteurs d'électrons que lors de la comparaison de la série des donneurs. Ces résultats soutiennent donc ceux obtenus par TMBZ sur microplaque tels qu'ils sont visibles dans les **Tableaux 10** et **11**.

Tableau 10 : Représentation de l'intensité des bandes des gels révélés au TMBZ selon le donneur d'électrons.

[illegible]

Tableau 11: Représentation de l'intensité des bandes des gels révélés au TMBZ selon l'accepteur d'électrons.

[illegible]

3.3.4 Recherche et analyse bioinformatique de cytochromes de type c dans le génome de *D. hafniense* Y51

La séquence complète du génome de *Desulfitobacterium hafniense* Y51, souche très proche de TCE1 a été analysée pour y déceler tous les gènes possibles codant pour des cytochromes de type c. Il existe un motif peptidique conservé au sein des cytochromes c représenté par CXXCH où C signifie l'acide aminé cystéine, X un acide aminé quelconque et H l'histidine. Ce motif est responsable de la liaison covalente d'une molécule d'hème, à savoir par la paire de cystéines qui se lient chacun à un groupe vinyle périphérique de l'hème, alors que l'histidine représente un ligand axial de l'atome de fer au centre de l'hème. Il peut arriver que l'histidine soit parfois remplacée par une lysine (K).














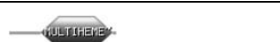

La recherche bioinformatique effectuée sur le génome de Y51 a révélé 26 protéines contenant au moins un motif CXXCH, mais parmi lesquelles toutes ne sont pas nécessairement un cytochrome c. Après analyse de la séquence des 26 protéines à l'aide d'un outil internet permettant l'identification de domaines connus de protéines [15], la sélection de cytochromes a été abaissée à 15, un nombre bien au-delà des 6 protéines initialement annotées comme cytochromes c par Nonaka *et al.* [3]. Le résultat de cette analyse figure dans le **Tableau 12**.

3.3.5 Identification des cytochromes par spectrométrie de masse

Les résultats obtenus par bio-informatique et confrontés aux résultats de spectrométrie de masse sont présentés dans le **Tableau 12**. Plusieurs échantillons représentatifs des bandes majoritaires ont été analysés mais un seul a donné une réponse satisfaisante. Il s'agit de la bande à 50 kDa issue de l'échantillon Hydrogène+Sulfite découpée dans un gel coloré au Coomassie. Ce cytochrome correspond à la protéine DSY3065 du génome de Y51, et a été annoté comme une sous-unité d'une nitrite réductase. L'analyse de la plupart des fragments a révélé bon nombre de protéines sans fonction avérée sans homologie aux cytochromes d'intérêt et ce, pour différentes raisons. Tout d'abord, la taille de la protéine identifiée comparée à la taille attendue permet d'écarter certains candidats. De plus, il faut prendre en compte le fait que certaines protéines ne s'apparentant nullement à des cytochromes vont migrer au même endroit dans le gel à cause de leur taille identique. Enfin, un score est attribué à chaque protéine identifiée lors de l'analyse, permettant ainsi d'évaluer la pertinence de l'identification. Ici DSY3065 figure parmi les dix premières protéines identifiées (score : 196, voir **Annexe 7.11**), ce qui représente un résultat fiable.

Afin d'enrichir un échantillon de protéines membranaires en cytochromes, et ainsi de faciliter leur identification, un essai de purification par HPLC suivie de la détection des cytochromes présents a été entreprise. Malheureusement cette expérience n'a pas mené aux résultats escomptés. Ces derniers sont présentés à l'**Annexe 7.9**.

Tableau 12 : Résultats de l'analyse bioinformatique.

Protéine (code)	Taille (# aa)	Poids mol. (KDa)	Motifs CXXCH	Fonction annotée	Domaine détecté par Prosite
DSY0260	187	19.9	CTQCH	Fonction non-définie	Cyt c 
DSY0314*	147	16.5	CLNCH, CYSCH, CWACH	Cytochrome c d'une menaquinol oxidoreductase (HmeE)	Cyt c multi-hémique 
DSY0325*	432	47.2	CISCK, CGTCH, CSQCH, CTDCH, CLSCH	Cytochrome c552 d'une nitrite reductase dépendante du formate	Cyt c multi-hémique 
DSY0882	214	23.1	CSVCH, CLACH, CLSCH, CTDCH, CYTCH, CYTCH	Fonction non-définie	Cyt c multi-hémique 
DSY0960	223	23.7	CSVCH, CSTCH, CLNCH, CVSCH, CISCCH, CYTCH	Fonction non-définie	Cyt c multi-hémique 
DSY1166	133	14.8	CVSCH	Fonction non-définie	Cyt c 
DSY1424	194	21.1	CALCH, CVDCH, CFQCH, CYKCH, CLSCH, CYTCH	Fonction non-définie	Cyt c multi-hémique 
DSY2218	94	10.3	CYRCH	Fonction non-définie	Cyt c 
DSY2471*	166	18.6	CGDCH, CLRCH, CFDCH	Cytochrome c tetrahémique d'une nitrate reductase (NrfH)	Cyt c multi-hémique 
DSY2472*	480	53.1	CWNCK, CADCH, CAQCH, CADCH, CQTCH	Cytochrome c552 d'une nitrite reductase dépendante du formate (NrfA)	Cyt c multi-hémique 
DSY2480	353	38.3	CKTCH, CGSCH, CESCH, CNSCH, CLTCH, CAKCH	Fonction non-définie	Cyt c multi-hémique 
DSY2607	185	20.7	CEQCH, CLSCH, CTTCH, CSTCH	Fonction non-définie	Cyt c multi-hémique 
DSY2759	211	23.7	CNQCH, CTSCH, CTTCH, CVDCH, CAKCH	Fonction non-définie	Cyt c multi-hémique 
DSY3065*	447	50.0	CWTCK, CANCH, CAQCH, CADCH, CLTCH	Cytochrome c552 d'une nitrite reductase dépendante du formate (NrfA)	Cyt c multi-hémique 
DSY3066*	161	18.2	CVSCH, CNDCH, CLRCH, CFDCH	Cytochrome c tetrahémique d'une nitrate reductase (NrfH)	Cyt c multi-hémique 

* Protéines annotées comme cytochromes *c* par Nonaka *et al.*, [3]

4 Discussion

4.1 Optimisation des techniques utilisées

Premièrement les efforts se sont concentrés sur la préparation des échantillons de protéines membranaires. Plusieurs étapes ont pu être améliorées, à commencer par la qualité d'extraction des protéines membranaires, et ce grâce à une combinaison de détergents et un volume de travail permettant une bonne extraction, tout en garantissant une détection satisfaisante des cytochromes. La fixation des protéines dans le gel au moyen de TCA a également permis une amélioration visuelle de la détection.

Pour ce qui est du choix des gels commerciaux, différents tests ont été effectués, tout d'abord pour savoir si l'utilisation d'un gel à gradient d'acrylamide était ou non plus judicieuse qu'un gel à concentration unique, puis afin de déterminer quel gradient offrait la meilleure résolution des protéines d'intérêt. Il est clair que le gel à gradient 8-16% a donné les meilleurs résultats (**Figures 7, 8 et 9**)

4.2 Suivi des cultures et récolte de la biomasse

Dans un premier temps, le travail s'est porté sur la mise en culture des différentes combinaisons de donneurs et accepteurs d'électrons. Il est parfois arrivé que certaines cultures ne croissent que très peu et n'aient pas pu être utilisées. C'est ce qui s'est produit pour les six cultures initialement prévues sur butyrate comme donneur d'électrons. Pour ces cultures, la mesure d'absorbance à 600 nm n'a jamais dépassé 0.04. Ce phénomène avait déjà été remarqué lors de précédents travaux [16]. Ce problème de croissance est également survenu avec les cultures suivantes : Formate+Nitrate, Formate+Sulfite, Ethanol+TCE, Ethanol+Fumarate et Ethanol+Sulfite. Les raisons de cette faible viabilité n'ont pas été recherchées. L'analyse des cytochromes s'est concentrée sur les cultures restantes. Certaines cultures n'ont également pas pu être exploitées à cause d'une lyse cellulaire insuffisante, à savoir Ethanol+Thiosulfate (a et b), Vanillate+PCE (a et b), Vanillate+TCE (a et b), Vanillate+Nitrate (a), Hydrogène+PCE (a), Hydrogène+TCE (a et b), et Formate+TCE (b). Rappelons que puisque toutes les cultures ont été menées à double, certaines de ces cultures ont tout de même pu être analysées grâce à leur duplicata. La difficulté de lyse ne semble pas liée au type de culture, mais pourrait être associée à un état physiologique des cellules au moment de la récolte.

Il a très vite été remarqué que les cultures poussant à l'aide de lactate comme donneur d'électrons menaient à une biomasse bien plus importante que pour les autres cultures, et ce dans un temps réduit par rapport aux autres conditions. Ceci avait déjà été remarqué précédemment par Yang *et al.*[17]. L'explication à ce phénomène tient dans le fait que le lactate est décomposé en produits utilisables par la cellule comme source d'énergie et de carbone tel que le pyruvate par exemple. Les molécules à voie de dégradation plus simple tel que l'hydrogène, le formate ou le vanillate ne produisent que respectivement des protons, du CO₂ et du DHB (3,4-dihydroxybenzoate), ne servant à la cellule que de source d'électrons. Cela implique une limitation au niveau énergétique et donc une croissance moins rapide et moins importante. Dans une certaine mesure, ceci permet d'expliquer les différences de croissance entre les types de cultures.

En outre, des variations ont également été observées d'une bouteille à l'autre pour des cultures avec les mêmes substrats. Bien que préparées exactement de la même façon, les petites différences de pH, de potentiel redox ou de concentration de substrats sont probablement responsables des variations observées. Cependant, ceci n'a pas fait ici l'objet d'une investigation détaillée. En effet, le but premier était d'obtenir une biomasse suffisamment dense afin d'en analyser le contenu en protéines. A titre d'information, selon les substrats utilisés la durée de culture s'est étendue de 3 à 9 jours, et la biomasse récoltée entre 0.11 et 0.66 g (**Annexe 7.7**).

4.3 Analyses des extraits membranaires issus des cultures

Beaucoup d'échantillons n'ont donné que peu ou pas de signal pour la mesure des pyridines hémochromes. Parmi ceux-ci, la plupart sont des échantillons pour lesquels l'extraction a mal fonctionné. Le manque de protéines permet d'expliquer le peu ou l'absence de signal observé. Les gels révélés au Coomassie présentés en **Annexe 7.10** démontrent les variations d'extraction d'un échantillon à l'autre. Ces gels permettent de déterminer si le manque de signal lors des analyses est issu d'une extraction limitée des protéines ou alors d'une faible concentration en cytochromes parmi les protéines extraites. Le fait que certaines cultures aient été extraites plus facilement que d'autre n'est probablement pas imputable au mélange d'extraction. En effet, puisque la proportion de solution d'extraction est maintenue d'un échantillon à l'autre, cela ne devrait pas avoir d'influence. Cependant, l'état des cellules au moment de la lyse peut avoir un impact important. En fonction de son stade de croissance et de l'environnement de culture, certaines cellules sont vraisemblablement plus faciles à détruire que d'autres.

Parallèlement à cela, une mesure de la concentration en protéines totales de chaque échantillon a été tentée. Malheureusement, la présence des détergents utilisés pour l'extraction crée une interférence telle qu'elle surpasse le signal des protéines, rendant une mesure fiable impossible.

4.3.1 Mesure des hémochromes par spectrophotométrie UV-vis

Le profil observé lors de la mesure des spectres des hémochromes est donné dans le **Graphique 2**. Tous les spectres qui ont pu être mesurés y ressemblent fortement. Seuls la longueur d'onde à laquelle apparaît le pic α , et l'intensité de ce dernier, il a été possible d'obtenir une indication sur le type de cytochromes majoritaires (*b* ou *c*), ainsi que sur la concentration totale en hèmes présents dans les échantillons (**Tableau 8** et **Annexe 7.8**). Puisque le pic α des cytochromes *b* et *c* sont généralement très proches (555 et 550 nm, respectivement), il est difficile d'affirmer n'avoir que tel ou tel type de cytochromes. Cependant le type de cytochromes majoritairement présents peut être estimé. Il est donc clair que la plupart des échantillons semblent posséder majoritairement des cytochromes de type *c*. Seul l'échantillon Lactate+PCE semble avoir une majorité de cytochromes *b*. Ce résultat reste inexpliqué, car dans un tel cas, le bon sens voudrait que la présence majoritaire de ce type de cytochromes soit liée soit à la présence soit du lactate, soit du PCE. Cependant, aucune autre culture poussant sur lactate ou PCE ne présente cette caractéristique. Certains échantillons, tels que Hydrogène+PCE ou Lactate+TCE, n'ont donné aucun résultat lors de cette analyse. Ceci est dû à la mauvaise extraction des protéines membranaires, comme il a été confirmé après coloration de ces échantillons au Coomassie (**Annexe 7.10**). Par contre, dans le cas des cultures avec nitrate comme accepteur d'électrons, il semble que la population en cytochromes est plus réduite, suggérant que la chaîne respiratoire ne contient pas de cytochrome spécialement dédié à la respiration du nitrate. En effet, les échantillons Nitrate semblent avoir bénéficié d'une extraction satisfaisante mais n'obtiennent que des résultats extrêmement faibles en hémochromes.

De manière générale, la méthode des pyridines hémochromes semble bien reproductible, les limites étant essentiellement la qualité de l'extraction, et peut-être la relative instabilité du signal correspondant à l'hème dans sa forme réduite. Par contre, l'hémochrome est une mesure directe du contenu en hèmes d'un échantillon, ce qui n'est pas le cas pour la détection au moyen du TMBZ, comme il est démontré plus bas.

4.3.2 Mesure TMBZ sur microplaque

Les résultats obtenus par la méthode de TMBZ sur microplaque ont permis de confirmer la tendance générale des résultats révélés par la mesure des hémochromes (**Tableaux 8 et 9**). Cependant, il faut émettre une certaine réserve. En effet, lors de la mesure au TMBZ sur microplaque, aucune distinction n'est faite entre les cytochromes et d'autres protéines de l'extrait qui ne contiennent pas d'hème, mais qui montrent une réactivité vis-à-vis du système TMBZ/H₂O₂, telles que les rhodanèses. C'est pour cela que certains échantillons ne donnent pas ou peu d'hémochromes, alors que la mesure au TMBZ émet un signal important (Hydrogène+PCE, Lactate+TCE, la série Nitrate). Pour ces échantillons, il est raisonnable de penser que la majorité du signal obtenu par TMBZ sur microplaque ne soit pas issu des cytochromes.

4.3.3 Analyse des cytochromes de type c par TMBZ

La détection des cytochromes c au TMBZ après gel-électrophorèse a été réalisée deux fois, selon le donneur d'électron, puis selon l'accepteur, ce qui a permis d'une part une évaluation de la reproductibilité de l'analyse et d'autre part, une comparaison visuelle simple des cytochromes présents dans les échantillons.

Les gels révèlent cinq signaux principaux correspondant à des cytochromes c. Ainsi, les bandes qui apparaissent le plus souvent sont celles situées à 50, 37, 25, 20 et 18 kDa. Une comparaison systématique des échantillons s'est donc basée essentiellement sur ces cinq bandes-là.

Suite à l'analyse de ces bandes pour chaque type de culture, il ne semble pas y avoir de cytochrome c apparaissant uniquement dans les conditions de déhalorespiration, c'est-à-dire en présence de PCE ou TCE. Il apparaît toutefois que les cytochromes autour de 15 kDa soient sensiblement plus représentés dans les échantillons avec PCE (**Figure 10, j**), bien qu'ils apparaissent également dans d'autres conditions. Il se pourrait que ces cytochromes s'apparentent aux protéines DSY1166 ou DSY0314 dont la fonction n'est pas claire (**Tableau 12**). De manière générale, aucun cytochrome ne semble exclusivement présent pour un donneur ou accepteur d'électrons particulier, mis à part pour le nitrate comme expliqué plus loin. Cependant, il ressort très clairement que les profils des échantillons classés selon les accepteurs d'électrons sont bien plus conservés que selon les donneurs. Ce résultat mieux visible sous la forme des **Tableaux 10** et **11** permet d'illustrer l'importance des cytochromes c dans la deuxième moitié de la chaîne respiratoire, à savoir entre le pool de quinones et la réductase finale (selon **Figure 3**). Il a également été observé que le cytochrome c de 20 kDa se retrouve systématiquement dans tous les échantillons. Il n'est donc pas tributaire du type de donneur ou d'accepteur d'électrons, et pourrait être impliqué dans un métabolisme autre que la respiration anaérobie.

Bien que ce ne soit pas flagrant sur la **Figure 12**, les gels originaux permettent de constater une bande d'une taille approximative de 40 kDa qui ne semble présente que dans les cultures sur Nitrate, suggérant l'implication possible de ce cytochrome c dans la respiration du nitrate. Il faut émettre une réserve quant au cytochrome c de 18 kDa. En effet, lors de travaux précédents, une protéine de cette taille avait été identifiée en temps que rhodanèse, protéine déjà mentionnée dans ce projet, car elle présente l'inconvénient de réagir partiellement au test TMBZ alors qu'elle ne présente aucun hème.

Malgré l'ébullition des échantillons avant analyse, servant normalement à inactiver cette protéine, il subsiste un risque que le signal apparaissant à cette taille contienne des traces de rhodanèse. Comme cette bande n'a pas pu être identifiée au cours de ce travail, cette possibilité ne peut pas être exclue.

L'analyse au TMBZ sur gel présente toutefois des limites. D'un gel à l'autre, la réaction peut se faire avec plus ou moins d'intensité même si les échantillons analysés sont identiques.

La double analyse des échantillons a permis de mettre ce point en évidence. Le même échantillon passé sur deux gels différents peut présenter des intensités de bandes différentes. Cela dit, son profil (nombre de cytochromes et ordre d'importance) est conservé.

Finalement, l'analyse des résultats obtenus par TMBZ sur microplaque et sur gel a mis en évidence le même biais déjà constaté lors de la comparaison avec les résultats d'hémochromes. Les cytochromes révélés sur gel ne sont que de type *c*. Les cytochromes de type *b* ne sont pas détectables car, lors de la migration à travers le gel, ils perdent l'hème responsable de la réaction avec le TMBZ. Le cytochrome *c* a la particularité de lier son hème de manière covalente contrairement au type *b*; c'est cela qui lui permet de le conserver lors de la migration. Lors de l'analyse sur microplaque, toutes les activités peroxydases de l'échantillon sont détectées fournissant ainsi un signal global, noyant de ce fait l'information liée au cytochrome *c*. Le signal apparaissant sur gel ne représente qu'une petite partie du signal obtenu par TMBZ en microplaque. Les résultats d'hémochromes, de TMBZ sur microplaque et sur gel peuvent être mis en relation. Ainsi, l'analyse TMBZ sur microplaque révèle toutes les activités peroxydases en présence, alors que les résultats d'hémochromes ne dévoilent que les cytochromes *b* et *c*. Finalement l'analyse TMBZ sur gel quant à elle ne met en évidence que les cytochromes de type *c*. Ces trois techniques sont donc complémentaires.

4.3.4 Analyse bio-informatique des de cytochromes de type *c* et identification des cytochromes par spectrométrie de masse

L'analyse bio-informatique du génome de la souche *Desulfitobacterium hafniense* Y51 a révélé la présence de 15 cytochromes *c* possibles, alors que seuls 6 avaient été annotés comme tels jusqu'ici. Les 9 autres ont été découverts à l'aide d'une recherche bio-informatique. Cette analyse a été effectuée afin d'évaluer la qualité de l'information présente dans les banques de données, ainsi que de mettre en évidence de nouveaux cytochromes *c*. L'identification par spectrométrie de masse des échantillons de protéines membranaires a été confrontée aux protéines présentées dans le **Tableau 12**.

Dans un premier temps, les échantillons analysés ont permis de constater que les bandes découpées depuis un gel traité au TMBZ ne constituent pas un échantillon idéal, probablement à cause de la présence de différents réactifs qui interfèrent avec l'analyse de spectrométrie de masse.

En effet, l'intensité du signal mesuré est largement plus faible que lorsque la même bande est découpée d'un gel simplement coloré au Coomassie. Ainsi, afin d'identifier certains cytochromes c mis en évidence durant ce travail, les bandes correspondant aux signaux TMBZ de l'échantillon Hydrogène+Sulfite (**Figure 10, i**) ont été découpées d'un gel coloré au Coomassie, puis envoyées pour analyse au laboratoire PCF de l'EPFL. Ces résultats ont ensuite été comparés à la recherche bio-informatique.

La bande qui a pu être identifiée à 50 kDa est un cytochrome c issu d'une nitrite réductase (DSY3065, **Tableau 12**). Cette bande, prélevée de l'échantillon Hydrogène+Sulfite se retrouve également dans la plupart des autres échantillons. Elle est cependant absente des conditions Hydrogène+PCE, Lactate+TCE, Formate+TCE, Formate+Fumarate et Formate+Thiosulfate. Il faut toutefois émettre une réserve quant au rôle possible joué par cette protéine. Il se peut que l'annotation en temps que nitrite réductase soit abusive, et qu'en réalité elle soit impliquée dans le transfert d'électrons vers d'autres substrats que le nitrite. De plus, il a été démontré que *Desulfitobacterium hafniense* n'est pas capable de respirer le nitrite, mais le nitrate, suggérant, au cas où l'annotation est exacte, que DSY3065 n'intervient pas directement dans un processus de respiration, mais pourrait être induite par la production de nitrite résultant de la respiration du nitrate. Cependant, le signal TMBZ à 50 kDa est présent dans la majorité des cultures. Ceci pourrait être lié au fait que le milieu de base contient une faible quantité de nitrate, certes pas suffisante pour maintenir une respiration. De plus amples investigations sont nécessaires ici pour pouvoir mieux évaluer la situation.

5 Conclusions et perspectives

Les résultats combinés des différentes analyses ont permis de mettre plusieurs aspects en évidence. Tout d'abord, l'hypothèse suggérant la présence d'un cytochrome de type c spécifiquement lié à la déhalorespiration a été démentie. L'implication plus importante des accepteurs d'électrons face aux donneurs en ce qui concerne la population en cytochromes d'une culture a été démontrée. Comme observé dans la partie Discussion, les limites des méthodes utilisées ont pu être posées. Notamment en ce qui concerne la technique de TMBZ sur microplaque. Cette méthode est intéressante pour se faire une idée de l'activité totale d'un échantillon mais ne permet pas de distinguer les sources de chacune de ces activités.

Comme perspective de ce projet, un intérêt particulier devrait être porté à la purification par HPLC des extraits avant l'identification. En effet, si l'identification par spectrométrie n'a pas donné les résultats escomptés, c'est en grande partie à cause de la faible concentration des cytochromes dans l'échantillon total. Une purification réussie suivie d'une reconnaissance des fractions d'intérêts permettrait ainsi d'éviter ce problème et d'identifier beaucoup plus de cytochromes. Une distinction plus précise pourrait alors être faite sur les bandes n'apparaissant que dans certaines conditions et les raisons de ces différences pourraient être investiguées. L'identification du cytochrome à 15 kDa s'avérerait également intéressante. Si ce cytochrome pouvait être analysé de manière plus approfondie, une réponse pourrait être donnée à la question de savoir si cette protéine a effectivement un rapport direct avec la présence de PCE.

6 Bibliographies

- [1] Villemur R., Lanthier M., Beaudet R., Lepine F., The *Desulfitobacterium* genus, FEMS Microbiol Rev 30 (2006) 706-733.
- [2] Gerritse J., Drzyzga O., Kloetstra G., Keijmel M., Wiersum L.P., Hutson R., Collins M.D., Gottschal J.C., Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1, Appl Environ Microbiol 65 (1999) 5212-5221.
- [3] Nonaka H., Keresztes G., Shinoda Y., Ikenaga Y., Abe M., Naito K., Inatomi K., Furukawa K., Inui M., Yukawa H., Complete genome sequence of the dehalorespiring bacterium *Desulfitobacterium hafniense* Y51 and comparison with *Dehalococcoides ethenogenes* 195, J Bacteriol 188 (2006) 2262-2274.
- [4] Richardson D.J., Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment, Microbiology 146 (2000) 551-571.
- [5] Campbell Peter S.A., Biochimie illustrée, Maloine, 2000.
- [6] Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang X., Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c, Cell 86 (1996) 147-157.
- [7] Louie Tai Man N.S., Xun Luying, Mohn William W., Purification, characterization and gene sequence analysis of a novel cytochrome c co-induced with reductive dechlorination activity in *Desufomonile tiedjei* DCB-1, Arch Microbiol (1997) 168 : 520-527.
- [8] Kreher S., Schilhabel A., Diekert G., Enzymes involved in the anoxic utilization of phenyl methyl ethers by *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2 and *Desulfitobacterium hafniense* PCE-S, Arch Microbiol 190 (2008) 489-495.
- [9] Garavito R.M., Ferguson-Miller S., Detergents as tools in membrane biochemistry, J Biol Chem 276 (2001) 32403-32406.
- [10] Kashino Y., Separation methods in the analysis of protein membrane complexes, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 797 (2003) 191-216.
- [11] Arnold T., Linke D., The use of detergents to purify membrane proteins, Curr Protoc Protein Sci Chapter 4 (2008) Unit 4 8 1-4 8 30.
- [12] Braun M., Rubio I.G., Thony-Meyer L., A heme tag for in vivo synthesis of artificial cytochromes, Appl Microbiol Biotechnol 67 (2005) 234-239.
- [13] Sinclair P.R., Nadia Gorman, Judith M. Jacobs, Measurement of Heme Concentration; spectrophotometric heme assay of pyridine hemochrome, Current protocols in Toxicology (1999) 8.3.1-8.3.7.
- [14] Clark T., UEA, Norwich, UK, Protocole for cytochrome c detection by TMBZ (personal communication).
- [15] www.expasy.ch/Prosite.
- [16] Aulenta F., Gossett J.M., Papini M.P., Rossetti S., Majone M., Comparative study of methanol, butyrate, and hydrogen as electron donors for long-term dechlorination of tetrachloroethene in mixed anerobic cultures, Biotechnol Bioeng 91 (2005) 743-753.
- [17] Yang Qi S.H.-T., Wang Xue-Lian, Li Hui-Di, Wang Jian-Long, Anaerobic Degradation of Tetrachloroehene Using Different Co-substrate as Electron Donors, Biomedical and Environmental Sciences (2006) 0895-3988.

Remerciements

Ma gratitude va à Christof Holliger pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je remercie chaleureusement Julien Maillard pour sa collaboration et son soutien tout au long de ce projet. Je lui suis infiniment reconnaissante pour sa patience, ses conseils ainsi que pour son amitié fortement appréciée et qui, je l'espère perdurera au-delà de cette expérience.

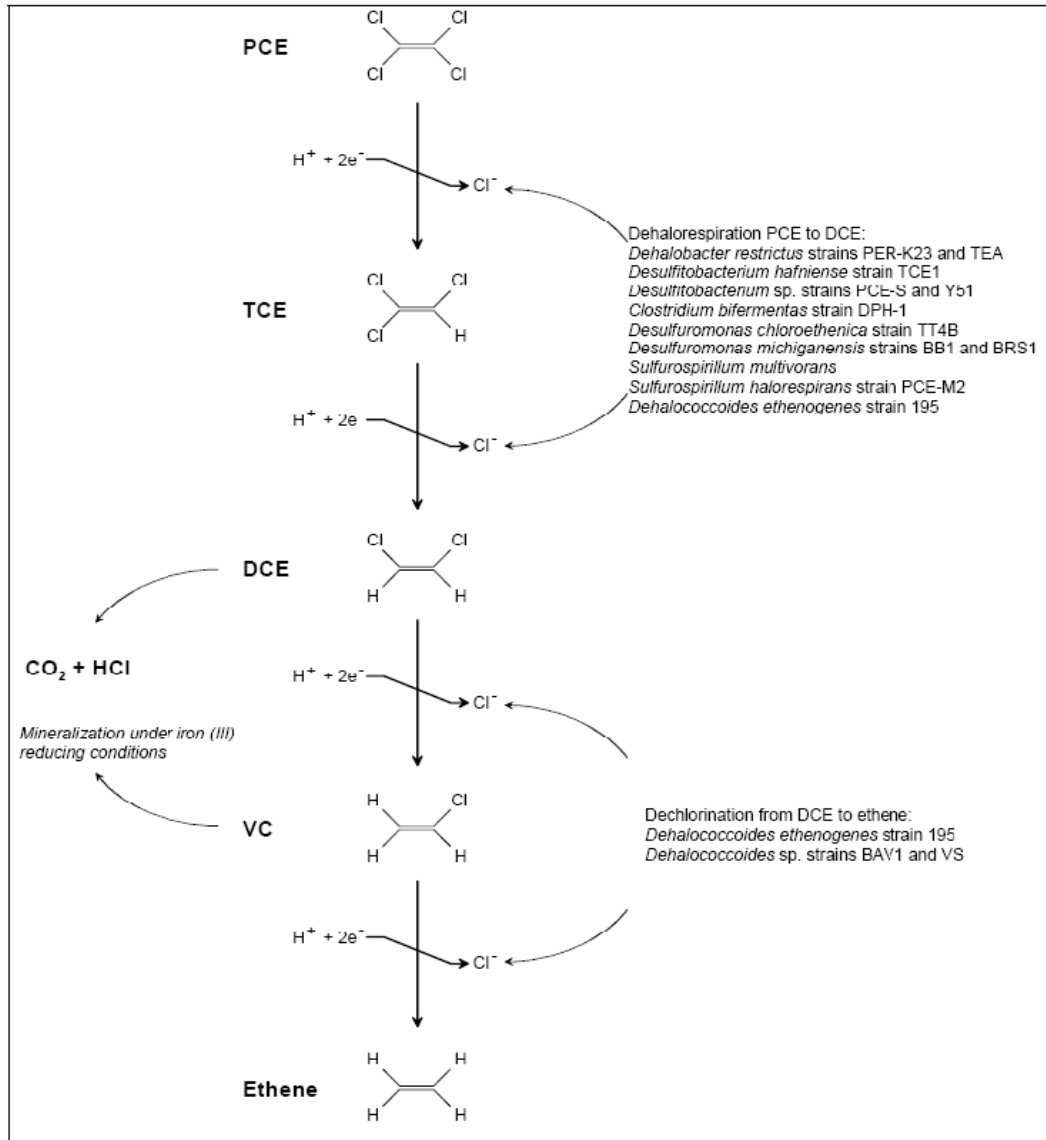
Merci à Diego Chiappe du laboratoire de PCF, EPFL pour les analyses de spectrométrie de masse.

Un grand merci à Aurélie Duret, Cyrille Dénarié et Laure Prat pour leur bonne humeur et les fous rires partagés.

Je tiens également à mentionner toutes les personnes du LBE qui ont rendu ce travail de diplôme des plus agréables et je garde une pensée toute particulière pour les apprentis, Audrey Ducret et Yoan Rappaz pour leur assistance toujours motivée au laboratoire.

7 Annexes

7.1 Chemin de dégradation du PCE



7.2 Solution de Selenite et Tungstate

0.5 g NaOH, 3 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 4 mg $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 1 L distilled water.
 Le pH final du milieu doit se situer entre 6.9-7.1.

7.3 Solution d'éléments traces

Produit	Quantité [g]
Nitrilotriacetic acid	1.500
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	3.000
$\text{MnSO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0.500
NaCl	1.000
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.100
$\text{CoSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.180
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0.100
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0.180
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0.010
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	0.020
H_3BO_3	0.010
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0.010
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0.025
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0.300
eau milli-Q	1000 mL

7.4 Solution de vitamines

	Medium 503 (mg)	Medium 141 (mg)	Final (mg)	Final (mg)	Final (mg)
Vitamin B₁₂	100	1	101x2,5= 250	62.5	25
p-Aminobenzoic acid	80	50	130	32.5	13
D(+) Biotin	20	20	40	10	4
Nicotinic acid	200	50	250	62.5	25
D-Ca-panthotenate	100	50	150	37.5	15
Pyridoxine-HCl	300	100	400	100	40
Thiamine-HClx2H ₂ O	200	50	250	62.5	25
Folic acid		20	20	5	2
Riboflavin		50	50	12.5	5
Lipoic acid		50	50	12.5	5
Distilled water	1000	1000	1000mL	250mL	100mL

A dissoudre lentement l'un après l'autre.

7.5 Solution d'acides aminés

Acide aminé	Quantité en mg / L	Quantité en mg / 100mL	Quantité en mg / 250mL	Quantité en mg / 500mL
Alanine	536	53.6	134	268
Arginine	302	30.2	75.5	151
Aspartic acid	669	66.9	167.25	334.5
Cystéine	74	7.4	18.5	37
Glutamine	1420	142	355	710
Glycine	325	32.5	81.25	162.5
Histidine	120	12	30	60
Isoleucine	323	32.3	80.75	161.5
Leucine	469	46.9	117.25	234.5
Lysine	515	100 µL=51.5	250 µL=128.75	500 µL=257.5
Méthionine	105	10.5	26.25	52.5
Phenylalanine	253	25.3	63.25	126.5
Serine	284	28.4	71	142
Threonine	295	29.5	73.75	147.5
Tryptophan	136	13.6	34	68
Tyrosine	120	12	30	60
Valine	379	37.9	94.75	189.5
	1000 mL	100 mL	250 mL	500 mL

ajout de 1 mL pour 100 mL de culture

7.6 Données techniques des résultats des optimisations des méthodes d'extraction des protéines membranaires

Extraction des protéines membranaires

Dans un premier temps, deux méthodes utilisées en laboratoire ont été confrontées l'une à l'autre. Une méthode utilisant uniquement une solution de Tris-HCl + Triton 2% a été comparée à une solution d'extraction plus complexe (Xtra) contenant de l'urée (420g/L), de la thiourée (152g/L), du CHAPS (40g/L) (3-[(3-cloramidopropyl)diméthylammoniol]-1-propane-sulfonate) et 10 mL/L de Triton-X 100 (concentration finale 1%).

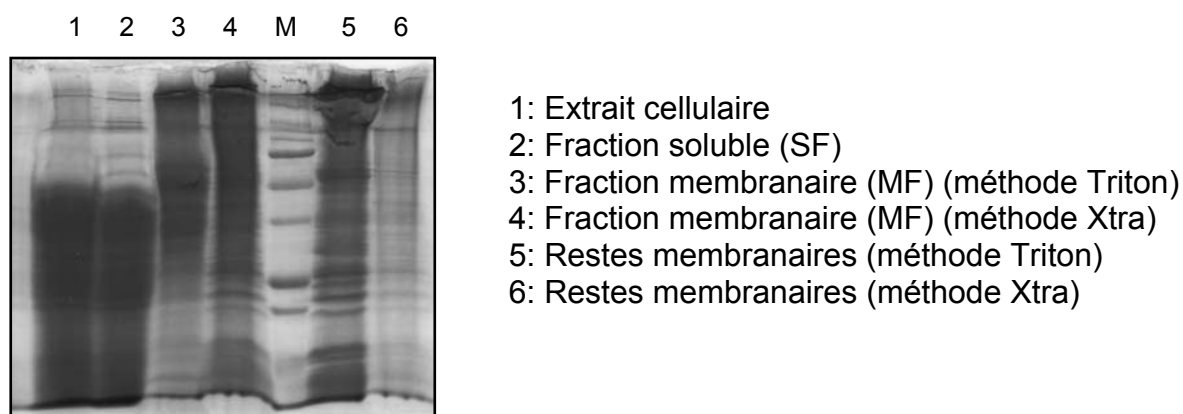


Figure 11 : Test d'extraction, gel révélé au bleu de Coomassie.

Ce test permet de réaliser que la méthode dite « Xtra » offre une meilleure extraction des protéines membranaires que la méthode n'utilisant que la solution de Triton. Le puit 6 représentant les restes membranaires contient beaucoup moins de matériel que les autres puits, dénotant que l'extraction a bien fonctionné et qu'une majorité des protéines se retrouvent dans la fraction membranaire lors de l'utilisation du mélange « Xtra ». La méthode dite « Xtra » a donc été la base pour l'optimisation de l'extraction.

Suite à cela, un test effectué sur une culture lactate-PCE a servi à déterminer quel détergent parmi différentes combinaisons était capable d'extraire au mieux les protéines membranaires. Les combinaisons suivantes ont été testées : urée 7M, thiourée 2M et Triton X-100 1% ; Triton X-100 2% ; Deoxycholate 2% ; Tween 1% et Tween 2%.

Test de l'impact de différents détergents sur la qualité du signal du cytochrome c

La migration des protéines dans le gel est altérée par la présence des détergents utilisés lors de l'extraction membranaires et se trouvant toujours dans le mélange. Afin de résoudre ce problème, différents types de détergents ont été testés sur le cytochrome c commercial afin d'observer leur impacte sur la migration.

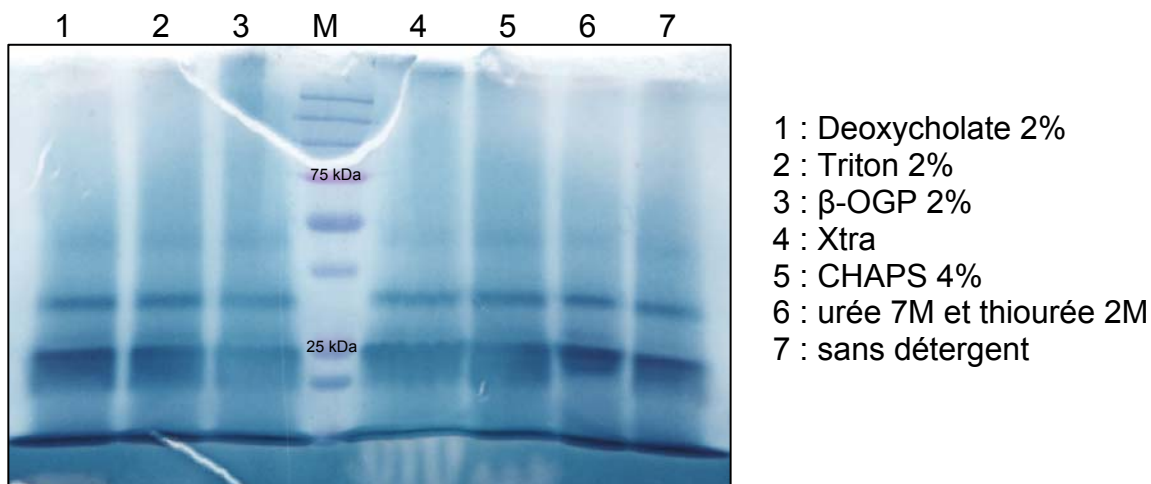


Figure 12 : Comparaison de l'impact de différents détergents sur la migration du cytochrome c commercial ; gel 12% révélé par TMBZ.

La **Figure 12** permet d'observer des différences d'intensité du signal d'un échantillon à l'autre. En effet, le signal émis pour l'échantillon ayant été traité avec une solution d'urée et de thiourée (puit 6) semble être le plus net et le plus comparable au cytochrome c sans traitement (puit 7). Il semblerait que l'ajout du CHAPS ait un effet négatif sur l'intensité du signal (puit 5). Cela se retrouve pour l'échantillon de solution Xtra (puit 4) qui contient également du CHAPS.

Test du volume de détergent nécessaire à une bonne extraction

Au vue des résultats précédents, ce test vise à déterminer l'impact du volume de détergent utilisé lors de l'extraction des protéines membranaires. Ce test est effectué à l'aide de la combinaison de détergents urée 7M, thio-urée 2M et Triton X-100 1%. Le culot de cellules utilisé provient d'une culture Lactate-PCE et le culot est de 0.27 g. La fraction cellulaire est divisée en 4 tubes avant la première ultracentrifugation. Les culots résultants sont alors ressuspendus dans quatre volumes différents de détergents, à savoir 250, 500, 750 et 1000 μ l. Après la deuxième ultracentrifugation, les surnageants sont mis sur gel. Les culots représentant les restes membranaires sont repris dans le même volume que le culot de membranes respectif et également mis sur gel.

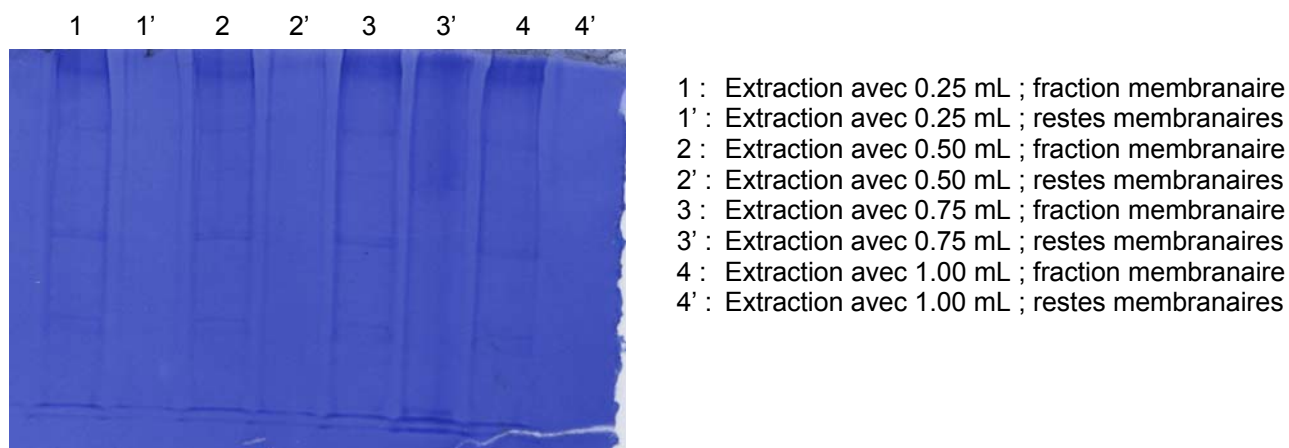


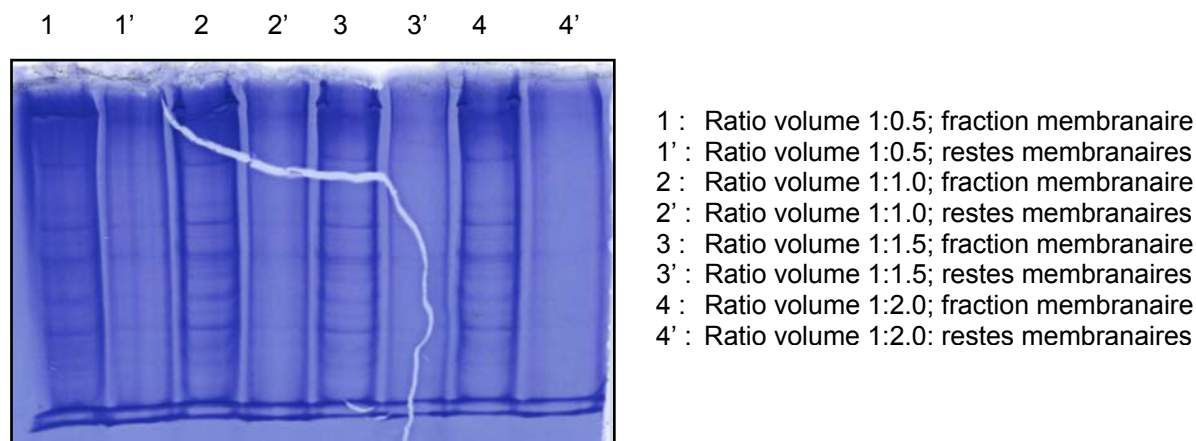
Figure 13 : Comparaison de la qualité d'extraction grâce à différents volumes, gel 12% révélé par Coomassie.

Ces résultats n'étant pas très probants, le test est réitéré mais cette fois en tentant d'appliquer une normalisation du volume d'extraction. En effet, les échantillons sont probablement trop dilués pour qu'une différence nette soit visible. La normalisation est basée sur l'observation que 0.250 mL au minimum de solution d'extraction sont nécessaires pour 0.5 g de culot de cellules récoltées. Ceci correspond à un ratio de 1:0.5. Le prochain test est effectué sur 0.47 g de cellules et pour quatre différentes dilutions. Les 0.47 g sont donc dispatchés en quatre tubes (0.12 g par tube). Le premier tube est testé avec le ratio initial, c'est-à-dire 1:0.5, c'est-à-dire avec 0.06 mL de solution d'extraction sont donc ajoutés au culot de membranes. Pour les trois autres culots, des dilutions sont effectuées afin d'observer un effet sur l'extraction.

Tableau 13 : Volume de solution d'extraction nécessaire à l'obtention du ratio pour comparaison d'extractions

Volume de solution d'extraction [mL]	Ratio
0.06	1:0.5
0.12	1:1.0
0.18	1:1.5
0.24	1:2.0

Les extraits sont ensuite mis sur gel d'acrylamide, une fois pour une détection TMBZ pour les échantillons d'extraits membranaires et une autre pour une coloration au bleu de Coomassie avec en parallèle les fractions membranaires et les restes membranaires. La coloration au bleu de Coomassie vise à observer une différence entre la fraction membranaire chargée en protéine et les restes membranaire qui devraient en être dépourvus. Le gel révélé par TMBZ n'ayant pas donné un bon résultat, il n'est pas présenté ici.



Figures 14 : Comparaison de la qualité de l'extraction grâce à différents volumes ; gel 12% révélé au Coomassie.

Au vue de ces résultats, il est choisi d'utiliser le ratio 1:1.5 pour les prochaines extractions. En effet, cette dilution permet une bonne extraction tout en maintenant une quantité de protéines assez importante pour être bien visible sur gel.

Tests de préparation des échantillons extraits : élimination de la rhodanèse

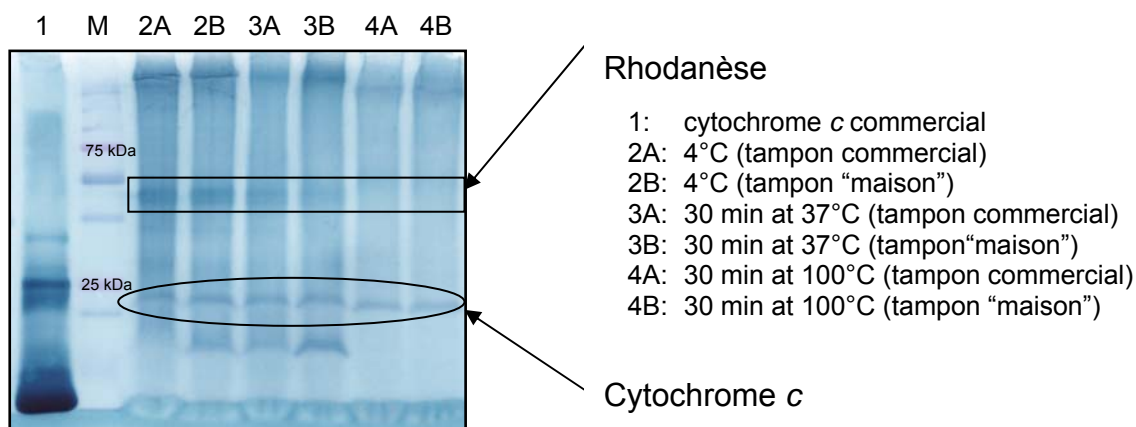


Figure 15 : Test d'élimination de la rhodanèse, gel révélé par la méthode TMBZ.

Le gel représenté à la **Figure 15** permet de comparer les différentes résistances thermiques des cytochromes c après traitement à diverses températures (4, 37 et 100°C). Il permet de remarquer une diminution du signal de la rhodanèse après traitement à 37°C puis à nouveau lors du traitement à 100°C. Ceci signifie que la rhodanèse ne résiste que très peu à de hautes températures. Au contraire, le cytochrome c résiste parfaitement au traitement thermique à 100°C.

Ce gel montre également qu'il n'y a pas de différence marquée entre le tampon de charge commercial et le tampon élaboré au laboratoire (voir *Matériel et Méthodes*).

Fixation des protéines dans le gel grâce au TCA (acide trichloroacétique)

Un gel a été chargé avec les mêmes échantillons de part et d'autre du marqueur. Une fois la migration terminée, le gel a été coupé en deux à la position du marqueur et les deux moitiés du gel comportant la même série d'échantillons ont été traitées différemment à des fins comparatives. Une moitié du gel a été révélée directement par la méthode au TMBZ et l'autre moitié a subi le traitement de fixation des protéines au TCA durant dix minutes avant d'être révélée au TMBZ.

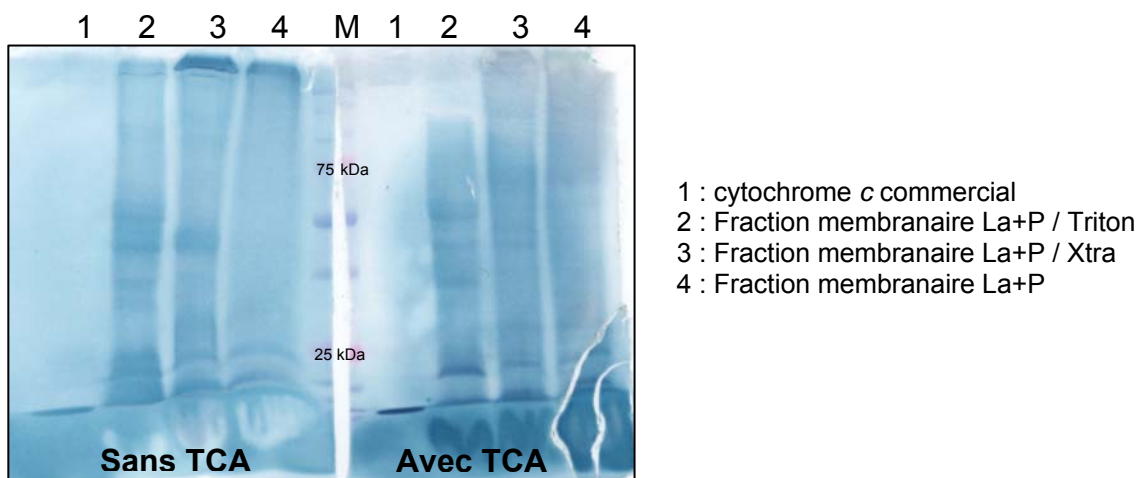


Figure 16 : Analyse comparative avec et sans TCA, gel 12%.

La **Figure 16** permet de reconnaître l'efficacité de la fixation des protéines dans le gel avant la détection. En effet, sur la partie gauche du gel, les protéines ont été directement révélées au TMBZ. Elles ont donc largement diffusé au travers du gel rendant la lecture moins aisée. Sur la partie droite du gel, traitée au TCA, les bandes apparaissent nettes et le signal en est ainsi augmenté.

Test de dilution de l'échantillon extrait

Ce test visait simplement à observer une différence de résolution du gel suivant la quantité de d'extrait de protéines membranaires chargé.

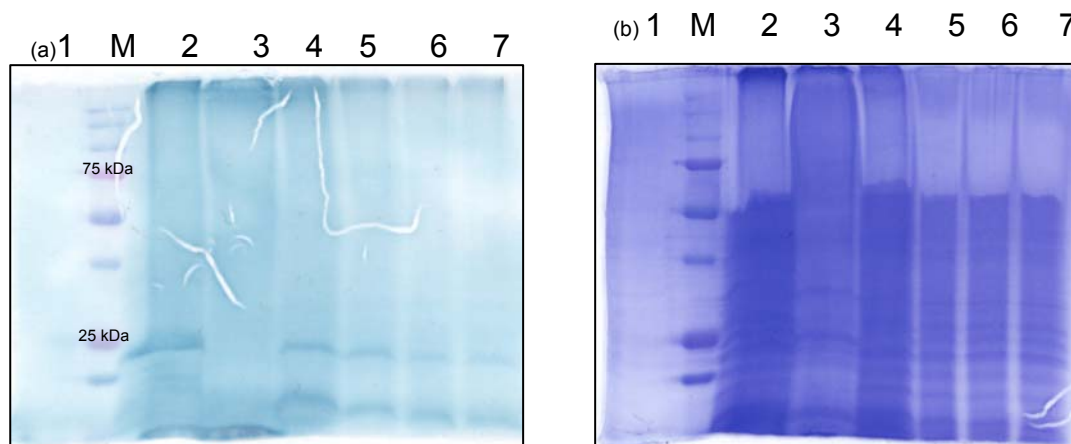


Figure 17 : Comparaison de la résolution à différentes dilutions de l'extrait révélé par la méthode TMBZ (a) et au bleu de Coomassie (b), gels 12%.

- 1 : cytochrome c commercial
- 2 : Extrait membranaire La+P 1:1
- 3 : Extrait membranaire La+P 1:1 bouilli
- 4 : Extrait membranaire La+P 1: 2
- 5 : Extrait membranaire La+P 1:5
- 6 : Extrait membranaire La+P 1:10
- 7 : Extrait membranaire La+P 1:20

La **Figure 17b** permet de remarquer une légère amélioration de la netteté des bandes avec l'augmentation de la dilution de l'échantillon membranaire sur le gel révélé par Coomassie. Sur TMBZ, la **Figure 17a** montre que l'intensité des bandes s'amenuise avec la dilution rendant la lecture plus ardue. La bande représentant la rhodanèse disparaît après ébullition de l'échantillon. Malheureusement, le gel ayant migré trop longtemps, le cytochrome c commercial utilisé comme référence est sorti du gel. Cependant, ce test a mené à une dilution systématique des échantillons de 5x pour le gels colorés au Coomassie. Les échantillons prévus pour la révélation au TMBZ seront quant à eux utilisés tels quels.

Test de concentration des protéines extraites

Ce test est effectué sur l'échantillon extrait avec un ratio de 1:1.5 (voir test volume d'extraction). Il vise à concentrer les échantillons extraits afin d'observer un résultat plus net lors de la détection au TMBZ. Ce test est fait grâce au kit Microcon (voir *Matériel*). Le volume de départ est de 0.10 mL. L'échantillon est concentré jusqu'à atteindre un volume de 0.02 mL. Ce volume est mis sur gel pour analyse TMBZ. Sont également mis sur gel, le filtrat ainsi que l'échantillon non concentré à des fins comparatives.

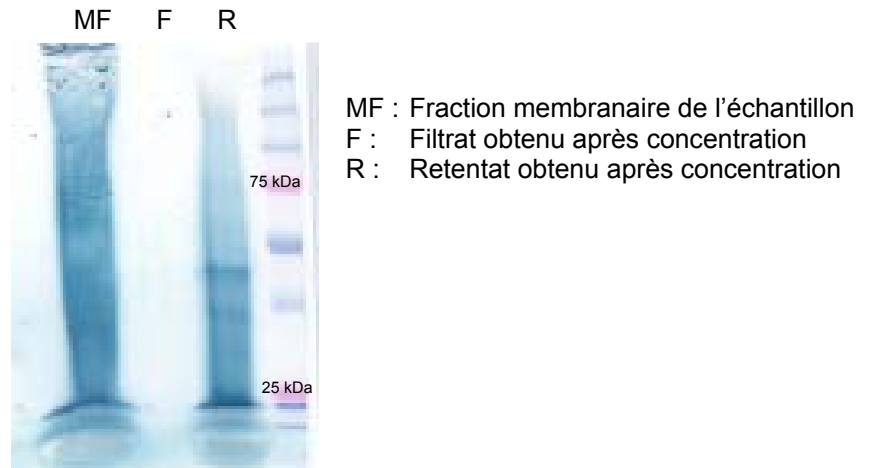


Figure 18 : Test de concentration de l'échantillon extrait, gel 12%, révélé par TMBZ.

La **Figure 18** permet de remarquer la différence entre l'échantillon tel qu'extrait (MF) et l'échantillon après concentration (R). Les bandes sont mieux visibles après concentration et le bruit de fond est atténué, améliorant la visibilité. Les bandes sont également moins diffuses. L'absence de signal dans le filtrat laisse dire que les protéines sont toutes maintenues dans le retentat lors de l'extraction.

7.7 Biomasses des cultures et volumes des solutions

Nom de la culture	Biomasse humide [g]	Volume de de tampon Tris de reprise de la biomasse [μ L]	Volume de solution d'extraction [μ L]	Volume de solution de lysosymes 50 mg/mL [μ L]
1. H+P a	0.25	744.00	372.00	29.76
1. H+P b	0.17	516.60	258.30	-
2. H+T a	0.17	510.00	255.00	20.66
2. H+T b				
3. H+Fu a	0.32	960.30	480.15	-
3. H+Fu b	0.28	835.50	417.75	-
4. H+Ni a	0.30	903.00	451.50	-
4. H+Ni b	0.20	607.50	303.75	-
5. H+Su a	0.21	630.00	315.00	25.20
5. H+Su b	0.28	840.00	420.00	-
6. H+Th a	0.41	1216.20	608.10	-
6. H+Th b	0.40	1185.60	592.80	-
7. La+P a	0.62	1860.00	930.00	-
7. La+P b	0.62	1860.00	930.00	-
8. La+T a	0.40	1200.00	600.00	-
8. La+T b	0.50	1500.00	750.00	-
9. La+Fu a	0.44	1320.00	660.00	-
9. La+Fu b	0.48	1440.00	720.00	-
10. La+Ni a	0.44	1320.00	660.00	-
10. La+Ni b	0.45	1350.00	675.00	-
11. La+Su a	0.55	1650.00	825.00	-
11. La+Su b	0.65	1950.00	975.00	-
12. La+Th a	0.61	1830.00	915.00	-
12. La+Th b	0.32	960.00	480.00	-
13. Fo+P a	0.20	600.00	300.00	-
13. Fo+P b	0.22	660.00	330.00	-
14. Fo+T a	0.37	1113.90	556.95	-
14. Fo+T b	0.15	448.80	224.40	17.95
15. Fo+Fu a	0.39	1176.00	588.00	-
15. Fo+Fu b	0.29	861.00	430.50	-
18. Fo+Th a	0.27	795.90	397.95	-
18. Fo+Th b	0.25	756.00	378.00	-
19. Et+P a	0.22	660.00	330.00	-
19. Et+P b	0.23	690.00	345.00	-
21. Et+Fu a	0.66	1990.80	995.40	-
22. Et+Ni a	0.26	780.30	390.15	-
22. Et+Ni b	0.23	690.00	345.00	-
24. Et+Th a	0.39	1170.00	585.00	46.80
24. Et+Th b	0.27	810.00	405.00	32.40
31. Va+P a	0.18	550.80	275.40	22.03
31. Va+P b	0.14	431.10	215.55	17.24
32. Va+T a	0.23	697.20	348.60	27.89
32. Va+T b				
33. Va+Fu a	0.16	478.20	239.10	-
33. Va+Fu b	0.11	336.30	168.15	-
34. Va+Ni a	0.12	369.00	184.50	14.76
34. Va+Ni b	0.40	1207.80	603.90	-
35. Va+Su a	0.33	978.90	489.45	-
35. Va+Su b	0.23	698.10	349.05	-
36. Va+Th a	0.21	637.80	318.90	-
36. Va+Th b	0.23	676.80	338.40	-

7.8 Récapitulatif des résultats de pyridine hémochromes

550 nm ϵ = 23.97 mal défini cytochrome c
555 nm ϵ = 23.98 cytochrome b

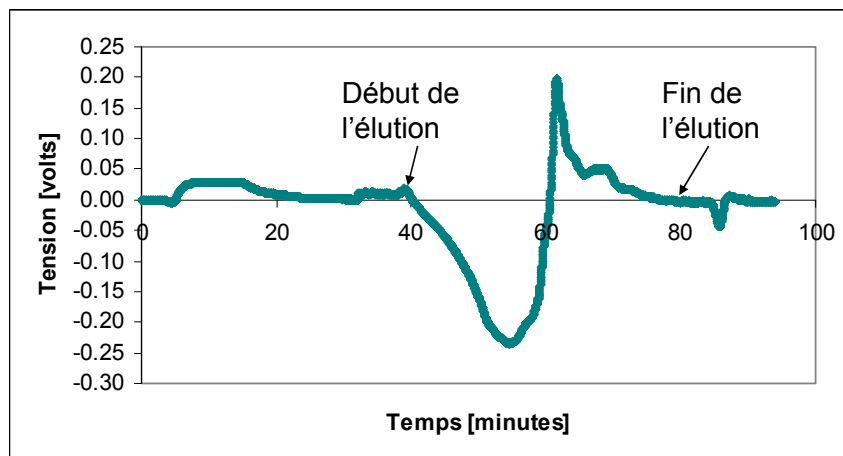
N.M = non mesuré
- = pas de signal

	550/555	535	hauteur du pic (550 ou 555 - 535)	Concentration [mmol/L]	Concentration [μmol/L]	Moyenne a et b [μmol/L]
1a H+P	-	-	-	-	-	-
1b H+P	-	-	-	-	-	-
2a+b	-	-	-	-	-	N.M
3a H+Fu	0.005	-0.028	0.033	1.38E-03	1.38	
3b H+Fu	0.024	0.001	0.023	9.60E-04	0.96	1.17
4a H+Ni	-0.01	-0.011	0.001	4.17E-05	0.04	
4b H+Ni	-	-	-	-	-	0.04
5a H+Su	0.036	0.017	0.019	7.93E-04	0.79	
5b H+Su	0.01	-0.03	0.04	1.67E-03	1.67	1.23
6a H+Th	-0.033	-0.041	0.008	3.34E-04	0.33	
6b H+Th	0.048	0.037	0.011	4.59E-04	0.46	0.40
7a La+P	0.054	0.03	0.024	1.00E-03	1.00	
7b La+P	-0.013	-0.032	0.019	7.92E-04	0.79	0.90
8a La+T	-	-	-	-	-	
8b La+T	-	-	-	-	-	-
9a La+Fu	0.024	0.01	0.014	5.84E-04	0.58	
9b La+Fu	0.02	0.009	0.011	4.59E-04	0.46	0.52
10a La+Ni	-0.016	-0.021	0.005	2.09E-04	0.21	
10b La+Ni	0.004	0.002	0.002	8.34E-05	0.08	0.15
11a La+Su	0.128	0.119	0.009	3.75E-04	0.38	
11b La+Su	0.059	0.04	0.019	7.93E-04	0.79	0.58
12a La+Th	-0.026	-0.04	0.014	5.84E-04	0.58	
12b La+Th	-0.039	-0.063	0.024	1.00E-03	1.00	0.79
13a Fo+P	-	-	-	-	-	
13b Fo+P	-0.026	-0.038	0.012	5.01E-04	0.50	0.5
14a Fo+T	-0.01	-0.018	0.008	3.34E-04	0.33	
14b Fo+T	-	-	-	-	-	0.33
15a Fo+Fu	-0.059	-0.078	0.019	7.93E-04	0.79	
15b Fo+Fu	-0.038	-0.059	0.021	8.76E-04	0.88	0.83
16a Fo+Ni	-	-	-	-	-	
16b Fo+Ni	-	-	-	-	-	N.M
17a Fo+Su	-	-	-	-	-	
17b Fo+Su	-	-	-	-	-	N.M
18a Fo+Th	-0.011	-0.026	0.015	6.26E-04	0.63	
18b Fo+Th	0.024	0	0.024	1.00E-03	1.00	0.81
19a Et+P	-0.046	-0.056	0.01	4.17E-04	0.42	
19b Et+P	0.064	0.056	0.008	3.34E-04	0.33	0.38
20a Et+T	-	-	-	-	-	
20b Et+T	-	-	-	-	-	N.M
21a Et+Fu	-	-	-	-	-	
21b Et+Fu	-	-	-	-	-	N.M
22a Et+Ni	0.059	0.058	0.001	4.17E-05	0.04	
22b Et+Ni	-	-	-	-	-	-
23a Et+Su	-	-	-	-	-	
23b Et+Su	-	-	-	-	-	N.M
24a Et+Th	-	-	-	-	-	
24b Et+Th	-	-	-	-	-	N.M
31a Va+P	-	-	-	-	-	
31b Va+P	-	-	-	-	-	N.M
32a Va+T	-	-	-	-	-	
32b Va+T	-	-	-	-	-	N.M
33a Va+Fu	0.083	0.078	0.005	2.09E-04	0.21	
33b Va+Fu	-	-	-	-	-	0.21
34a Va+Ni	-	-	-	-	-	
34b Va+Ni	-	-	-	-	-	-
35a Va+Su	0.098	0.069	0.029	1.21E-03	1.21	
35b Va+Su	0.066	0.02	0.046	1.92E-03	1.92	1.56
36a Va+Th	0.071	0.035	0.036	1.50E-03	1.50	
36b Va+Th	0.005	-0.023	0.028	1.17E-03	1.17	1.34

7.9 Purification des cytochromes par HPLC et détection par Dot Blot

Plusieurs cultures H+P (environ 6L) ont été récoltées et leurs protéines membranaires extraites. C'est sur cet extrait ensuite dilué 10x qu'a été faite la purification par HPLC.

Tout d'abord sur colonne échangeuse d'anions :

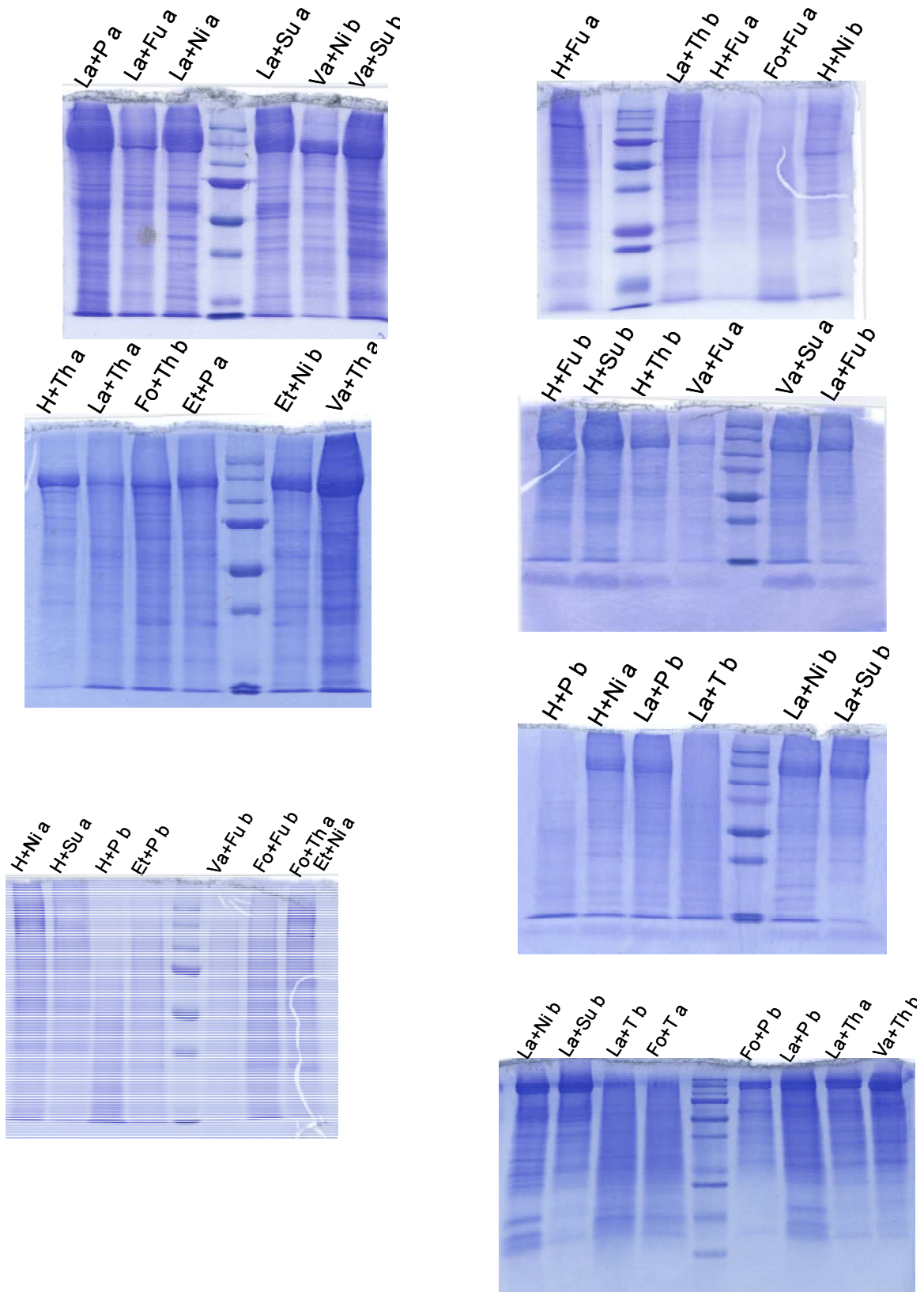


Graphique 4 : Chromatogramme de purification sur colonne échangeuse d'anion de l'extrait H+P.

Le **Graphique 4** rend compte du déroulement de l'analyse par HPLC. Il est possible de remarquer une chute du signal à la suite du début de l'élution par la solution saline puis une remontée de ce dernier. Le signal attendu devrait augmenter à partir du début de l'élution puis redescendre (type Gauss) traduisant le détachement des protéines de la colonne avec l'augmentation de la concentration en sel. L'analyse Dot Blot visant à mettre en évidence les fractions contenant des cytochromes c n'a pas non plus donné de résultats exploitables, le signal étant trop faible.

Suite à ces résultats peu concluants, un autre essai a été fait cette fois-ci en utilisant une colonne d'exclusion de taille qui sépare chaque protéine par la taille, les grosses protéines sortant avant les petites. L'échantillon extrait H+P a quand à lui été concentré (à l'aide du kit Microcon) avant son passage sur colonne. L'échantillon a donc été passé sur colonne puis les fractions récoltées ont été analysées par Dot Blot. Le graphique issu de l'HPLC est à nouveau décevant puisqu'il ne suit pas le spectre attendu. Le Dot Blot n'a pas révélé de signal. Seul le contrôle positif (cytochrome c commercial) réagit.

7.10 Gels d'acrylamide révélés au bleu de Coomassie



7.11 Résultats de spectrométrie de masse pour le cytochrome de 50 kDa

Référence	Score	Queries
DSY0502	889	29
DSY4914	504	17
DSY1651	436	12
DSY3329	405	8
DSY1628	325	7
DSY4742	308	9
DSY1598	294	12
DSY4952	286	7
DSY0307	243	4
DSY4023	196	4
DSY3065	196	4
DSY4838	169	3
DSY2839	162	9
DSY1627	153	4
DSY1363	152	5
DSY3323	147	4
DSY2828	144	3
DSY2052	123	3
DSY0001	123	4

La référence DSY3065 correspond au cytochrome *c* identifié. La colonne « Queries » rend compte du nombre de peptides recouvrant chaque protéine.

7.12 Détermination des acides aminés essentiels à la croissance de *Desulfitobacterium hafniense* TCE1

Le milieu de culture dans lequel croît *Desulfitobacterium hafniense* TCE1 et d'autres souches utilisées au laboratoire était autrefois agrémenté d'extrait de levure. Afin de mieux contrôler les conditions de cultures, il a été décidé d'échanger l'extrait de levure par une solution définie d'acides aminés. En effet, la préparation de l'extrait de levure peut être très variable d'un fournisseur à l'autre et sa composition n'est pas parfaitement connue. Ce projet vise donc à une meilleure maîtrise du milieu de base utilisé. En se basant sur la composition générale de l'extrait de levure en acides aminés, une solution contenant dix-sept acides aminés a donc été préparée et utilisée durant quelques mois au laboratoire. Une question importante s'est alors posée : la bactérie utilise-t-elle tous les acides aminés ou n'est-elle auxotrophe que pour une partie d'entre eux ? C'est de cela qu'est né ce petit projet visant à formuler une solution d'acides aminés ne contenant que ceux qui devaient s'avérer essentiels à la croissance de la souche utilisée par le laboratoire.

Afin de déterminer quels acides aminés sont nécessaires à la croissance de *Desulfitobacterium hafniense*, chacun des vingt acides aminés existant a été préparé à une concentration de 140 mM. Un mL de chacune de ces solutions (sauf une) a été mis dans une nouvelle bouteille en plus de 41 mL d'eau milli-Q afin d'obtenir vingt solutions d'acides aminés avec dans chaque bouteille, un acide aminé manquant différent. Ensuite, des cultures poussant sur lactate et fumarate ont été complétées par 3 mL de la solution d'acide aminés et suivies en duplicata sur trois générations. Cela représente une concentration finale dans la culture en acides aminés de 70 μ M ; cette concentration est la plus élevée retrouvée dans l'extrait de levure. Elle a été choisie afin d'être certain que chaque acide aminé serait présent en quantité suffisante. Les calculs et les masses obtenues sont présentés en **Annexe 7.12.1**.

Résultats

Pour être certain que la souche ait bien besoin d'acides aminés pour sa survie, un test a été effectué où une culture a été inoculée dans du milieu sans ajout ni d'extrait de levure, ni d'acides aminés. La culture n'ayant pas poussé, il semblait que cette souche nécessite la présence d'au moins un acide aminé pour sa croissance.

Malgré cela, et suite à ce projet, il a été déterminé qu'aucun acide aminé n'est essentiel à la croissance de *Desulfitobacterium hafniense* TCE1. En effet, les cultures reflétant toutes les différentes combinaisons d'acides aminés ont poussé. Cependant, la culture visant à prouver ce résultat et n'étant agrémenté d'aucun acide aminé n'a quant à elle pas poussé. Une hypothèse est posée face à ces résultats contradictoires. Il est possible qu'avec le temps et les différentes manipulations, la souche se soit adaptée à l'absence progressive de ces acides aminés et que, suite à cela, elle soit devenue capable de les synthétiser elle-même. C'est en effet ce que révèle un test fait sur une bouteille ne contenant pas d'acides aminés et inoculée avec l'une des cultures où manquait un des acides aminés. Cette culture ayant poussé, cela confirme que la souche à ce stade n'a plus besoin de la présence d'acides aminés pour sa croissance. Ce résultat est intéressant, car il a été montré dans le cas de *Desulfitobacterium hafniense* Y51. En effet, cette souche ne nécessiterait la présence d'aucun acide aminé pour sa croissance. Cependant, il s'agissait là d'un résultat obtenu par bio-informatique et aucun test *in-vivo* n'avait été réalisé jusqu'à ce jour.

Afin d'être certain que la souche poussant dans les cultures était bien celle d'intérêt et pas une contamination, une analyse T-RFLP a été effectuée. La T-RFLP, ou Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism est une technique de biologie moléculaire permettant d'obtenir un profil microbien d'une culture basée sur la position des sites de restrictions du gène 16S amplifié dont une extrémité est marquée par un fluorochrome. La méthode est basée sur une digestion enzymatique des produits PCR (polymerase chain reaction) avec une ou plusieurs enzymes de restriction, puis la détection des fragments obtenus à l'aide d'une électrophorèse capillaire de type séquenceur. Le résultat se traduit par un graphique dont l'axe X représente la taille des fragments et l'axe Y leur intensité en fluorescence. Dans le cas présent, la culture a révélé un profil caractéristique de notre souche et donc toute contamination a pu être exclue.

A partir de ce travail, cette culture ne nécessitant pas l'ajout d'acides aminés est maintenue en vie afin de servir d'inoculum pour d'autres expériences. Elle a été finalement transférée sur un milieu Lactate+PCE, afin d'être au plus proche des conditions de culture utilisées au laboratoire.

7.12.1 Préparation des solutions mère d'acides aminés à 140 mM

L'extrait de levure est ajouté au milieu à raison de 0.1g/l

Acide aminé	Masse molaire [g/mol]	% d'acides aminés dans l'extrait de levure ¹	Masse d'acides aminés dans l'extrait de levure [mg] pour 1L de culture	Molarité dans l'extrait de levure [mmol/l]	Masse d'acides aminés pour 50 mL de solution stock à 140 mM [mg]
L-Alanine	81.10	5.6	5.6	0.0691	567.700
Arginine	174.20	2.6	2.6	0.0149	1219.400
Aspartic acid	133.10	1.6	1.6	0.0120	931.700
Asparagine	150.14	5.3	5.3	0.0353	1050.980
Cysteine	175.60	0.2	0.2	0.0011	1229.200
Glutamine	146.15	0.2	0.2	0.0014	1023.050
L-Glutamic acid	147.13	9.4	9.4	0.0639	1029.910
Glycine	75.07	3.0	3.0	0.0400	525.490
Histidine	155.16	1.3	1.3	0.0084	1086.120
Isoleucine	131.17	3.0	3.0	0.0229	918.190
Leucine	131.18	4.1	4.1	0.0313	918.260
Lysine	146.12	4.6	4.6	0.0315	1022.826
Methionine	149.21	0.8	0.8	0.0054	1044.470
Phenylalanine	165.19	2.6	2.6	0.0157	1156.330
Proline	115.13	2.0	2.0	0.0174	805.910
Serine	105.09	1.6	1.6	0.0152	735.630
Threonine	119.12	1.6	1.6	0.0134	833.840
Tryptophane	204.23	0.5	0.5	0.0024	1429.575
Tyrosine	181.19	1.2	1.2	0.0066	1268.330
Valine	117.15	3.5	3.5	0.0299	820.050

¹ : valeurs données par le BD BIONUTRIENTS TECHNICAL MANUAL

Recherche des cytochromes de type *c* liés à la respiration anaérobie de
Desulfitobacterium hafniense TCE1