

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	xii
Remerciements	xv
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 Le fer est essentiel	1
1.2 Système d'acquisition de l'hème	4
1.2.1 Système d'acquisition direct de l'hème.....	5
1.2.2 Système d'acquisition de l'hème via un récepteur bipartite.....	7
1.2.3 Système d'acquisition de l'hème via un hémophore	8
1.2.4 L'hème dans le cytoplasme	9
1.3 Le regroupement des gènes <i>chu</i>	11
1.4 La protéine ChuS	14
1.5 La protéine ChuX	17
1.6 La protéine ChuY	20
1.7 La protéine ChuW	25
1.8 Objectifs spécifiques.....	28
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes	29
2.1 Matériel.....	29
2.1.1 Vecteurs pour le clonage et la production des protéines	29
2.1.2 Principaux composés chimiques utilisés	30
2.1.3 Solutions	30
2.2 Amplification par PCR des gènes <i>chuX</i> , <i>chuY</i> et <i>chuW</i>	31
2.3 Clonage des gènes	32
2.3.1 Clonage des gènes <i>chuX</i> , <i>chuY</i> et <i>chuW</i> dans les vecteurs pASK-IBA	32
2.3.2 Clonage des gènes <i>chuX</i> et <i>chuS</i> dans le vecteur pET15b	33
2.4 Purification et séquençage des clones	33
2.5 Surexpression des protéines.....	34
2.5.1 Transformation par électroporation.....	34

2.5.2 Cultures bactériennes et induction de l'expression protéique	34
2.5.3 Extraction des protéines totales pour l'analyse d'expression	35
2.5.4 Bris de cellules pour la purification de protéines	35
2.5.5 Méthode de solubilisation en conditions dénaturantes de ChuW	37
2.6 Purification des protéines	38
2.6.1 Chromatographie d'affinité sur résine couplée à la streptavidine	38
2.6.2 Chromatographie d'affinité sur Ni ²⁺ -Sépharose	39
2.6.3 Dosage des protéines par la méthode de Bradford	40
2.6.4 Vérification de la pureté des protéines	40
2.7 Tamisage moléculaire	40
2.8 Reconstitution des protéines ChuS et ChuX avec de l'hème	41
2.8.1 Préparation d'une solution d'hémine	41
2.8.2 Préparation d'holo-ChuS	41
2.8.3 Préparation d'holo-ChuX	42
2.8.4 Dosage par la méthode du pyridine-hémochrome	43
2.9 Spectroscopie d'absorption	44
2.10 Cinétiques pré-stationnaires avec un mélangeur à flux arrêté	44
2.11 Extraction à la pyridine et spectre optique du complexe pyridine-verdohème	45
2.12 Dosage du fer	46
Chapitre 3 : Présentation des résultats	47
3.1 Amplification par PCR des gènes <i>chuX</i> , <i>chuY</i> et <i>chuW</i>	47
3.2 Clonage et séquençage des clones	48
3.3 Surexpression des protéines	49
3.3.1 Expression des protéines ChuX _{N-Strep} et ChuX _{N-His}	49
3.3.2 Expression de la protéine ChuY _{N-Strep}	50
3.3.3 Expression des protéines ChuW _{N-Strep} et ChuW _{C-Strep}	51
3.4 Purification des protéines	53
3.4.1 Purification de la protéine ChuX _{N-Strep}	53
3.4.2 Purification de la protéine ChuX _{N-His}	54
3.4.3 Purification de la protéine ChuY _{N-Strep}	56
3.4.4 Purification de la protéine ChuW _{N-Strep}	57
3.4.5 Purification de la protéine ChuS _{N-His}	58
3.5 Reconstitution des protéines avec de l'hème	58
3.5.1 Reconstitution de la protéine ChuX _{N-Strep} avec de l'hème	58

3.5.2 Reconstitution de la protéine ChuS _{N-His} avec de l'hème	61
3.6 Tamisage moléculaire.....	62
3.6.1 Tamisage moléculaire de la protéine ChuX _{N-Strep}	62
3.6.2 Tamisage moléculaire de la protéine ChuY _{N-Strep}	63
3.7 Activité enzymatique de la protéine ChuYN-Strep _{N-Strep}	64
3.7.1 Réduction du tripyrrole par ChuY _{N-Strep}	64
3.7.2 Détermination des constantes liées aux réactions	66
3.7.3 Dosage du fer libéré en solution	71
3.8 Caractérisation de la protéine ChuX _{N-Strep}	72
3.8.1 Transfert de l'hème de la protéine Chu _{N-Strep} X à ChuS _{N-His}	72
3.8.2 Vitesse de transfert de l'hème	75
3.9 Réaction de dégradation de l'hème par ChuS _{N-His} dans du tampon Tris-HCl	77
3.9.1 Réaction de la protéine ChuS _{N-His} avec le peroxyde d'hydrogène dans du tampon Tris-HCl.....	77
3.9.2 Action de la protéine ChuY _{N-Strep}	81
3.9.4 Détermination des constantes liées aux réactions	83
Chapitre 4 : Discussion.....	86
4.1 Clonage et expression des protéines	86
4.2 Purification des protéines	87
4.3 Reconstitution des protéines ChuX et ChuS avec de l'hème	88
4.3.1 Reconstitution de la protéine ChuX	88
4.3.2 Reconstitution de la protéine ChuS	89
4.4 Propriétés de la protéine ChuX.....	90
4.5 La protéine ChuY	91
4.6 La protéine ChuW	93
4.7 La protéine ChuS	95
4.8 Le regroupement de gènes <i>chu</i>	95
4.9 Perspectives	96
Conclusion	98
Bibliographie	99
Annexe.....	103

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résidus ou motifs conservés chez les SDRs	21
Tableau 2 : Vecteurs utilisés pour le clonage des gènes et permettant l'expression de protéines recombinantes	29
Tableau 3 : Souches d' <i>Escherichia coli</i> utilisées pour le clonage de gènes et l'expression des protéines	30
Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR des gènes <i>chuX</i> , <i>chuY</i> et <i>chuW</i> servant au clonage dans pASK-IBA5+	32
Tableau 5 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR du gène <i>chuW</i> servant au clonage dans pASK-IBA3+	32
Tableau 6 : Conditions utilisées pour la surexpression des protéines ChuX et ChuY	36
Tableau 7 : Conditions utilisées pour la surexpression des protéines ChuW et ChuS	36
Tableau 8 : Tampons utilisés pour la dialyse séquentielle de ChuW	37
Tableau 9 : Tampons utilisés pour la purification des protéines avec une étiquette streptag	38
Tableau 10 : Tampons utilisés pour la purification des protéines avec une étiquette de poly-histidine	39
Tableau 11 : Tampons utilisés pour le tamisage moléculaire des protéines	41
Tableau 12 : Différents tampons testés pour la reconstitution de ChuX _{N-His} avec de l'hème	60
Tableau 13 : Résultats des reconstitutions de la protéine ChuX _{N-Strep}	61
Tableau 14 : Résultats des reconstitutions de la protéine ChuS _{N-His}	62
Tableau 15 : Constantes de vitesse observées pour la réaction de ChuS _{N-His}	68
Tableau 16 : Constantes de vitesse observées pour différents ratios de ChuY _{N-Strep}	68
Tableau 17 : Constantes de vitesse observées pour la réaction de ChuS _{N-His} dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8	85
Tableau 18 : Composition des solutions utilisées	103

Liste des figures

Figure 1 : Système d'acquisition du fer chez les bactéries pathogènes.....	2
Figure 2 : Structure de l'hème	3
Figure 3 : Représentation schématique des systèmes d'acquisition de l'hème chez les bactéries à Gram négatifs	5
Figure 4 : Mécanisme de la dégradation de l'hème en biliverdine par les hèmes oxygénases	10
Figure 5 : Arrangement des gènes <i>chu</i> d' <i>E. coli</i> O157:H7.....	11
Figure 6 : La structure des protéines ShuA, ShuT et HmuUV.....	13
Figure 7 : La structure de la protéine ChuS.....	15
Figure 8 : Modèle de la réaction de dégradation de l'hème de la protéine ChuS.....	16
Figure 9 : Réaction de ChuS avec le peroxyde d'hydrogène	17
Figure 10 : Alignement de séquences de la protéine ChuX avec ses homologues.....	18
Figure 11 : Structure de la protéine ChuX.....	19
Figure 12 : Similarités de la structure de ChuX avec celle des protéines ChuS et HemS....	20
Figure 13 : Structure tridimensionnelle d'une SDR classique	21
Figure 14 : Réactions catalysées par les SDRs.....	22
Figure 15 : Structures de SDRs atypiques	23
Figure 16 : Alignement de séquences de la protéine ChuY avec ses homologues appartenant à la famille des SDRs atypiques	24
Figure 17 : Première étape de réaction commune à toutes les enzymes à radical SAM	26
Figure 18 : Conversion du coproporphyrinogène-III en protoporphyrinogène-IX par HemN	26
Figure 19 : Alignement de séquences de la protéine ChuW avec ses homologues appartenant à la famille des enzymes à radical SAM.....	27
Figure 20 : Représentation schématique d'un mélangeur à flux arrêté	45
Figure 21 : Vérification des produits d'amplification par PCR du gène <i>chuW</i> servant au clonage dans le vecteur pASK-IBA3+	47
Figure 22 : Vérification des produits d'amplification par PCR des gènes <i>chuX</i> , <i>chuY</i> et <i>chuW</i> servant au clonage dans le vecteur pASK-IBA5+.....	48

Figure 23 : Analyse par SDS-PAGE de l'expression de la protéine ChuX _{N-Strep} chez <i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3)	50
Figure 24 : Analyse par SDS-PAGE de l'expression de la protéine ChuY _{N-Strep} chez <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	51
Figure 25 : Analyse par SDS-PAGE de l'expression de la protéine ChuW _{N-Strep} chez <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	52
Figure 26 : Analyse par SDS-PAGE des échantillons récoltés lors de la purification de la protéine ChuX _{N-Strep}	54
Figure 27 : Analyse gel SDS-PAGE des échantillons récoltés lors de la purification de la protéine ChuX _{N-His}	55
Figure 28 : Analyse par SDS-PAGE des échantillons récoltés lors de la purification de la protéine ChuY _{N-Strep}	56
Figure 29 : Analyse par SDS-PAGE des échantillons récoltés lors de la purification de la protéine ChuW _{N-Strep}	57
Figure 30 : Spectre d'absorption de la protéine holo-ChuX _{N-Strep}	60
Figure 31 : Tamisage moléculaire des protéines ChuX _{N-Strep} et ChuY _{N-Strep}	63
Figure 32 : Réduction du tripyrrole par ChuY _{N-Strep} en présence NADPH	65
Figure 33 : Réaction d'holo-ChuS _{N-His} avec le peroxyde d'hydrogène en présence de ChuY _{N-Strep} et NADPH	66
Figure 34 : Cinétiques de la réaction d'holo-ChuS _{N-His} avec le peroxyde d'hydrogène en présence de ChuY _{N-Strep} et de NAD(P)H	69
Figure 35 : Cinétique de la réduction du tripyrrole par ChuY _{N-Strep} en présence de NADPH et instabilité du produit	70
Figure 36 : Modèle de la réaction de dégradation de l'hème de la protéine ChuS _{N-His} en absence et en présence de la protéine ChuY _{N-Strep}	71
Figure 37 : Transfert de l'hème de holo-ChuX _{N-Strep} à apo-ChuS _{N-His} et ajout de peroxyde d'hydrogène pour initier la dégradation de l'hème	74
Figure 38 : Réaction d'holo-ChuX _{N-Strep} en présence de peroxyde d'hydrogène	75
Figure 39 : Graphique des constantes observées pour le transfert de l'hème en fonction de la concentration de la protéine apo-ChuS _{N-His}	77
Figure 40 : Réaction d'holo-ChuS _{N-His} avec le peroxyde d'hydrogène	79

Figure 41 : Spectres d'absorption du complexe pyridine-verdohème issu de la réaction de dégradation de l'hème d'holo-ChuS _{N-His} dans du tampon Tris-HCl pH 8.....	80
Figure 42 : Comparaison de l'activité peroxydase de la protéine holo-ChuS _{N-His} dans du tampon phosphate et de tampon Tris-HCl.....	81
Figure 43 : Réaction d'holo-ChuS _{N-His} en présence de ChuY _{N-Strep} et NADPH avec le peroxyde d'hydrogène.....	83
Figure 44 : Cinétiques de la réaction d'holo-ChuS _{N-His} avec le peroxyde d'hydrogène avec ou sans la présence de ChuY _{N-Strep} et de NADPH dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8. 85	85
Figure 45 : Structures de différents membres de la famille des prodiginines.....	93
Figure 46 : Promoteur et séquence codant pour le gène <i>chuX</i> dans pASK-IBA5+.....	104
Figure 47 : Promoteur et séquence codant pour le gène <i>chuX</i> dans pET15b.....	104
Figure 48 : Promoteur et séquence codant pour le gène <i>chuY</i> dans pASK-IBA5+.....	104
Figure 49 : Promoteur et séquence codant pour le gène <i>chuW</i> dans pASK-IBA5+.....	105
Figure 50 : Promoteur et séquence codant pour le gène <i>chuW</i> dans pASK-IBA3+.....	105

Liste des abréviations

ABC	Cassette de liaison à l'ATP d'un transporteur
Abs	Absorbance
ADN	acide désoxyribonucléique
AHT	anhydrotétracycline
Amp	ampicilline
apo-ChuS	protéine ChuS sans hème dans son site actif
apo-ChuX	protéine ChuX sans hème dans son site actif
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
BSA	albumine de sérum bovin
Cam	chloramphénicol
ChuS _{N-His}	protéine ChuS avec une étiquette d'histidine à l'extrémité N-terminale
ChuX _{N-His}	protéine ChuX avec une étiquette d'histidine à l'extrémité N-terminale
ChuX _{N-Strep}	protéine ChuX avec une étiquette streptag à l'extrémité N-terminale
ChuY _{N-Strep}	protéine ChuY avec une étiquette streptag à l'extrémité N-terminale
ChuW _{C-Strep}	protéine ChuW avec une étiquette streptag à l'extrémité C-terminale
ChuW _{N-Strep}	protéine ChuW avec une étiquette streptag à l'extrémité N-terminale
CO	monoxyde de carbone
DO	densité optique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	acide éthylènedinitrolo-trétaacétique
EtOH	éthanol
Fe	fer
Fe ²⁺	fer sous forme ferreuse
Fe ³⁺	fer sous forme ferrique
FeCl ₃	chlorure de fer
FPLC	chromatographie en phase liquide des protéines

g	champ de pesanteur terrestre
H ₂ O	oxyde d'hydrogène, eau
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HCl	acide chlorhydrique
Hème	protoporphyrine de fer IX
holo-ChuS	protéine ChuS avec de l'hème dans son site actif
holo-ChuX	protéine ChuX avec de l'hème dans son site actif
IPTG	isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside
K ₄ (Fe(CN) ₆)	ferrocyanide de potassium
KCl	chlorure de potassium
K _d	constante de dissociation à l'équilibre
kDa	kiloDalton
K ₂ HPO ₄	phosphate de potassium dibasique
KH ₂ PO ₄	phosphate de potassium monobasique
kV	kilovolt
LB	Luria-Bertani
mA	miliampère
MgCl ₂	chlorure de magnésium
MWCO	« molecular weight cut-off »
NaCl	chlorure de sodium
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NaOH	hydroxyde de sodium
NaPi	tampon phosphate de sodium inorganique
Ni ²⁺	ion nickel
NiSO ₄	sulfate de nickel
O ₂	dioxygène
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
Pb	paire de base
PCR	réaction de polymérisation en chaîne

PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyle
PSI	livre-force par pouce carré (Pound per square inch)
RPE	résonance paramagnétique électronique
rpm	rotation par minute
S	soufre
SAM	S-adénosyl-méthionine
SDS	dodécylsulfate de sodium
SDR	déshydrogénase/réductase à courte chaîne
sec	seconde
SOC	« super optimal broth »
TB	« terrific broth »
U	unité d'enzyme
μ FD	microFaraday
V	volt

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à ma directrice de recherche, Manon Couture, sans qui je n'aurais pu réaliser ce magnifique projet. Elle ne s'est jamais découragée de me voir arriver dans son bureau avec la face longue. Merci de m'avoir accueillie dans ton laboratoire, de m'avoir appuyée, d'avoir répondu à mes très nombreuses « bébé » questions et de m'avoir appris tant de choses. Sans elle je serais très loin d'où j'en suis aujourd'hui.

Merci également aux membres de mon comité aviseur. Je remercie Michel Guertin pour toutes les conversations scientifiques et moins scientifiques que l'on a pu avoir. Merci d'avoir été présent aux réunions de laboratoire. Tes questions et tes idées ont joué un rôle important dans l'avancement de ce projet. Merci à Rong Shi de m'avoir initié à l'art de la cristallographie et de toujours savoir poser LA question qui fait en sorte que je m'interroge, que j'apprends et que j'avance.

Merci à ma collègue Karine Turbis avec qui je me suis liée d'amitié. Elle a été ma « maman » du laboratoire en me montrant comment tout fonctionnait avec tellement de minutie. Tes conversations et tes carottes ont enjoué mes journées.

Un gros merci tout spécial à tous les gens de mon entourage, famille et amis à qui j'ai tant de difficulté à expliquer la biochimie. Votre présence a été précieuse pour moi. Merci à Philippe, mon copain, qui m'a énormément soutenue et encouragée au cours de ma maîtrise. Les journées n'ont pas toujours été faciles mais tu as toujours été si patient avec moi. Tu as toujours cru en moi. Merci également à mes parents, Claude et France, de m'avoir constamment encouragée dans mes études et de toujours m'avoir dit que j'avais le potentiel d'accomplir de grandes choses. Merci à Marie-Anne, ma meilleure amie de longue date, pour toutes les discussions qu'on a pu avoir. Merci d'être simplement présente dans ma vie. Je remercie aussi Jean-Luc, Maxim et Maude pour être des amis exceptionnels avec qui je peux me changer les idées.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Le fer est essentiel

Le fer est le 26^e élément du tableau périodique et le quatrième élément le plus abondant sur la Terre [1]. Il est un métal faisant partie des éléments de transition. Les métaux de cette famille sont caractérisés par une sous-couche électronique *d* incomplète, c'est-à-dire que cette sous-couche n'est pas complètement remplie d'électrons et qu'il y a place au mouvement entre certaines orbitales. À cause de cette particularité, les métaux de cette famille peuvent osciller entre une grande variété d'état d'oxydation [2]. Sous des conditions physiologiques, le fer est principalement retrouvé sous deux formes, soit la forme ferreuse Fe^{2+} et la forme ferrique Fe^{3+} . Dans ces deux formes, les électrons du fer peuvent adopter un état de spin haut ou un bas dépendamment de l'environnement l'entourant. Ces propriétés font du fer un élément extrêmement versatile [1]. Cette flexibilité a fait de lui, au cours de l'évolution, un élément important pour plusieurs réactions enzymatiques et sa présence est maintenant nécessaire à la survie des organismes vivants. Le fer participe à plusieurs processus cellulaires vitaux comme le transport d'électrons et d'oxygène, la synthèse d'acides aminés, la respiration, la régulation des gènes, la biosynthèse d'ADN et la photosynthèse [3]. Ainsi, à part quelques exceptions chez les lactobacilles, le fer est essentiel pour maintenir la vie sous toutes formes [1].

Chez les bactéries pathogènes, on retrouve différents systèmes d'acquisition et de transport du fer qu'elles ont développés pour subvenir à leurs besoins. Lors de l'infection, ces stratégies leur permettent d'entrer en compétition avec la séquestration du fer effectuée par l'hôte. Ces systèmes d'acquisition peuvent être classés sous trois groupes : les récepteurs transferrines/lactoferrines, les sidérophores et le transport du fer ferreux (Figure 1) [1, 4]. Les récepteurs transferrines/lactoferrines sont retrouvés chez quelques bactéries et les plus étudiés appartiennent aux genres bactériens *Neisseriaceae* et *Pasteurellaceae*. Ces récepteurs sont en mesure de lier les transferrines et les lactoferrines présentes chez l'humain. Ces dernières sont de très grandes réserves de fer produites dans le foie et le lait respectivement. Les récepteurs transferrines/lactoferrine ont pour fonction de leur enlever

le fer et de le transporter dans le cytoplasme de la cellule bactérienne [4]. Quant à eux, les sidérophores sont synthétisés et sécrétés par les bactéries lorsque le niveau de fer est bas. Ils lient le fer ferrique avec une grande constante d'affinité pouvant aller jusqu'à 10^{50} M [4]. Une fois que le complexe fer-sidérophore est fait, il est reconnu par un récepteur exprimé à la surface des cellules. Le complexe est internalisé dans la bactérie et le fer peut être utilisé comme nutriment [1]. Pour sa part, le transport du fer ferreux s'effectue à l'aide du transporteur FeoB qui permettrait au fer ferreux de traverser la membrane cytoplasmique des bactéries. Ce système a été découvert pour la première fois chez *E. coli* et le mécanisme est encore incertain mais celui-ci impliquerait aussi les protéines FeoA et FeoC [1].

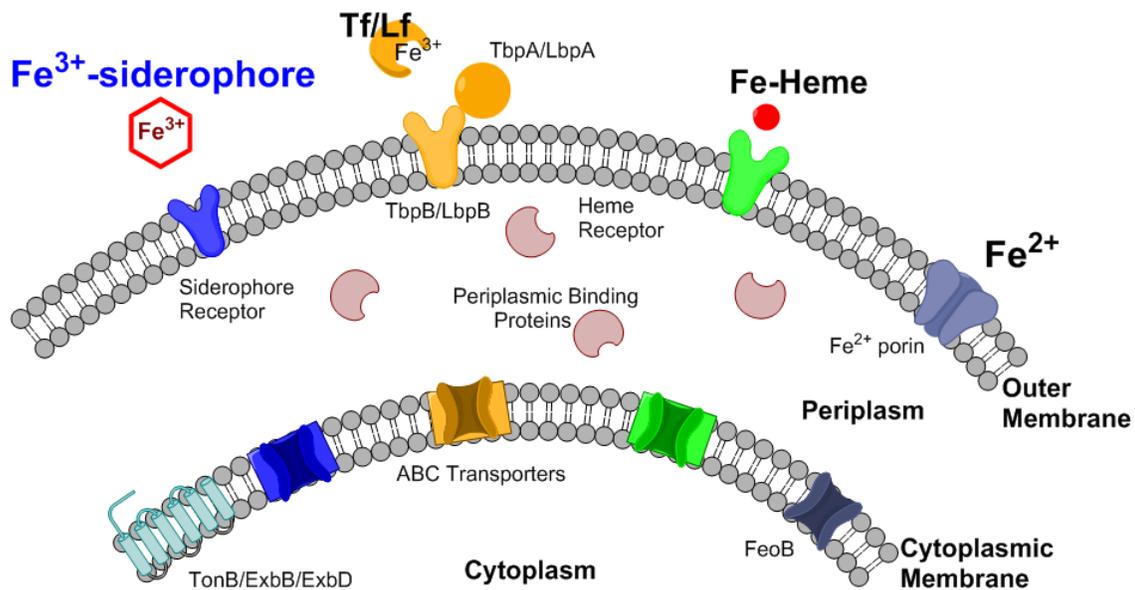


Figure 1 : Système d'acquisition du fer chez les bactéries pathogènes

Les bactéries pathogènes peuvent acquérir du fer par différents systèmes lorsqu'elles infectent un hôte : les récepteurs transferrines/lactoferrines, les sidérophores, le transport du fer ferreux et via l'hème. Ces mécanismes permettent à la cellule d'obtenir du fer pour survivre et croître [5].

Toutefois, au pH physiologique et en condition aérobie, le fer est très peu soluble. De plus, à cause de sa grande réactivité et de ses propriétés oxydantes, le fer libre peut occasionner un stress oxydatif qui peut être fatal pour la cellule [1]. Les systèmes d'acquisition, de

transport, de stockage et d'utilisation du fer sont donc nécessaires pour subvenir aux besoins des cellules mais ils doivent être hautement régulés [6]. Chez l'humain, le fer extracellulaire libre est retrouvé à une concentration très faible, soit 0.1 M pour l'état ferreux, et $\sim 10^{-18}$ M pour l'état ferrique [1]. Puisque le fer est nécessaire à la survie, la concentration en fer libre est insuffisante pour soutenir la croissance des bactéries pathogènes lorsqu'elles infectent un hôte. Le fer est solubilisé par séquestration dans des molécules ou dans des protéines comme dans les transferrines, lactoferrines et ferritines [3]. Toutefois, approximativement 70% du fer humain est retrouvé dans les molécules d'hème, ce qui en fait la source de fer la plus abondante (Figure 2) [7]. Les sources d'hème chez l'humain sont variées; on retrouve l'hème dans l'hémoglobine, l'hémopexine, l'albumine, le complexe hémoglobine-haptoglobine, la myoglobine et les cytochromes [8]. Lorsque les bactéries pathogènes infectent un mammifère, elles doivent donc être en mesure d'acquérir l'hème et de le métaboliser si elles veulent l'utiliser comme source de fer pour continuer de croître et survivre. De ce fait, différents systèmes d'acquisition de l'hème ont été développés par les bactéries pathogènes au cours de l'évolution.

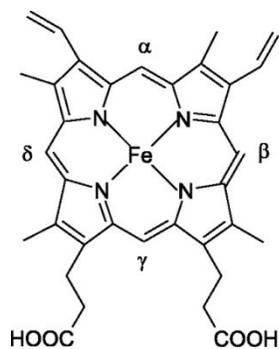


Figure 2 : Structure de l'hème

Structure de l'hème *b* contenant un atome de fer au centre d'un large hétérocycle organique appelé porphyrine [9]. Le porphyrine est constitué de 4 anneaux pyrroles (cycles à 4 carbones et 1 azote). Les carbones situés entre les pyrroles, appelés carbones méso, sont identifiés α , β , γ et δ . Le porphyrine est décoré de 4 groupements méthyles, 2 groupements vinyles et 2 groupements propionates.

1.2 Système d'acquisition de l'hème

Lorsque les organismes pathogènes infectent un hôte, ceux-ci doivent être en mesure d'acquérir du fer et certains peuvent utiliser l'hème comme source de fer pour survivre et croître. Les différentes sources d'hème sont libérées des érythrocytes par des hémolysines et des protéases. Une fois les cellules lysées, l'hème est rapidement lié à des protéines de l'hôte (hémopexine, albumine) mais peut aussi être transporté ou capté par les bactéries à l'aide de différents systèmes d'acquisition [1]. Les systèmes d'acquisition de l'hème chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif ont divergé au cours de l'évolution, à cause des différences dans leur composition membranaire. Dans cette étude, seulement les systèmes d'acquisition de l'hème par les bactéries à Gram négatif seront abordés. Chez les bactéries à Gram négatif pathogènes, il y a trois différents types de systèmes qui ont été identifiés : acquisition directe, acquisition via un récepteur bipartite et acquisition via un hémophile (Figure 3). Ceux-ci sont tous dépendants d'un système appelé TonB. La protéine TonB forme un complexe avec les protéines ExbB et ExbD dans la membrane cytoplasmique de la cellule. Ce complexe utilise la force proton motrice pour fournir l'énergie nécessaire aux récepteurs de la membrane externe permettant l'acquisition et le transport de substrats spécifiques, comme l'hème, jusqu'au périplasme [10]. Le fonctionnement général des différents systèmes d'acquisition de l'hème ainsi que le sort de l'hème une fois dans le cytoplasme sont présentés aux sections 1.2.1 à 1.2.3.

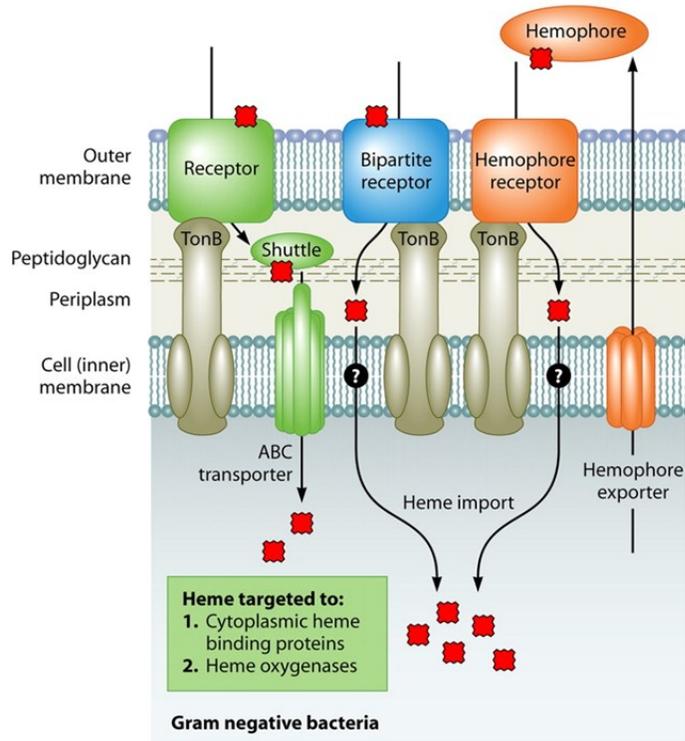


Figure 3 : Représentation schématique des systèmes d'acquisition de l'hème chez les bactéries à Gram négatifs

Chez les bactéries à Gram négatif, trois types de systèmes d'acquisition de l'hème ont été identifiés. Ces systèmes d'internalisation de l'hème incluent l'acquisition directe, l'acquisition via un récepteur bipartite et l'acquisition via un hémophore [8].

1.2.1 Système d'acquisition direct de l'hème

Le système d'acquisition direct de l'hème permet le transport de l'hème de la membrane externe jusqu'au cytoplasme. Ce type de système implique un récepteur membranaire externe, une protéine périplasmique, un transporteur ABC et une protéine cytoplasmique. Les protéines impliquées dans l'acquisition directe de l'hème sont codées par un regroupement de gènes qui est retrouvé chez plusieurs bactéries pathogènes à Gram négatif notamment : *Yersinia pestis* (Hmu), *Yersinia enterocolitica* (Hem), *Shigella dysenteriae* (Shu), *Pseudomonas aeruginosa* (Phu), *Citrobacter freundii* (Hut), *Vibrio cholerae* (Hut) et *Escherichia coli* O157:H7 (Chu) [8, 11].

Le récepteur membranaire externe capte l'hème libre, ou l'hème des hémoprotéines de l'hôte, à la surface de la cellule et le transporte jusqu'au périplasm via l'énergie fournie par le complexe TonB/ExbB/ExbD [7]. Plusieurs types de récepteurs ont été identifiés chez

différentes bactéries à Gram négatif. Ces récepteurs pouvant lier l'hème d'une ou plusieurs sources incluent ShuA de *S. dysenteriae*, ChuA de *E. coli* O157:H7, PhuR de *P. aeruginosa* et HemR de *Y. enterocolitica*. Certaines espèces possèdent plus d'un récepteur, qui sont probablement utiles pour lier différentes hémoprotéines [11]. Quelques récepteurs d'hémophores peuvent aussi jouer ce rôle, comme HasR de *S. marcescens*, car en plus de lier le complexe hème-hémophore, ils capturent l'hème libre et celui de l'hémoglobine [12]. Les récepteurs de cette famille ont une taille de 70 à 120 kDa et sont caractérisés par deux domaines : un baril β possédant 22 feuillets antiparallèles avec un diamètre interne variant entre 35-40 Å et une séquence N-terminale qui occupe la cavité et prévient la diffusion passive. De plus, deux histidines hautement conservées, qui sont impliquées dans le transport de l'hème, ont été identifiées chez cette famille de récepteurs [13].

Une fois rendu au périplasma, l'hème est lié à une protéine périplasmique assurant son transport jusqu'au un transporteur ABC de la membrane interne. Quelques transporteurs périplasmiques ont été identifiés tels que HemT de *Y. enterocolitica*, ShuT de *S. dysenteriae*, PhuT de *P. aeruginosa*, HutB de *V. cholerae* et ChuT de *E. coli* O157:H7 [14]. Le mécanisme de transport n'est pas encore très bien caractérisé mais les études effectuées proposent que l'hème se lie entre deux sous-domaines du transporteur créant ainsi un changement structural de la protéine. Ce changement de conformation permettrait au complexe hème-transporteur périplasmique d'interagir avec le domaine transmembranaire du transporteur ABC [11].

La protéine périplasmique assure le transport de l'hème dans l'espace périplasmique jusqu'au transporteur ABC. Quand la protéine est associée au transporteur ABC, cela forme une perméase d'acquisition de l'hème complète qui permet le transport de l'hème vers le cytoplasme via un système dépendant de l'ATP [15]. La perméase identifiée chez *Y. enterocolitica* est composée d'une protéine périplasmique liant l'hème (HemT), une protéine transmembranaire (HemU) et une protéine ATPase (HemV) [14]. Des protéines homologues sont retrouvées dans d'autres bactéries comme PhuTUV de *P. aeruginosa*, ShuTUV de *S. dysenteriae* et ChuTUV de *E. coli* O157:H7.

Au moins une protéine cytoplasmique est normalement présente dans les systèmes d'acquisition directs de l'hème. Toutefois, la fonction associée à cette famille de protéine reste ambiguë. Les protéines HemS de *Y. enterocolitica*, ShuS de *S. dysenteriae*, PhuS de *P. aeruginosa* et ChuS de *E. coli* O157:H7 font toutes partie de cette famille. Les rôles proposés pour chacune d'elles diffèrent [8]. Au départ, la protéine HemS était proposée pour être responsable de la dégradation de l'hème [15]. Toutefois, aucune étude biochimique n'a encore été faite à ce jour. Les auteurs d'une étude sur la structure de HemS (apo et holo) proposent plutôt que la protéine serait un transporteur de l'hème plutôt qu'une hème oxygénase [16]. Les études effectuées sur la protéine ShuS ont démontré que la présence de celle-ci favorise la croissance de la bactérie lorsque l'hème est la seule source de fer disponible dans l'environnement. De plus, à basse concentration d'hème, la protéine ShuS améliore l'utilisation de l'hème tandis qu'à plus haute concentration d'hème, elle protège la cellule de la toxicité [17]. Tout comme ShuS, la présence de la protéine PhuS est requise pour l'utilisation efficace de l'hème comme source de fer [18]. Il a aussi été démontré que holo-PhuS transfère l'hème à apo-paHO, l'hème oxygénase classique présente chez cette bactérie, de manière spécifique à l'aide d'une interaction protéine-protéine [19]. De plus, PhuS régulerait la quantité d'hème importé via paHO selon l'équilibre de concentration entre les formes apo-PhuS et holo-PhuS [20]. Pour sa part, la protéine ChuS a été présentée comme une hème oxygénase capable de dégrader l'hème pour rendre le fer disponible à l'organisme (section 1.4) [21]. Même si les fonctions de ces protéines semblent diverses, elles pourraient toutes un rôle important dans utilisation de l'hème et la prévention de ses effets de toxicité. Le sort de l'hème une fois qu'il a atteint le cytoplasme est décrit à la section 1.2.4.

1.2.2 Système d'acquisition de l'hème via un récepteur bipartite

À ce jour, le système d'acquisition de l'hème via un récepteur bipartite a été identifié seulement chez le genre *Neisseria*. Ce système implique un récepteur membranaire externe dépendant de TonB, HupB, et une lipoprotéine située sur la membrane externe, HpuA. Le complexe HpuA-HupB est requis pour l'acquisition de l'hème de l'hémoglobine et du complexe hémoglobine-haptoglobine comme source de fer. Contrairement au système

d'acquisition direct de l'hème qui utilise un récepteur à une seule composante, l'acquisition de l'hème via un récepteur bipartite nécessite les deux parties pour être fonctionnel.

1.2.3 Système d'acquisition de l'hème via un hémophore

Certaines bactéries sécrètent des protéines appelées hémophores. Les hémophores sont exportés dans l'environnement pour capturer l'hème libre ou l'hème lié à une protéine hémique [8]. Le complexe hème-hémophore est reconnu par un récepteur de la membrane externe qui importe la molécule d'hème à l'intérieur de la cellule. Deux types d'hémophores ont été identifiés pour les bactéries à Gram négatif : HasA et HxuA.

Le système HasA a été identifié chez quelques bactéries incluant *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia pestis*. Les hémophores de type HasA forment une famille de protéines hautement conservées [3]. HasA capture l'hème libre et le transmet au récepteur membranaire externe HasR via la formation d'un complexe protéine-protéine pour que celui-ci le transporte [7, 22]. TonB, ou un homologue de TonB, fournit l'énergie nécessaire pour le transport de l'hème de la surface de la cellule jusqu'au périplasma par HasR. Le récepteur HasR est capable de lier l'hème et l'hémoglobine mais le processus est moins efficace que l'acquisition via HasA [8].

Pour sa part, l'hémophore HxuA faisant partie de l'opéron *hxuCBA* a été décrit seulement chez *Haemophilus influenzae*. Les études faites jusqu'à présent démontrent que HuxB exporterait HuxA à la surface de la cellule où celle-ci est en mesure de lier le complexe hème-hémopexine. Le récepteur du complexe nécessaire à l'internalisation de l'hème n'a pas encore été décrit mais la protéine HuxC est proposée pour jouer ce rôle [23, 24].

1.2.4 L'hème dans le cytoplasme

Une fois que l'hème est transporté jusqu'au cytoplasme, il peut être lié à des protéines chaperonnes pour minimiser la toxicité, être utilisé par les hémoprotéines (cytochrome P450, peroxydase, tryptophane oxygénase et autres) ou encore être dégradé pour rendre le fer disponible à l'organisme [7]. À cause de sa nature lipophile, de son aptitude à peroxyder des lipides et de sa capacité à catalyser la formation d'espèces réactives de l'oxygène, l'hème libre est toxique pour la cellule [7]. Ainsi, l'accumulation d'hème dans la cellule est dommageable pour celle-ci et peut causer un grand stress oxydatif [11]. De ce fait, on croit que l'hème entrant dans le cytoplasme est majoritairement séquestré par des protéines.

Chez beaucoup de bactéries à Gram négatif pathogènes, la dégradation de l'hème est catalysée par des hèmes oxygénases qui sont similaires à celles caractérisées chez les eucaryotes [25]. Ces protéines, appelées hème oxygénases classiques, ont d'abord été découvertes chez les mammifères et leur fonction prédite était de protéger la cellule de la toxicité de l'hème [8]. Les hèmes oxygénases possèdent une structure secondaire comprenant seulement des hélices α . La molécule d'hème se retrouve coordonnée entre deux hélices α [13]. Les hèmes oxygénases sont ubiquitaires dans la nature et elles protègent la cellule d'un stress oxydatif en contrôlant le niveau d'hème libre. Les hèmes oxygénases catalysent l'ouverture du porphyrine de l'hème à l'aide de O_2 , de NADPH et d'une cytochrome P450 réductase [26]. Le fer est ainsi libéré en générant comme produits du monoxyde de carbone (CO) et de la biliverdine (Figure 4) [27]. Le carbone *méso* α de l'hème est d'abord hydroxylé ce qui crée du α -*meso*-hydroxyhème. Puis, en présence d'oxygène, le même carbone est remplacé par un atome d'oxygène, ce qui forme l'intermédiaire verdohème. À l'aide d'une autre réduction en présence d'oxygène, le cycle est ouvert, ce qui libère le fer et produit de la biliverdine et du CO [28]. Dans cette réaction, l'hème sert à la fois de substrat et de cofacteur [13]. Au total, la conversion de l'hème en biliverdine par une hème oxygénase consomme trois molécules d'oxygène et sept électrons. Chez les mammifères, les électrons nécessaires à l'oxydation de l'hème sont fournis par le NADPH via une cytochrome P450 réductase [28]. À la suite de cette réaction, une autre enzyme, la biliverdine réductase réduit la biliverdine en bilirubine en utilisant du NADPH

[29]. La bilirubine s'est avérée être un antioxydant très important. En fait, la bilirubine protège les cellules contre les radicaux peroxydes en s'oxydant, ce qui recrée de la biliverdine qui est retransformée rapidement en bilirubine par la biliverdine réductase [30]. De plus, d'autres fonctions intéressantes de la biliverdine réductase ont été proposées chez l'humain. Elle serait un facteur de transcription régulant l'expression de l'hème oxygénase HO-1 et elle serait un régulateur de la voie de signalisation de l'insuline [29].

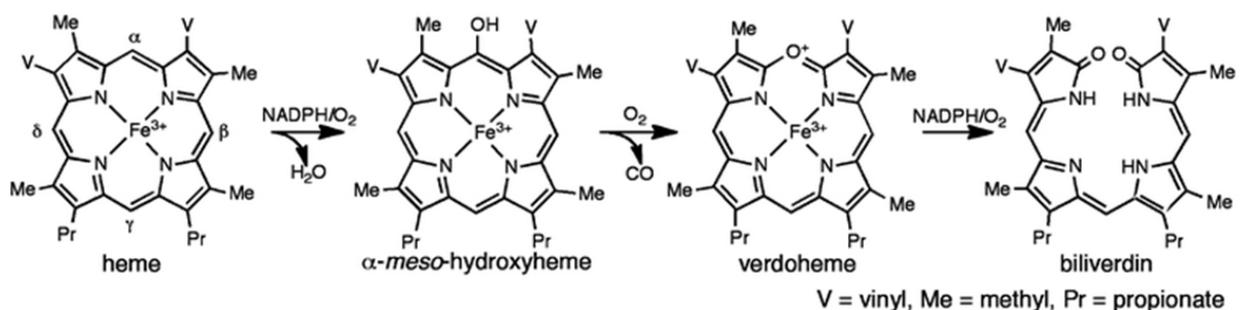


Figure 4 : Mécanisme de la dégradation de l'hème en biliverdine par les hèmes oxygénases

La réaction de dégradation de l'hème par les hèmes oxygénases débute par la conversion de l'hème en α -meso-hydroxyhème qui rapidement forme du verdohème en condition aérobie. Finalement, l'intermédiaire verdohème est oxydé en Fe^{3+} -biliverdine. Le fer et la biliverdine sont libérés lorsque le fer du complexe Fe^{3+} -biliverdine est réduit en présence de cytochrome P450 réductase [27].

Des protéines ayant une activité de dégradation de l'hème, qui possèdent une structure tridimensionnelle différente de celle des hèmes oxygénases classiques et qui catalysent une réaction de dégradation de l'hème différente de celle des hèmes oxygénases classiques, ont récemment été identifiées dans d'autres espèces bactériennes. Les protéines IsdG et IsdI de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus anthracis* dégradent l'hème selon un mécanisme différent de celui des hèmes oxygénases, libérant le fer en produisant de la staphylobiline et du formaldéhyde plutôt que de la biliverdine et du CO [31]. Un deuxième type d'hème oxygénase a été caractérisé chez *Mycobacterium tuberculosis*, la protéine MhuD. Cette protéine ouvre le porphyrine de l'hème en produisant seulement de la mycobiline, i.e. qu'il n'y a pas de réaction de décarboxylation du porphyrine et donc pas de libération de CO ou

de formaldéhyde [32]. La découverte et la caractérisation de ces nouvelles enzymes de dégradation de l'hème est importante et démontre que la dégradation de l'hème n'est pas restreinte à la réaction catalysée par les hèmes oxygénases classiques.

1.3 Le regroupement des gènes *chu*

Chez *Escherichia coli* O157:H7, le système d'acquisition direct de l'hème est codé par un regroupement de huit gènes (Figure 5). Le regroupement a une longueur de près de 10 kb et contient huit gènes qui codent pour différentes protéines impliquées dans l'internalisation et l'utilisation de l'hème comme source de fer. Quatre des huit gènes sont nécessaires au transport de l'hème de la membrane externe jusqu'au cytoplasme : *chuA*, *chuT*, *chuU* et *chuV*. Un cinquième gène, *chuS*, code pour une protéine cytoplasmique qui dégrade l'hème pour rendre le fer disponible à l'organisme selon une réaction unique et pas encore entièrement caractérisée [21].

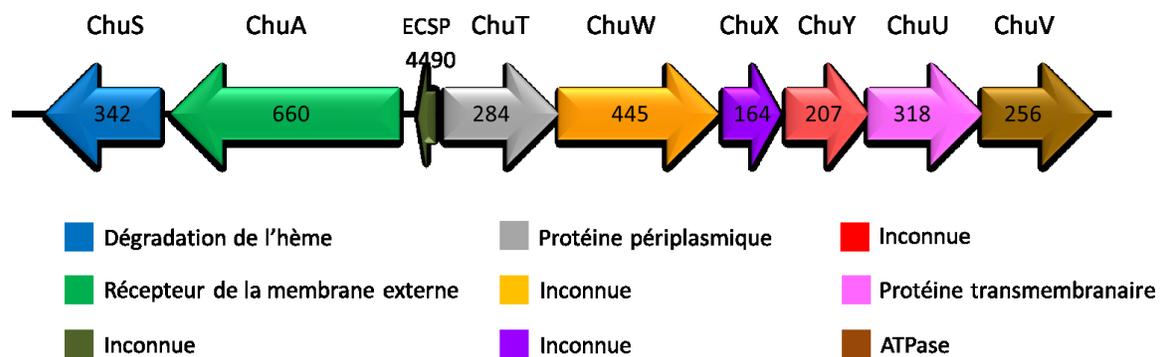


Figure 5 : Arrangement des gènes *chu* d'*E. coli* O157:H7

Carte montrant le regroupement de gènes d'acquisition directe de l'hème chez *Escherichia coli* O157:H7. Les flèches de couleurs décrivent le début et la fin de chaque gène ainsi que le sens dans lequel ils sont transcrits. Les fonctions proposées pour chacun des gènes sont présentées dans la légende. Les chiffres indiquent le nombre d'acides aminés des protéines codées par ces gènes.

La protéine ChuA agit en tant que récepteur de l'hème à la membrane externe et elle est dépendante du système TonB. Sa fonction est de transporter l'hème extracellulaire jusqu'au périplasma. ChuA est absolument nécessaire à la croissance de cellules dans un milieu

ayant l'hème comme seule source de fer. De plus, la présence seule de ChuA et TonB est suffisante pour l'utilisation de l'hème par *Escherichia coli* [33]. Les fonctions des protéines ChuT, ChuU et ChuV sont déduites de la caractérisation d'homologues chez *S. dysenteriae* et *Y. enterocolitica* [15, 34-36]. ChuT est la protéine périplasmique qui transporte l'hème dans le périplasme jusqu'au transporteur ABC. Le transporteur ABC est formé par les protéines ChuU et ChuV qui transporte l'hème du périplasme au cytoplasme. ChuU est la protéine transmembranaire et ChuV est l'ATPase. Les structures des protéines ChuA, ChuT, ChuU et ChuV n'ont pas encore été obtenues. Toutefois, les structures de protéines homologues retrouvées chez *S. dysenteriae* et *Y. pestis* ont été caractérisées (Figure 6). Pour sa part, ChuS est une protéine cytoplasmique qui dégrade l'hème pour rendre le fer disponible à l'organisme [21]. Des études ont également démontré que son homologue chez *S. dysenteriae*, ShuS, est requis pour la capture de l'hème à partir du transporteur ABC, sinon la molécule d'hème n'est pas libérée [34].

Finalement, les protéines codées par les gènes *chuX*, *chuY* et *chuW* ont des fonctions inconnues et très peu d'études ont été réalisées sur celles-ci. Ces protéines font l'objet du présent mémoire. Les quelques connaissances que l'on a de chacune d'entre elles sont présentées aux sections 1.5, 1.6 et 1.7. À la Figure 5, on peut voir la présence d'un neuvième orf, ECSP4490, dont la fonction est complètement inconnue. Sa séquence ne correspond à aucune famille de protéine connue et il est absent de la majorité des voies d'acquisition de l'hème semblable à celle retrouvée chez *E. coli* O157:H7.

La régulation de l'expression des gènes *chu* est encore indéterminée, car très peu d'études de transcriptomique ont été effectuées. On sait toutefois que l'expression de l'ensemble des gènes *chu* chez une souche uropathogène (*E. coli* CFT073) est régulée à la hausse lorsque l'environnement est pauvre en fer. Les gènes *chuW*, *chuS* et *chuT* semblent être les plus touchés [37]. De plus, l'augmentation de l'expression des gènes *chuT*, *chuW*, *chuX* et *chuY* a été démontrée dans des macrophages humains infectés par *E. coli* O157:H7 [38].

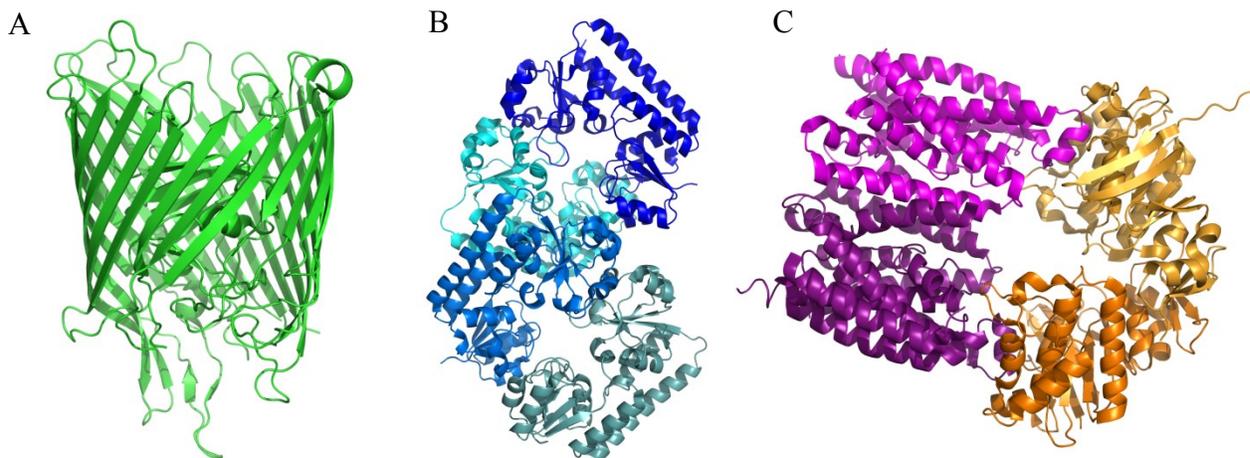


Figure 6 : La structure des protéines ShuA, ShuT et HmuUV

Représentation des protéines impliquées dans le transport de l'hème de la membrane externe jusqu'au cytoplasme dans une voie d'acquisition directe de l'hème. Structure du récepteur de l'hème de la membrane externe, la protéine ShuA de *S. dysenteriae*, représentée en vert (code PDB : 3FHH) (A). Structure tétramérique de la protéine périplasmique ShuT de *S. dysenteriae* représentée par différents tons de bleu (code PDB : 2RG7) (B). Structure du transporteur ABC, HmuUV, formé par les dimères des protéines HmuU (mauve) et HmuV (orange) de *Y. pestis* (code PDB : 4G1U) (C). Les protéines sont représentées avec le style en ruban. La figure a été réalisée avec le logiciel PyMOL.

Peu d'études se sont intéressées à l'analyse génomique du regroupement de gènes *chu*. Toutefois, l'analyse de la séquence de la voie homologue *shu* retrouvée chez *Shigella dysenteriae*, ayant 98% d'identité, donne une bonne idée de l'organisation des gènes. Un promoteur Fur est présent en amont du gène *shuA* [39]. Les promoteurs du type Fur font partie des régulateurs les plus communs pour les systèmes d'acquisition de l'hème. La transcription des gènes est régulée négativement par le fer. Ainsi, lorsque le fer est abondant dans la cellule, il y a répression de l'acquisition de l'hème [7]. Les gènes *shuA* et *shuS* sont séparés par 48 nucléotides dans lesquels on retrouve une séquence répétée inversée [35]. Des études ont également démontré que la présence d'un promoteur entre *shuA* et *shuS* serait probable, car la mutation de *shuA* par l'insertion d'un transposon n'affecte pas l'expression de ShuS [35, 39]. En amont de *shuA*, on retrouve la deuxième partie du regroupement de gènes qui sont transcrits dans le sens inverse. Les gènes *shuT*, *shuW*, *shuX* et *shuY* sont potentiellement transcrits et régulés par le même promoteur Fur qui est situé juste avant de *shuT*, il n'y a toutefois aucune évidence expérimentale à ce jour. Finalement, le gène *shuU* est séparé de *shuY* par 86 nucléotides qui contiennent une séquence répétée inversée qui pourrait agir comme régulateur transcriptionnel. De plus, un

promoteur présumé ainsi qu'une boîte Fur sont retrouvés dans cette région. Les gènes *shuU* et *shuV* seraient co-transcrits [35].

L'origine d'une telle voie d'acquisition de l'hème reste un mystère, car aucune séquence provenant d'un plasmide, d'un phage ou d'un élément transposable n'a été retrouvée aux alentours du regroupement de gènes ni d'un îlot de pathogénicité. Il y a toutefois présence d'une séquence identique de huit paires de base de chaque côté du regroupement de gènes *chu* dont la signification n'est pas encore connue. Le contenu en GC du regroupement de gènes est de 50%, ce qui est très similaire au taux de 51% retrouvé chez *Escherichia coli* et *Shigella dysenteriae* [35]. Cela indique donc que la voie d'acquisition de l'hème a été acquise il y a très longtemps ou encore qu'elle provient d'un organisme ayant un contenu en GC similaire. Les gènes auraient pu être acquis par transfert horizontal ou par recombinaison entre les espèces dans la nature [33].

1.4 La protéine ChuS

L'étude du génome d'*E. coli* O157:H7 a révélé l'absence d'un gène susceptible de coder pour une hème oxygénase classique, ce qui est étonnant vu la présence d'une voie d'acquisition de l'hème chez la bactérie. Le rôle de la protéine ChuS est présentement débattu dans la littérature scientifique. Contrairement à ses homologues, ShuS de *S. dysenteriae* et PhuS de *P. aeruginosa*, la protéine ChuS a été présentée comme une hème oxygénase même si sa structure tridimensionnelle diffère de celle des hèmes oxygénase classiques (normalement constituée entièrement d'hélices α) et que la réaction de dégradation de l'hème qu'elle catalyse n'est pas caractéristique à cette famille (*vide infra*) [17, 19, 40]. Certains chercheurs lient cette activité à une dégradation non spécifique de l'hème faite par le peroxyde d'hydrogène, appelée oxydation couplé [19, 41]. L'oxydation couplée réfère à l'oxydation de l'hème par la réaction de peroxyde d'hydrogène avec la forme réduite d'hème libre en solution ou lié à une protéine (ex. hémoglobine, myoglobine et autres protéines hémiques). Dans l'étude présente, basée sur les évidences de la haute réactivité de l'hème dans sa forme oxydée avec le peroxyde d'hydrogène tel que décrit par

les études du laboratoire Couture [21], nous proposons que le rôle de la protéine ChuS est de dégrader l'hème pour rendre le fer disponible à l'organisme.

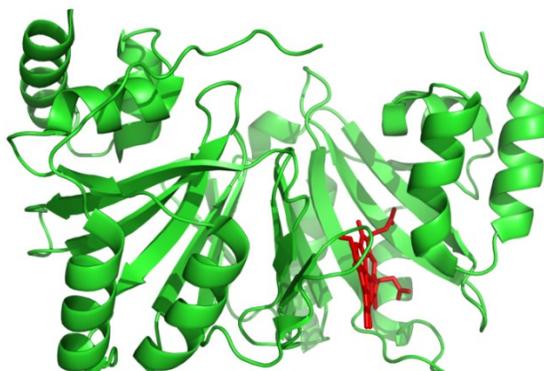


Figure 7 : La structure de la protéine ChuS

Structure de la protéine ChuS d'*E. coli* O157:H7 (code PDB : 4CDP) obtenue par cristallographie. La protéine est représentée avec le style ruban et la molécule d'hème présente en son site actif est représentée en rouge avec le style bâton. La figure a été réalisée avec le logiciel PyMOL.

Un modèle de la réaction de dégradation de l'hème de ChuS basé sur des études récentes du laboratoire Couture est présenté à la Figure 8 [21]. Les étapes principales du mécanisme de la réaction sont connues. La réaction est initiée par la réaction du complexe hème/ChuS avec le peroxyde d'hydrogène et les premières étapes sont similaires à celles de la réaction catalysée par les hèmes oxygénases. Il y aurait d'abord la formation très rapide d'un complexe Fe^3OOH . Celui-ci est trop instable pour être observé mais sa formation est proposée d'après les connaissances du mécanisme réactionnel des oxygénases de l'hème. Un des carbones méso est ensuite hydroxylé pour former de l'hydroxyhème. En présence d'oxygène, ce même carbone est remplacé par un atome d'oxygène, ce qui forme du verdohème. Les deux intermédiaires, hydroxyhème et verdohème, sont visualisés au même moment en spectroscopie optique et en RPE (résonance paramagnétique de l'électron). Par la suite, la réaction diffère de celle des hèmes oxygénase classiques. Le porphyrine de l'intermédiaire verdohème est clivé à deux carbones méso adjacents menant à la libération du fer et à la formation d'un monopyrrole (acide hématinique) et d'un tripyrrole [21]. De plus, des études ont démontré, que tout comme les hèmes oxygénase classique, il y avait libération de CO lors de la réaction [40].

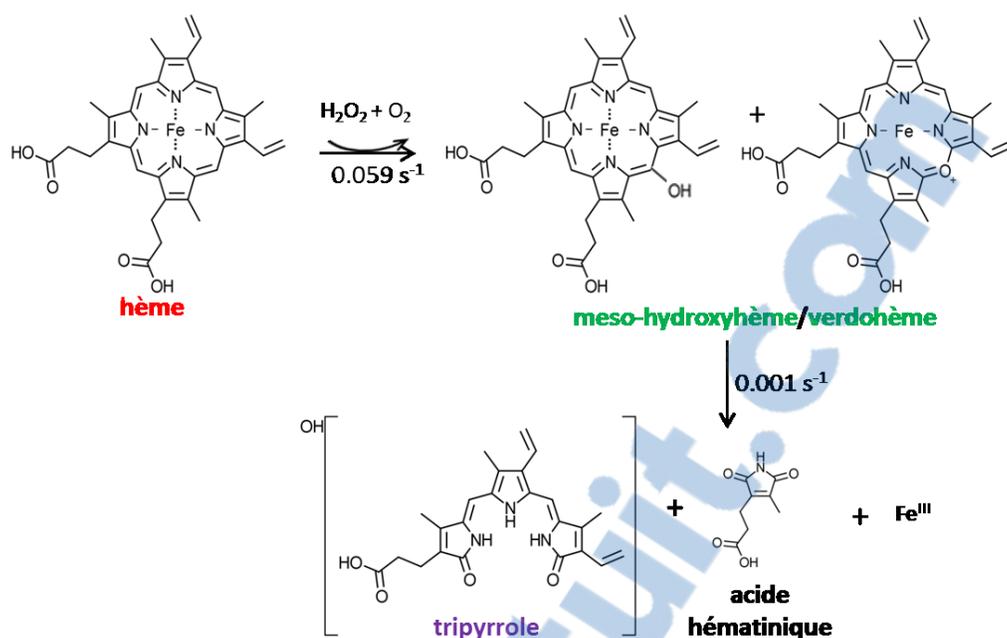


Figure 8 : Modèle de la réaction de dégradation de l'hème de la protéine ChuS

La réaction de dégradation de l'hème passe par l'intermédiaire méso-hydroxyhème/verdohème pour produire du fer libre, un tripyrrole et un acide hématinique. Les constantes de vitesse apparentes associées aux réactions sont connues. Le schéma montre une attaque initiale au carbone β du porphyrine, les attaques γ et δ sont aussi possibles.

À l'aide de la spectroscopie d'absorption de lumière, il est possible de suivre la réaction de dégradation de l'hème effectuée par ChuS (Figure 9). Lorsque le peroxyde d'hydrogène est ajouté à de l'holo-ChuS, on observe une baisse de l'intensité de la bande de Soret (410 nm) et une augmentation de l'absorbance dans la région visible (bande large entre 700-800 nm) causée par la formation des intermédiaires méso-hydroxyhème et verdohème. Cette réaction s'effectue en ~ 100 s. Ensuite, une seconde réaction plus lente s'effectue en ~ 60 min où l'absorbance de la bande entre 700-800 nm diminue tandis que celle à 565 nm augmente. Ce changement est attribué aux intermédiaire méso-hydroxyhème et verdohème lentement transformés en un tripyrrole caractérisé par une coloration mauve. Il est intéressant de noter qu'une coloration mauve est retrouvée lors de l'expression de la protéine ChuS recombinante chez *E. coli*, ce qui suggère que la protéine y est possiblement active *in vivo*. L'étude des cinétiques pré-stationnaires a permis de caractériser les constantes de vitesse associées aux différentes étapes de cette réaction [21]. Celles-ci sont notées dans le modèle de réaction présenté à la Figure 8.

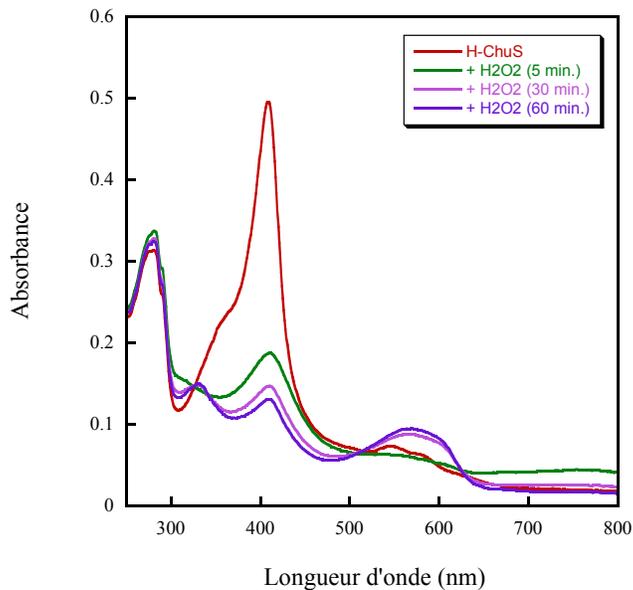


Figure 9 : Réaction de ChuS avec le peroxyde d'hydrogène

La réaction de dégradation de l'hème a été effectuée en ajoutant 10 μM de peroxyde d'hydrogène à 5 μM d'holo-ChuS dans du tampon 0.1 M NaPi pH 7. La réaction a été suivie au spectrophotomètre en enregistrant des spectres d'absorption (800-250 nm) à toutes les 5 minutes pendant 60 minutes à 20°C. Certains des spectres optiques enregistrés sont montrés.

1.5 La protéine ChuX

La recherche dans les banques de données de séquences à l'aide du logiciel BLAST a été effectuée sur la base de données du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Cette analyse suggère que ChuX appartient à la superfamille ChuX_HutX, qui a un rôle présumé, mais non défini, dans l'utilisation de l'hème. ChuX possède un haut pourcentage d'identité avec des protéines homologues codées par des gènes retrouvés dans les voies d'acquisition de l'hème de pathogènes humains tels que *S. dysenteriae* (ShuX), *C. freundii* (ShuX), *Y. enterocolitica* (CH37_3140), *V. cholerae* (HutX), *Photobacterium damsela* (HutX), *Listonella anguillarum* (HuvX) et plusieurs autres. De plus, d'autres homologues de ChuX sont également retrouvés dans des bactéries photosynthétiques non-pathogènes comme *Halorhodospira halophila* (42% d'identité avec ChuX) et *Rhodopseudomonas palustris* (40% d'identité avec ChuX). L'alignement de séquence de ChuX avec quelques-uns de ses homologues révèle la présence de plusieurs résidus hautement conservés (Figure 10).

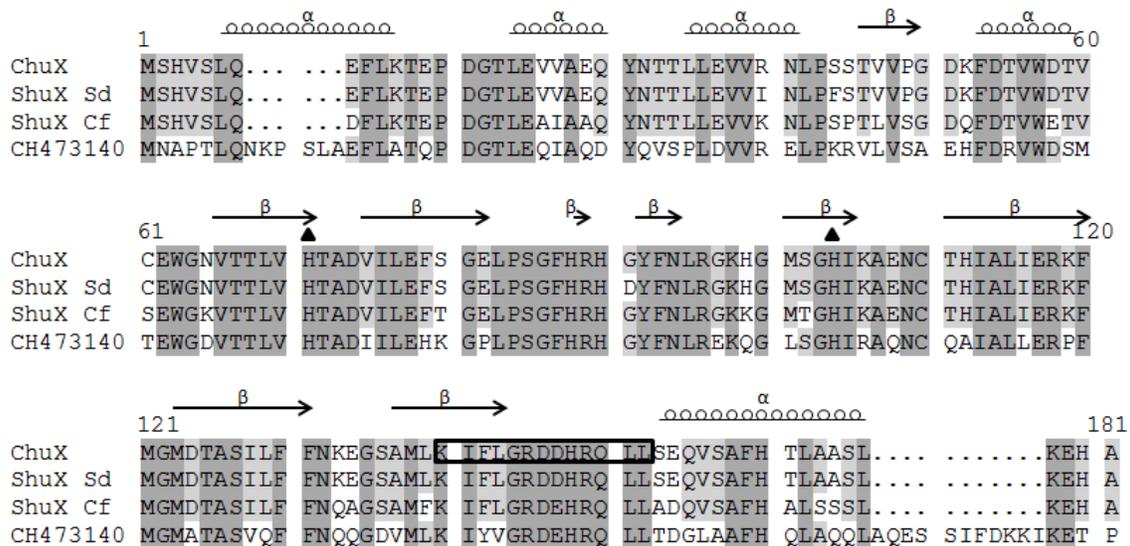


Figure 10 : Alignement de séquences de la protéine ChuX avec ses homologues

La séquence en acides aminés de la protéine ChuX de *Escherichia coli* O157:H7 EDL 933 (AAG58645.1) est alignée avec trois de ses homologues codées par des gènes de voie d'acquisition de l'hème : ShuX de *Shigella dysenteriae* (98%, AAC27814.1), ShuX de *Citrobacter freundii* (85%, AKL19917.1) et CH37_3140 de *Yersinia enterocolitica* (62%, AJI83441.1). Le pourcentage d'identité avec ChuX de chacun de ceux-ci est noté. Les résidus surlignés en gris foncé représentent des acides aminés parfaitement conservés entre les quatre séquences et ceux en gris pâle représentent des acides aminés conservés dans trois des quatre séquences. Les éléments de structures secondaires de la protéine ChuX sont représentés en haut des séquences. Les triangles indiquent les résidus histidine importants pour la coordination de l'hème. Les acides aminés importants pour la formation de dimères de la protéine ChuX sont encadrés. L'alignement de séquence a été réalisé à partir de MULTALIN (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>).

Les études précédentes faites sur ChuX ont démontré que l'apoprotéine forme un dimère de dimère en cristallographie et qu'elle est en mesure de lier l'hème dans un ratio 1:1 avec une constante d'affinité, K_d , de $1.99 \pm 0.02 \mu\text{M}$ [42]. Cela indique que chaque homodimère lie probablement deux molécules d'hème. Aucune activité enzymatique et aucune dégradation de l'hème n'ont été associées à cette protéine. Comme la structure de ChuX, ou d'un homologue, en complexe avec l'hème n'a pas encore été obtenue à ce jour, le rôle et le mécanisme d'utilisation de l'hème par cette famille de protéines restent un mystère. Les fonctions suivantes leur sont présentement attribuées : utilisation et transport de l'hème et rôle contre la toxicité de l'hème chez la bactérie.

La structure cristallographique de l'apo-ChuX a été élucidée (Figure 11). Les histidines H65 et H98 seraient importantes pour la coordination de l'hème, car la double mutation abolie la liaison. Deux sites de liaisons de l'hème ont été proposés selon les résultats obtenus par arrimage moléculaire. Il a aussi été déterminé que le segment d'acides aminés K134 à L145 aurait un rôle important pour la dimérisation de la protéine. De plus, la structure cristallographique d'apo-ChuX a révélé que les deux homodimères ne sont pas dimérisés selon la même organisation des domaines. L'étude propose que la flexibilité du mode de dimérisation faciliterait la liaison de l'hème dans la protéine [42]. Seulement trois structures de protéines de la superfamille ChuX_HutX sont présentement publiées : ChuX d'*E. coli* O157:H7, AGR_C_4470p de *A. tumefaciens* et Q6D2T7_ERWCT de *Erwinia carotovora*. Ces trois protéines forment des dimères qui, malgré une très basse identité de séquence (~15-20%), montrent un repliement similaire à celui des protéines ChuS et HemS de *Escherichia coli* et *Yersinia enterocolitica* (Figure 12). Cependant, le site de liaison de l'hème n'est pas conservé et semble différent chez les protéines de type ChuX appuyant la différenciation de leur fonction au cours de l'évolution. Certains proposent que ChuS et HemS auraient évolués par une duplication de gènes à partir des protéines ChuX et HemX [43].

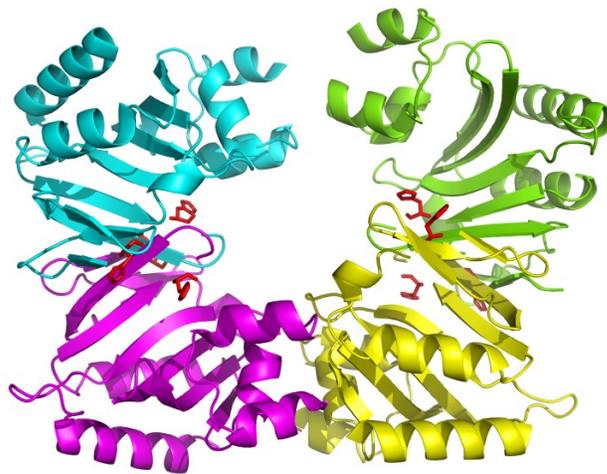


Figure 11 : Structure de la protéine ChuX

Structure de la protéine ChuX d'*E. coli* O157:H7 (code PDB : 2OVI) obtenue par cristallographie. Chacun des quatre monomères de ChuX formant deux paires d'homodimères est représentés par une couleur différente. La protéine est représentée avec le style ruban et les histidines importantes pour la coordination de l'hème (H65 et H98) sont indiquées en rouge avec le style bâton. La figure a été réalisée avec le logiciel PyMOL.

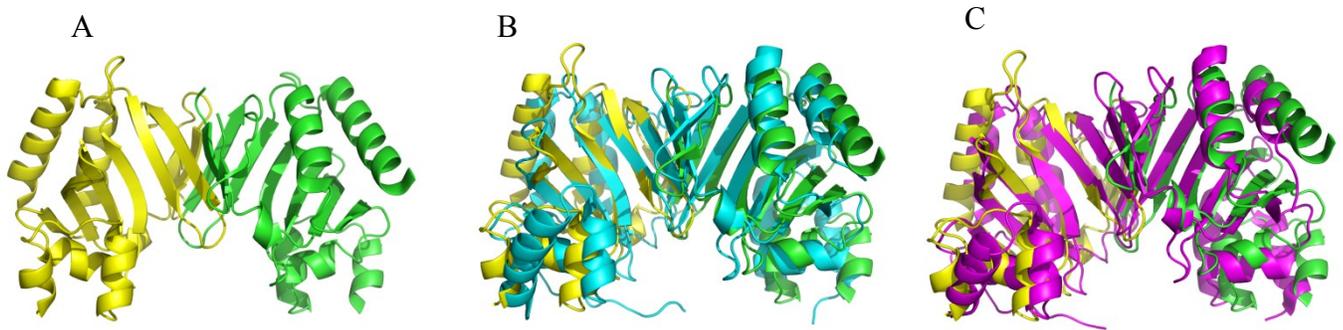


Figure 12 : Similarités de la structure de ChuX avec celle des protéines ChuS et HemS

Représentation schématique d'un dimère de la protéine ChuX d'*E. coli* O157:H7 (code PDB : 2OVI) (A). Les deux monomères sont colorés en jaune et en vert. Superposition de la structure du dimère de ChuX avec la protéine ChuS d'*E. coli* O157:H7 colorée en bleu (code PDB : 4CDP) (B). Superposition de la structure du dimère de ChuX avec la protéine HemS de *Y. enterocolitica* colorée en magenta (code PDB : 2J0P) (C). Les protéines sont représentées avec le style en ruban. La figure a été réalisée avec les logiciels WinCoot et PyMOL.

1.6 La protéine ChuY

La protéine ChuY fait partie de la famille des déshydrogénase/réductase à courtes chaînes (SDRs) catégorisées comme atypiques (selon NCBI Conserved Domains). Les SDRs sont reconnues pour couvrir un large éventail de fonctions métaboliques comme la biosynthèse d'hormones et de cofacteurs, l'oxydation/réduction d'alcools et d'aldéhydes et la détoxification de xénobiotiques. La superfamille des SDRs contient plus de 170 000 membres (UniProt) qui sont actifs sur une très grande gamme de substrats. Ce groupe d'enzymes est capable de catalyser un grand nombre de réactions (Figure 14). La majorité des SDRs ont une longueur d'environ 250 acides aminés. L'identité de séquence entre les membres de cette famille est très faible et varie entre 15 et 30%. Malgré une région C-terminale très variable, les structures tridimensionnelles des SDRs sont hautement similaires. Celles-ci contiennent un motif structural α/β appartenant à la famille du repliement de Rossmann, c'est-à-dire que la structure secondaire est une répétition de l'arrangement feuillet β -hélice α formant une structure tridimensionnelle les feuillets β contenant au centre et en périphérie les hélices α (Figure 13) [44]. Comparativement au SDRs classiques, la séquence conservée riche en glycine située en N-terminale et liant le NAD(P)(H), TGXXXGXG, est altérée chez les SDRs atypiques. De plus, le motif et les

acides aminés normalement conservés du site catalytique chez les SDRs, soit la tétrade catalytique N-S-YXXXK, sont variables ou manquants chez cette sous-famille (Tableau 1) [44-46].

Tableau 1 : Résidus ou motifs conservés chez les SDRs

Résidu ou Motif	Position approximative	Fonction
TGXXXGXG	12-19	Liaison NAD(P)(H), maintien du feuillet β central
D	60	Stabilisation de l'adénine, faible liaison au NAD(P)(H)
NNAG	86-89	Stabilisation du feuillet β central
N	111	Site actif
SYK	138, 151, 155	Site actif
N	179	Connexion de la boucle de liaison du substrat et site actif
PG	183-184	Interaction avec le NAD(P)(H)
T	188	Pont H avec le carboxamide du nicotinamide

Tableau tiré de [44].

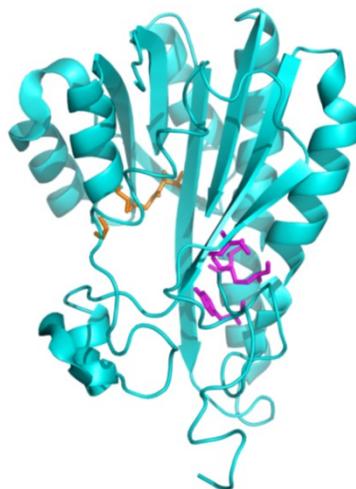


Figure 13 : Structure tridimensionnelle d'une SDR classique

Le repliement typique d'une SDR, repliement de Rossmann, consiste en un cœur de feuillets β (normalement 6 à 7) pris entre trois ou quatre hélices α de chaque côté [47]. La structure présentée est celle de la 3 α ,20 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (code PDB : 2HSD). La protéine est représentée avec le style en ruban. Les acides aminés importants pour la liaison du NAD, **TGXXXGXG**, sont représentés en couleur orange selon le style bâton. Les résidus du site actif, **N-S-YXXXK**, sont représentés en couleur magenta selon le style bâton. La figure a été réalisée avec le logiciel PyMOL.

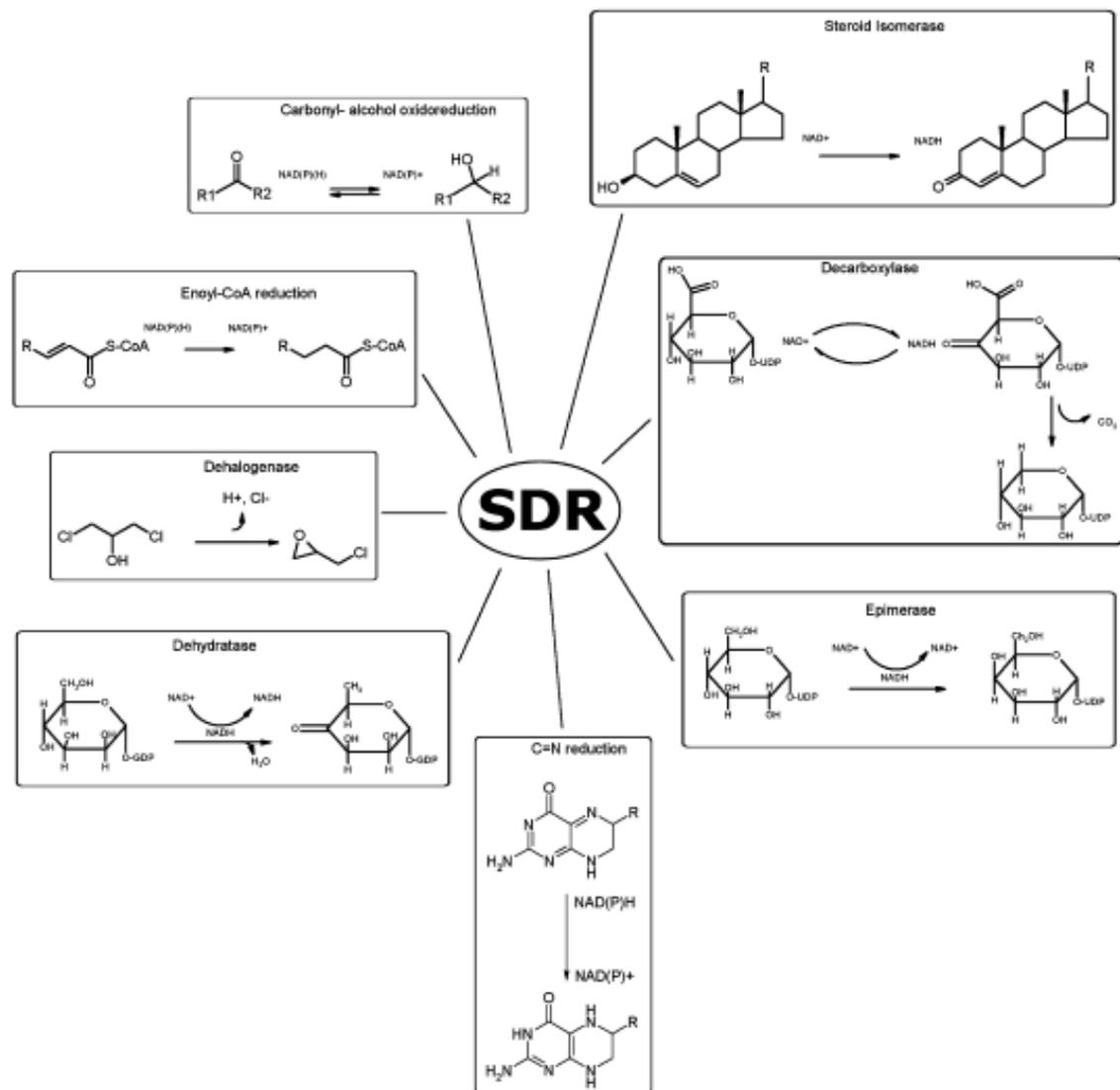


Figure 14 : Réactions catalysées par les SDRs

Les enzymes de la famille SDR sont capables de catalyser un grand nombre de réactions [45].

La perte d'activité enzymatique et le gain d'une fonction régulatrice ont été proposées pour les enzymes appartenant à la famille des SDRs atypiques [48, 49]. Certains membres des SDRs atypiques ont été caractérisés de façon exhaustive et ceux-ci adoptent aussi la structure tridimensionnelle conservée du repliement de Rossman. C'est le cas de la biliverdine IX beta réductase de l'humain qui réduit la biliverdine- β en bilirubine- β après la dégradation de l'hème, et du régulateur transcriptionnel NmrA de *Pseudomonas* qui

participe au système de répression des métabolites de l'azote chez les champignons (Figure 15) [50, 51]. Toutefois, à ce jour, la majorité des études effectuées sur ces enzymes décrivent seulement leur structure cristallographique et leurs fonctions restent inconnues. Aucune protéine homologue à ChuY, provenant de système d'acquisition de l'hème, n'a encore été caractérisée. La protéine ChuY et des homologues chez *Shigella dysenteriae* et de *Yersinia pestis* sont alignés à la Figure 16 avec Q94EG6.1 d'*Arabidopsis thaliana*, une SDR atypique ayant une structure connue. C'est celle qui présente le plus haut pourcentage d'identité par rapport à ChuY.

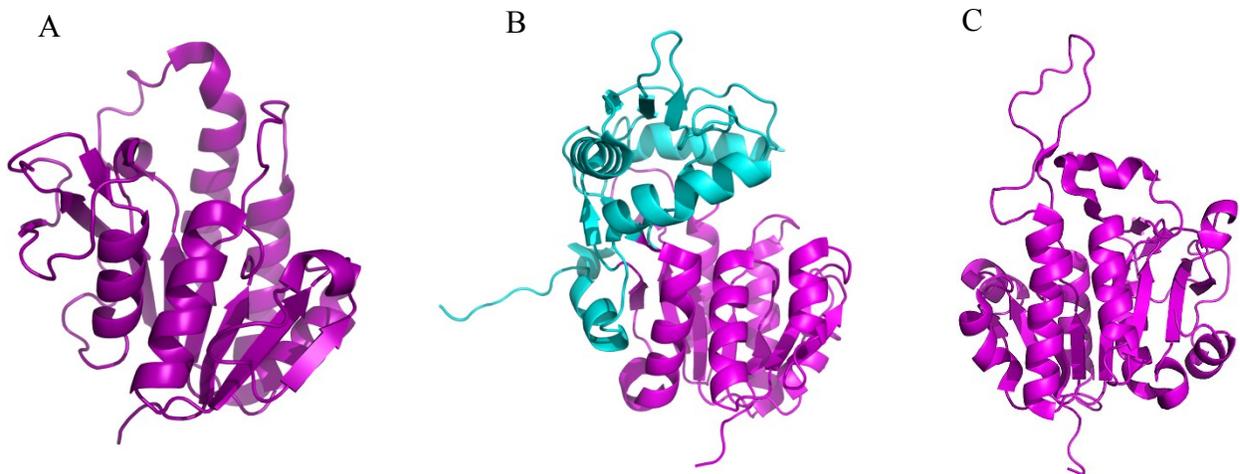


Figure 15 : Structures de SDRs atypiques

Les SDRs atypiques, tout comme les SDRs classiques, ont une structure tridimensionnelle conservée associée à la famille de repliement de Rossmann représentée en mauve. Structure de la biliverdine IX beta réductase de l'humain (code PDB : 1HDO) (A). Structure du régulateur transcriptionnel NmrA de *Pseudomonas* (code PDB : 1K6X) (B). Structure de la protéine Q94EG6.1 de *Arabidopsis thaliana* dont la fonction est inconnue (code PDB : 1XQ6) (C). Les protéines sont représentées avec le style en ruban. La figure a été réalisée avec le logiciel PyMOL.

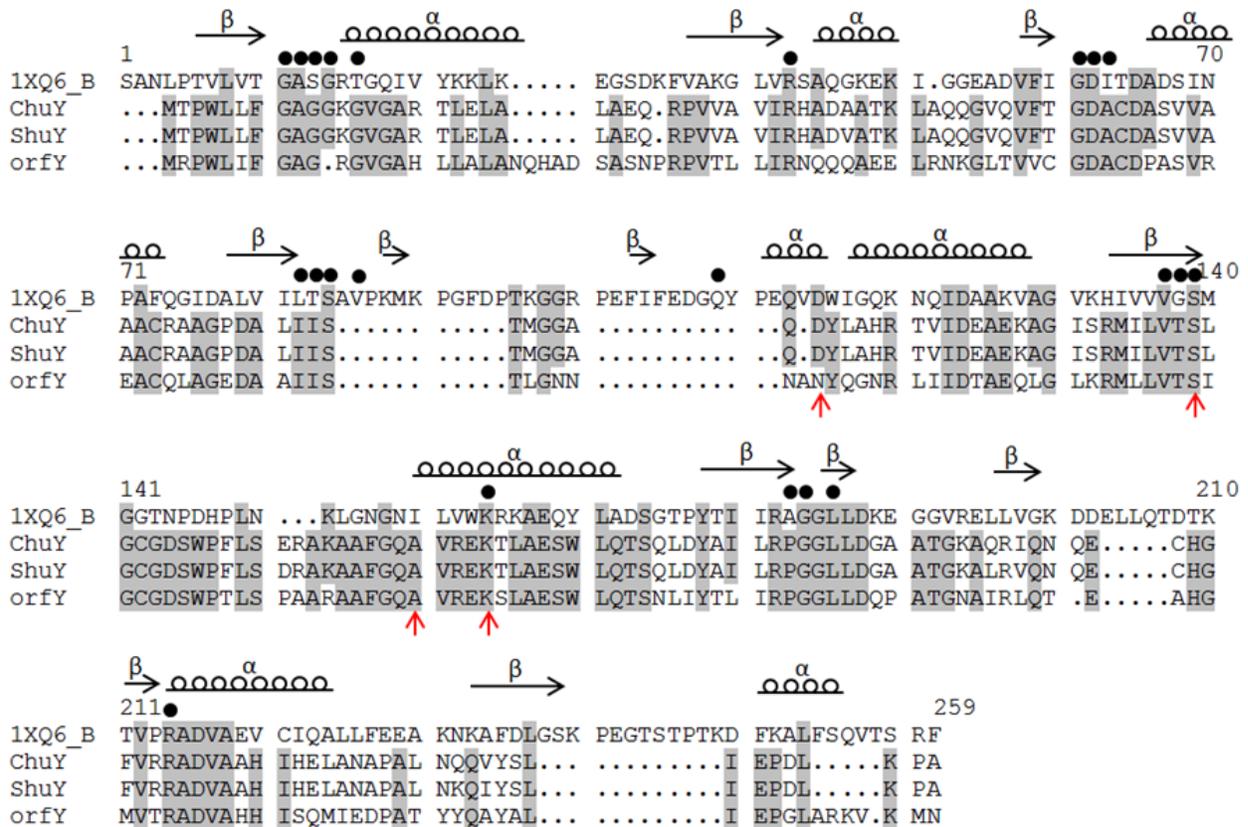


Figure 16 : Alignement de séquences de la protéine ChuY avec ses homologues appartenant à la famille des SDRs atypiques

La séquence en acides aminés de Q94EG6.1 de *Arabidopsis thaliana* (24%, code PDB : 1XQ6) et de trois protéines provenant de système d'acquisition de l'hème sont présentées : ChuY d'*Escherichia coli* O157:H7 EDL 933 (AAG58646.1), ShuY de *Shigella dysenteriae* (97%, ABB63524.1) et orfY de *Yersinia pestis* (54%, AAC64864.1). Le pourcentage d'identité avec ChuY de chacune de celles-ci est noté. Les résidus hautement conservés sont surlignés en gris. Les structures secondaires et les acides aminés impliqués dans la liaison du NADPH (cercles noirs) de la protéine 1XQ6_B sont représentés en haut des séquences. Les résidus proposés comme étant important pour le site actif des SDRs atypiques sont indiqués par des flèches rouges. Le motif du site actif, YXXXK, n'est conservé que partiellement chez ce sous-groupe de SDR. L'alignement de séquence a été réalisé à partir de MULTALIN (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>).

1.7 La protéine ChuW

Selon sa séquence primaire, la protéine ChuW fait partie de la famille des métalloenzymes à radical SAM (S-AdénosylMéthionine) (NCBI Conserved Domains). Les enzymes à radical SAM sont retrouvées dans les trois domaines de la vie (eucaryotes, bactéries et archaebactéries) et participent à plusieurs voies de biosynthèse comme celles de vitamines, de cofacteurs, de précurseurs d'ADN et d'antibiotiques. Malgré le large éventail de réactions qu'elles catalysent, les enzymes à radical SAM partagent toutes la présence d'un centre fer-soufre [4Fe-4S] non conventionnel caractérisé par une séquence conservée riche en cystéine, CXXXCXXC [52]. Le quatrième fer n'est pas coordonné par la protéine ce qui pourrait expliquer la grande variabilité du centre et la décomposition de celui-ci en [3Fe-4S] ou [2Fe-2S] [53]. Les premières étapes de réaction sont communes à toutes les enzymes à radical SAM (Figure 17). Le centre fer-soufre doit d'abord être réduit de l'état [4Fe-4S]²⁺ à [4Fe-4S]¹⁺ par un électron. Dans le cas de la coproporphyrinogène-III oxydase HemN d'*E. coli*, c'est la flavodoxine et son cofacteur (NADPH) qui permettent la réduction du centre fer-soufre. Une fois le centre fer-soufre réduit, [4Fe-4S]⁺, celui-ci transfère un électron au groupe sulfonium de la molécule SAM. La molécule SAM est clivée pour produire une méthionine et un radical hautement réactif, le 5'-déoxyadénosyl, qui est nécessaire à la modification du substrat [54]. À ce jour, très peu de membres de cette famille ont été caractérisés et aucune protéine homologue à ChuW n'a été étudiée.

La protéine ChuW possède des homologues provenant de voie d'acquisition de l'hème chez des pathogènes tels que *Shigella dysenteriae* (ShuW), *Citrobacter freundii* (HutW) et *Yersinia enterocolitica* (HutW) (Figure 19). La séquence du gène *shuW* de *S. dysenteriae* a 98% d'identité avec celle du gène *chuW*. Cependant, *shuW* contient un codon de terminaison prématuré au milieu de sa séquence qui rendrait la protéine non fonctionnelle [17]. Dans la littérature scientifique, les protéines de type ChuW sont souvent comparées à HemN d'*E. coli* avec qui elles partagent une faible identité de séquence (~20%). La protéine HemN est une coproporphyrinogène-III oxydase jouant un rôle indispensable dans la voie de biosynthèse de l'hème. Elle catalyse la conversion du coproporphyrinogène-III en protoporphyrinogène-IX (Figure 18). Les motifs importants et les acides aminés conservés chez HemN sont représentés à la Figure 19 [55]. On peut y voir qu'une partie de

ceux-ci sont aussi conservés chez les protéines de type ChuW. Cette homologie, quoique faible, suggère que la protéine ChuW aurait un rôle dans le métabolisme de l'hème. D'autres protéines de la famille des enzymes à radical SAM ne contenant pas la quatrième cystéine du centre fer-soufre ont également été étudiées. Ces études démontrent que les protéines HemW de *L. lactis* et Sll1917 de *Synechocystis* n'ont pas d'activité coproporphyrinogène-III oxidase contrairement à ce qui était supposé pour ces protéines [56, 57].

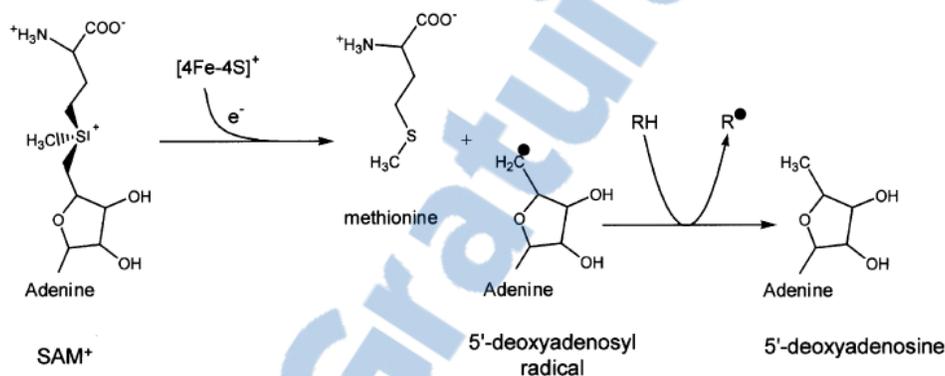


Figure 17 : Première étape de réaction commune à toutes les enzymes à radical SAM

Toutes les enzymes à radical SAM possèdent les mêmes premières étapes de réaction. Le centre fer-soufre [4Fe-4S]²⁺ est d'abord réduit par un donneur d'électron. Le centre fer-soufre réduit [4Fe-4S]⁺ transfère un électron au sulfonium de la molécule SAM (S-Adénosylméthionine). Le lien C5'-S⁺ est clivé, ce qui produit une méthionine et un radical, 5'-déoxyadénosyl. Ce radical modifiera le substrat [55].

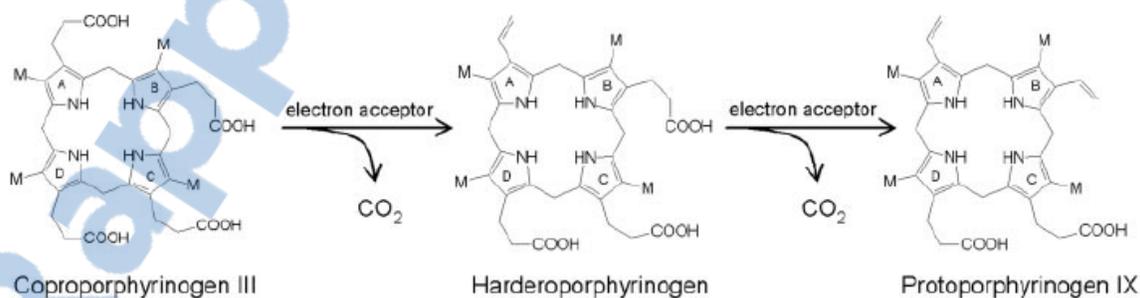


Figure 18 : Conversion du coproporphyrinogène-III en protoporphyrinogène-IX par HemN

La protéine HemN d'*E. coli* catalyse la décarboxylation oxydative du coproporphyrinogène-III en protoporphyrinogène-IX. Les propionates des cycles A et B sont convertis en groupements vinyles [58].

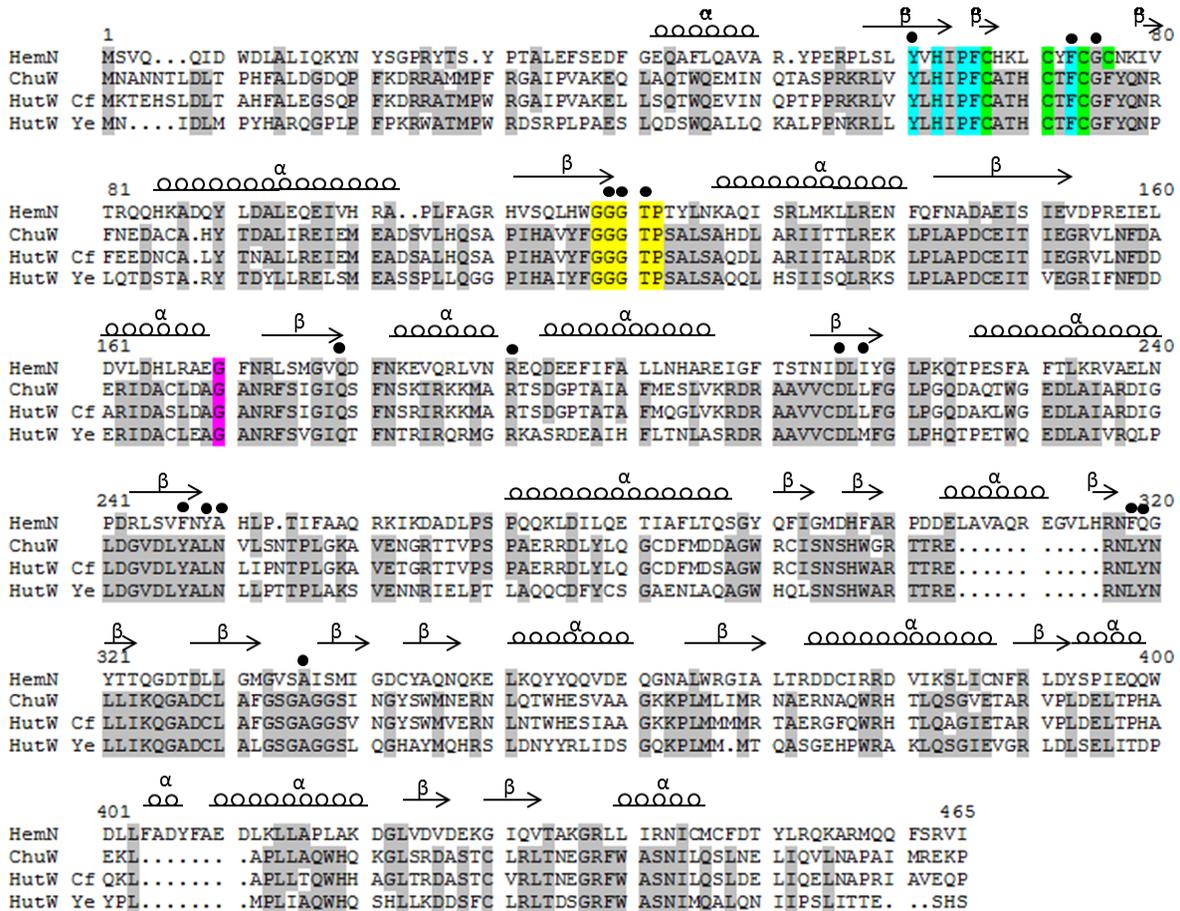


Figure 19 : Alignement de séquences de la protéine ChuW avec ses homologues appartenant à la famille des enzymes à radical SAM

La séquence en acides aminés de HemN de *Escherichia coli* K-12 (22%, code PDB : 1OLT) et de trois protéines provenant de voies permettant l'acquisition de l'hème sont présentées : ChuW d'*Escherichia coli* O157:H7 (AAG58644.1), HutW de *Citrobacter freundii* (85%, ALD76334.1) et HutW de *Yersinia enterocolitica* (59%, AJI81854.1). Le pourcentage d'identité avec ChuX de chacune de celles-ci est noté. Les résidus surlignés en gris représentent des similarités complètes ou partielles entre un minimum de trois séquences sur quatre. Les structures secondaires et les acides aminés impliqués dans la liaison des molécules SAM (cercles noirs) de la protéine HemN sont représentés en haut des séquences. Le motif conservé CXXXCXXCXC, surligné en vert, est responsable de la formation du centre fer-soufre. La séquence YXHXPF CXXXCF C, surlignée en bleu, a un rôle présumé dans la catalyse en stabilisant le radical du centre fer-soufre. Le motif surligné en jaune, GGGTP, serait en principe le site actif pour la molécule SAM. Le résidu glycine, surligné en rose, est conservé et est impliqué dans la liaison du cofacteur SAM. L'alignement de séquence a été réalisé à partir de MULTALIN (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>).

1.8 Objectifs spécifiques

La voie d'acquisition de l'hème chez *Escherichia coli* O157:H7 contient huit gènes. Quatre des gènes du regroupement *chu* codent pour des protéines nécessaires à la capture et au transport de l'hème : ChuA, ChuT, ChuU et ChuV [15]. Une cinquième protéine, ChuS, dégrade l'hème en ouvrant le porphyrine pour rendre le fer disponible à l'organisme [21, 59]. Il y a ainsi trois gènes auxquels peu d'attention a été portée soit *chuX*, *chuY* et *chuW*. Ce projet de maîtrise vise à caractériser ces trois protéines afin de mieux comprendre leurs rôles respectifs dans cette voie d'acquisition.

Notre première hypothèse est que la protéine ChuX pourrait transférer de l'hème à la protéine ChuS pour que celle-ci assure sa dégradation. Dans ce sens, ChuX agirait comme protéine d'entreposage pour l'hème, empêchant ainsi que sa toxicité affecte la bactérie. Deuxièmement, la protéine ChuY pourrait agir comme réductase et réduire le produit de dégradation de l'hème fait par ChuS, soit un tripyrrole, en utilisant le NAD(P)H. Cette hypothèse est basée sur le fait que chez les hèmes oxygénase, la biliverdine réductase réduit le produit de dégradation de l'hème, la biliverdine, en bilirubine. Finalement, la protéine ChuW n'aurait pas l'activité enzymatique qui lui est attribuée selon la littérature, soit une activité coproporphyrinogène-III oxidase, car la présence d'une enzyme faisant partie de la voie de synthèse de l'hème dans une voie catabolique visant sa dégradation serait surprenante. Notre hypothèse est que ChuW pourrait plutôt transformer l'hème ou ses produits de dégradation.

Les objectifs spécifiques de ce projet sont donc de :

- Cloner les gènes *chuX*, *chuY* et *chuW* dans des vecteurs d'expression et purifier les protéines
- Caractériser l'activité de ces protéines en se basant sur les prédictions faites selon les analyses bio-informatiques des séquences primaires
- Mettre en évidence de possibles interactions entre ces protéines (complexes protéines-protéines).

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

2.1 Matériel

2.1.1 Vecteurs pour le clonage et la production des protéines

Les différents vecteurs et les souches d'*Escherichia coli* utilisés pour les expériences présentées dans ce mémoire sont présentés dans les Tableaux 2 et 3. L'expression des gènes chez les plasmides pASK-IBA3+ et pASK-IBA5+ est régulée par le promoteur *tet* qui est reconnu par l'ARN polymérase de *E. coli*. La répression du promoteur est levée par l'ajout d'AHT (anhydrotétracycline), démarrant ainsi l'expression du gène cloné. Le promoteur *tet* n'est couplé à aucun autre mécanisme de régulation cellulaire, il n'y a donc aucune restriction quant à la souche ou le milieu de culture pouvant être utilisés. Chez les vecteurs pET, on retrouve le promoteur T7 qui n'est pas reconnu par l'ARN polymérase de *E. coli*. Pour permettre la transcription du gène cloné, les cellules compétentes utilisées doivent contenir le lysogène DE3 qui code pour l'ARN polymérase du phage T7. L'expression de cette polymérase est sous le contrôle d'un promoteur lac, qui est inductible par la présence d'IPTG (isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside) dans le milieu.

Tableau 2 : Vecteurs utilisés pour le clonage des gènes et permettant l'expression de protéines recombinantes

Nom du plasmide	Gène de résistance	Étiquette	Remarques
pASK-IBA5+	Ampicilline	N-terminale Streptag	Promoteur <i>tet</i> inductible par l'anhydrotétracycline.
pASK-IBA3+	Ampicilline	C-terminale Streptag	Promoteur <i>tet</i> inductible par l'anhydrotétracycline.
pET-15b	Ampicilline	N-terminale Histidine	Promoteur T7 et ARN polymérase du phage T7 inductibles par IPTG.

Tableau 3 : Souches d'*Escherichia coli* utilisées pour le clonage de gènes et l'expression des protéines

Souche	Profil génétique	Protocole pour rendre les cellules compétentes
NEB-5-alpha (Chimiocompétentes)	Cette souche augmente la stabilité ainsi que le nombre de copies du plasmide et améliore la qualité de l'ADN purifié.	Cellules achetées sous forme compétente de la compagnie New England Biolabs (NEB)
BL21 (DE3) (Électrocompétentes)	Cette souche est utilisée pour l'expression des protéines. Le gène de l'ARN polymérase du phage T7 est intégré à son chromosome.	Tiré de MicroPulser™ Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide, Bio-Rad
Rosetta 2 (DE3) (Électrocompétentes)	Cette souche est dérivée de BL21 (DE3). Elle contient les gènes codant pour sept ARNt rares : AUG, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA et CGG.	Tiré de MicroPulser™ Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide, Bio-Rad

2.1.2 Principaux composés chimiques utilisés

Le NADPH, le NADH, l'hémine, la pyridine, la d-desthiobiotine, le chloramphénicol, le dithionite de sodium, la biliverdine, le ferrocyanide de potassium, l'ABTS et le sulfate de nickel ont été obtenus chez la compagnie Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). L'imidazole et le SDS ont été commandés chez Fischer Scientific (Ottawa, Ontario, Canada). L'IPTG et l'ampicilline proviennent de la compagnie Bio Basic (Markham, Ontario, Canada). Le peroxyde d'hydrogène et le chlorure de fer viennent de BDH (VWR, Ville Mont-Royal, Québec, Canada). L'urée a été obtenue de Invitrogen (Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). Finalement, l'anhydrotétracycline a été commandé chez la compagnie IBA (Goettingen, Allemagne).

2.1.3 Solutions

La composition des différents milieux de culture et des solutions utilisés pour les études présentées dans ce mémoire sont décrites dans le Tableau 18 placé en Annexe.

2.2 Amplification par PCR des gènes *chuX*, *chuY* et *chuW*

Les régions codantes des trois gènes ont été amplifiées par PCR à partir de l'ADN génomique provenant d'un lysat d'*E. coli* O157 : H7 (EDL933) gracieusement fourni par le laboratoire du Dr Steve Charrette (Université Laval, Québec). Les amorces servant au clonage dans le plasmide pASK-IBA5+ ne contiennent pas le codon de la première méthionine de la séquence native des gènes. Pour le clonage du gène *chuW* dans pASK-IBA3+, l'amorce en aval du gène remplace la proline terminale de la séquence native du gène et le codon stop par la séquence « ASA » afin que la séquence soit en phase avec l'étiquette C-terminale. Les réactions d'amplification ont été faites avec la polymérase à haute-fidélité Fast-Pfu (Feldan) et les cycles ont été effectués en suivant les recommandations du fabricant : 94°C, 5 minutes suivi de 5 cycles de 94°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 72°C, 60 sec et 25 cycles additionnels de 94°C, 30 sec; 72°C, 30 sec; 72°C, 10 minutes. Le milieu réactionnel contenait des concentrations finales de 0.2 mM de désoxynucléosides triphosphates, tampon Fast-Pfu 1X, Band Sharpener 1X, 0.8 µM d'amorces, 1.25 U de la polymérase Fast-Pfu et 5 µL de lysat d'*E. coli* O157 : H7 (EDL933). Pour optimiser les conditions PCR, la solution de Band Sharpener 5X fournie avec la polymérase a été ajoutée aux mélanges de réactions à une concentration finale de 0.5X pour contrer les problèmes de contenu en GC trop élevé et de formation de structures secondaires. Le site de restriction *BsaI* a été intégré aux amorces pour faciliter le clonage. Les amorces utilisées ont été produites par la compagnie Integrated DNA Technologies (IDT) et sont décrites dans les Tableaux 4 et 5. Les produits d'amplification ont été déposés sur gel d'agarose 0.8% et visualisés à l'aide d'un marqueur fluorescent (EZ-vision, Amresco) afin de vérifier le succès de l'amplification. La séparation électrophorétique a été effectuée dans du tampon TAE 1X à 75 mA pendant 55 minutes à température pièce.

Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR des gènes *chuX*, *chuY* et *chuW* servant au clonage dans pASK-IBA5+

<i>chuX</i>	Brin codant	5'-TTATCTGGTCTCAGCGCCAGCCATGTCTCGTTACA-3'
	Brin anti-codant	5'-TGATGAGGTCTCATATCTCAGGCGTGTTCCTTTAAC-3'
<i>chuY</i>	Brin codant	5'-TTATCTGGTCTCAGCGCCACGCCGTGGCTACTCTTTG-3'
	Brin anti-codant	5'-TGATGAGGTCTCATATCTCACGCCGGTTTCAGGTC-3'
<i>chuW</i>	Brin codant	5'-TTATCTGGTCTCAGCGCCAACGCAAATAACACCCT-3'
	Brin anti-codant	5'-TGATGAGGTCTCATATCTTATGGTTTTTCACGCATAAT-3'

Tableau 5 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR du gène *chuW* servant au clonage dans pASK-IBA3+

<i>chuW</i>	Brin codant	5'-TGATGAGGTCTCAGCGCTTGCTTTTTTCACGCATAATCGCTGG-3'
	Brin anti-codant	5'-TTATCTGGTCTCAAATGATGAACGCAAATAACACCCTGG-3'

2.3 Clonage des gènes

2.3.1 Clonage des gènes *chuX*, *chuY* et *chuW* dans les vecteurs pASK-IBA

Les gènes amplifiés ont été purifiés à l'aide de la trousse PCR Purification Kit (Feldan) et ont été ensuite digérés avec l'enzyme de restriction *BsaI* (NEB). Les amplicons ont été repurifiés avec la même trousse dans le but d'enlever les fragments de nucléotides issus de cette digestion et pour empêcher qu'ils ne se lient de nouveau lors de l'opération de ligation. Les amplicons digérés et purifiés ont été dosés à l'aide d'un NanoDrop (ThermoScientific) disponible au service de séquençage de l'IBIS. Les plasmides pASK-IBA5+ et pASK-IBA3+ ont été préalablement digérés avec l'enzyme *BsaI* (NEB) et purifiés sur gel d'agarose 1% à bas point de fusion avec la trousse Gel Extraction Kit (Feldan) avant la ligation. À l'aide de l'enzyme T4 ligase (Invitrogen), chacun des trois gènes a été lié dans le plasmide pASK-IBA5+ et le gène *chuW* a aussi été lié dans le plasmide pASK-IBA3+. Le ratio molaire 3:1 (insert:vecteur) a été utilisé pour la ligation. Ainsi, pour les gènes ayant été clonés dans le vecteur pASK-IBA5+, la séquence N-terminale des protéines contient une étiquette streptag (MASWSHPQFEKGA) suivie du deuxième acide aminé de leur séquence native. Pour le gène *chuW* ayant été cloné dans le vecteur pASK-IBA3+, la proline et le codon stop de la séquence C-terminale de la protéine ont été remplacés par une alanine suivie d'une sérine, d'une alanine et d'une étiquette streptag (MASWSHPQFEKGA) provenant du plasmide.

2.3.2 Clonage des gènes *chuX* et *chuS* dans le vecteur *pET15b*

Les plasmides *pET15b/chuX* et *pET15b/chuS* proviennent d'études précédentes faites par M. D Suits alors qu'il était étudiant dans le laboratoire du Prof. Zongchao Jia [40, 42]. Ces plasmides contenant les gènes *chuX* et *chuS* fusionnés à une étiquette histidine positionnée en N-terminale ont été obtenus du Dr Zongchao Jia (Université Queen's, Ontario). Ces gènes sont clonés dans le vecteur d'expression *pET15b* entre les sites de restriction *NcoI* et *BamHI*. Les séquences N-terminales des protéines issues de ce clonage contiennent donc six résidus histidines suivis d'une glycine, d'une sérine et de la séquence native de leur gène.

2.4 Purification et séquençage des clones

La souche *E. coli* NEB-5-alpha (NEB) a été utilisée pour la transformation de cellules chimiocompétentes avec les différents clones provenant des réactions de ligation afin de purifier les plasmides. La transformation a été effectuée en ajoutant le milieu de ligation contenant 80 ng de plasmides à la suspension de cellules. Après avoir incubé le mélange sur la glace pendant 30 minutes, les plasmides sont insérés dans *E. coli* par un choc thermique de 45 secondes à 42°C. Les bactéries ont été incubées cinq minutes supplémentaires sur glace. Ensuite, un volume de 950 µL de SOC a été ajouté à la suspension qui a été incubée à 37°C pendant une heure, sous agitation à 250 rpm. Les cellules transformées ont été étalées sur gélose LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline et incubées toute une nuit à 37°C. Une colonie a été choisie pour inoculer 25 mL de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline. La culture a été incubée à 37°C pendant toute une nuit avec mouvement de 250 rpm. Pour purifier les plasmides, les trousseaux Plasmid DNA Extraction Maxiprep et Miniprep Kit (Feldan) ont été utilisées. Les plasmides purifiés ont été dosés au NanoDrop (ThermoScientific). Pour vérifier leur pureté, ils ont été déposés sur gel d'agarose 0.8% et visualisés à l'aide d'un marqueur fluorescent (EZ-vision, Amresco). Les plasmides ont été séquencés par la méthode de Sanger à la Plate-forme d'Analyse Génomique (PAG) de l'Université Laval. Les séquences obtenues ont été comparées avec celles des gènes publiés dans la banque de donnée du « National Center for Biotechnology Information ». (NCBI) à l'aide du logiciel Clone Manager Suite 7.

2.5 Surexpression des protéines

2.5.1 Transformation par électroporation

Des cellules électrocompétentes de la souche appropriée d'*E. coli* (Tableaux 6 et 7) ont été transformées par électroporation avec les différents clones pour permettre l'expression des protéines. La transformation a été effectuée en ajoutant 30 ng de plasmides à la suspension cellulaire. Les cellules ont été incubées deux minutes sur la glace et transférées dans une cuvette d'électroporation de 0.1 cm (Bio-Rad) froide en s'assurant qu'il n'y ait pas de bulles et de condensation. La cuvette a ensuite été placée dans la chambre d'électroporation de l'appareil MicroPulser™ Electroporator (Bio-Rad) et pulsée une fois à 1.8 kV, 200 OHMS et 25 μ FD. Immédiatement après le choc électrique, un volume de 960 μ L de SOC a été ajouté à la cuvette afin de resuspendre les cellules. La suspension bactérienne a été transférée dans un tube stérile de 1.5 mL et incubée à 37°C pendant une heure, sous agitation de 250 rpm. Les cellules transformées ont été étalées sur gélose LB contenant le ou les antibiotiques approprié(s) (Tableaux 6 et 7) et incubées toute une nuit à 37°C.

2.5.2 Cultures bactériennes et induction de l'expression protéique

Les diverses conditions utilisées pour l'expression de chaque protéine sont présentées dans le Tableaux 6 et 7. À partir de l'étape de transformation, deux colonies isolées ont été sélectionnées pour inoculer une préculture de 20 mL de milieu LB supplémenté avec l'antibiotique. Cette préculture a été incubée à 37°C avec agitation de 250 rpm pendant toute une nuit. Le lendemain, un volume de 5 mL de la préculture a été utilisé pour inoculer un litre de milieu TB contenant le ou les antibiotiques. Lorsque la culture a atteint une densité optique entre 0.6 et 0.8 à 600 nm (mesuré avec un spectrophotomètre Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech), l'expression des protéines a été induite avec l'agent inducteur approprié. Une fois l'induction commencée, le milieu de culture a été incubé à la température d'induction sous agitation de 250 rpm jusqu'au lendemain.

2.5.3 Extraction des protéines totales pour l'analyse d'expression

Des tests d'expression des protéines dans diverses conditions ont été faits au préalable pour s'assurer de l'expression de la protéine désirée et de la solubilité de celle-ci. Tout d'abord, un volume de 5 mL des cultures bactériennes a été centrifugé pendant dix minutes à 7 000 x g. Le culot a été resuspendu dans 1 mL de tampon de resuspension (Tableaux 6 et 7). À partir de la suspension cellulaire, les protéines totales et les protéines solubles et insolubles ont été extraites. Pour l'extraction des protéines totales, 100 µL de la suspension cellulaire a été prélevé et a été centrifugé à 10 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot résultant a été resuspendu dans 200 µL de tampon d'échantillon 1X. Pour l'extraction des protéines solubles et insolubles, 100 µL de tampon de lyse (Fast Break Reagent Cell Lysis 10X, Promega) a été ajouté au reste de la suspension cellulaire. Le mélange a été incubé à température pièce pendant 15 minutes sous agitation de 225 rpm. Après incubation, 100 µL a été prélevé du lysat cellulaire. L'aliquote a été centrifugé à 10 000 x g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant (protéines solubles) a été mélangé à 100 µL de tampon d'échantillon 2X. Le culot (protéines insolubles) a été resuspendu dans 200 µL de tampon d'échantillon 1X. Tous les échantillons ont ensuite été déposés sur SDS-PAGE (méthode section 2.6.4) pour observer le profil d'expression des protéines.

2.5.4 Bris de cellules pour la purification de protéines

Des cultures bactériennes d'un litre ont été séparées également dans quatre bouteilles et ont été récoltées par centrifugation à 4 225 x g (rotor GS-3, Sorval) pendant 15 minutes à 4°C. Chacun des culots a été resuspendu dans 5 mL de tampon de resuspension. Les cellules ont ensuite été lysées à l'aide de l'appareil homogénéisateur Emulsiflex-C3 (Avestin) à une pression de 15 000 PSI. Le lysat a été centrifugé à 17 500 x g (rotor SA-600, Sorval) pendant 30 minutes à 4°C. Pour les protéines ChuX_{N-Strep}, ChuX_{N-His}, ChuY_{N-Strep} et ChuS_{N-His}, le surnageant contenant les protéines solubles a été placé dans des tubes de 50 mL et a été utilisé pour la purification. Comme les protéines ChuW_{N-Strep} et ChuW_{C-Strep} sont insolubles, le surnageant a été jeté et le culot a été resuspendu dans un tampon contenant 8 M d'urée (section 2.5.5).

Tableau 6 : Conditions utilisées pour la surexpression des protéines ChuX et ChuY

Protéine	ChuX _{N-Strep}	ChuX _{N-His}	ChuY _{N-Strep}
Clone	pASK-IBA5+/chuX	pET15b/chuX	pASK-IBA5+/chuY
Étiquette	Streptag N-terminale	Histidine N-terminale	Streptag N-terminale
Souche <i>E. coli</i> utilisée	Rosetta 2 (DE3)	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)
Antibiotique	100 µg/mL Amp + 34 µg/mL Cam	100 µg/mL Amp	100 µg/mL Amp
Agent inducteur	1.2 µg/mL* AHT	0.4 mM IPTG	0.2 µg/mL AHT
Température d'induction	37°C	37°C	30°C
Tampon de resuspension	50 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 50 µM EDTA + 1 mM PMSF	50 mM NaPi pH 8 + 300 mM NaCl + 0.1% Triton X-100	100 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 1 mM EDTA + 1 mM PMSF

* Plus d'agent inducteur, que ce qui est normalement recommandé par le fabricant, a été utilisé pour l'amélioration de l'expression de ChuX_{N-Strep}.

Tableau 7 : Conditions utilisées pour la surexpression des protéines ChuW et ChuS

Protéine	ChuW _{N-Strep}	ChuW _{C-Strep}	ChuS _{N-His}
Clone	pASK-IBA5+/chuW	pASK-IBA3+/chuW	pET15b/chuS
Étiquette	Streptag N-terminale	Streptag C-terminale	Histidine N-terminale
Souche <i>E. coli</i> utilisée	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)
Antibiotique	100 µg/mL Amp	100 µg/mL Amp	100 µg/mL Amp
Agent inducteur	0.2 µg/mL AHT	0.2 µg/mL AHT	0.4 mM IPTG
Température d'induction	30°C	30°C	30°C
Tampon de resuspension	50 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 50 µM EDTA + 1 mM PMSF	50 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 50 µM EDTA + 1 mM PMSF	50 mM NaPi pH 8 + 300 mM NaCl + 0.1% Triton X-100

2.5.5 Méthode de solubilisation en conditions dénaturantes de *ChuW*

Pour les protéines *ChuW*_{N-Strep} et *ChuW*_{C-Strep}, les culots des lyses cellulaires ont été resuspendus dans 10 mL du tampon de resuspension (Tableau 7) contenant 8 M d'urée par agitation et à l'abri de la lumière pendant 30 minutes à température pièce. Le mélange a ensuite été centrifugé à 31 000 x g (rotor SLA-1000, Sorval) durant dix minutes à 4°C. Les surnageants contenant les protéines *ChuW* solubilisées dans l'urée ont été dialysés à 4°C de façon séquentielle à l'aide d'une membrane à dialyse (10 kDa MWCO, VWR) contre 0.5 litre des tampons retrouvés au Tableau 8. Après la dialyse, le contenu des sacs a été centrifugé à 17 500 x g (rotor SA-600, Sorval) pendant 30 minutes à 4°C et le surnageant a été utilisé pour une purification par chromatographie d'affinité.

Tableau 8 : Tampons utilisés pour la dialyse séquentielle de *ChuW*

Étape	Tampons
1	50 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 50 µM EDTA + 6 M Urée + 10% glycérol
2	50 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 50 µM EDTA + 4 M Urée + 10% glycérol
3	50 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 50 µM EDTA + 2 M Urée + 10% glycérol
4	50 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 50 µM EDTA + 1 M Urée + 10% glycérol
5	50 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 50 µM EDTA + 0.5 M Urée + 10% glycérol
6	50 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 50 µM EDTA + 10% glycérol
7	50 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 50 µM EDTA

Des essais ont aussi été effectués avec l'ajout de 1 mM DTT aux tampons.

2.6 Purification des protéines

2.6.1 Chromatographie d'affinité sur résine couplée à la streptavidine

Les protéines ayant une étiquette streptag ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne StrepTrap HP (GE Healthcare, 5 mL) couplée à un FPLC (ÄKTA, Amersham Pharmacia Biotech). Comme la colonne a une capacité maximale de liaison de 6 mg/mL, plusieurs séquences de purification ont été faites avec un même échantillon de protéines solubles. La colonne a d'abord été lavée avec cinq volumes d'eau bi-distillée et équilibrée avec cinq volumes de tampon de purification (Tableau 9). Après le dépôt des protéines solubles sur la colonne (~7 mL), celle-ci a été lavée avec cinq à dix volumes de tampon de purification jusqu'à ce que la ligne de base reste stable. Les protéines ont été éluées avec quatre volumes de tampon d'éluion. Celui-ci a la même composition que le tampon de purification avec l'ajout de 2.5 mM de d-desthiobiotine (Sigma). La d-desthiobiotine se lie à la résine, créant ainsi une compétition de liaison qui déloge la protéine d'intérêt liée à la résine. Les aliquotes prélevées lors de l'éluion et ayant les niveaux d'absorbance les plus élevés ont été sélectionnées et dialysées quatre fois à l'aide d'une membrane à dialyse (10 kDa MWCO, VWR) contre deux litres du tampon désiré (Tableau 9) à 4°C sous agitation. Des aliquotes des protéines solubles avant dépôt sur la colonne, des protéines solubles non-liées (flow-through), des lavages et de l'éluat ont été gardées pour dépôt sur SDS-PAGE (section 2.6.4). Les protéines dosées par la méthode de Bradford (section 2.6.3) ont ensuite été aliquotées, congelées à l'azote liquide et préservées dans un congélateur -80°C. Pour la régénérer, la colonne a été lavée avec cinq volumes d'eau bi-distillée, cinq volumes de 0.5 M NaOH, cinq volumes d'eau bi-distillée et cinq volumes d'EtOH 20% dans lequel la colonne est conservée à 4°C.

Tableau 9 : Tampons utilisés pour la purification des protéines avec une étiquette streptag

	Tampon de purification	Tampon de dialyse
ChuX _N -Strep	50 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 50 µM EDTA	50 mM Tris-HCl pH 8
ChuY _N -Strep	100 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 1 mM EDTA	0.1 M NaPi pH 7
ChuW _N -Strep	50 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 50 µM EDTA	50 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 50 µM EDTA

2.6.2 Chromatographie d'affinité sur Ni²⁺-Sépharose

Les protéines ayant une étiquette de poly-histidine ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne XK 26 (Pharmacia Bioscience) contenant 50 mL de résine Ni²⁺-NTA Sepharose (Amersham Bioscience) couplée à un FPLC (ÄKTA, Amersham Pharmacia Biotech). L'étiquette d'histidines fusionnée à la protéine s'accroche aux ions nickel de la résine permettant l'élimination des protéines contaminantes. Les protéines solubles ont été déposées sur la colonne préalablement lavée avec cinq volumes d'eau bi-distillée, chargée avec deux volumes d'une solution de 100 mM NiSO₄, relavée avec cinq volumes d'eau bi-distillée et équilibrée avec cinq volumes de tampon de purification (Tableau 10). Les contaminants ont été éliminés par lavage successif avec cinq volumes de tampon de purification contenant respectivement 2 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM et 70 mM d'imidazole. La protéine d'intérêt a ensuite été éluée avec du tampon de purification contenant 400 mM d'imidazole. Les aliquotes, récoltées lors de l'éluion, ayant les niveaux d'absorbance les plus élevés ont été sélectionnées et dialysées quatre fois à l'aide d'une membrane à dialyse (10 kDa MWCO, VWR) contre deux litres du tampon désiré (Tableau 10) à 4°C sous agitation. Des aliquotes des protéines solubles avant dépôt sur la colonne, des protéines solubles non-liées (flow-through), des lavages et de l'éluat ont été gardées pour dépôt sur SDS-PAGE (section 2.6.4). Les protéines dosées par la méthode de Bradford (section 2.6.3) ont ensuite été aliquotées, congelées à l'azote liquide et préservées dans un congélateur -80°C. La colonne de nickel a été lavée avec dix volumes d'une solution de 50 mM EDTA + 0.5 M NaCl, trois volumes de NaCl 0.5 M, un demi volume de NaCl 2 M, cinq volumes d'eau bi-distillée, trois volumes de NaOH 1 M, cinq volumes d'eau bi-distillée, quatre volumes d'EtOH 70%, trois volumes d'eau bi-distillée et finalement cinq volumes d'EtOH 20% dans lequel la colonne est conservée à 4°C.

Tableau 10 : Tampons utilisés pour la purification des protéines avec une étiquette de poly-histidine

	ChuX _{N-His}	ChuS _{N-His}
Tampon de purification	50 mM NaPi pH 8 + 300 mM NaCl + 0.1% Triton X-100	50 mM NaPi pH 8 + 300 mM NaCl + 0.1% Triton X-100
Tampon de dialyse	50 mM NaPi pH 7	0.1 M NaPi pH 7

2.6.3 Dosage des protéines par la méthode de Bradford

La méthode de Bradford permet un dosage colorimétrique fréquemment utilisé pour déterminer la concentration en protéine d'un échantillon. Ce dosage est basé sur le changement d'absorbance à 595 nm du bleu de Coomassie complexé aux protéines [60]. Les protéines purifiées ont été dosées à l'aide du réactif de Bradford en utilisant la protéine standard BSA fournie par la compagnie Bio-Rad.

2.6.4 Vérification de la pureté des protéines

Des échantillons de protéines solubles avant dépôt sur la colonne, des protéines solubles non-liées (flow-through), des lavages, de la protéine purifiée ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (Broad Range, Bio-Rad, 161-0317) ont été analysés par SDS-PAGE 12% pour visualiser le profil des protéines aux différentes étapes de purification et pour vérifier la pureté des protéines éluées [61]. Les échantillons ont été mélangés à du tampon d'échantillon 2X et chauffés à 95°C pendant 3 minutes avant leur dépôt sur gel. L'électrophorèse a été effectuée dans du tampon d'électrode 1X à un voltage de 200 V pendant environ une heure à température pièce dans un MiniProtean® II Cell (Bio-Rad Laboratories). Les gels ont été colorés avec une solution au bleu de Coomassie et décolorés à l'aide d'une solution décolorante constituée de 30% méthanol et de 10% acide acétique.

2.7 Tamisage moléculaire

Le tamisage moléculaire a été effectué sur une colonne Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech), couplée à un FPLC (ÄKTA, Amersham Pharmacia Biotech), préalablement lavée avec trois volumes d'eau bi-distillée et équilibrée avec deux volumes de tampon (Tableau 11). Le standard de poids moléculaire (Bio-Rad, 151-1901) a d'abord été déposé sur la colonne afin d'obtenir un profil de protéines de référence. Ce profil permet d'assigner à chacun des volumes d'élution un poids connu et de déterminer une courbe standard. Le profil de tamisage moléculaire a été suivi à 280 nm. Un volume de 200 µL de protéine concentrée à 40 µM a été appliqué sur la colonne pour d'obtenir un bon signal. Le poids moléculaire des protéines basé sur la calibration à l'aide des standards de

poids moléculaire est calculé à l'aide du logiciel UNICORN fourni avec le FPLC (AKTA, Pharmacia). La colonne a été lavée avec trois volumes d'eau bi-distillée, un volume de 0.5 M NaOH, trois volumes d'eau bi-distillée et deux volumes d'EtOH 20% dans lequel elle est conservée à 4°C.

Tableau 11 : Tampons utilisés pour le tamisage moléculaire des protéines

Protéine	Tampon de filtration
ChuX _{N-Strep}	50 mM Tris-HCl pH 8 + 150 mM NaCl + 50 μM EDTA
ChuY _{N-Strep}	0.1 M NaPi pH 7 + 250 mM NaCl + 50 μM EDTA

2.8 Reconstitution des protéines ChuS et ChuX avec de l'hème

2.8.1 Préparation d'une solution d'hémine

Pour la reconstitution, une solution d'hémine de 4 mM a d'abord été préparée (0.0103g d'hémine dans 0.75 mL de NaOH 0.1 M auquel 4.25 mL de tampon 50 mM Tris-HCl pH 8 est ajouté). Cette solution a été filtrée (filtre à seringue stérile, 0.45 μm, VWR) et dosée par la méthode pyridine-hémochrome (section 2.8.4).

2.8.2 Préparation d'holo-ChuS

Lors d'une chromatographie à échangeurs d'anions, la protéine d'intérêt, ayant des charges négatives, est fortement liée à la résine chargée positivement. Lorsqu'on ajoute du sel au tampon, la protéine se détache de la matrice et les ions chargés négativement du sel occupent les sites chargés positivement de la résine. Six équivalents molaires d'hémine ont été ajoutés à 20 mg d'apo-protéine dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8 pour un volume total de 5 mL. La préparation a été incubée dans l'obscurité à température pièce pendant une heure. Le mélange protéine-hème a été déposé sur une colonne (1 x 20 cm, Pharmacia Bioscience) de chromatographie à échangeurs d'anions (10 mL, DEAE Sepharose Fast-Flow, GE Healthcare) couplée à un FPLC (ÄKTA, Amersham Pharmacia Biotech), préalablement lavée et équilibrée avec cinq volumes d'eau bi-distillée, cinq volumes de tampon 50 mM Tris-HCl pH 8, deux volumes de tampon 50 mM Tris-HCl pH 8 contenant 1 M NaCl et cinq volumes de tampon 50 mM Tris-HCl pH 8. Pour éliminer les contaminants,

la colonne a été lavée avec cinq volumes de tampon 50 mM Tris-HCl pH 8. La protéine a ensuite été éluée et séparée de l'excès d'hème avec du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8 contenant 250 mM NaCl. Les aliquotes récoltées lors de l'éluion, où est retrouvée la protéine reconstituée avec de l'hème, ont été dialysées quatre fois à l'aide d'une membrane à dialyse (10 kDa MWCO, VWR) contre un litre de tampon 0.1 M NaPi + 50 μ M EDTA à 4°C sous agitation. L'holo-Chu_{N-His} dialysée a été concentrée par ultrafiltration (Amicon Ultra-15, 10 K, Millipore) par trois centrifugations à 5000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. La protéine reconstituée a été dosée par la méthode de Bradford (section 2.6.3) et l'hème contenu sur la protéine par la méthode du pyridine-hémochrome (section 2.8.4). La concentration finale des protéines rapportée dans la section Résultats (Chapitre 3) est basée sur le résultat du dosage de l'hème. La protéine a ensuite été aliquotée, congelée à l'azote liquide et préservée dans un congélateur -80°C. La résine contenue dans la colonne a été jetée après chaque reconstitution car celle-ci reste imprégnée d'hème qui ne peut être délogé par des lavages.

2.8.3 Préparation d'holo-ChuX

Le principe de la filtration sur gel est basé sur la séparation de différentes molécules déposées sur la colonne en fonction de leur taille. Les plus grosses molécules quittent la colonne en premier parce qu'elles contournent les pores de la matrice alors que les plus petites molécules sont retenues par celle-ci. Il est ainsi possible de séparer les protéines, l'ADN ou l'ARN de particules non désirables. Dans le cas de la reconstitution de ChuX_{N-Strep}, cela permet de séparer l'holo-protéine de l'excès d'hème non-lié. Les colonnes utilisées peuvent retenir toutes les molécules ayant un poids moléculaire plus petit que 6 000 kDa. Trois équivalents molaires d'hémine ont été ajoutés à 73 μ M (110 μ g) d'apo-ChuX_{N-Strep} dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8 pour un volume total de 75 μ L. La préparation a été incubée dans l'obscurité à température pièce pendant une heure. Le mélange protéine-hème a été déposé sur une colonne Micro Bio-Spin Chromatography Columns P-6 (Bio-Rad, 732-6221) équilibrée quatre fois avec 500 μ L de tampon 50 mM Tris-HCl pH 8. La protéine reconstituée a été éluée par centrifugation à 1 000 x g pendant deux minutes. L'hème en excès a été retenu dans le haut de la colonne. Plusieurs colonnes

ont été utilisées pour obtenir de plus grandes quantités de protéine reconstituée. Les différentes fractions contenant l'holo-ChuX_{N-Strep} ont ensuite été concentrées par ultrafiltration (Amicon Ultra-0.5, 10 K, Millipore) par plusieurs centrifugations à 7 000 rpm pendant dix minutes à 4°C. La protéine reconstituée a été dosée par la méthode de Bradford (section 2.6.3) et l'hème contenu sur la protéine par la méthode du pyridine-hémochrome (section 2.8.4). La concentration finale de la protéine holo-ChuX rapportée dans la section résultats est basée sur le résultat du dosage de l'hème. La protéine a ensuite été aliquotée, congelée à l'azote liquide et préservée dans un congélateur -80°C. Les colonnes ont été jetées car elles sont conçues pour usage unique.

2.8.4 Dosage par la méthode du pyridine-hémochrome

Le dosage pyridine-hémochrome permet de doser spécifiquement la quantité d'hème présente dans un échantillon (Appleby, 1978). Il a été démontré que chaque polypeptide de ChuS lie une molécule d'hème et les études structurales de ChuX prédisent le même scénario pour cette dernière [42, 59]. Donc, un ratio hème/protéine de 1:1 devrait être observé pour les deux protéines. Les échantillons ont été dosés à partir d'un mélange de X mL de la protéine ou de la solution d'hème, (1 - X) mL de tampon 50 mM Tris-HCl pH 7.5 et 1 mL d'une solution de pyridine (Tableau 18, Annexe). Un millilitre de ce mélange jaunâtre est conservé comme référence pour le spectre d'absorbance et l'autre millilitre prend une couleur rosée lorsqu'il est réduit à l'aide de dithionite de sodium. Le spectre d'absorbance réduit moins oxydé est enregistré. La concentration d'hème dans l'échantillon est calculée selon cette formule :

$$[\text{Hème}](\mu\text{M}) = \left(\frac{2000 \mu\text{L}}{X}\right) * [46.7 * (\text{DO}_{555} - \text{DO}_{539}) - 9.3 * (\text{DO}_{550} - \text{DO}_{535})]$$

Les protéines reconstituées avec de l'hème ainsi que les solutions d'hémimine préparées pour les reconstitutions ont été dosées à partir de cette méthode.

2.9 Spectroscopie d'absorption

Tous les spectres d'absorption ont été enregistrés à 20°C avec un spectrophotomètre Cary 300 UV-Vis Series (Agilent Technologies). Les spectres d'absorption ont été enregistrés de 800 nm à 250 nm. Pour suivre la progression des réactions enzymatiques, un spectre d'absorption a été enregistré à des intervalles de cinq minutes. Pour déterminer les constantes de vitesse, l'absorbance à une seule longueur d'onde a été suivie dans le temps. Les protéines utilisées ont été diluées à une concentration de 5 μM dans du tampon 0.1 M NaPi pH 7 ou du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8. Les réactions de dégradation de l'hème par holo-ChuS_{N-His} ont été initiées par l'ajout de deux excès molaires d'une solution de peroxyde d'hydrogène fraîchement préparée et préalablement dosée à 240 nm à l'aide de son coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Les réactions de réduction de ChuY_{N-Strep} ont été effectuées en présence de cinq équivalents molaires des cofacteurs NADPH ou NADH. Les solutions de NADPH et NADH ont été préparées et dosées selon leur coefficient d'extinction molaire à 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La cuvette utilisée avait un chemin optique de 1cm.

2.10 Cinétiques pré-stationnaires avec un mélangeur à flux arrêté

Un mélangeur à flux arrêté permet de mesurer les variations d'absorbance de réactions rapides aussi appelées cinétiques pré-stationnaires. L'appareil SX.18MV de la compagnie Applied Photophysics a été utilisé pour l'acquisition de données à une longueur d'onde (Figure 20). Le temps mort de l'appareil est de 1.28 ms. Les réactions en lien avec la protéine ChuY_{N-Strep} ont été effectuées dans du tampon 0.1 M NaPi pH 7 tandis que celles en rapport avec la protéine ChuX_{N-Strep} dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8, due à la précipitation de la protéine ChuX_{N-Strep} dans du tampon phosphate. La température du mélangeur a été maintenue à 20°C à l'aide d'un bain circulant. L'acquisition des données a été faite sur différentes échelles de temps selon l'expérience réalisée. Les données ont été exportées et analysées avec le logiciel SPECFIT. Les cinétiques ont été enregistrées à deux longueurs d'onde différentes : à 410 nm pour observer la diminution ou l'augmentation d'intensité de la bande de Soret et à 730 nm pour suivre l'apparition et la disparition des intermédiaires réactionnels méso-hydroxyhème et verdohème.

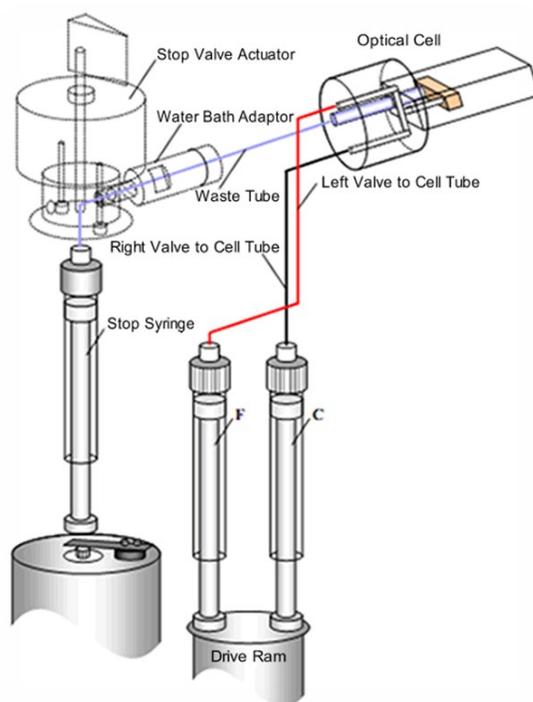


Figure 20 : Représentation schématique d'un mélangeur à flux arrêté

Les réactifs sont contenus dans deux seringues (F et C). Un bloc propulsé à l'azote compressé pousse les pistons des seringues de façon à ce que les réactifs se mélangent et atteignent la cellule d'observation. Ce processus pousse le contenu de la cellule d'observation issu de la réaction précédente vers la seringue d'arrêt. Une fois que les solutions ont rempli la seringue d'arrêt, le flux s'arrête et l'acquisition des données démarre simultanément (Applied Photophysics, <https://www.photophysics.com/lab/stopped-flow-spectroscopy-beginners-guide>).

2.11 Extraction à la pyridine et spectre optique du complexe pyridine-verdohème

L'extraction à la pyridine a été effectuée en ajoutant de la pyridine aux échantillons contenant les réactions enzymatiques pour obtenir une concentration finale de 16%. Après avoir été mélangées par inversion, les solutions ont été centrifugées à 10 000 x g pendant trois minutes pour séparer les molécules en solution des protéines qui avaient précipité. Le surnageant a été récolté et placé dans une cuvette de quartz pour enregistrer le spectre optique de 800 nm à 250 nm à 20°C. Il a été comparé au spectre optique du complexe pyridine-verdohème de la littérature [62].

2.12 Dosage du fer

La coloration au bleu de Prusse de Perls permet de doser la concentration en fer présent dans un échantillon. En présence d'acide chlorhydrique, le ferrocyanide de potassium forme un complexe avec le fer inorganique. Ce complexe est caractérisé par une coloration bleue, appelé bleu de Prusse. Ce dosage du fer complexé est basé sur l'absorbance à 630 nm qu'on compare à celle d'une courbe standard créé à partir d'une solution de FeCl_3 [63]. La quantité de fer libérée par la réaction de dégradation de l'hème de $\text{ChuS}_{\text{N-His}}$ avec et sans $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$ dans différentes conditions a été mesurée à partir de cette méthode. Pour les différents essais des concentrations de 50 μM de holo- $\text{ChuS}_{\text{N-His}}$, 50 μM de $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$ et 250 μM de NADPH ont été utilisées dans un volume total de 300 μL . La réaction a été initiée par l'ajout de 100 μM H_2O_2 , incubée à température pièce le temps voulu et filtrée par ultrafiltration (Amicon Ultra-0.5, 10 K, Millipore). Un volume de 233.4 μL de l'éluat a été incubé avec 33.3 μL de 5 M HCl pendant une heure suivi de l'ajout de 33.3 μL de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 15% pendant 15 minutes afin de doser le fer en solution. Les dosages ont été effectués en triplicata.

Chapitre 3 : Présentation des résultats

3.1 Amplification par PCR des gènes *chuX*, *chuY* et *chuW*

L'ADN amplifié par PCR a été visualisé à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'agarose (Figures 21 et 22). Les tailles calculées pour les gènes *chuX*, *chuY* et *chuW* sont respectivement de 524 pb, 653 pb et 1367 pb. Selon le marqueur de poids moléculaire, tous les gènes amplifiés ont la bonne taille. Le gène *chuW* a été amplifié à l'aide d'amorces pour le clonage dans le plasmide pASK-IBA3+ (Figure 21) et les trois gènes, *chuX*, *chuY* et *chuW*, ont été amplifiés à l'aide d'amorces pour le clonage dans le plasmide pASK-IBA5+ (Figure 22).

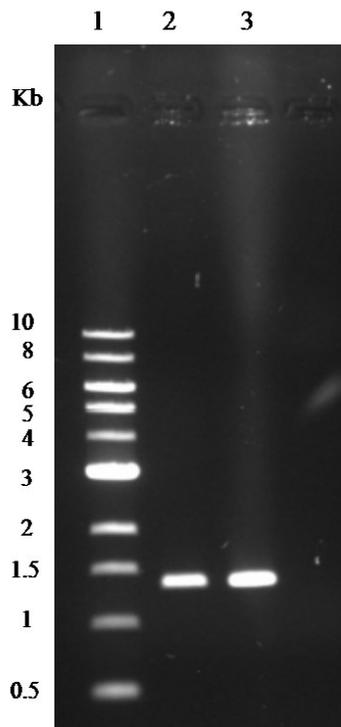


Figure 21 : Vérification des produits d'amplification par PCR du gène *chuW* servant au clonage dans le vecteur pASK-IBA3+

Électrophorèse sur gel d'agarose 0.8% des produits d'amplification du gène *chuW* (puits 2 et 3) avec les amorces servant au clonage dans le vecteur pASK-IBA3+. Le marqueur de poids moléculaire 1 Kb DNA ladder (puits 1) de la compagnie New England Biolabs (NEB) a été utilisé.

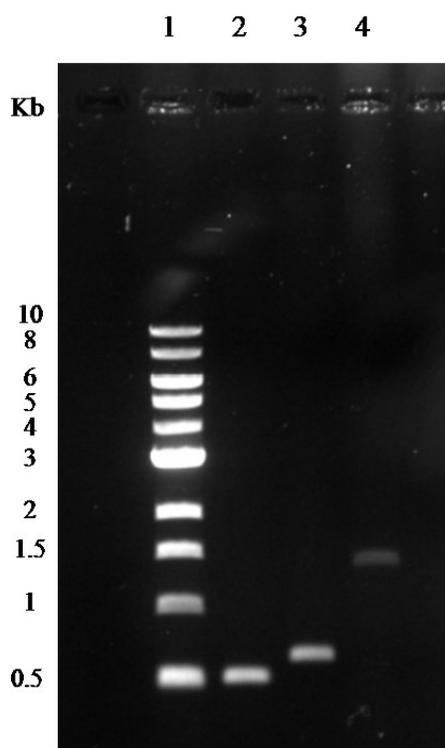


Figure 22 : Vérification des produits d'amplification par PCR des gènes *chuX*, *chuY* et *chuW* servant au clonage dans le vecteur pASK-IBA5+

Électrophorèse sur gel d'agarose 0.8% des produits d'amplification des gènes *chuX* (puits 2), *chuY* (puits 3) et *chuW* (puits 4) avec les amorces servant au clonage dans le vecteur pASK-IBA5+. Le marqueur de poids moléculaire 1 Kb DNA ladder (puits 1) de la compagnie New England Biolabs (NEB) a été utilisé.

3.2 Clonage et séquençage des clones

Suite au clonage des produits PCR dans leurs vecteurs respectifs, les clones purifiés ont été digérés avec les enzymes de restriction appropriées et déposés sur gel d'agarose pour vérifier leur pureté et la présence des inserts. Les clones ont ensuite été séquencés à l'aide d'amorces se trouvant de part et d'autre du site d'insertion des différents gènes. Après l'analyse des résultats de séquençage des plasmides, la présence de la totalité des gènes dans les différents plasmides a été confirmée. Les séquences des diverses clones sont présentés aux Figures 45, 46, 47, 48 et 49 retrouvées en Annexe. Le clone pET15b/*chuS* provient d'une étude antérieure par un collaborateur [40].

3.3 Surexpression des protéines

3.3.1 Expression des protéines *ChuX_{N-Strep}* et *ChuX_{N-His}*

Au départ, l'expression de la protéine *ChuX_{N-Strep}* a été testée dans la souche *E. coli* BL21 (DE3) et a été vérifiée sur gel SDS-PAGE. Cependant, aucune bande correspondant à la protéine recombinante n'était présente. Il n'y avait donc aucune ou une très faible expression de la protéine dans cette souche. Comme la séquence du gène *chuX* contient cinq codons rares (serveur Rare Codon Calculator), son expression a été testée chez la souche *E. coli* Rosetta 2 (DE3) et analysée à différents temps après l'induction sur SDS-PAGE (Figure 23). On peut constater qu'il y a eu expression de la protéine *ChuX_{N-Strep}* en comparant les bandes avant et après induction (puits 2, 3 et 4). L'expression de la protéine est peu élevée après deux heures d'induction et n'augmente pas beaucoup suite à une incubation de 18 heures (puits 3 et 4). On remarque aussi aux puits 5 et 6 que la protéine semble être complètement retrouvée dans la partie soluble. La masse moléculaire théorique de la protéine est de 20 kDa. Selon l'analyse par SDS-PAGE, la protéine migre à une masse moléculaire d'environ 24 kDa. En ce qui concerne la protéine *ChuX_{N-His}*, celle-ci avait déjà été purifiée auparavant par M. D. Suits [42], donc les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées pour la purification de celle-ci.

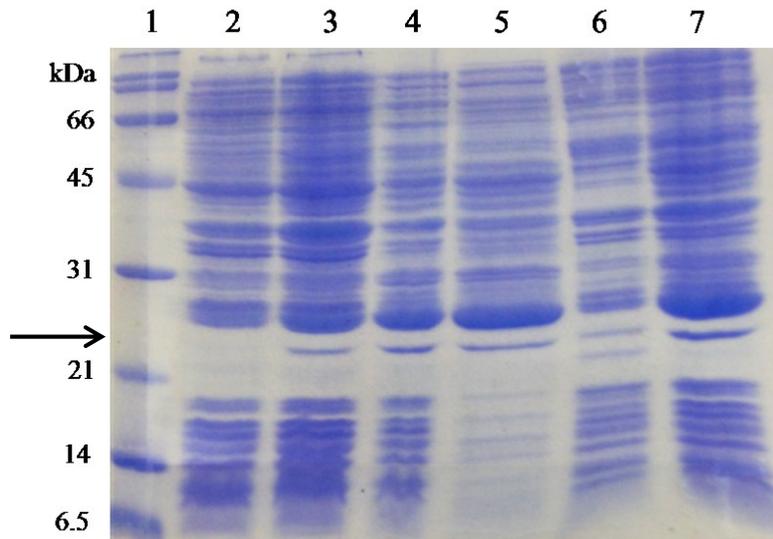


Figure 23 : Analyse par SDS-PAGE de l'expression de la protéine ChuX_{N-Strep} chez *E. coli* Rosetta 2 (DE3)

Analyse par SDS-PAGE 12% des échantillons de culture prélevés avant et après induction à l'AHT ainsi que l'extraction des protéines solubles, insolubles et totales. Marqueur de poids moléculaire (kDa) « Unstained SDS-PAGE standards, Broad Range » de Bio-Rad (1), protéines totales avant l'induction (2), protéines totales 2 h après l'induction (3), protéines totales 18 h après l'induction (4 et 7), protéines solubles extraites 18 h après l'induction (5), protéines insolubles extraites 18 h après l'induction (6). La flèche indique la bande du gel SDS-PAGE correspondant à l'expression de la protéine ChuX_{N-Strep}.

3.3.2 Expression de la protéine ChuY_{N-Strep}

L'expression de la protéine ChuY_{N-Strep} a été testée chez la souche *E. coli* BL21 (DE3) et analysée à différents temps par SDS-PAGE (Figure 24). On peut constater qu'il y a eu expression de la protéine ChuY_{N-Strep} en comparant les bandes avant et après induction (puits 2, 3 et 4). Le niveau d'expression de la protéine après induction augmente en fonction de temps d'incubation (puits 3 et 4). Les puits 5 et 6 de la Figure 24, démontrent que la majorité de la protéine est retrouvée sous forme soluble. La masse moléculaire théorique de la protéine est de 23 kDa. Selon l'analyse par SDS-PAGE, la protéine migre à une masse moléculaire d'environ 27 kDa.

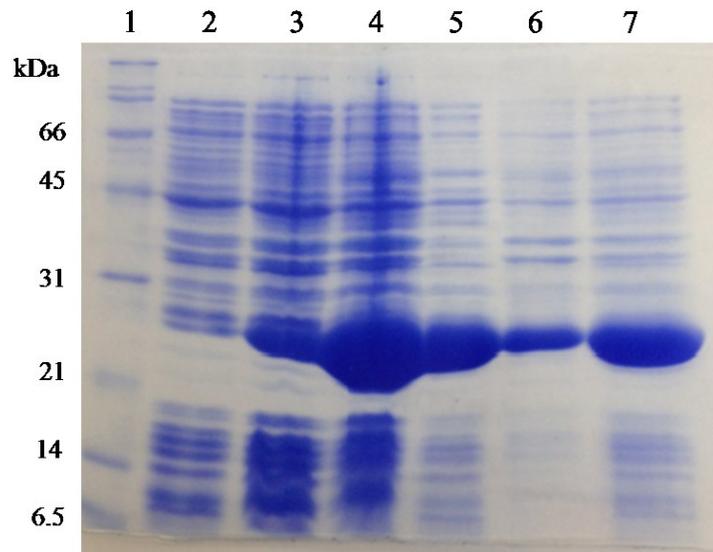


Figure 24 : Analyse par SDS-PAGE de l'expression de la protéine ChuY_{N-Strep} chez *E. coli* BL21 (DE3)

Analyse par SDS-PAGE 12% des échantillons de culture prélevés avant et après induction à l'AHT ainsi que l'extraction des protéines solubles, insolubles et totales. Marqueur de poids moléculaire (kDa) « Unstained SDS-PAGE standards, Broad Range » de Bio-Rad (1), protéines totales avant l'induction (2), protéines totales 1 h après l'induction (3), protéines totales 18 h après l'induction (4 et 7), protéines solubles extraites 18 h après l'induction (5), protéines insolubles extraites 18 h après l'induction (6).

3.3.3 Expression des protéines ChuW_{N-Strep} et ChuW_{C-Strep}

L'expression de la protéine ChuW_{N-Strep} a été testée chez la souche *E. coli* BL21 (DE3) et analysée à différents temps par SDS-PAGE (Figure 25). La masse moléculaire théorique de la protéine est de 51 kDa. Selon l'analyse par SDS-PAGE, la protéine migre à une masse moléculaire d'environ 48 kDa. On peut constater qu'il y a eu expression de la protéine ChuW_{N-Strep} en comparant les bandes avant et après induction (puits 2, 3 et 4). Le niveau d'expression de la protéine après induction augmente en fonction de temps d'incubation (puits 3 et 4). Les puits 5 et 6 de la Figure 25, démontrent que la protéine est entièrement retrouvée dans la portion insoluble. De nombreux tests d'expression ont été effectués avec la souche exprimant cette protéine afin de rendre la protéine soluble. Différentes températures d'incubation après induction (4°C, 18°C, 20°C, 30°C et 37°C), de souches d'*E. coli* (BL21 (DE3) et Rosetta 2 (DE3)), de temps de récolte (1 heure, 2 heures et 18 heures), de milieux de culture (LB, LB + FeCl₃, TB et TB + FeCl₃) et de méthodes de lyse

pour l'extraction des protéines (Mini-Beadbeater (BIOSPEC) et tampon de lyse (FastBreak™ Cell Lysis Reagent 10X, Promega)) ont été expérimentés sans aucun résultat positif. Les analyses par SDS-PAGE de ces essais sont tous semblables à la Figure 25. De plus, l'étiquette streptag a aussi été déplacée du côté C-terminal pour la protéine ChuW_{C-Strep}. Quelques essais ont été effectués avec cette protéine qui est aussi complètement insoluble (non-montré). Il a donc été conclu que la protéine ChuW_{N-Strep} serait purifiée en conditions dénaturantes.

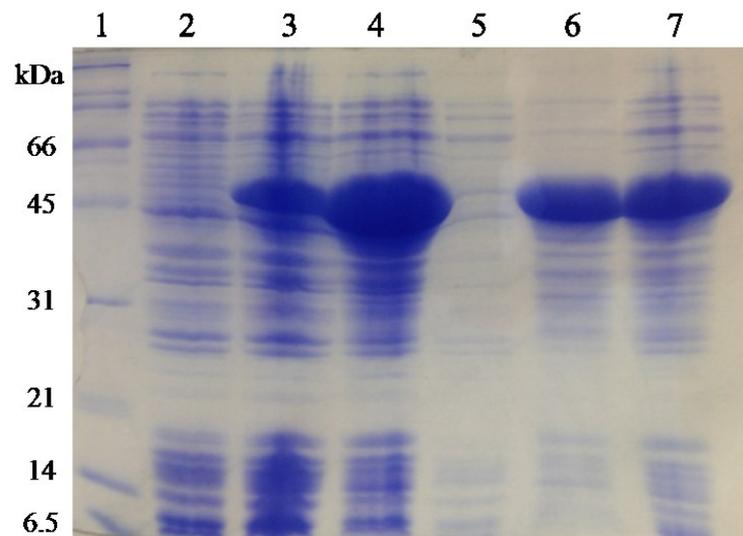


Figure 25 : Analyse par SDS-PAGE de l'expression de la protéine ChuW_{N-Strep} chez *E. coli* BL21 (DE3)

Analyse par SDS-PAGE 12% des échantillons de culture pris avant et après induction à l'AHT ainsi que l'extraction des protéines solubles, insolubles et totales. Marqueur de poids moléculaire (kDa) « Unstained SDS-PAGE standards, Broad Range » de Bio-Rad (1), protéines totales avant l'induction (2), protéines totales 1 h après l'induction (3), protéines totales 18 h après l'induction (4 et 7), protéines solubles extraites 18 h après l'induction (5), protéines insolubles extraites 18 h après l'induction (6).

3.4 Purification des protéines

3.4.1 Purification de la protéine *ChuX_{N-Strep}*

La protéine *ChuX_{N-Strep}* a été purifiée par chromatographie d'affinité sur streptavidine. La purification a été effectuée en cinq répliques avec les protéines solubles provenant d'un litre de culture. Les fractions d'élution avaient une légère couleur jaunâtre. Après vérification par spectroscopie d'absorption, on a pu confirmer que la couleur est attribuable au fait qu'un faible pourcentage de la protéine élue possède une molécule d'hème et est donc sous forme holo-*ChuX_{N-Strep}* (non montré). Les échantillons récoltés lors de la purification ainsi que la pureté de la protéine ont été analysés par SDS-PAGE (Figure 26). La protéine purifiée (puits 8), d'une taille théorique de 20 kDa, migre à une taille d'environ 23 kDa selon le marqueur de poids moléculaire. L'analyse par SDS-PAGE révèle qu'il y a présence de quelques contaminants dans l'échantillon de protéine purifiée. Les contaminants proviennent des protéines biotinylées chez *E. coli* ayant la capacité de se lier à la colonne de streptavidine. Leur présence pourrait être diminuée ou enrayée par l'ajout d'avidine dans les protéines solubles recueillies. On peut voir qu'il n'y a pas de perte de la protéine d'intérêt lors de l'application des protéines solubles sur la colonne et des lavages (puits 3 à 7). Un plus grand volume de protéines solubles aurait pu être déposé sur la colonne à chaque séquence. La quantité de *ChuX_{N-Strep}* purifiée est de 24 mg par litre de culture. Tous les essais de ce projet ont été réalisés avec cette protéine plutôt que celle avec une étiquette histidine. Une étiquette de purification différente de la protéine *ChuS_{N-His}* était nécessaire pour tester s'il y a formation de complexe entre les deux protéines à l'aide de la méthode par « pull-down ».

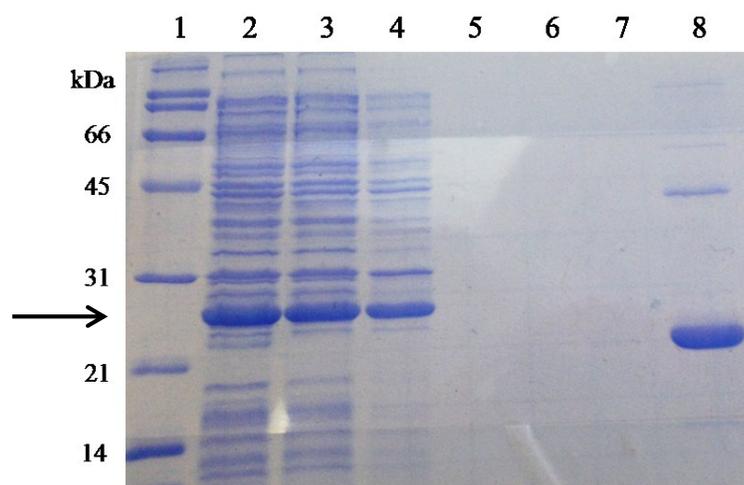


Figure 26 : Analyse par SDS-PAGE des échantillons récoltés lors de la purification de la protéine ChuX_{N-Strep}

Analyse par SDS-PAGE 12% des aliquotes recueillies lors de la purification de ChuX_{N-Strep} par chromatographie d'affinité sur streptavidine. Marqueur de poids moléculaire (kDa) « Unstained SDS-PAGE standards, Broad Range » de Bio-Rad (1), protéines solubles (2), protéines solubles non-liées (flow-through) (3), protéines solubles non-liées (flow-through) (4), lavage (5), lavage (6), lavage (7), protéine ChuX_{N-Strep} purifiée (8). La flèche indique la bande du gel SDS-PAGE correspondant à la protéine ChuX_{N-Strep}. La protéine présente dans du lysat d'*E. coli* ne migre pas à la même hauteur que la protéine purifiée. Il s'agit d'un artefact de migration tel que vérifié par SDS-PAGE par l'ajout de lysat à la protéine purifiée (non-montré).

3.4.2 Purification de la protéine ChuX_{N-His}

La protéine ChuX_{N-His} a été purifiée par chromatographie d'affinité sur Ni²⁺-Sephrose. La purification a été effectuée avec les protéines solubles provenant d'un litre de culture. Les aliquotes récoltées lors de l'élution avaient une légère couleur jaunâtre qui est attribuée au fait qu'un faible pourcentage de la protéine élue possède une molécule d'hème et est donc sous forme holo-ChuX_{N-His} (non-montré). On a observé le même résultat pour la purification de la protéine ChuX_{N-Strep}. Les échantillons récoltés lors de la purification ainsi que la pureté de la protéine ont été analysés par SDS-PAGE (Figure 27). La protéine purifiée (puits 9) migre à une taille d'environ 21 kDa, ce qui correspond à sa taille théorique qui est de 20 kDa. La protéine purifiée contient quelques contaminants. Les contaminants sont toutefois en très faibles quantités et la protéine ChuX_{N-His} est majoritaire. L'analyse par SDS-PAGE révèle que des lavages à l'imidazole jusqu'à une concentration

de 50 mM (puits 4 à 8) sont nécessaires pour éliminer la majorité des protéines indésirables. Lorsque la protéine purifiée a été dialysée, une portion de celle-ci a précipité. Le contenu du sac à dialyse a donc été centrifugé à 17 500 x g (rotor SA-600) pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant a été conservé et dosé par la méthode de Bradford (section 2.6.3). Dans des expériences ultérieures, on verra que la nature du tampon utilisé est en cause (section 3.5.1). La quantité finale de ChuX_{N-His} purifiée est de 75 mg par litre de culture. Cette protéine a été mise de côté en début de projet et celle ayant une étiquette streptag a plutôt été utilisée à cause de sa plus grande pureté. Les deux formes de la protéine recombinante ChuX ont tout de même été purifiées au cours de ce projet pour tenter de solutionner les difficultés rencontrées lors de la reconstitution de ChuX avec de l'hème (section 3.5.1). Les résultats de la section 3.8 ont été obtenus avec la protéine ChuX_{N-Strep}.

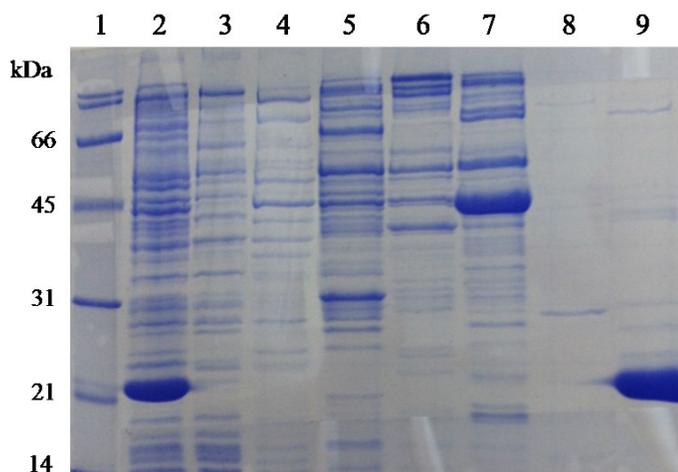


Figure 27 : Analyse gel SDS-PAGE des échantillons récoltés lors de la purification de la protéine ChuX_{N-His}

Analyse par SDS-PAGE 12% des aliquotes recueillis lors de la purification de ChuX_{N-His} par chromatographie d'affinité sur Ni²⁺-Sepharose. Marqueur de poids moléculaire (kDa) « Unstained SDS-PAGE standards, Broad Range » de Bio-Rad (1), protéines solubles (2), protéines solubles non-liées (flow-through) (3), lavage à 2 mM d'imidazole (4), lavage à 10 mM d'imidazole (5), lavage à 20 mM d'imidazole (6), lavage à 50 mM d'imidazole (7), lavage à 70 mM d'imidazole (8), protéine ChuX_{N-His} purifiée éluée à 400 mM d'imidazole (9).

3.4.3 Purification de la protéine $ChuY_{N-Strep}$

La protéine $ChuY_{N-Strep}$ a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une résine couplée à la streptavidine. La purification a été effectuée avec les protéines solubles provenant d'un litre de culture. Les échantillons récoltés lors de la purification ainsi que la pureté de la protéine ont été analysés par gel SDS-PAGE (Figure 28). La protéine purifiée (puits 10), d'une taille théorique de 23 kDa, migre à une taille d'environ 26 kDa selon le marqueur de poids moléculaire. L'analyse SDS-PAGE révèle l'absence de contaminants. Pour les puits contenant les échantillons de protéines solubles et les lavages (puits 6 à 10), on note qu'une certaine quantité de protéine $ChuY_{N-Strep}$ est éluée car la quantité de protéine appliquée dépasse la capacité maximale de liaison de la résine. Pour avoir moins de perte de protéine lors de la purification, plus de répétitions avec des quantités moindres de protéines solubles auraient pu être faites. Ainsi, moins de $ChuY_{N-Strep}$ aurait été retrouvé dans les déchets lors de l'application des protéines solubles et des lavages et une plus grande quantité aurait été récoltée. La quantité de $ChuY_{N-Strep}$ purifiée est tout de même de 18 mg par litre de culture.

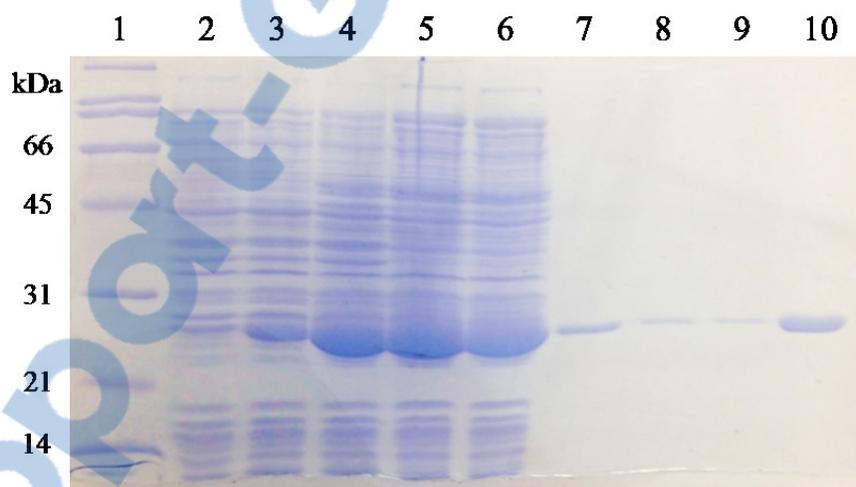


Figure 28 : Analyse par SDS-PAGE des échantillons récoltés lors de la purification de la protéine $ChuY_{N-Strep}$

Analyse par SDS-PAGE 12% des aliquotes recueillies lors de la purification de $ChuY_{N-Strep}$ par chromatographie d'affinité sur streptavidine. Marqueur de poids moléculaire (kDa) « Unstained SDS-PAGE standards, Broad Range » de Bio-Rad (1), protéines totales avant l'induction (2), protéines totales 2 h après l'induction (3), protéines totales 18 h après l'induction (4), protéines solubles (5), protéines solubles non-liées (flow-through) (6), lavage (7), lavage (8), lavage (9), protéine $ChuY$ purifiée (10).

3.4.4 Purification de la protéine $ChuW_{N-Strep}$

La protéine $ChuW_{N-Strep}$ a été purifiée par chromatographie d'affinité sur streptavidine. Les protéines insolubles issues d'un litre culture ont été solubilisées en conditions dénaturantes à l'aide d'urée. L'urée a ensuite été enlevée de l'échantillon par dialyse. La purification de $ChuW_{N-Strep}$ a été effectuée à partir des protéines solubles obtenues après la dialyse. Les échantillons récoltés lors de la purification ainsi que la pureté de la protéine ont été analysées par SDS-PAGE (Figure 29). La protéine purifiée (puits 5 à 9), d'une taille théorique de 51 kDa, migre à une taille d'environ 48 kDa selon le marqueur de poids moléculaire. L'analyse par SDS-PAGE révèle la présence de quelques contaminants dans l'échantillon de protéine purifiée en faible concentration. La quantité de $ChuW_{N-Strep}$ purifiée est de 300 μ g par litre de culture. L'échantillon de protéine purifié a été utilisé pour tester une reconstitution du centre fer-soufre aérobie avec du β -mercaptoéthanol et du $FeCl_3$ mais le mélange a précipité. Vu la difficulté à purifier cette protéine, elle a été mise de côté. Nos efforts ont été concentrés sur les protéines $ChuX_{N-Strep}$ et $ChuY_{N-Strep}$.

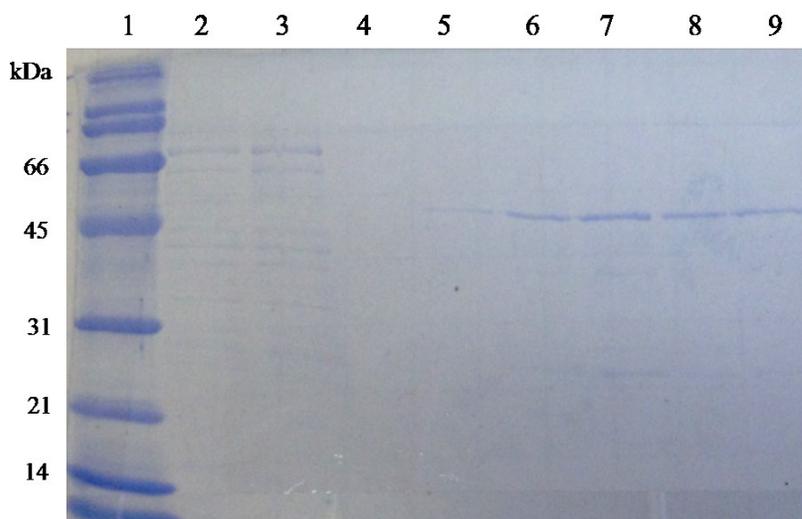


Figure 29 : Analyse par SDS-PAGE des échantillons récoltés lors de la purification de la protéine $ChuW_{N-Strep}$

Analyse par SDS-PAGE 12% des aliquotes recueillies lors de la purification de $ChuW_{N-Strep}$ par chromatographie d'affinité sur streptavidine. Marqueur de poids moléculaire (kDa) « Unstained SDS-PAGE standards, Broad Range » de Bio-Rad (1), protéines solubles non-liées (flow-through) (2), lavage (3), lavage (4), fraction d'élution (5), fraction d'élution (6), fraction d'élution (7), fraction d'élution (8), fraction d'élution (9).

3.4.5 Purification de la protéine *ChuS_{N-His}*

La protéine *ChuS_{N-His}* a été purifiée par chromatographie d'affinité sur Ni²⁺-Sepharose tel que décrit dans Ouellet et al. 2015 [21]. Les échantillons récoltés lors de la purification ainsi que la pureté de la protéine ont été analysés par SDS-PAGE (non montré). La protéine purifiée, d'une taille théorique de 40 kDa, migre à une taille d'environ 37 kDa selon le marqueur de poids moléculaire. L'analyse par SDS-PAGE révèle la présence de quelques contaminants de faible concentration dans l'échantillon de protéine purifiée. Une grande majorité des contaminants a été éliminée lors de l'étape de reconstitution avec l'hème. La protéine apo-*ChuS_{N-His}* présentait une légère coloration mauve. Cette coloration est due au produit tripyrrole mauve présent sur la protéine provenant d'une dégradation de l'hème fait *in vivo* [21]. La quantité de *ChuS* purifiée est de 300 mg par litre de culture.

3.5 Reconstitution des protéines avec de l'hème

3.5.1 Reconstitution de la protéine *ChuX_{N-Strep}* avec de l'hème

Au départ, la protéine *ChuX_{N-Strep}* a été purifiée dans du tampon 0.1 M NaPi pH 7. À partir de cette purification, la reconstitution de cette protéine avec de l'hème a été testée. L'excès d'hème a été enlevé sur une colonne de chromatographie à échangeurs d'anions. Cependant, la totalité de l'hème est resté accroché sur la résine et seulement de l'apo-*ChuX_{N-Strep}* a été récoltée. Il a été conclu que la protéine n'a pas une affinité pour l'hème assez grande afin d'utiliser cette méthode de purification, c'est-à-dire que l'hème se dissocie de la protéine et qu'il est capté par la résine. De plus, lors de l'ajout de l'excès d'hémine, une grande portion de la protéine a précipité. Comme les conditions de reconstitution de la protéine *ChuX_{N-His}* par filtration sur gel étaient connues et publiées, celles-ci ont été utilisées [42]. Tout comme la protéine ayant une étiquette streptag, *ChuX_{N-His}* a précipité lors de l'ajout des excès d'hémine. Nous avons émis l'hypothèse que le tampon n'était pas optimal pour la stabilité de la protéine. La protéine a été diluée 1/10 dans différents tampons et la présence ou l'absence d'un précipité lors de l'ajout de trois excès d'hème a été notée (Tableau 12). Les résultats ont démontré que *ChuX_{N-His}* préfère le tampon Tris-HCl pH 8 au tampon phosphate. Selon les résultats, c'est la présence de sel qui

semble être problématique et non la nature du tampon. A partir de ce moment, la protéine ChuX_{N-Strep} a été purifiée dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8 pour le reste de l'étude.

Dans ce nouveau tampon, l'enlèvement de l'excès d'hème par filtration sur gel a d'abord été envisagé. La protéine ChuX_{N-Strep} ne s'est pas bien reconstituée par cette méthode. En effet, seulement 20-25% des protéines possédaient un hème après la reconstitution malgré l'utilisation d'une méthode douce pour éliminer l'excès d'hème de la solution de protéine. Ces premiers résultats n'étaient pas prometteurs. Selon nos observations, comme le tamisage moléculaire est chromatographie qui demande beaucoup de temps, la molécule d'hème pourrait se dissocier de ChuX_{N-Strep} et aurait tendance à interagir avec la résine.

La protéine ChuX_{N-Strep} a finalement été reconstituée et séparée de l'excès d'hème à l'aide de petites colonnes contenant de la résine Bio-Gel P-6 pouvant être centrifugées. Ces colonnes sont normalement utilisées pour le dessalage des protéines après purification. Elles sont en mesure de retarder toute molécule ayant une taille plus petite que 6 kDa. Le mélange d'hème et de protéines a été déposé sur la résine de ces colonnes et la protéine reconstituée a été éluée immédiatement par centrifugation. Comme la solution passe très peu de temps en contact avec la résine, l'hème reste lié à ChuX_{N-Strep}. Les trois reconstitutions effectuées de cette façon ont donné de bons résultats (Tableau 13). En effet, le ratio hème/protéine se situe autour de 1.0, ce qui signifie que chaque protéine possède une molécule d'hème. L'hème n'a pas été dosé lors de la troisième reconstitution, car la méthode de dosage nécessite beaucoup de protéine et un maximum de protéine a été conservé pour les essais de cristallisation. Un spectre d'holo-ChuX_{N-Strep} est présenté à la Figure 30. Le spectre d'absorption montre un maximum d'absorption de la bande de Soret à 390 nm caractéristique d'une coordination 5c de l'hème. De plus, la bande observée à 610 nm révèle que l'hème est dans un état de haut spin (bande de transfert de charge). L'épaule visualisée à 365 nm ne suggère pas nécessairement la présence d'hème en solution. Un épaulement est souvent retrouvée dans les spectres optiques de protéines hémiques.

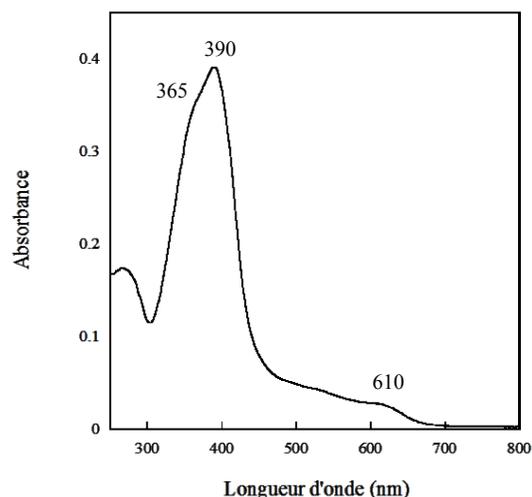


Figure 30 : Spectre d'absorption de la protéine holo-ChuX_N-Strep

Spectre d'absorption de 5 μ M de la protéine ChuX_N-Strep reconstituée avec de l'hème dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8 à 20°C.

Tableau 12 : Différents tampons testés pour la reconstitution de ChuX_N-His avec de l'hème

Tampons	Précipitation
0.1 M NaPi pH 7	**
0.1 M NaPi pH 7 + 50 mM NaCl	***
0.1 M NaPi pH 7 + 100 mM NaCl	**
0.1 M NaPi pH 7 + 200 mM NaCl	***
0.1 M NaPi pH 7 + 0.1% Tween	*
0.1 M NaPi pH 7 + 50 mM NaCl + 0.1% Tween	*
0.1 M NaPi pH 7 + 100 mM NaCl + 0.1% Tween	*
50 mM Tris-HCl pH 7.5	-
50 mM Tris-HCl pH 8	-
50 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 50 μ M EDTA	-
50 mM Tris-HCl pH 8 + 250 mM NaCl	*
50 mM Tris-HCl pH 8 + 1 M NaCl	*
50 mM Tris-HCl pH 7.5 + 0.1% Tween	-
50 mM Tris-HCl pH 8 + 0.1% Tween	-
50 mM Tris-HCl pH 8 + 50 mM NaCl + 50 μ M EDTA + 0.1% Tween	-
50 mM Tris-HCl pH 8 + 250 mM NaCl + 0.1% Tween	*
100 mM Tris-HCl pH 8.3	-
100 mM Tris-HCl pH 8.3 + 0.1% Tween	-
100 mM Tris-HCl pH 8.3 + 50 mM NaCl + 0.1% Tween	*

- Aucun précipité * Peu de précipité ** Moyen précipité *** Beaucoup de précipité

Tableau 13 : Résultats des reconstitutions de la protéine ChuX_{N-Strep}

	holo-ChuX _{N-Strep}		
Dosage de la protéine	1.83 mg/mL	1.25 mg/mL	10.9 mg/mL
Dosage de l'hème (pyridine-hémochrome)	100 µM	73 µM	-
Ratio hème/protéine	1.04	1.12	-
Rendement	91%	87%	93%

3.5.2 Reconstitution de la protéine ChuS_{N-His} avec de l'hème

La protéine holo-ChuS_{N-His} a été obtenue en reconstituant de l'apo-ChuS_{N-His} avec de l'hème et purifiée de l'excès d'hème sur une colonne de chromatographie à échangeurs d'anions couplé à un FPLC. Les résultats des trois reconstitutions effectuées avec cette protéine lors de cette étude sont présentés au Tableau 14. La protéine ChuS_{N-His} s'est bien reconstituée avec l'hème. Il est connu que chaque protéine possède une molécule d'hème, ainsi le ratio hème/protéine devrait se situer autour de 1.0 [59]. Dans la deuxième et la troisième reconstitution, on retrouve un ratio un peu plus élevé que 1.0, ce qui est probablement significatif étant donné la précision estimée à 0.1. Donc, cela indique qu'il resterait un peu d'hème libre en solution. Probablement que trop d'échantillons d'élution ont été gardés puisque l'on sait que les échantillons de la fin de la chromatographie contiennent plus d'hème que de protéine. L'hypothèse probable serait que la concentration en hémine était un peu trop élevée pour permettre une séparation optimale lors de la purification sur échangeurs d'anions. Lors de la quatrième reconstitution, la méthode a été optimisée en allongeant la longueur de la colonne et en réduisant le nombre d'excès molaire d'hémine utilisé à quatre pour la reconstitution. Pour les travaux rapportés dans ce mémoire, ce petit excès d'hème n'a pas d'impact puisque les cinétiques sont suivies sur un cycle de catalyse, soit pour l'hème présent au site actif de ChuS. Un spectre d'absorption typique de la protéine holo-ChuS_{N-His} est retrouvé à la Figure 9.

Tableau 14 : Résultats des reconstitutions de la protéine ChuS_{N-His}

	holo-ChuS _{N-His}			
Dosage de la protéine	3.5 mg/mL	4.2 mg/mL	10.6 mg/mL	6.35 mg/mL
Dosage de l'hème (pyridine-hémochrome)	86 µM	144 µM	345 µM	175 µM
Ratio hème/protéine	0.99	1.37	1.3	1.1
Rendement	64%	94%	92%	90%

3.6 Tamisage moléculaire

Pour connaître sous quelle forme les protéines ChuX_{N-Strep} et ChuY_{N-Strep} sont retrouvées en solution, un tamisage moléculaire a été effectué pour chacune d'elle. Comme cette méthode permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire, il devient possible de déterminer si celles-ci sont sous forme de monomère ou de multimère en comparant le résultat de la filtration avec leur poids moléculaire théorique. Une courbe standard a été créée à l'aide de différentes protéines (γ -globuline, ovalbumine, myoglobine et vitamine B12) retrouvées dans le standard (Bio-Rad, 151-1901).

3.6.1 Tamisage moléculaire de la protéine ChuX_{N-Strep}

La protéine apo-ChuX_{N-Strep} a une masse moléculaire théorique de 20 kDa. Le profil d'éluion de la protéine sur une colonne Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech) dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8 + 150 mM NaCl + 50 µM EDTA est représenté à la Figure 31 A. Le pic correspondant à un poids de 42 kDa indique que la majorité de la protéine est retrouvée sous forme de dimère en solution, soit environ le double de sa masse théorique. De plus, environ 10% de ChuX_{N-Strep} semble former un tétramère (81 kDa). Le pic ayant un poids de 3 kDa correspond à un contaminant présent dans le tampon de filtration. Le profil d'éluion présente aussi un pic possédant une haute masse moléculaire. Toutefois, celui-ci est hors des limites de résolution de la colonne.

3.6.2 Tamisage moléculaire de la protéine *ChuY_{N-Strep}*

La Figure 31 B représente le profil d'élution de la protéine *ChuY_{N-Strep}* sur une colonne Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech) dans du tampon 0.1 M NaPi pH 7 + 250 mM NaCl + 50 μ M EDTA. Le poids moléculaire calculé à partir du volume d'élution de la protéine est de 42 kDa. Comme la protéine a une masse théorique de 23 kDa, nous avons conclu que celle-ci était essentiellement retrouvée sous forme de dimère en solution. Le pic correspondant à un poids de 3 kDa est dû à un contaminant non-protéique présent dans le tampon de filtration tel que vérifié en injectant le tampon seul et par SDS-Page.

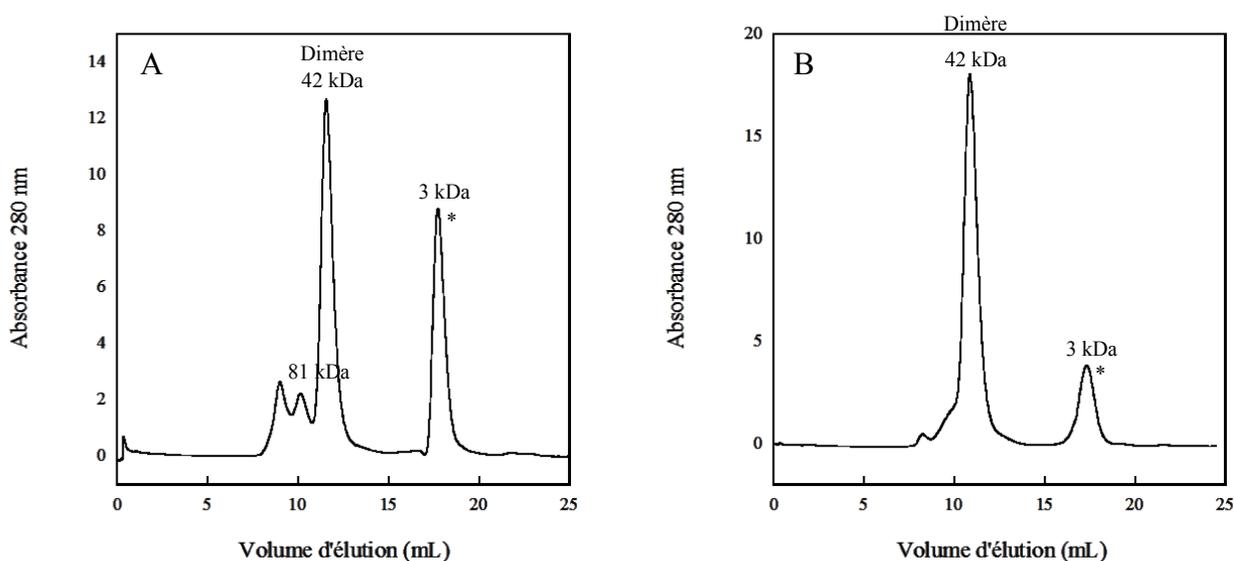


Figure 31 : Tamisage moléculaire des protéines *ChuX_{N-Strep}* et *ChuY_{N-Strep}*

Profils d'élution de la protéine *ChuX_{N-Strep}* (20 kDa) dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8 + 150 mM NaCl + 50 μ M EDTA (A) et de la protéine *ChuY_{N-Strep}* (23 kDa) dans du tampon 0.1 M NaPi pH 7 + 250 mM NaCl + 50 μ M EDTA (B). Les deux protéines sont majoritairement retrouvées sous forme de dimère en solution. Un contaminant (*) provenant des tampons de filtration est visualisé.

3.7 Activité enzymatique de la protéine ChuYN-Strep_{N-Strep}

3.7.1 Réduction du tripyrrole par ChuY_{N-Strep}

La spectroscopie d'absorption a révélé que la protéine ChuY_{N-Strep} réduit le tripyrrole issu de la réaction catalysée par ChuS_{N-His} en utilisant le NADH ou le NADPH. La Figure 32 A montre que la bande à 565 nm, caractéristique du tripyrrole, disparaît dès l'ajout de la protéine ChuY_{N-Strep} et de son cofacteur NADPH aux produits finaux de la réaction de ChuS_{N-His}. La même réduction par ChuY est observée avec l'utilisation du cofacteur NADH. La nécessité de la présence de NAD(P)H pour la réduction du tripyrrole par ChuY a été vérifiée (non montré). Lors de la réaction, un gain d'absorbance à 410 nm est observé (lié à la réduction du tripyrrole) alors que la diminution d'absorbance à 340 nm est expliquée par l'oxydation du NADPH. Le tripyrrole ayant une couleur mauve au départ devient jaune après l'action de ChuY_{N-Strep} (Figure 32 B). Bien que la structure du produit reste à être caractérisée, une réduction du tripyrrole est suggérée par ces résultats car le changement de conjugaison des carbones dans une molécule est susceptible de produire un changement de coloration [64]. D'autres essais ont démontré que le produit final semble rester accroché à l'une des deux protéines et n'est pas relâché en solution, tel que vérifié par l'ultrafiltration du mélange réactionnel final (Amicon Ultra-0.5, 10 K, Millipore). Les évidences cinétiques présentées à la section 3.7.2 montrent qu'avec un faible ratio de ChuY_{N-Strep} par rapport à ChuS_{N-His} la réduction du tripyrrole semble tout de même complète. Ces résultats suggèrent que la protéine ChuY_{N-Strep} se déplacerait d'un site actif de ChuS_{N-His} à un autre pour transférer des électrons. Le produit final (tripyrrrole réduit) serait donc possiblement complexé à la protéine ChuS_{N-His}.

Lorsque la réaction est produite par l'ajout simultané de ChuS_{N-His} et ChuY_{N-Strep} (ratio équimolaire) à partir d'hème non dégradé, l'intermédiaire hydroxyhème/verdohème est toujours visible (bande 700-800 nm) après l'ajout du peroxyde d'hydrogène mais l'accumulation du tripyrrole n'est plus observée (Figure 33). Cette réaction initiée de façon simultanée passe tout de même par l'intermédiaire tripyrrole mauve, car celui-ci devient visible lorsque le ratio de la protéine ChuY_{N-Strep} présente dans l'essai est réduit (non montré). La réaction de dégradation de l'hème par ChuS_{N-His} seule est normalement complétée en ~60 minutes. Pourtant, la réaction observée à la Figure 33 était terminée après

15 minutes. À partir de ces observations, nous avons conclu que la protéine ChuY_{N-Strep} réduit le tripyrrole mauve de façon rapide et que sa présence accélère la réaction catalysée par ChuS_{N-His}. Cette hypothèse a été vérifiée directement par des expériences réalisées à l'aide d'un mélangeur à flux arrêté (section 3.7.2). Des contrôles ont été effectués pour confirmer que la présence de la protéine ChuY_{N-Strep} avec son cofacteur NAD(P)H sont nécessaires pour l'accélération de la réaction de dégradation de l'hème et la réduction du tripyrrole (non montré). Nous avons aussi vérifié que ChuY_{N-Strep} effectue la réduction du tripyrrole formé *in vivo* par ChuS_{N-His}. En effet, le produit qui co-purifie avec la protéine apo-ChuS_{N-His}, très probablement un tripyrrole, peut être réduit par ChuY_{N-Strep} (non-moñtré). De plus, nous avons observé que lorsque les deux protéines ChuY_{N-Strep} et ChuS_{N-His} sont surexprimées dans la même cellule d'*E. coli*, le culot de bactéries est beige pâle au lieu de bleu tel qu'observé lors de la surexpression de ChuS_{N-His} seule (non-moñtré). La réaction de réduction par ChuY_{N-Strep} semble donc se produire aussi *in vivo*.

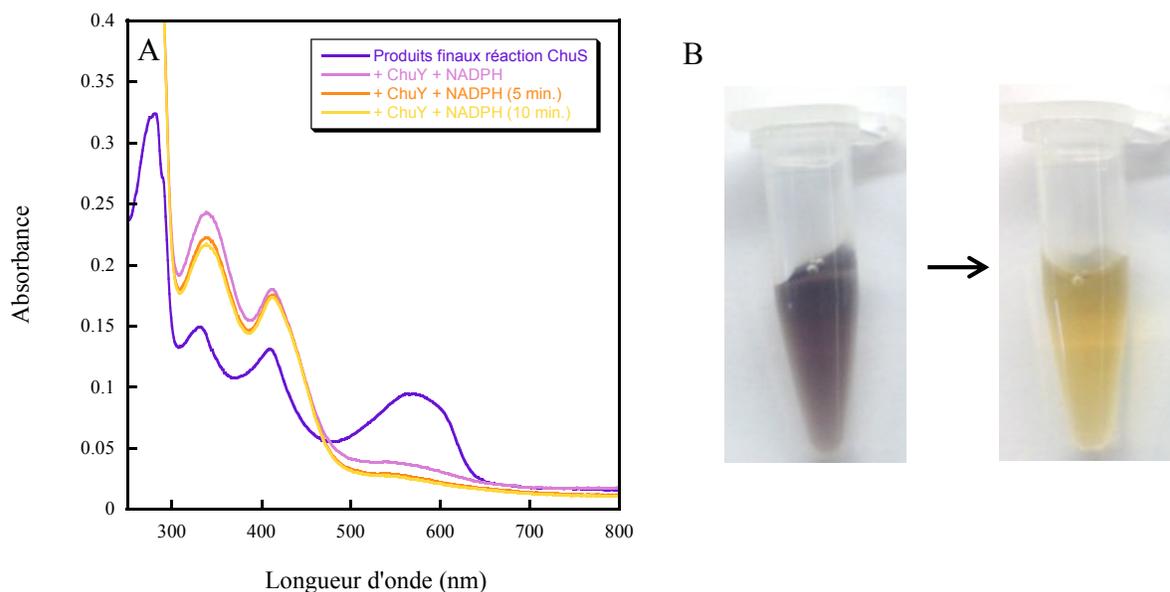


Figure 32 : Réduction du tripyrrole par ChuY_{N-Strep} en présence NADPH

La réduction du tripyrrole a été effectuée en ajoutant 5 μM de ChuY_{N-Strep} et 25 μM de NADPH aux produits finaux issus d'une réaction de dégradation de l'hème par 5 μM d'holo-ChuS_{N-His} dans du tampon 0.1 M NaPi pH 7. La réaction a été suivie au spectrophotomètre en enregistrant des spectres d'absorption (800-250 nm) à toutes les 5 minutes pendant 10 minutes à 20°C (A). Le gain d'absorbance à 340 nm est dû à l'ajout du NADPH. Visuellement, le mélange réactionnel mauve devient jaune après l'ajout de ChuY et de son cofacteur (B).

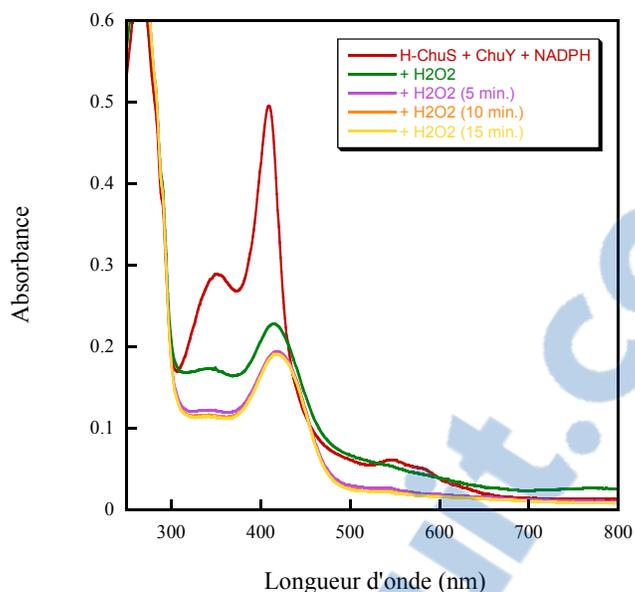


Figure 33 : Réaction d'holo-ChuS_{N-His} avec le peroxyde d'hydrogène en présence de ChuY_{N-Strep} et NADPH

La réaction de dégradation de l'hème a été effectuée en ajoutant 10 μM de peroxyde d'hydrogène à 5 μM d'holo-ChuS_{N-His}, 5 μM de ChuY_{N-Strep} et 25 μM de NADPH dans du tampon 0.1 M NaPi pH 7. La réaction a été suivie au spectrophotomètre en enregistrant des spectres d'absorption (800-250 nm) à des intervalles de 5 minutes pendant 15 minutes à 20°C.

3.7.2 Détermination des constantes liées aux réactions

Comme les constantes de vitesse reliées à la dégradation de l'hème par ChuS_{N-His} sont rapides [21], un mélangeur à flux arrêté a été utilisé pour enregistrer la variation de l'absorbance à différentes longueurs d'ondes. Pour déterminer la valeur des constantes observées, un modèle à deux ou trois exponentielles a été utilisé. Le modèle a été choisi selon l'étape qui était analysée dans le modèle global de la réaction $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$, où A correspond à l'hème, B est le mélange hydroxyhème/verdohème, C est le tripyrrole mauve et D le produit final jaune. Le choix d'utiliser un modèle à deux ou trois exponentielles selon la réaction est basé sur la qualité de la régression obtenue et sur la grandeur des résiduelles calculées. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 15.

Pour la réaction impliquant seulement la protéine ChuS_{N-His}, l'hème est transformé en hydroxyhème/verdohème avec une constante de $0.04 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ et le verdohème passe au tripyrrole mauve avec une constante de $0.0011 \pm 0.0007 \text{ s}^{-1}$. Ces résultats sont semblables à

ceux observés dans une précédente étude [21]. En présence de la protéine ChuY_{N-Strep}, l'hème passe à l'intermédiaire hydroxyhème/verdohème avec une constante de vitesse de $0.05 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ (Figure 34A). Ensuite, le produit final jaune est généré avec une constante de $0.009 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$. La première constante de vitesse de la réaction est pratiquement la même que celle de la réaction de ChuS_{N-His} seule, donc la première partie de la réaction est indépendante de la présence de ChuY_{N-Strep}. Pour la deuxième partie de la réaction, la protéine ChuS_{N-His} seule transforme l'hydroxyhème/verdohème en tripyrrole tandis qu'en présence de ChuY_{N-Strep} on observe la transformation de l'hydroxyhème/verdohème jusqu'au produit final directement. Bien qu'il y ait une étape de plus, la présence de ChuY_{N-Strep} accélère d'environ neuf fois la deuxième partie de la réaction de dégradation de l'hème. L'intermédiaire hydroxyhème/verdohème semble donc être un substrat, en plus du tripyrrole mauve, de la protéine ChuY_{N-Strep}. La réaction a aussi été suivie à 340 nm pour déterminer la quantité de NADPH consommée par la réaction. Toutefois, on s'est aperçu que la dégradation de l'hème cause un changement optique trop grand à cette longueur d'onde pour être en mesure de déterminer l'amplitude associée à l'oxydation du NADPH. Les constantes observées à 340 nm étaient les mêmes que celles à 410 nm. La Figure 34 A montre que la protéine ChuY_{N-Strep} a une légère préférence pour le cofacteur NADPH par rapport au NADH, car la transformation de l'hydroxyhème/verdohème en produit final est environ deux fois plus rapide avec le NADPH.

Des réactions ont aussi été mesurées à différents ratios de ChuY_{N-Strep} par rapport à ChuS_{N-His} (Figure 34 B). Les résultats sont présentés dans le Tableau 16. On peut y voir qu'à un ratio de 0.7 : 1 (ChuY_{N-Strep} : ChuS_{N-His}) une vitesse maximale de $0.008 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$ est atteinte pour la transformation de l'hydroxyhème/verdohème en produit final. Cette étape est donc l'étape limitante de la réaction, car la vitesse atteint un plateau même s'il y a augmentation de la concentration de ChuY_{N-Strep} dans le mélange réactionnel. À la Figure 34 B, on peut remarquer qu'aux plus basses concentrations de ChuY_{N-Strep}, on observe d'abord une augmentation de l'absorbance à 730 nm dû à la production et l'accumulation d'hydroxyhème/verdohème suivie d'une baisse lorsqu'il est transformé en produit final tandis qu'aux plus hautes concentrations de ChuY_{N-Strep}, cette augmentation à 730 nm est très faible possiblement à cause de sa transformation immédiate en produit. De plus, on

observe qu'à basse concentration de $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$ la réaction semble tout de même complétée. Ces résultats démontrent que la vitesse de réaction mesurée en présence de $\text{ChuS}_{\text{N-His}}$ et de $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$ n'est pas bimoléculaire puisque celle-ci n'augmente pas de façon linéaire et proportionnellement à la concentration de protéine présente dans l'essai. Nous concluons donc que l'activité de $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$ est catalytique et que plusieurs cycles de réduction par $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$ sont possibles, puisqu'à ratio faible la réaction est complète. Donc, comme cette réduction est rapide, le complexe protéine-protéine ChuY-ChuS nécessaire à cette réaction n'existerait que sur un laps de temps très court.

Tel que mentionné précédemment, nous avons émis l'hypothèse que le produit final jaune serait probablement sur la protéine $\text{ChuS}_{\text{N-His}}$ et non sur $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$. Il est possible que la protéine $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$ se déplacerait d'un site actif de $\text{ChuS}_{\text{N-His}}$ à un autre puisque le produit jaune n'est pas relâché en solution et que l'action de $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$ est catalytique. Notre hypothèse est que le produit est sur ChuS tout comme observé précédemment pour le tripyrrole mauve [21].

Tableau 15 : Constantes de vitesse observées pour la réaction de $\text{ChuS}_{\text{N-His}}$

Protéine	Constante de vitesse observée pour les différentes étapes (s^{-1})				Référence
	A \rightarrow B	B \rightarrow C	B \rightarrow D	C \rightarrow D	
$\text{ChuS}_{\text{N-His}}$	0.04 ± 0.01 0.059	0.0011 ± 0.0007 0.001	-	-	Ce travail [21]
$\text{ChuS}_{\text{N-His}} + \text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$	0.05 ± 0.01	-	0.009 ± 0.002	$0.14 \rightarrow 0.03$	Ce travail

Les constantes observées ont été calculées à partir d'essais à deux longueurs d'ondes, 410 nm et 730 nm, effectués sur trois journées distinctes en triplicata. Les concentrations finales obtenues après mélange étaient de $5 \mu\text{M}$ d'holo- $\text{ChuS}_{\text{N-His}}$, $5 \mu\text{M}$ de $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$, $10 \mu\text{M}$ de H_2O_2 et $25 \mu\text{M}$ de NADPH.

Tableau 16 : Constantes de vitesse observées pour différents ratios de $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$

Ratio ($\text{ChuY}_{\text{N-Strep}} : \text{ChuS}_{\text{N-His}}$)	Constantes de vitesse observée (s^{-1})	
	A \rightarrow B	B \rightarrow D
0.1 : 1	0.049 ± 0.002	0.004 ± 0.001
0.4 : 1	0.050 ± 0.001	0.005 ± 0.001
0.7 : 1	0.058 ± 0.001	0.008 ± 0.001
1 : 1	0.055 ± 0.002	0.008 ± 0.001
1.5 : 1	0.057 ± 0.001	0.008 ± 0.001

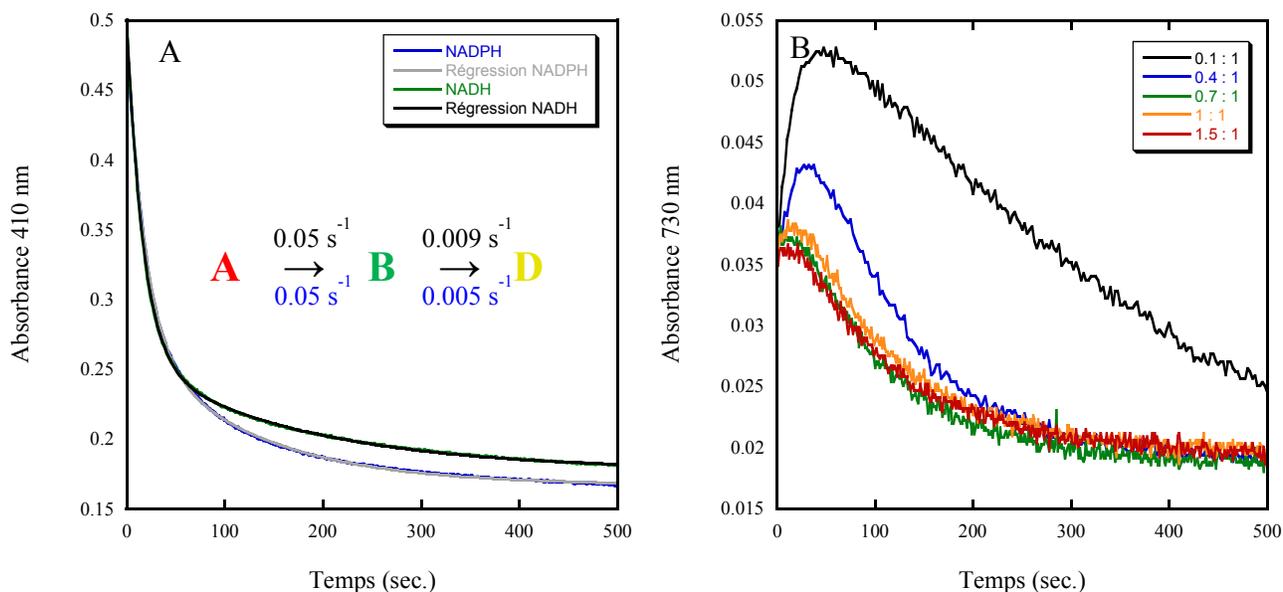


Figure 34 : Cinétiques de la réaction d'holo-ChuS_{N-His} avec le peroxyde d'hydrogène en présence de ChuY_{N-Strep} et de NAD(P)H

La réaction de dégradation de l'hème a été effectuée en ajoutant 10 μM de H_2O_2 à 5 μM d'holo-ChuS_{N-His}, 5 μM de ChuY_{N-Strep} et 25 μM de NADPH ou de NADH dans du tampon 0.1 M NaPi pH 7 (A). L'absorbance à 410 nm a été suivie au mélangeur à flux arrêté sur 500 secondes à 20°C. Les résiduelles issues des régressions sont uniformément distribuées et les amplitudes sont très faibles, soit de 1.5×10^{-3} pour les deux réactions. La réaction de dégradation de l'hème a été effectuée en ajoutant 10 μM de H_2O_2 à différentes concentrations de ChuY_{N-Strep} (0.5, 2, 3.5, 5 et 7.5 μM) avec 5 μM de holo-ChuS_{N-His} et 25 μM de NADPH dans du tampon 0.1 M NaPi pH 7 (B). L'absorbance à 730 nm a été suivie au mélangeur à flux arrêté sur 500 secondes à 20°C.

La constante vitesse de réduction du tripyrrole par la protéine ChuY_{N-Strep} a été déterminée en réalisant d'abord la réaction de dégradation de l'hème par 5 μM de ChuS_{N-His} seule avec 10 μM de peroxyde d'hydrogène pendant 60 minutes à 20°C à l'abri de la lumière. La vitesse de transformation du tripyrrole en produit final jaune a été déterminée en enregistrant la baisse d'absorbance à 565 nm et l'augmentation d'absorbance à 410 nm lors de l'ajout de 5 μM de ChuY_{N-Strep} et 25 μM de NADPH aux produits finaux de la réaction de ChuS_{N-His} (Figure 35 A). Un modèle à trois exponentielles a été nécessaire pour l'analyse des données, car avec deux exponentielles, une moins bonne qualité de régression en début de réaction était observée et les valeurs de résiduelles étaient plus élevées. Les deux premières constante de vitesse observées sont celles de la réduction du tripyrrole. Elles sont respectivement de $0.84 \pm 0.07 \text{ s}^{-1}$ et $0.16 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$, ce qui est plutôt rapide. Une

troisième constante de vitesse, qui n'est pas due à la réaction catalysée par $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$, est observée. En effet, une fois généré, le produit final jaune est instable dans le temps tel que montré à la Figure 35 B. Finalement, à partir de tous les résultats obtenus, nous proposons un modèle de dégradation de l'hème impliquant les protéines $\text{ChuS}_{\text{N-His}}$ et $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$ (Figure 36).

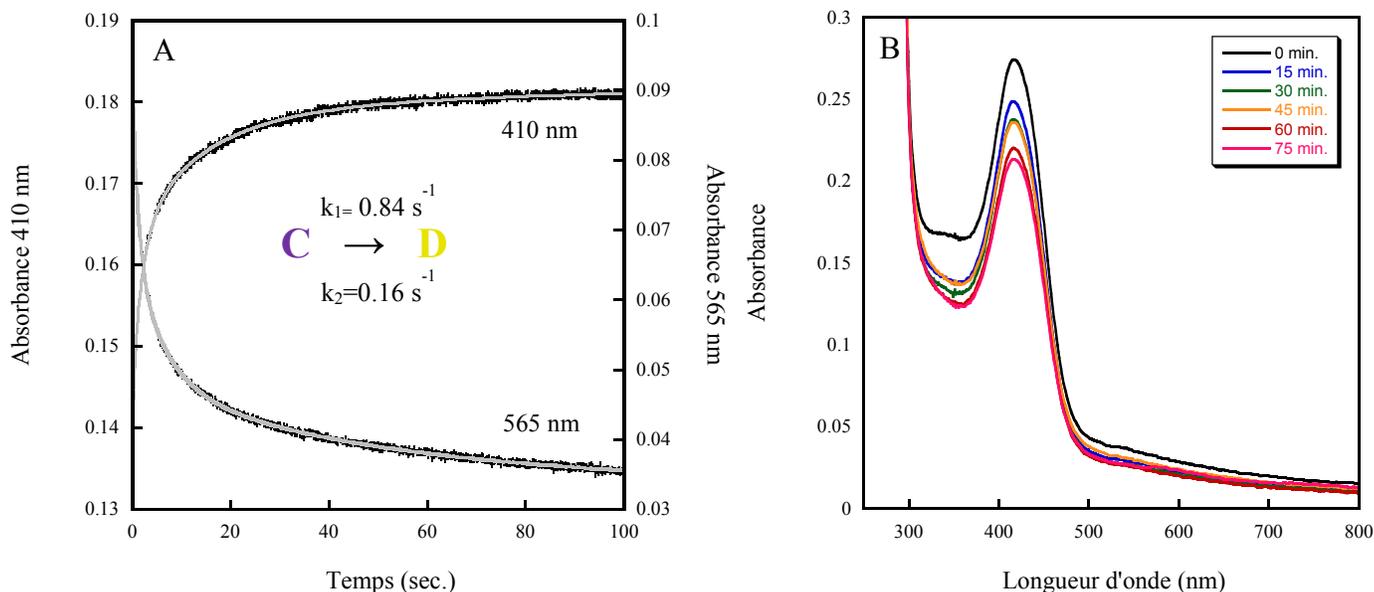


Figure 35 : Cinétique de la réduction du tripyrrole par $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$ en présence de NADPH et instabilité du produit

La réduction du tripyrrole a été effectuée en ajoutant $5 \mu\text{M}$ de $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$ et $25 \mu\text{M}$ de NADPH aux produits finaux de la réaction de $5 \mu\text{M}$ d'holo- $\text{ChuS}_{\text{N-His}}$ avec $10 \mu\text{M}$ de H_2O_2 dans du tampon $0.1 \text{ M NaPi pH } 7$ (A). L'absorbance à 565 nm a été suivie au mélangeur à flux arrêté sur 500 secondes à 20°C . Les résiduelles issues des régressions sont uniformément distribuées et les amplitudes sont très faibles, soit d'environ 8.0×10^{-4} . Le spectre optique du produit final jaune a été suivi en prenant des spectres d'absorption au spectrophotomètre ($800\text{-}250 \text{ nm}$) aux 15 minutes pendant 75 minutes à 20°C dans du tampon $0.1 \text{ M NaPi pH } 7$ (B).

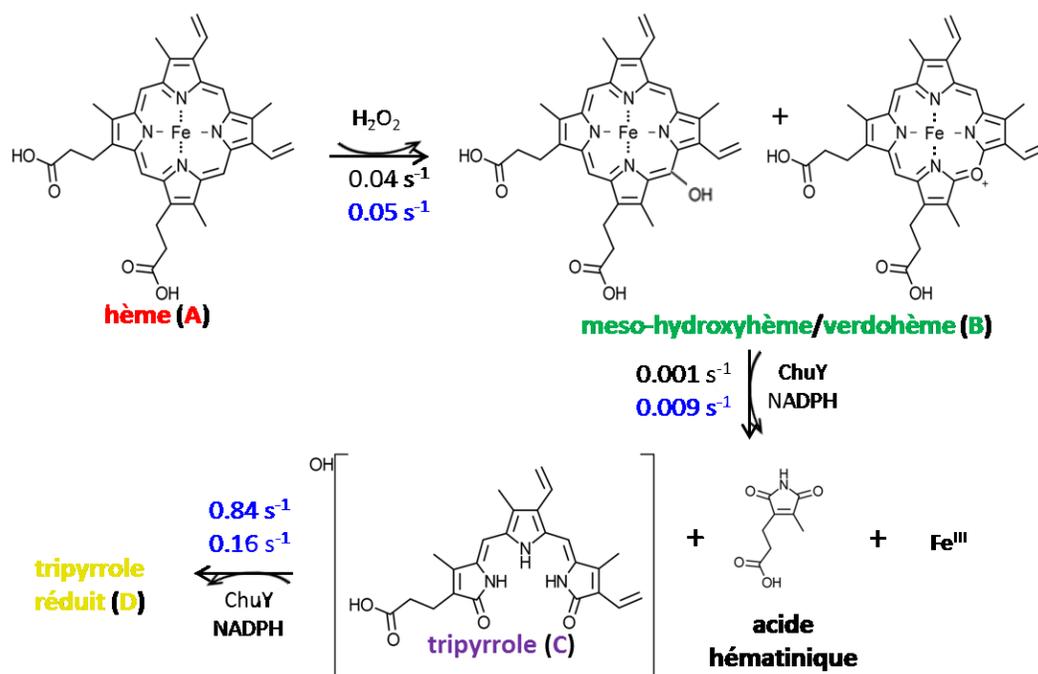


Figure 36 : Modèle de la réaction de dégradation de l'hème de la protéine ChuS_{N-His} en absence et en présence de la protéine ChuY_{N-Strep}

Les constantes associées à la réaction de ChuS_{N-His} seule sont en noirs tandis que celles de la réaction en présence de ChuY_{N-Strep} sont bleues. L'étape limitante est dans les deux cas l'ouverture du porphyrine. La structure du produit final n'est pas représentée, car elle reste à être caractérisée.

3.7.3 Dosage du fer libéré en solution

Lors de la réaction de dégradation de l'hème effectuée par ChuS_{N-His} seule, $46 \pm 3 \%$ du fer est libéré en solution après 60 minutes. Le résultat obtenu par le dosage du fer libéré par cette réaction se rapproche de la valeur de 58 % présenté lors de précédentes études [21]. Lorsque la même réaction est effectuée en présence d'une concentration égale de ChuY_{N-Strep} et de cinq équivalents du cofacteur NADPH, $71 \pm 3 \%$ du fer initial est dosé en solution après seulement 15 minutes d'incubation. Ces résultats indiquent qu'il y a une accélération de la vitesse de la réaction ainsi qu'une augmentation du fer libéré en solution lorsque la protéine ChuY_{N-Strep} est présente. Ceci corrèle avec les observations faites en spectroscopie optique qui sont décrites à la section 3.7.1. La fer ne peut pas être libéré en entier, car une faible portion de la réaction de ChuS_{N-His} est arrêtée à l'intermédiaire verdohème tel que montré par l'extraction à la pyridine [21]. Les études en RPE ont aussi révélé qu'une

grande proportion du fer reste fixé sur la protéine ChuS_{N-His} après la réaction [21]. Pour corriger ce problème de dosage, des essais ont été effectués en ajoutant le HCl à la réaction avant l'étape de l'ultrafiltration pour détacher le fer qui pourrait être sur ChuS_{N-His}. Ces expériences ont révélé que plus de fer était dosé en solution de cette façon (82% du fer libéré). Cependant, en ajoutant l'acide avant de séparer la protéine du fer libéré du porphyrine, le verdohème présent sur ChuS_{N-His} est hydrolysé ce qui libère le fer du verdohème. Dans ces conditions, le fer dosé est celui libéré par l'action de ChuY-ChuS additionné de celui libéré par l'hydrolyse acide du verdohème, ce qui peut fausser les données.

3.8 Caractérisation de la protéine ChuX_{N-Strep}

3.8.1 Transfert de l'hème de la protéine Chu_{N-Strep}X à ChuS_{N-His}

En mélangeant de la protéine holo-ChuX_{N-Strep} avec de la protéine apo-ChuS_{N-His}, en concentrations égales on observe un changement de la bande de Soret dans le spectre d'absorption (Figure 37 A). Au départ, le spectre optique de la protéine holo-ChuX_{N-Strep} est caractérisé par une bande de Soret situé à 390 nm et ayant une absorption d'environ 0.4. Lorsque la protéine apo-ChuS_{N-His} est ajoutée, on observe un changement du spectre optique. La bande de Soret s'est modifiée rapidement par l'ajout de la protéine apo-ChuS_{N-His} et devient plus caractéristique à celle-ci, passant de 390 nm à 408 nm. De plus, l'absorbance augmente de 0.4 à 0.6, ce qui est normalement observé pour 5 μ M d'holo-ChuS_{N-His} reconstituée complètement avec l'hème. Ce résultat suggère que l'hème a été transféré de ChuX_{N-Strep} à ChuS_{N-His}. Bien que la majorité de l'hème semble être transféré, il est difficile de quantifier précisément la fraction de l'hème qui est maintenant sur la protéine ChuS_{N-His}. En accord avec un transfert substantiel vers ChuS_{N-His}, on peut aussi observer que la couleur de la solution passe d'une couleur brunâtre au rouge lors du mélange des deux protéines. En ajoutant du peroxyde d'hydrogène au mélange, la réaction de dégradation de l'hème de ChuS_{N-His} est initiée, démontrant que de l'hème était bien présent sur ChuS_{N-His} (Figure 37 B). La réaction est cependant arrêtée à l'intermédiaire verdohème, tel que vérifié par le spectre pyridine-hémochrome montré à la Figure 41 (section 3.9.1). Pour être certain que cette dégradation n'était pas due à une activité

enzymatique inconnue de ChuX_{N-Strep}, du peroxyde d'hydrogène a été ajoutée à holo-ChuX_{N-Strep} (sans ChuS). La Figure 38 démontre qu'il n'y a pas de formation de verdohème. Les variations se limitent à une baisse d'absorbance de la bande de Soret. La baisse d'intensité de la bande de Soret pourrait être causée par une faible dégradation non spécifique de l'hème (oxydation couplée). Ces résultats permettent d'ajouter la protéine ChuX_{N-Strep} au modèle de réaction proposé à la section 3.7.2. La voie commence d'abord par ChuX_{N-Strep} qui capterait l'excès d'hème libre. ChuX_{N-Strep} le donne ensuite à ChuS_{N-His} pour que celle-ci assure sa dégradation et finalement ChuY_{N-Strep} accélère la réaction en plus de réduire le tripyrrole mauve en un composé jaune.

Des essais ont été effectués pour essayer de déterminer s'il y a présence d'un complexe entre les protéines ChuX_{N-Strep} et ChuS_{N-His}. Toutefois, les résultats n'ont pas été concluants car les méthodes utilisées ne permettraient en fait que de visualiser la formation de complexes stables (filtration sur gel et « pull-down », non montré). Nos évidences indiquent plutôt que les deux protéines devraient plutôt interagir selon un complexe dynamique. Des études supplémentaires portant sur la vérification d'un tel complexe seraient intéressantes et pourraient être effectuées à l'aide d'autres méthodes dont la résonance plasmique de surface.

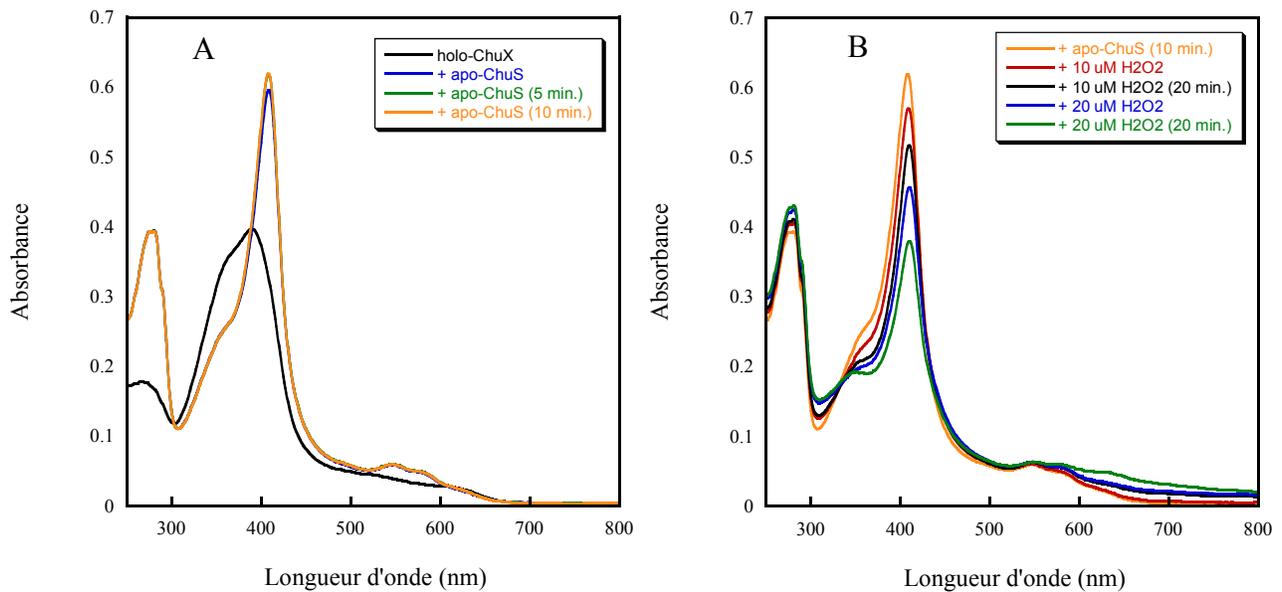


Figure 37 : Transfert de l'hème de holo-ChuX_{N-Strep} à apo-ChuS_{N-His} et ajout de peroxyde d'hydrogène pour initier la dégradation de l'hème

Le transfert d'hème a été effectué en ajoutant 5 μ M d'apo-ChuS_{N-His} à 5 μ M d'holo-ChuX dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8 (A). Le spectre final de la Figure 37 A devient le spectre initial de la Figure 37 B. La dégradation de l'hème de ChuS a été initiée par l'ajout de 10 μ M de peroxyde d'hydrogène (B). Une dose supplémentaire de peroxyde d'hydrogène a été ajoutée par la suite. La réaction a été suivie au spectrophotomètre en enregistrant des spectres d'absorption (250-800 nm) aux 5 minutes pendant 10 et 20 minutes à 20°C.

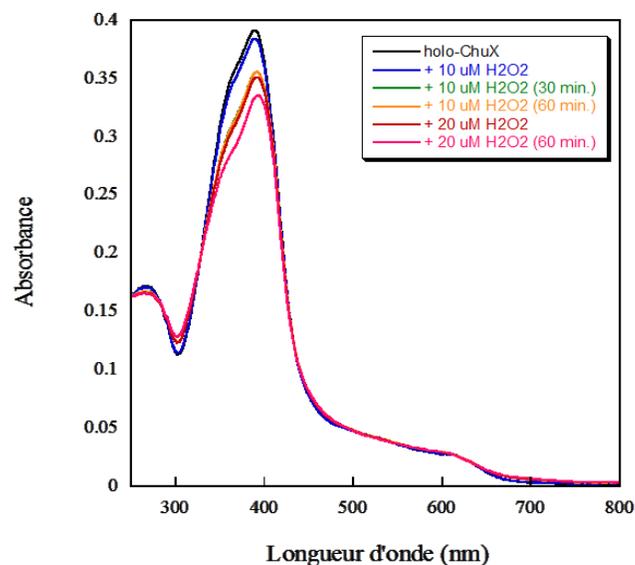


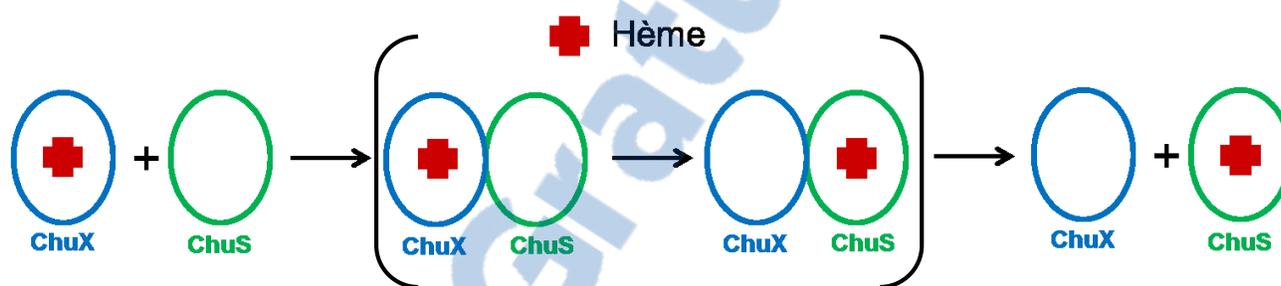
Figure 38 : Réaction d'holo-ChuX_{N-Strep} en présence de peroxyde d'hydrogène

La réaction d'holo-ChuX en présence de peroxyde d'hydrogène a été effectuée en ajoutant 10 μM de peroxyde d'hydrogène à 5 μM de la protéine dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8. Une dose supplémentaire de peroxyde d'hydrogène a été ajoutée par la suite. La réaction a été suivie au spectrophotomètre en enregistrant des spectres d'absorption (250-800 nm) sur 60 minutes à 20°C.

3.8.2 Vitesse de transfert de l'hème

En spectroscopie d'absorption, on observe que la vitesse de transfert de l'hème entre la protéine holo-ChuX_{N-Strep} et apo-ChuS_{N-His} semble rapide. Ceci peut sembler étonnant, étant donné que les deux protéines ont des constantes d'affinité (K_d) semblables pour l'hème, soit $1.0 \pm 0.3 \mu\text{M}$ pour ChuS [40] et $1.99 \pm 0.02 \mu\text{M}$ pour ChuX [42]. Dans le but de déterminer la vitesse de transfert, des cinétiques pré-stationnaires ont été enregistrées en suivant l'augmentation de l'absorbance à 410 nm à l'aide d'un mélangeur à flux arrêté. Les cinétiques pré-stationnaires du mélange de 2.5 μM de holo-ChuX_{N-Strep} avec différentes concentrations (25, 37.5, 50, 62.5 et 75 μM) de apo-ChuS_{N-His} dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8 ont été enregistrées sur 10, 20 et 50 secondes en triplicata à 20°C. Les tracés ont d'abord été coupés à un temps de 5 secondes et étudiés selon un modèle $A \rightarrow B \rightarrow C$ pour déterminer la constante k_1 (très rapide). Une fois la valeur de la première exponentielle déterminée, les cinétiques complètes ont été analysées selon le modèle $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$ en fixant la première exponentielle à celle ayant été calculée puisque sur des temps longs, la première exponentielle est plus difficile à observer précisément.

À la Figure 39, on observe que chacune des trois constantes de vitesse est indépendante de la concentration d'apo-ChuS_{N-His} présente dans l'essai. L'étape limitante n'est donc pas une réaction bi-moléculaire. Deux scénarios permettraient d'expliquer le transfert d'hème. Un premier impliquerait la dissociation de l'hème de ChuX_{N-Strep} (sans complexe avec ChuS_{N-His}) et l'association subséquente de l'hème (en solution) à l'apo-ChuS_{N-His} pour former holo-ChuS_{N-His}. Ce scénario n'est pas privilégié parce qu'il est possible de purifier les deux protéines sous forme holo même si la K_d est relativement élevée (μM). L'hème ne semble donc pas se dissocier facilement de ces protéines. Le second scénario propose la formation d'un complexe transitoire entre ChuX_{N-Strep} et ChuS_{N-His} pour le transfert de l'hème selon le schéma suivant :



La première exponentielle observée, soit $2.9 \pm 0.9 \text{ s}^{-1}$, correspondrait à l'étape de transfert de l'hème de la protéine ChuX_{N-Strep} à la protéine ChuS_{N-His} (entre parenthèses). Selon le schéma présenté, cette étape n'est pas celle qui est dépendante de la concentration d'apo-ChuS_{N-His} dans l'essai. En fait, l'étape bimoléculaire serait l'étape de l'interaction entre les deux protéines avant qu'il y ait le transfert de l'hème. Comme l'augmentation de l'absorbance à 410 nm est due à la coordination de l'hème au site actif de la protéine ChuS, on peut déduire que l'interaction entre les deux protéines semble très rapide et ne peut pas être déterminée ici. Dans ce scénario, la deuxième exponentielle, $0.5 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$, et la troisième exponentielle, $0.05 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$, pourraient être reliées à des changements de conformation de l'hème coordonné à ChuS ou encore à une vitesse très lente de dissociation de l'hème de ChuX_{N-Strep}. Il faut aussi noter que la réaction semble majoritairement unidirectionnelle, c'est-à-dire que la majorité des molécules d'hème sont sur la protéine ChuS_{N-His} une fois qu'elle est transférée. Comme la réaction biomoléculaire ne peut être détectée, sa constante de vitesse n'a pu être calculée. Toutefois, il est intéressant de noter que la première constante de vitesse obtenue dans cette réaction de

transfert est environ 32 fois plus rapide que celle qui a été observée pour le transfert de l'hème de holo-PhuS à apo-HO chez *Pseudomonas aeruginosa* [19].

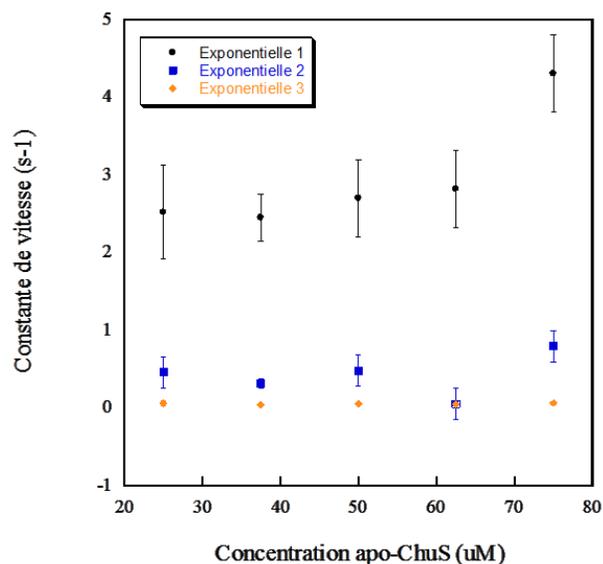


Figure 39 : Graphique des constantes observées pour le transfert de l'hème en fonction de la concentration de la protéine apo-ChuS_{N-His}

Les constantes ont été obtenues en enregistrant les cinétiques pré-stationnaires à 410 nm à l'aide d'un mélangeur à flux arrêté. Les essais ont été effectués avec 2.5 μ M de holo-ChuX_{N-Strep} et différentes concentration de apo-ChuS_{N-His} (25, 37.5, 50, 62.5 et 75 μ M) dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8 à 20°C.

3.9 Réaction de dégradation de l'hème par ChuS_{N-His} dans du tampon Tris-HCl

3.9.1 Réaction de la protéine ChuS_{N-His} avec le peroxyde d'hydrogène dans du tampon Tris-HCl

Contrairement aux essais effectués avec la protéine ChuY_{N-Strep} les essais combinant les protéines ChuX_{N-Strep} et ChuS_{N-His} ont été effectuées dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8, car la protéine ChuX_{N-Strep} précipite dans le tampon phosphate qui est normalement utilisé pour suivre la dégradation de l'hème. À cause de ce changement de tampon, on a pu observer que la réaction de dégradation de l'hème de ChuS_{N-His} dans du tampon Tris

s'arrête à l'intermédiaire verdohème et ne tend pas à former le tripyrrole pour libérer le fer en solution (Figure 37 B et Figure 40 A). Un ajout supplémentaire de peroxyde d'hydrogène a été nécessaire pour dégrader la majorité de l'hème vers le verdohème. On peut observer à la Figure 40 B que le mélange réactionnel est vert. La présence de verdohème a été confirmée par le spectre d'absorption de l'extraction à la pyridine (Figure 41) qui présentait les maxima typiques de celui-ci tel qu'indiqué au tableau de la Figure 41 [62]. La Figure 41 démontre qu'après le premier ajout de peroxyde d'hydrogène, de l'hème était toujours présent en solution et qu'après le deuxième ajout de peroxyde d'hydrogène les pics étaient devenus plus caractéristiques du verdohème. Le dosage du fer en solution après la réaction dans le tampon Tris, qui a donné une valeur nulle, a confirmé qu'il n'y avait pas de fer libéré en solution. Ces résultats obtenus avec le tampon Tris-HCl corrélaient avec ceux observés chez l'homologue PhuS de *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, les essais effectués avec la protéine PhuS démontrent que celle-ci produit aussi du verdohème dans du tampon Tris-HCl après l'ajout d'un donneur d'électron pour initier la réaction (acide ascorbique) [65]. Il serait intéressant de tester si la dégradation complète de l'hème par la protéine PhuS pourrait s'avérer possible dans du tampon phosphate.

Des études supplémentaires ont démontré que la protéine holo-ChuS_{N-His} possède une activité peroxydase dans le tampon 50 mM Tris-HCl pH 8 qui n'est pas observée dans le tampon phosphate (Figure 42). Cette activité n'a pas été caractérisée en détail mais on doit en tenir compte puisqu'elle pourrait entrer en compétition pour l'utilisation du peroxyde d'hydrogène lors de la réaction de dégradation de l'hème. Ceci expliquerait que l'ajout supplémentaire de peroxyde d'hydrogène soit nécessaire pour compléter la réaction jusqu'au verdohème dans le tampon Tris-Cl pH 8. La réaction effectuée par ChuS_{N-His} serait donc dépendante du tampon et peut-être même dépendante du pH. D'autres expériences seront nécessaires afin d'investiguer ces questions.

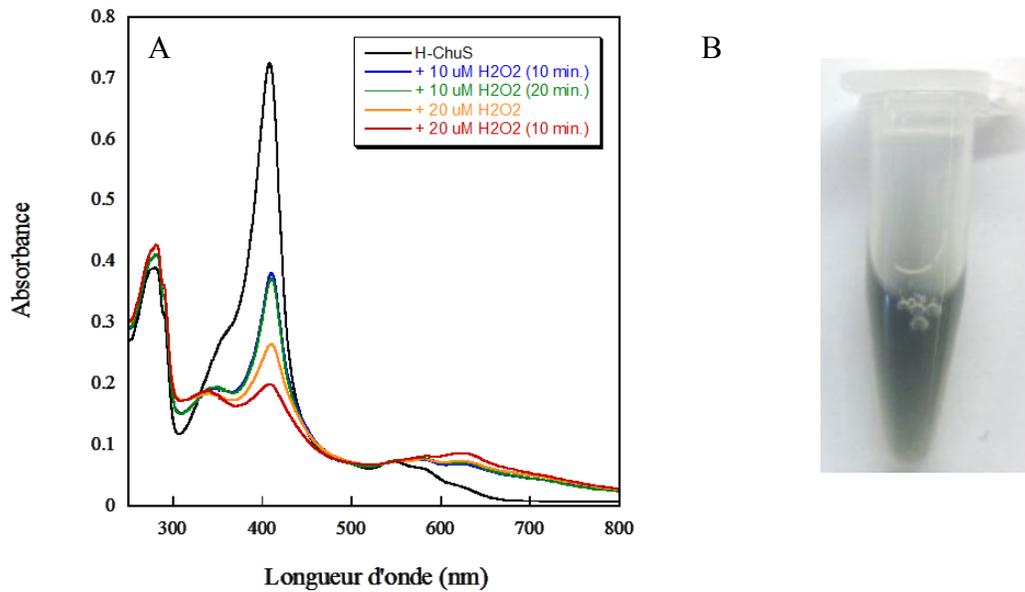
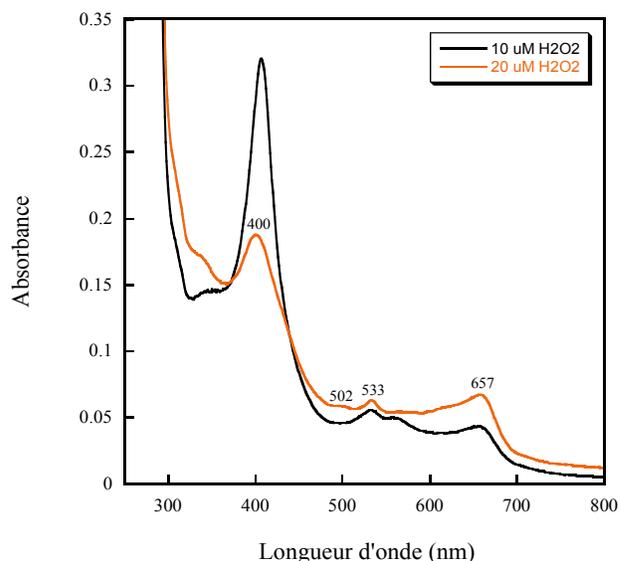


Figure 40 : Réaction d'holo-ChuS_{N-His} avec le peroxyde d'hydrogène

La réaction de dégradation de l'hème a été effectuée en ajoutant 10 μM de peroxyde d'hydrogène à 5 μM d'holo-ChuS_{N-His} dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8. Une dose supplémentaire de peroxyde d'hydrogène a été ajoutée au mélange après 20 minutes d'incubation. La réaction a été suivie au spectrophotomètre en enregistrant des spectres d'absorption (250-800 nm) à des intervalles de 10 minutes à 20°C (A). Visuellement, le mélange réactionnel prend une coloration verte (B).



Pics (nm)	Référence
396, 501, 534, 660	δ-verdohème [62]
400, 502, 533, 657	Ce travail

Figure 41 : Spectres d'absorption du complexe pyridine-verdohème issu de la réaction de dégradation de l'hème d'holo-ChuS_{N-His} dans du tampon Tris-HCl pH 8

Le mélange de la réaction, réalisée avec 5 μM d'holo-ChuS_{N-His} (Figure 40), a été utilisé pour l'extraction à la pyridine. Celle-ci a été effectuée en ajoutant de la pyridine à une concentration finale de 16% (v/v) et en éliminant la protéine précipitée par centrifugation. Les spectres d'absorption ont été enregistrés au spectrophotomètre (250-800 nm) à 20°C pour la réaction effectuée avec 10 μM de peroxyde d'hydrogène ainsi que pour celle avec 20 μM de peroxyde d'hydrogène total. Le tableau de droite montre les longueurs d'ondes des maxima pour une extraction à la pyridine en solution aqueuse effectuée avec du δ-verdohème [62] ainsi que les maxima observés pour la réaction de ChuS (Figure de gauche).

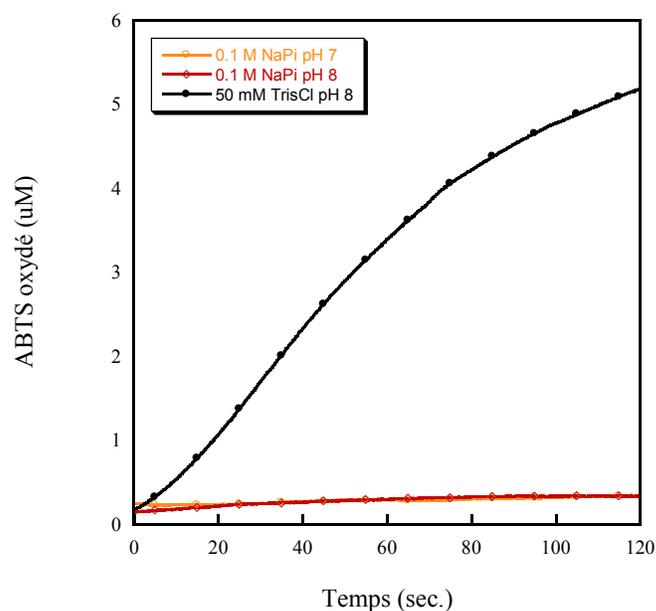


Figure 42 : Comparaison de l'activité peroxydase de la protéine holo-ChuS_{N-His} dans du tampon phosphate et de tampon Tris-HCl

Activité peroxydase de la protéine holo-ChuS_{N-His} dans du tampon phosphate et du tampon Tris-HCl. L'activité peroxydase a été mesurée avec 100 nM d'holo-ChuS_{N-His} en utilisant de l'ABTS (300 µM) et du H₂O₂ (500 µM) comme substrat dans du tampon 0.1 M NaPi pH 7 (cercle orange), 0.1 M NaPi pH 8 (losange rouge) et 50 mM Tris-HCl pH 8 (cercle noir).

3.9.2 Action de la protéine ChuY_{N-Strep}

La réaction d'holo-ChuS_{N-His} en présence de ChuY_{N-Strep} et de NADPH a été testée dans du tampon Tris-Cl pH 8.0 pour vérifier si la réaction était toujours arrêtée à l'intermédiaire verdohème. Étonnamment, la présence de la protéine ChuY_{N-Strep} permet de compléter une partie de la réaction (Figure 43). Bien qu'elle ne puisse être quantifiée, une fraction significative du verdohème a été dégradé (Figure 43). Selon les spectres optiques enregistrés en fonction du temps, la vitesse de dégradation de l'hème semble plus lente que celle étudiée dans du tampon phosphate. L'ajout de deux excès molaires de peroxyde d'hydrogène paraît suffisant pour compléter la réaction, ce qui n'est pas le cas pour celle d'holo-ChuS_{N-His} seule dans le tampon Tris-HCl pH 8.0. À la Figure 43, on voit que les spectres d'absorption en cours de réaction dans du tampon Tris sont différents de ceux observés pour la même réaction dans du tampon phosphate (Figure 33). Pour faciliter la

comparaison des spectres optiques enregistrés à des temps similaires ont été extraits des Figures 33 et 43 A et superposés (Figure 43 B). En effet, l'intermédiaire verdohème n'est pas aussi bien visualisé malgré que l'augmentation de l'absorbance dans la région visible 700-800 nm soit toujours présente. Toutefois, le produit final de la réaction montre un spectre d'absorption et une couleur jaune similaires à ceux de la réaction dans le tampon phosphate. Après 75 minutes d'incubation d'une réaction effectuée en présence de ChuY_{N-Strep}, le pourcentage de fer dosé en solution était de 31 ± 1 % comparativement à zéro pour holo-ChuS_{N-His} seule ce qui confirme qu'une partie de l'hème a été dégradé au-delà du verdohème. Le faible pourcentage de fer libéré en présence de ChuY_{N-Strep} pourrait être dû au fer qui est complexé à la protéine ChuS_{N-His} et à une fraction d'hème non dégradé. En effet, une partie de l'hème pourrait se trouver sous la forme de composé I ou de composé II à cause de l'activité peroxydase de la protéine ChuS_{N-His}.

Il est important de souligner que, lorsqu'on ajoute la protéine ChuY_{N-Strep} avec le cofacteur NADPH au verdohème créé d'abord par la réaction de ChuS_{N-His} seule dans le tampon Tris-Cl, une partie du verdohème est transformé en produit final jaune (non-montré). Ce résultat confirme que dans le tampon Tris-HCl, ChuY_{N-Strep} permet la dégradation du verdohème. L'activité de ChuY_{N-Strep} dans le tampon Tris-HCl est donc en quelque sorte encore plus spectaculaire que l'accélération de la conversion du verdohème en produit final par ChuS dans le tampon phosphate.

A

B

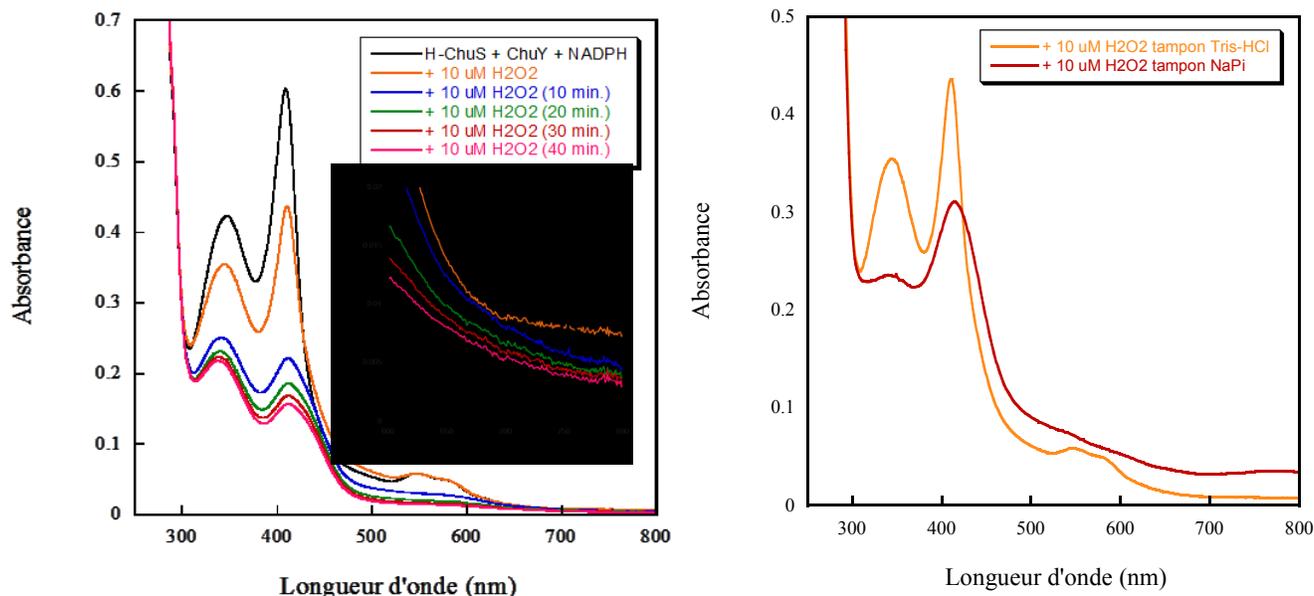


Figure 43 : Réaction d'holo-ChuS_{N-His} en présence de ChuY_{N-Strep} et NADPH avec le peroxyde d'hydrogène

La réaction de dégradation de l'hème a été effectuée en ajoutant 10 μM de peroxyde d'hydrogène à 5 μM d'holo-ChuS_{N-His}, 5 μM de ChuY_{N-Strep} et 25 μM de NADPH dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8. La réaction a été suivie au spectrophotomètre en enregistrant des spectres d'absorption (250-800 nm) aux 10 minutes pendant 40 minutes à 20°C. Un agrandissement de la figure dans la région 600–800 nm est présent montrant une faible augmentation de l'absorbance dans le visible (A). Comparaison des spectres optiques de la réaction effectuée dans du tampon phosphate (Figure 33) et celle effectuée dans du tampon Tris-HCl (Figure 43 A) directement après l'ajout de peroxyde d'hydrogène (B).

3.9.4 Détermination des constantes liées aux réactions

Les cinétiques pré-stationnaires de la réaction de ChuS_{N-His} avec et sans ChuY_{N-Strep} dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8 ont été mesurées afin de les comparer avec la réaction produite dans du tampon phosphate. Comme les réactions semblaient plus lentes, elles ont été enregistrées à l'aide d'un spectrophotomètre plutôt qu'un mélangeur à flux arrêté. La réaction de holo-ChuS_{N-His} seule a été suivie à 410 nm et 750 nm et la réaction en présence de ChuY_{N-Strep} à 410 nm et 500 nm. Pour déterminer les constantes de vitesse de la réaction de holo-ChuS_{N-His} seule, un modèle à deux exponentielles a été nécessaire, $A \rightarrow B \rightarrow X$, où A correspond à l'hème, B est le mélange hydroxyhème/verdohème et la nature de X est incertaine. Pour sa part, la réaction en présence de ChuY_{N-Strep} a été analysée selon le mécanisme $A \rightarrow B \rightarrow D$, où A correspond à l'hème, B est le mélange

hydroxyhème/verdohème et D le produit final jaune. Les constantes de vitesse ont été calculées à partir d'essais suivis à deux longueurs d'onde, effectués en trois journées distinctes et en triplicata. Les résultats sont présentés dans le Tableau 17. Les concentrations finales obtenues après mélange étaient de 5 μM d'holo-ChuS_{N-His}, 5 μM de ChuY_{N-Strep}, 10 μM de H₂O₂ et 25 μM de NADPH.

Pour la réaction impliquant seulement la protéine ChuS_{N-His}, l'hème est transformé en hydroxyhème/verdohème à une vitesse de $0.026 \pm 0.005 \text{ s}^{-1}$ (Figure 44). Cette constante est plus petite (Tableau 17) mais toutefois demeure dans le même ordre de grandeur que celle observée pour la réaction dans le tampon phosphate (Tableau 15, 0.04 s^{-1}). Une deuxième exponentielle, $0.003 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$, fut nécessaire pour modéliser les données. Celle-ci pourrait avoir pour origine une transformation plus lente de l'hème en verdohème ou être causée par l'activité peroxydase de la protéine. La réaction de ChuS_{N-His} est arrêtée à l'intermédiaire hydroxyhème/verdohème dans du tampon Tris-HCl pH 8. En présence de la protéine ChuY_{N-Strep}, l'hème passe à l'intermédiaire hydroxyhème/verdohème avec une constante de vitesse de $0.028 \pm 0.006 \text{ s}^{-1}$ (Figure 44). Ensuite, le produit final jaune est généré à une vitesse de $0.006 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$. La première constante de vitesse de la réaction est pratiquement la même que pour la réaction de ChuS_{N-His} seule et environ deux fois plus lente que la réaction dans le tampon phosphate (Tableau 15). La deuxième portion de la réaction s'effectue aussi un plus lentement ($k_{\text{obs}} = 0.006 \text{ s}^{-1}$) que ce qui est observé dans le tampon phosphate (Tableau 15, $k_{\text{obs}} = 0.009 \text{ s}^{-1}$). Toutefois, les constantes de vitesse observées dans le tampon Tris-Cl ont le même ordre de grandeur que celles dans le tampon phosphate et l'étape limitante de la réaction reste la même, soit l'ouverture du porphyrine. Une troisième constante de vitesse, $0.0004 \pm 0.0003 \text{ s}^{-1}$, a été nécessaire pour modéliser les données de la réaction en présence de ChuY_{N-Strep}. Celle-ci proviendrait de l'instabilité du produit final dans le temps. On voit aussi à la Figure 44 qu'il y a une plus grande baisse d'absorbance à 410 nm lorsque la protéine ChuY_{N-Strep} est présente. Bien que certains éléments soient différents de la réaction dans le tampon phosphate, il est important de noter que la protéine ChuY_{N-Strep} permet de compléter, à tout le moins en partie, la réaction normalement arrêté à l'intermédiaire verdohème avec ChuS_{N-His}.

Tableau 17 : Constantes de vitesse observées pour la réaction de ChuS_{N-His} dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8

Protéine	Constante de vitesse observée pour les différentes étapes (s ⁻¹)	
	A → B	B → D
ChuS _{N-His}	0.026 ± 0.005	-
ChuS _{N-His} + ChuY _{N-Strep}	0.028 ± 0.006	0.006 ± 0.002

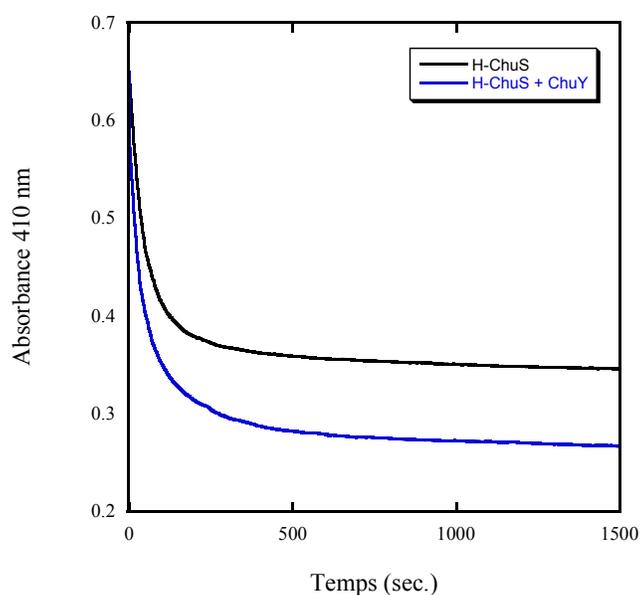


Figure 44 : Cinétiques de la réaction d'holo-ChuS_{N-His} avec le peroxyde d'hydrogène avec ou sans la présence de ChuY_{N-Strep} et de NADPH dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8.

La réaction de dégradation de l'hème a été effectuée en ajoutant 10 μM de H₂O₂ à 5 μM d'holo-ChuS_{N-His} avec ou sans la présence de 5 μM de ChuY_{N-Strep} et 25 μM de NADPH dans du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8. L'absorbance à 410 nm a été suivie au spectrophotomètre sur 1500 secondes à 20°C.

Chapitre 4 : Discussion

Les microorganismes ont besoin de fer pour croître et se multiplier puisqu'il est un cofacteur essentiel pour des enzymes impliquées dans des processus cellulaires vitaux. À cause de sa faible solubilité et de ses propriétés oxydantes au pH physiologique, la majorité du fer est séquestré par des protéines chez l'humain, notamment dans l'hème de l'hémoglobine [1]. Les bactéries pathogènes ont développé diverses façons d'acquérir le fer de l'hôte. Ainsi on retrouve chez certaines bactéries, dont *Escherichia coli* O157:H7, le regroupement de gènes *chu* codant pour un système d'acquisition direct de l'hème. Quatre des huit gènes de ce regroupement codent pour des protéines nécessaires à la capture et au transport de l'hème de la membrane externe vers le cytoplasme. Un cinquième gène, codant la protéine cytoplasmique ChuS, dégrade l'hème en ouvrant l'anneau porphyrine pour rendre le fer disponible à l'organisme [21]. Il y a ainsi trois gènes auxquels peu d'attention a été portée soit *chuX*, *chuY* et *chuW*. L'objectif de ce projet était de purifier et de caractériser les protéines codées par ces gènes afin de mieux comprendre leurs rôles respectifs dans cette voie d'acquisition de l'hème chez *E. coli* O157:H7.

4.1 Clonage et expression des protéines

Les gènes *chuX*, *chuY* et *chuW* ont été amplifiés à partir d'un lysat d'*E. coli* O157:H7 (EDL 933). Dès le premier essai, les résultats ont démontré une bonne efficacité et une bonne spécificité d'amplification. Les différentes variables d'amplification n'ont pas eu besoin d'être optimisées pour le clonage de ces gènes.

Les niveaux d'expression des protéines ChuY_{N-Strep} et ChuW_{N-Strep} étaient très élevés dans *E. coli* BL21 (DE3). Cependant, la protéine ChuW_{N-Strep} était retrouvée entièrement dans la portion insoluble. Malgré plusieurs tentatives d'optimisation des conditions d'expression et de bris des cellules, ChuW n'est jamais devenue soluble. Ceci pourrait être causé par la sensibilité à l'oxygène bien connue pour les protéines à centre fer-souffre. ChuW_{N-Strep} a donc été purifiée sous conditions dénaturantes. La protéine ChuX_{N-Strep} ne présentait aucune expression dans la souche BL21 (DE3). La recherche sur la présence de codons rares d'*E.*

coli a mené à l'essai de l'expression chez la bactérie *E. coli* Rosetta 2 (DE3), une souche optimisée pour régler ce type de problème. L'expression de $\text{ChuX}_{\text{N-Strep}}$ chez cette souche était plutôt faible mais tout de même présente. Ces conditions ont donc été conservées.

4.2 Purification des protéines

La purification des protéines $\text{ChuX}_{\text{N-Strep}}$, $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$ et $\text{ChuW}_{\text{N-Strep}}$, ayant toutes une étiquette streptag, par chromatographie d'affinité a donné de bons résultats. Les protéines $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$ et $\text{ChuW}_{\text{N-Strep}}$ étaient très pures alors que la protéine $\text{ChuX}_{\text{N-Strep}}$ ne contenait qu'une faible portion de contaminants. La capacité de liaison de la colonne StrepTrap HP limitait la quantité de protéine qui pouvait être déposée. Même si plusieurs cycles d'applications des protéines solubles étaient effectués, beaucoup de protéines étaient perdues lors de l'application des protéines sur la colonne et lors des lavages. Les rendements obtenus pour les protéines $\text{ChuX}_{\text{N-Strep}}$ et $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$, ~ 20 mg par litre de culture, sont tout de même bons et ont permis d'effectuer plusieurs essais sans devoir repurifier constamment ces protéines. Nous avons observé que la protéine $\text{ChuX}_{\text{N-Strep}}$ montre une légère couleur jaunâtre lors de la purification qui est due à une faible quantité d'hème lié tel que déterminé par le spectre d'absorption.

La quantité de $\text{ChuW}_{\text{N-term}}$ soluble obtenue après la purification était de $300 \mu\text{g/litre}$ de culture. Ce très faible rendement est dû à la précipitation de la protéine lors de l'étape de dialyse visant à renaturer la protéine après l'étape de solubilisation dans l'urée. Cette précipitation a peut-être été amplifiée par la présence de protéines contaminantes dans l'échantillon. En séparant d'abord $\text{ChuW}_{\text{N-Strep}}$ des contaminants, les chances d'obtenir une plus grande quantité de protéine soluble auraient peut-être été plus élevées. Mais les protéines solubilisées dans l'urée ne peuvent pas être directement appliquées sur la résine de la colonne StrepTrap HP à cause de la sensibilité de cette résine à l'urée. Cette approche serait possible sur une colonne de Ni-NTA mais cela demanderait que la protéine soit produite avec une étiquette histidine. À cause du temps déjà écoulé, la protéine ChuW a été mise de côté et les efforts de cette étude de maîtrise ont été portés sur les protéines $\text{ChuX}_{\text{N-Strep}}$ et $\text{ChuY}_{\text{N-Strep}}$.

Pour sa part, la protéine ChuS_{N-His} fusionnée à une étiquette histidine a montré de très bons rendements de purification, soit 300 mg/litre de culture. Des quantités plus élevées de protéines sont notées lors des purifications sur colonne de Ni-NTA pour ChuS_{His}, tout comme pour la protéine ChuX_{His}. La résine a une plus grande capacité de liaison et un seul cycle est suffisant pour appliquer la totalité des protéines solubles récoltées. Peu de protéines d'intérêt sont perdues dans le « flow-through » et les lavages. Toutefois, par cette méthode plus de contaminants sont visualisés sur gel SDS-PAGE. Pour diminuer ceux-ci, plus de lavages à différentes concentrations d'imidazole pourraient être effectuées. Dans le cas de ChuS_{N-His}, la majorité des contaminants présents sont éliminés lors de la reconstitution sur une colonne à échangeurs d'anions. La protéine ChuS_{N-His} possède une couleur mauve lors de la purification, car il semble y avoir une activité de dégradation de l'hème *in vivo* menant au tripyrrole mauve qui reste accroché à la protéine.

4.3 Reconstitution des protéines ChuX et ChuS avec de l'hème

4.3.1 Reconstitution de la protéine ChuX

Selon les études précédentes faites sur ChuX, il est attendu que chaque protéine lie une molécule d'hème [42]. Le pourcentage de protéines sous forme holo dans l'échantillon a été déterminé par le dosage pyridine-hémochrome par rapport au dosage par la méthode de Bradford. Pour la reconstitution de la protéine ChuX_{N-Strep} avec de l'hème, il a fallu plusieurs essais pour trouver la méthode à utiliser afin d'enlever l'excès d'hème en solution. La protéine a une trop faible affinité pour l'hème pour l'utilisation de la technique standard du laboratoire soit une chromatographie sur échangeur d'anions ($K_d = 1.99 \pm 0.02 \mu\text{M}$, [42]). De plus, un changement de tampon a été nécessaire vu la tendance de ChuX à précipiter dans le tampon phosphate. Nous avons observé que l'hème avait tendance à interagir avec la résine des différentes colonnes testées. Finalement, la méthode par chromatographie de filtration sur gel à l'aide de colonnes qui sont centrifugées s'est révélée être la meilleure. Dans nos mains, c'est la seule technique essayée qui a permis d'obtenir une préparation de protéine où chaque site de liaison avait un hème lié. Comme le mélange hème/protéine passait très peu de temps sur la colonne, la rapidité de la chromatographie

devait aider au maintien de l'hème sur la protéine. Toutefois, le volume d'échantillon maximal est faible (75 μ L). Plusieurs colonnes doivent donc être utilisées en série pour obtenir une quantité raisonnable d'holo-ChuX_N-Strep. Cela est donc plus dispendieux comme méthode de reconstitution.

Le spectre optique de la protéine holo-ChuX_N-Strep obtenu au cours de cette étude n'est pas identique à celui publié par Suits et al. 2009 [42]. Dans cette étude, le spectre optique de la protéine avait une plus grande dominance de la coordination 6c de l'hème avec une bande de Soret à 404 nm comparativement à 390 nm pour l'étude présentée dans ce mémoire. Dans la publication, il n'est pas noté si la protéine est reconstituée à 100% ou si seulement une fraction de la protéine contient de l'hème. Lors des essais effectués pour éliminer l'excès d'hème de la protéine par filtration sur gel, soit la méthode utilisée dans le papier, nos résultats ont démontré que seulement 25% des protéines étaient reconstituées sous forme holo. De plus, cette méthode sélectionnait préférentiellement une coordination de l'hème 6c. Ainsi, il est possible que les spectres optiques obtenus par Suits et al. aient été enrichis par une forme 6c sélectionnée par la méthode de reconstitution. C'est pourquoi le spectre optique de holo-ChuX publié ne correspond peut-être pas à celui de la protéine complexée à l'hème à 100%.

4.3.2 Reconstitution de la protéine ChuS

Les conditions de reconstitution de la protéine ChuS avec l'hème étaient déjà connues grâce aux études précédentes faites sur celle-ci [21]. Il est très facile de reconstituer une grande quantité de ChuS en une seule expérience et d'avoir un bon rendement. Grâce au dosage pyridine-hémochrome et au dosage par la méthode de Bradford, on peut s'assurer que chaque protéine ChuS contient une molécule d'hème dans son site actif.

4.4 Propriétés de la protéine ChuX

Nos études spectroscopiques ont démontré que la protéine holo-ChuX_{N-Strep} transfère sa molécule d'hème à la protéine apo-ChuS_{N-His} rapidement. Les constantes d'affinité de l'hème de ces deux protéines sont très semblables, soit 1 μM pour ChuS et 2 μM pour ChuX [40, 42]. Avec de telles K_d relativement élevées, on pourrait penser qu'une partie de l'hème des protéines holo devrait repasser en solution ce qui pourrait expliquer le transfert d'hème entre ces protéines. Mais ça ne semble pas être une explication suffisante en soi. Si l'hème se dissociait facilement de ChuX et de ChuS en solution, l'hème pourrait être perdu en cours de purification et il serait alors impossible de purifier la forme holo de ces protéines. Comme il est tout à fait possible de purifier ChuX et ChuS sous forme holo, cela suggère que l'hème ne se dissocie pas si facilement. L'interaction des protéines ChuX et ChuS, et la formation d'un complexe transitoire, pourraient expliquer que le transfert de l'hème s'effectue et expliquer que le transfert semble unidirectionnel malgré la faible différence entre les constantes d'affinité. Des études supplémentaires visant à mettre en évidence une interaction transitoire entre ces deux protéines seraient intéressantes.

Les résultats obtenus appuient le rôle qui était proposé pour la protéine ChuX, soit le transport et le stockage de l'hème. De plus, ChuX pourrait avoir un rôle contre la toxicité de l'hème. Comme mentionné en introduction (section 1.2.4), l'hème peut être très toxique pour la cellule et son accumulation sous forme libre peut causer un grand stress oxydatif pour celle-ci. Donc, bien que l'hème soit une biomolécule essentielle, elle peut être néfaste pour la bactérie qui l'acquière. Le stockage de l'hème par ChuX pourrait permettre son confinement lorsque la concentration d'hème dans la cellule est élevée jusqu'à l'obtention d'une équilibre entre l'acquisition de l'hème et son utilisation. Il serait aussi intéressant de déterminer, par des études *in vivo*, si la présence de ChuX confère un avantage à la cellule lorsque la concentration en hème dans le milieu est élevée. À ce jour, dans la littérature, les stratégies de séquestration de l'hème par les bactéries sont très peu connues et caractérisées [8, 25]. Les découvertes impliquant la protéine ChuX dans cette étude font un pas vers une meilleure compréhension de l'utilisation de l'hème par les bactéries pathogènes. Des études effectuées sur les protéines ShuT, ShuU, ShuV et ShuS de *Shigella dysenteriae* ont démontré que la protéine ShuS semble nécessaire au relâchement de l'hème dans le

cytoplasme par le transporteur ABC [34]. Dans ce cas, la molécule d'hème doit être prise en charge par une protéine et ne peut pas être relâchée sous forme libre dans la cellule par le système ABC. Chez *E. coli* O157:H7, il serait intéressant de voir si les protéines ChuX et/ou ChuS pourraient jouer ce rôle.

4.5 La protéine ChuY

Notre étude a permis de confirmer que la protéine ChuY est une réductase du tripyrrole issu de la réaction de dégradation de l'hème catalysée par ChuS. Cette réaction catalytique a une légère préférence pour le cofacteur NADPH par rapport au NADH. Cette préférence a aussi été notée chez la biliverdine- β réductase, également membre des SDRs atypiques [50]. Dans la grande famille regroupant les SDRs, la préférence des enzymes pour un ou l'autre des cofacteurs, NADPH ou NADH, est divisée également. Cette distinction se joue sur la présence d'acides aminés acides ou basiques près ou dans le motif riche en glycine responsable de la liaison du cofacteur. La présence d'une arginine ou d'une lysine favorise le cofacteur NADPH tandis que la présence d'un aspartate ou un glutamate favorise le NADH [66]. Nos résultats ont également démontré que ChuY accélère neuf fois la vitesse de l'étape limitante de la réaction catalysée par ChuS qui est l'ouverture de l'anneau porphyrine de l'hème à partir du verdohème. Ce dernier résultat suggère que le complexe ChuS/verdohème est un substrat de ChuY au même titre que le complexe ChuS/tripyrrole. Les deux évidences sont 1-qu'il y a une accélération de la réaction de dégradation de l'hème de ChuS en présence de ChuY et de son cofacteur dans le tampon phosphate et 2-que la protéine ChuY permet de compléter une partie de la réaction dans du tampon Tris normalement arrêté à l'intermédiaire verdohème. De plus, nous avons pu confirmer l'accélération de la réaction de dégradation de ChuS en présence de ChuY par le dosage du fer. Ces dosages ont montré que 71% du fer de l'hème a été libéré en 15 minutes par le duo ChuY et ChuS comparativement à 46% en 60 minutes par ChuS seule. Bien que la nature du produit final issu de la réaction avec ChuY reste à être caractérisée, la détermination des constantes cinétiques a permis de proposer un modèle pour la réaction de dégradation de l'hème impliquant le travail concerté des protéines ChuS et ChuY. L'hypothèse que la protéine ChuY serait capable de réduire le fer du verdohème ferrique pour accélérer la

réaction de dégradation de l'hème a été considérée mais mise de côté en l'absence d'évidence que ChuY peut réduire l'hème présent sur ChuS. Il n'est pas connu par quel mécanisme ChuY accélère l'ouverture du verdohème par ChuS.

Lorsqu'on surexprime la protéine ChuS chez *E. coli*, le culot a une coloration bleuté tandis que lorsque les protéines ChuS et ChuY sont surexprimées ensemble, le culot de cellules est beige pâle (la surexpression des protéines a été validée par SDS-PAGE). Ces résultats laissent présumer que la réaction de dégradation de l'hème par ChuS ainsi que la réduction du tripyrrole se produisent de la même façon *in vivo* que *in vitro*. Le génome d'*E. coli* contient une vingtaine d'enzymes appartenant à la famille des SDRs (selon UniProt). Pourtant, la réduction du tripyrrole semble spécifique à la protéine ChuY car la réaction est arrêtée au tripyrrole mauve lors de la surexpression de ChuS dans *E. coli* en absence de ChuY.

La structure du produit réduit n'a pas encore été caractérisée. Toutefois, on suppose que celui-ci soit toujours sous la forme d'un tripyrrole et que ce soit l'une des doubles liaisons entre les groupements pyrroles qui ait été réduite. Certaines voies de biosynthèse de composés tripyrroliques ont été découvertes chez différentes bactéries. Les études effectuées sur les prodiginines ont démontré que ces molécules possédaient des activités antibactériennes, antifongiques, antiprotozoaires, antipaludiques, anticancers et d'immunosuppression [67]. Bien que la structure du tripyrrole issu de la réaction faite par ChuS, et aussi présumé du produit réduit par ChuY, diffèrent un peu de celles des prodiginines classiques par la présence d'un carbone de plus entre deux pyrroles (Figure 45), il serait intéressant de voir si le tripyrrole possède de telles activités biologiques. Le tripyrrole réduit pourrait aussi avoir un rôle similaire à celui de la bilirubine, un antioxydant important chez l'humain. La bilirubine, retrouvée abondamment dans le plasma sanguin, s'oxyde en présence de radicaux pour former de la biliverdine. La biliverdine est ensuite réduite en bilirubine par la biliverdine réductase afin de protéger la cellule d'un stress oxydatif [30]. D'autres activités physiologiques intéressantes sont possibles. Il se pourrait que la cellule puisse utiliser le tripyrrole comme source de carbone. Pour le démontrer, il faudrait d'essayer de faire croître *E. coli* sur milieu minimal ayant comme seule source de

carbone le tripyrrole ayant été isolé. Des études supplémentaires *in vivo* sur les produits de réaction, autant sur le tripyrrole mauve que celui réduit, seraient très intéressantes et pourraient ouvrir la porte à d'étonnantes découvertes. Finalement, comme le tripyrrole réduit reste accroché à l'une des protéines Chu, probablement ChuS, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il y a peut-être une autre protéine qui pourrait modifier le produit et permettre sa dissociation, par exemple par l'action de ChuW.

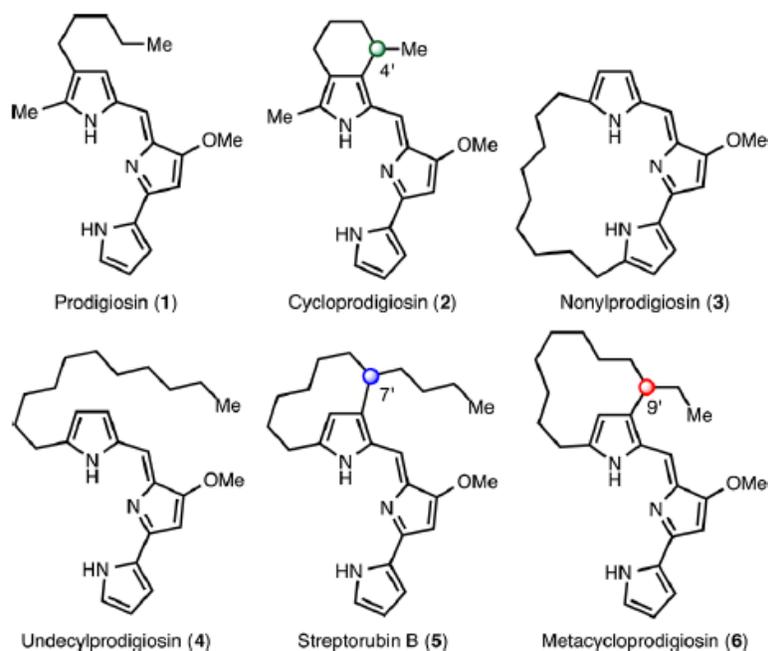


Figure 45 : Structures de différents membres de la famille des prodiginines

La famille des prodiginines comprend différentes molécules ayant un noyau tripyrrolique conservé [68].

4.6 La protéine ChuW

Peu d'études ont été effectuées sur la protéine ChuW_{N-Strep} au cours de ce projet. Énormément de temps a été consacré afin d'optimiser l'expression et essayer de rendre cette protéine soluble. Comme aucune condition n'a permis d'obtenir la protéine soluble en quantité appréciable, il a été conclu qu'elle serait purifiée sous conditions dénaturantes. Cependant, le taux de rendement fut de seulement 300 µg par litre de culture et la

reconstitution du centre fer-soufre n'a pas été obtenue. À cause du faible taux de rendement et de la complexité de reconstitution de centre fer-soufre, nos efforts ont plus été portés sur les protéines ChuX et ChuY.

Toutefois, la protéine ChuW pourrait être un quatrième joueur impliqué dans la réaction de dégradation de l'hème. Nos résultats montrent que ChuX donne l'hème à ChuS, ChuS dégrade l'hème et libère le fer alors que ChuY accélère la réaction faite par ChuS et réduit le tripyrrole issu de la réaction de dégradation d'hème. Cependant, le produit jaune est encore sur l'une des protéines, probablement ChuS, alors que l'on devrait s'attendre à ce que les produits d'une réaction enzymatique sont libérés dans l'environnement. La protéine ChuW est peut-être nécessaire au relâchement du produit. Elle pourrait compléter ainsi la voie de dégradation de l'hème et peut-être produire des molécules différentes utiles pour la cellule ou encore des molécules devant être excrétées par celle-ci. L'homologue de ChuW, HemN d'*E. coli*, catalyse une décarboxylation oxydative pour transformer deux groupements propionates de l'hème en groupements vinyles. Si la protéine ChuW avait une activité similaire, elle aurait la possibilité de transformer le groupement propionate qui est présent sur le tripyrrole issu de la réaction par ChuS. De plus, il est connu que les enzymes à radical SAM ont besoin d'une réductase pour réduire le centre fer-soufre et ainsi permettre leur réaction enzymatique. La protéine ChuY pourrait jouer ce rôle. D'un autre côté, on ne peut pas exclure que ChuW soit une protéine non fonctionnelle car son homologue chez *S. dysenteriae*, *shuW*, contient un codon stop au milieu de sa séquence. Toutefois, il a été démontré que le gène *chuW* est surexprimé lors de la survie d'*E. coli* O157:H7 dans un macrophage humain [38]. Il semble probable que le gène *chuW* doive donner un avantage à la cellule si celle-ci prend la peine de fournir de l'énergie pour son expression. Ces raisonnements ne restent que des suppositions et la purification de ChuW sous forme soluble pourrait permettre sa caractérisation afin de mener à une meilleure compréhension de son rôle. Pour obtenir plus de protéine, il serait intéressant de tester la purification de la protéine ChuW avec une étiquette histidine afin d'éliminer les protéines contaminantes, présente lors de la solubilisation à l'urée en permettant d'ajouter une étape de chromatographie d'affinité. De tels essais n'ont pas pu être effectués dans ce travail à cause de la sensibilité de la résine streptavidine à l'urée.

4.7 La protéine ChuS

Les résultats obtenus pour la protéine ChuY viennent appuyer le rôle proposé pour la protéine ChuS [40]. Le produit de la réaction catalysée par ChuS devient le substrat d'une autre protéine, ChuY. De plus, la présence de la protéine ChuY et de son cofacteur accélèrent neuf fois l'étape limitante de la réaction. Ces résultats appuient la proposition que la réaction de dégradation de l'hème fait par ChuS est spécifique et n'est pas seulement créée à cause des conditions oxydatives utilisées. Nos études ont aussi démontré que la réaction de ChuS semble être dépendante du tampon et peut-être du pH. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour investiguer ce point et déterminer les conditions optimales de réaction. Toutefois, les résultats obtenus dans le tampon 0.1 M NaPi pH 7 corrélerent avec les observations *in vivo*. En effet, la coloration bleue du culot de bactéries lors de la surexpression de ChuS corréle avec la coloration mauve du produit qui est observé lors de l'activité mesurée *in vitro* dans le tampon phosphate. Il est intéressant aussi de noter que, dans du tampon Tris-HCl, la protéine PhuS de *P. aeruginosa*, qui est une protéine homologue à ChuS et qui est décrite comme une chaperonne, a tout de même une activité catalytique menant à l'intermédiaire verdohème [19]. Il serait intéressant d'étudier la réaction de PhuS dans du tampon phosphate pour voir si elle progresse au-delà du verdohème.

4.8 Le regroupement de gènes *chu*

Ce projet a permis d'avoir une meilleure compréhension de la voie d'acquisition de l'hème chez *E. coli* O157:H7. En fait, les études effectuées sur les protéines ChuX et ChuY ont permis de proposer un modèle de réaction de dégradation de l'hème impliquant trois protéines. Premièrement, la protéine ChuX pourrait capter l'hème en excès présent dans la bactérie après son importation. Il y aurait ensuite transfert de l'hème de la protéine ChuX à la protéine ChuS. ChuS et ChuY travailleraient ensuite de concert pour dégrader l'hème et rendre le fer disponible à la cellule. Finalement, la protéine ChuY réduit le produit de la réaction catalysée par ChuS. On peut ainsi dire que les gènes *chu* constituent une voie métabolique où chaque protéine a un rôle précis. L'étude d'un tel sentier est fascinante.

Toutefois, il faut se rappeler que des études antérieures ont démontré qu'*E. coli* peut croître en milieu minimal en présence d'hème comme seule source de fer lorsque la protéine ChuA est exprimée. Cette protéine est responsable du transport de l'hème de la membrane externe vers le périplasma [33]. Dans ces conditions, il n'est pas connu comment s'effectue le transport de l'hème du périplasma vers le cytoplasme ainsi que la libération du fer de l'hème. Des études supplémentaires *in vivo* seraient intéressantes pour voir à quel point chaque gène aide à l'acquisition ou à l'utilisation efficace de l'hème par la bactérie. De plus, les gènes de type *chuX*, *chuY* et *chuW* ne sont pas retrouvés dans toutes les voies d'acquisition directes de l'hème et leur présence semble restreinte à une minorité d'entérobactéries pathogènes. À première vue, celles-ci n'ont pas de niche écologique distincte par rapport aux bactéries ayant certains gènes *chu* mais sans les gènes *chuWXY*. Il est à noter aussi que lorsque l'un de ces trois gènes est présent, soit *chuX*, *chuY* ou *chuW*, les autres le sont aussi. Ces trois gènes semblent donc s'être suivis au cours de l'évolution. Leur ordre est toujours le même, soit WXY, mais la configuration du trio au sein du regroupement de gènes diffère d'un organisme à un autre (non montré). Certaines bactéries possédant une voie homologue à celle des gènes *chu* n'ont pas ce trio de protéines telles que *P. aeruginosa*, *Enterobacter asburiae* et *Serratia marcescens*. Il semble ainsi y avoir deux catégories de système d'acquisition direct de l'hème chez les bactéries à Gram négatif pathogènes. Il y a des bactéries qui possèdent le regroupement de gènes *ASTUVWXY* (exemple *E. coli* O157:H7) et celles dont le regroupement contient plutôt seulement les gènes *RSTUV* (exemple *P. aeruginosa*). Les bactéries contenant les gènes *chuWXY* ont peut-être évolué de façon à utiliser le produit de dégradation de l'hème pour une fonction spécifique. Cette « voie couplée » pourrait en fait leur donner un avantage lors de l'infection d'un hôte.

4.9 Perspectives

La bactérie *Escherichia coli* O157:H7 est une entérobactérie à Gram négatif pathogène causant la maladie du hamburger. L'infection se produit chez l'humain en mangeant de la viande contaminée insuffisamment cuite. Typiquement, une infection par *E. coli* O157:H7 dure de cinq à sept jours et les symptômes suivants vont y être associés : fièvre, diarrhée,

vomissement et vives crampes d'estomac. Toutefois, cette bactérie peut aussi causer des problèmes plus graves comme un syndrome hémolytique ou urémique [69]. Aux États-Unis, il y a environ 73 000 cas d'infection par *E. coli* O157:H7 par an. Parmi ces infections, s'ensuivront 2 200 hospitalisations et 60 décès. Les coûts reliés aux infections par *E. coli* O157:H7 sont estimés à 405 millions de dollars [69].

Dans cette optique, une meilleure compréhension des protéines codées par les gènes *chu*, qui constituent le système d'acquisition direct de l'hème chez *E. coli* O157:H7, est importante pour évaluer si elles sont des cibles potentielles pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Comme l'acquisition de l'hème comme source de fer est importante pour la survie, la croissance et la virulence de la bactérie lors d'une infection, le dérèglement d'éléments clés de cette voie pourrait permettre à l'hôte de mieux se défendre [25]. Des études chez *Streptococcus agalactiae* et *Staphylococcus aureus* ont démontré que l'acquisition de l'hème donne un avantage durant l'infection [8]. Le fer de l'hème est essentiel pour les bactéries pour entre autre permettre la respiration en condition aérobie, pour diverses biosynthèses et pour la résistance au stress oxydatif dans les macrophages [8, 70]. De cette façon, les systèmes d'acquisition de l'hème donnent un avantage à la bactérie lors de l'infection. Il a également démontré chez *V. cholerae*, *S. aureus*, *Haemophilus* sp. et *Bordetella pertussis*, que la mutation des systèmes d'acquisition de l'hème atténuait la virulence de celles-ci [8]. C'est pourquoi une bonne connaissance des différents rôles et fonctions des protéines codées par le regroupement des gènes *chu* est importante.

Conclusion

L'objectif de cette étude était de cloner, de purifier et de caractériser les protéines de fonctions inconnues codées par les gènes *chu* afin de mieux comprendre leurs rôles respectifs dans cette voie d'acquisition de l'hème chez *Escherichia coli* O157:H7.

La première hypothèse proposait que la protéine ChuX permettrait de transférer l'hème à la protéine ChuS. Les résultats obtenus corrélaient avec cette proposition. La protéine holo-ChuX est en mesure de donner sa molécule d'hème rapidement à la protéine apo-ChuS pour que cette dernière assure sa dégradation. La deuxième hypothèse était que la protéine ChuY serait capable de réduire le produit de la réaction de dégradation de l'hème faite par ChuS, soit un tripyrrole, en utilisant le NAD(P)H. La spectroscopie d'absorption a révélé que ChuY réduit effectivement le tripyrrole mauve en un produit jaune. De plus, l'étape limitante de la réaction catalysée par ChuS est accélérée de neuf fois en présence de ChuY. La détermination des constantes cinétiques pré-stationnaires a permis de confirmer que ChuY agit de façon catalytique et de proposer un modèle de dégradation de l'hème impliquant les protéines ChuS et ChuY. La troisième hypothèse émise était que la protéine ChuW n'aurait pas l'activité enzymatique qui lui est attribuée selon la littérature, soit une coproporphyrinogène-III oxidase. Notre hypothèse est que la protéine pourrait plutôt utiliser l'hème ou un produit de la réaction de ChuS comme substrat pour compléter ou poursuivre le cycle de transformation de la molécule par une réaction de décarboxylation oxydative. Comme la protéine a été difficile à purifier, nous n'avons pas été en mesure de caractériser celle-ci et son rôle n'a pas été découvert.

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'utilisation de l'hème par la protéine ChuX, il serait intéressant de caractériser la structure de sa forme holo. Comme aucun homologue de la protéine ChuY n'a encore été caractérisé, l'obtention de sa structure permettrait de mieux connaître le fonctionnement de cette enzyme et les acides aminés qui sont impliqués dans la catalyse. Finalement, la purification de la protéine ChuW pourrait faciliter la compréhension de sa fonction dans la voie d'acquisition de l'hème, car elle est peut-être un élément manquant permettant de modifier le tripyrrole réduit fait par ChuY.

Bibliographie

1. Andrews, S.C., A.K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones, *Bacterial iron homeostasis*. FEMS Microbiol Rev, 2003. **27**(2-3): p. 215-37.
2. McNaught, A.D., A. Wilkinson, and International Union of Pure and Applied Chemistry., *Compendium of chemical terminology : IUPAC recommendations*. 2nd ed. 1997, Oxford England ; Malden, MA, USA: Blackwell Science. vii, 450 p.
3. Wandersman, C. and P. Delepelaire, *Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores*. Annu Rev Microbiol, 2004. **58**: p. 611-47.
4. Skaar, E.P., *The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts*. PLoS Pathog, 2010. **6**(8): p. e1000949.
5. Reedijk, J. and K. Poeppelmeier, *Comprehensive Inorganic Chemistry II: From Elements to Applications*. 2013: Elsevier Science Limited.
6. Crichton, R. and J.R. Boelaert, *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism: From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences*. 2001: Wiley.
7. Runyen-Janecky, L.J., *Role and regulation of heme iron acquisition in gram-negative pathogens*. Front Cell Infect Microbiol, 2013. **3**: p. 55.
8. Anzaldi, L.L. and E.P. Skaar, *Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens*. Infect Immun, 2010. **78**(12): p. 4977-89.
9. Kirkby, K.A. and C.A. Adin, *Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(3): p. F563-71.
10. Krewulak, K.D. and H.J. Vogel, *Structural biology of bacterial iron uptake*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(9): p. 1781-804.
11. Tong, Y. and M. Guo, *Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes*. Arch Biochem Biophys, 2009. **481**(1): p. 1-15.
12. Ghigo, J.M., S. Letoffe, and C. Wandersman, *A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of Serratia marcescens reconstituted in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1997. **179**(11): p. 3572-9.
13. Benson, D.R. and M. Rivera, *Heme uptake and metabolism in bacteria*. Met Ions Life Sci, 2013. **12**: p. 279-332.
14. Stojiljkovic, I. and D. Perkins-Balding, *Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria*. DNA Cell Biol, 2002. **21**(4): p. 281-95.
15. Stojiljkovic, I. and K. Hantke, *Transport of haemin across the cytoplasmic membrane through a haemin-specific periplasmic binding-protein-dependent transport system in Yersinia enterocolitica*. Mol Microbiol, 1994. **13**(4): p. 719-32.
16. Schneider, S., et al., *An induced fit conformational change underlies the binding mechanism of the heme transport proteobacteria-protein HemS*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32606-10.
17. Wyckoff, E.E., et al., *Shigella dysenteriae ShuS promotes utilization of heme as an iron source and protects against heme toxicity*. J Bacteriol, 2005. **187**(16): p. 5658-64.
18. Kaur, A.P., I.B. Lansky, and A. Wilks, *The role of the cytoplasmic heme-binding protein (PhuS) of Pseudomonas aeruginosa in intracellular heme trafficking and iron homeostasis*. J Biol Chem, 2009. **284**(1): p. 56-66.

19. Lansky, I.B., et al., *The cytoplasmic heme-binding protein (PhuS) from the heme uptake system of Pseudomonas aeruginosa is an intracellular heme-trafficking protein to the delta-regioselective heme oxygenase*. J Biol Chem, 2006. **281**(19): p. 13652-62.
20. O'Neill, M.J. and A. Wilks, *The P. aeruginosa heme binding protein PhuS is a heme oxygenase titratable regulator of heme uptake*. ACS Chem Biol, 2013. **8**(8): p. 1794-802.
21. Ouellet, Y.H., et al., *An alternative reaction for heme degradation catalyzed by the Escherichia coli O157:H7 ChuS protein: Release of hematinic acid, tripyrrole and Fe(III)*. J Inorg Biochem, 2015.
22. Caillet-Saguy, C., et al., *Direct-detected ¹³C NMR to investigate the iron(III) hemophore HasA*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(1): p. 150-8.
23. Cope, L.D., et al., *Binding of heme-hemopexin complexes by soluble HxuA protein allows utilization of this complexed heme by Haemophilus influenzae*. Infect Immun, 1998. **66**(9): p. 4511-6.
24. Baelen, S., et al., *Structure of the secretion domain of HxuA from Haemophilus influenzae*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2013. **69**(Pt 12): p. 1322-7.
25. Wilks, A. and K.A. Burkhard, *Heme and virulence: how bacterial pathogens regulate, transport and utilize heme*. Nat Prod Rep, 2007. **24**(3): p. 511-22.
26. Spencer, A.L., et al., *Protein/protein interactions in the mammalian heme degradation pathway: heme oxygenase-2, cytochrome P450 reductase, and biliverdin reductase*. J Biol Chem, 2014. **289**(43): p. 29836-58.
27. Kamachi, T., T. Nishimi, and K. Yoshizawa, *A new understanding on how heme metabolism occurs in heme oxygenase: water-assisted oxo mechanism*. Dalton Trans, 2012. **41**(38): p. 11642-50.
28. Wilks, A. and G. Heinzl, *Heme oxygenation and the widening paradigm of heme degradation*. Arch Biochem Biophys, 2014. **544**: p. 87-95.
29. Florczyk, U.M., A. Jozkowicz, and J. Dulak, *Biliverdin reductase: new features of an old enzyme and its potential therapeutic significance*. Pharmacol Rep, 2008. **60**(1): p. 38-48.
30. Baranano, D.E., et al., *Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16093-8.
31. Matsui, T., et al., *Heme degradation by Staphylococcus aureus IsdG and IsdI liberates formaldehyde rather than carbon monoxide*. Biochemistry, 2013. **52**(18): p. 3025-7.
32. Nambu, S., et al., *A new way to degrade heme: the Mycobacterium tuberculosis enzyme MhuD catalyzes heme degradation without generating CO*. J Biol Chem, 2013. **288**(14): p. 10101-9.
33. Torres, A.G. and S.M. Payne, *Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. Mol Microbiol, 1997. **23**(4): p. 825-33.
34. Burkhard, K.A. and A. Wilks, *Functional characterization of the Shigella dysenteriae heme ABC transporter*. Biochemistry, 2008. **47**(31): p. 7977-9.
35. Wyckoff, E.E., et al., *Structure of the Shigella dysenteriae haem transport locus and its phylogenetic distribution in enteric bacteria*. Mol Microbiol, 1998. **28**(6): p. 1139-52.

36. Stojiljkovic, I. and K. Hantke, *Hemin uptake system of Yersinia enterocolitica: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria*. EMBO J, 1992. **11**(12): p. 4359-67.
37. Snyder, J.A., et al., *Transcriptome of uropathogenic Escherichia coli during urinary tract infection*. Infect Immun, 2004. **72**(11): p. 6373-81.
38. Poirier, K., et al., *Escherichia coli O157:H7 survives within human macrophages: global gene expression profile and involvement of the Shiga toxins*. Infect Immun, 2008. **76**(11): p. 4814-22.
39. Mills, M. and S.M. Payne, *Genetics and regulation of heme iron transport in Shigella dysenteriae and detection of an analogous system in Escherichia coli O157:H7*. J Bacteriol, 1995. **177**(11): p. 3004-9.
40. Suits, M.D., et al., *Identification of an Escherichia coli O157:H7 heme oxygenase with tandem functional repeats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(47): p. 16955-60.
41. Sigman, J.A., X. Wang, and Y. Lu, *Coupled oxidation of heme by myoglobin is mediated by exogenous peroxide*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(28): p. 6945-6.
42. Suits, M.D., et al., *Structure and heme binding properties of Escherichia coli O157:H7 ChuX*. Protein Sci, 2009. **18**(4): p. 825-38.
43. Vorobiev, S.M., et al., *Crystal structure of AGR_C_4470p from Agrobacterium tumefaciens*. Protein Sci, 2007. **16**(3): p. 535-8.
44. Oppermann, U., et al., *Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update*. Chem Biol Interact, 2003. **143-144**: p. 247-53.
45. Kavanagh, K.L., et al., *Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(24): p. 3895-906.
46. Persson, B. and Y. Kallberg, *Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs)*. Chem Biol Interact, 2013. **202**(1-3): p. 111-5.
47. Lesk, A.M., *NAD-binding domains of dehydrogenases*. Curr Opin Struct Biol, 1995. **5**(6): p. 775-83.
48. Persson, B., et al., *The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative*. Chem Biol Interact, 2009. **178**(1-3): p. 94-8.
49. Link, S., et al., *The atypical short-chain dehydrogenases HCF173 and HCF244 are jointly involved in translational initiation of the psbA mRNA of Arabidopsis*. Plant Physiol, 2012. **160**(4): p. 2202-18.
50. Pereira, P.J., et al., *Structure of human biliverdin IXbeta reductase, an early fetal bilirubin IXbeta producing enzyme*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(3): p. 215-20.
51. Stammers, D.K., et al., *The structure of the negative transcriptional regulator NmrA reveals a structural superfamily which includes the short-chain dehydrogenase/reductases*. EMBO J, 2001. **20**(23): p. 6619-26.
52. Sofia, H.J., et al., *Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(5): p. 1097-106.
53. Marsh, E.N., A. Patwardhan, and M.S. Huhta, *S-adenosylmethionine radical enzymes*. Bioorg Chem, 2004. **32**(5): p. 326-40.

54. Layer, G., et al., *Structure and function of radical SAM enzymes*. Curr Opin Chem Biol, 2004. **8**(5): p. 468-76.
55. Layer, G., et al., *Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of Radical SAM enzymes*. EMBO J, 2003. **22**(23): p. 6214-24.
56. Abicht, H.K., et al., *Lactococcus lactis HemW (HemN) is a haem-binding protein with a putative role in haem trafficking*. Biochem J, 2012. **442**(2): p. 335-43.
57. Goto, T., et al., *Functional differentiation of two analogous coproporphyrinogen III oxidases for heme and chlorophyll biosynthesis pathways in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803*. Plant Cell Physiol, 2010. **51**(4): p. 650-63.
58. Layer, G., et al., *Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase HemN from Escherichia coli*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 34136-42.
59. Suits, M.D., N. Jaffer, and Z. Jia, *Structure of the Escherichia coli O157:H7 heme oxygenase ChuS in complex with heme and enzymatic inactivation by mutation of the heme coordinating residue His-193*. J Biol Chem, 2006. **281**(48): p. 36776-82.
60. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
61. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
62. Sakamoto, H., et al., *Separation and identification of the regioisomers of verdoheme by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography, and characterization of their complexes with heme oxygenase*. J Inorg Biochem, 2000. **82**(1-4): p. 113-21.
63. Boutry, S., et al., *How to quantify iron in an aqueous or biological matrix: a technical note*. Contrast Media Mol Imaging, 2009. **4**(6): p. 299-304.
64. Clayden, J., N. Greeves, and S. Warren, *Organic Chemistry*. 2012: OUP Oxford.
65. Lee, M.J., et al., *Structural analysis and identification of PhuS as a heme-degrading enzyme from Pseudomonas aeruginosa*. J Mol Biol, 2014. **426**(9): p. 1936-46.
66. Persson, B., et al., *Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs)*. Chem Biol Interact, 2003. **143-144**: p. 271-8.
67. Williamson, N.R., et al., *The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(12): p. 887-99.
68. Johnson, R.E., et al., *Synthesis of Cycloprodiginosin Identifies the Natural Isolate as a Scalemic Mixture*. Org Lett, 2015. **17**(14): p. 3474-7.
69. Lim, J.Y., J. Yoon, and C.J. Hovde, *A brief overview of Escherichia coli O157:H7 and its plasmid O157*. J Microbiol Biotechnol, 2010. **20**(1): p. 5-14.
70. Slauch, J.M., *How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question*. Mol Microbiol, 2011. **80**(3): p. 580-3.

Annexe

Tableau 18 : Composition des solutions utilisées

Solutions	Compositions
Milieu LB	100 mL H ₂ O, 1 g de bacto-tryptone, 1 g de NaCl et 0.5 g d'extrait de levure Si milieu solide, 1.5 g d'agar est ajouté
Milieu TB	900 mL H ₂ O, 12 g bacto-tryptone, 24 g d'extrait de levure et 4 mL de glycérol 100 mL de tampon phosphate (0.17M de KH ₂ PI/0.72 M de K ₂ HPI) est ajouté au milieu juste avant l'inoculation
SOC	975 mL H ₂ O, 20 g bacto-tryptone, 5 g d'extrait de levure, 0.5 g NaCl et 0.186 g de KCl Le pH est ajusté à 7.0 à l'aide de 5M NaOH Après stérilisation, 5 mL de 2 M MgCl ₂ (0.952 g MgCl ₂ anhydre) et 20 mL de 1 M glucose (4 g de glucose) stériles sont ajoutés à la solution
Gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	Gel de rattrapage : 3.4 mL H ₂ O, 630 µL de 1 M Tris-HCl pH 6.8, 50 µL de SDS 10% (p/v), 830 µL d'acrylamide 30% (p/v), 50 µL d'ammonium persulfate 10% (p/v) et 4 µL de Temed Gel de séparation : 3.3 mL H ₂ O, 2.5 mL de 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 100 µL de SDS 10% (p/v), 4 mL d'acrylamide 30% (p/v), 100 µL d'ammonium persulfate 10% et 4 µL de temed
Tampon d'échantillon 2X	2.45 mL H ₂ O, 1.25 mL de 1 M Tris-HCl pH 6.8, 2 mL glycérol, 4 mL SDS 10% et 100 µL de bleu de bromophénol 1% Du β-mercaptoéthanol est ajouté juste avant la préparation des échantillons dans une proportion de 4% du volume final utilisé
Tampon d'électrode 5X	1000 mL H ₂ O, 15 g Tris, 72 g glycine et 5 g SDS
Solution de pyridine	3.1 mL H ₂ O, 0.2 mL de NaOH 10 N et 1.7 mL de pyridine
TAE 50X	500 mL H ₂ O, 121 g de Tris, 50 mL de EDTA 0.5 M pH 8 et 28.55 mL d'acide acétique glacial

promoteur tet RBS étiquette streptavidine chuX
 ATGAATAGTTCGACAAAAATCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAAATGGCTAGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAGGCGCCAGCC
 ATGTCCTCGTTACAAGAAATTTTGA AACCGGAGCCGGACGGTACGCTGGAGGTGGTAGCCGAACAATACAAACCACACTGCTGGAGGTAGTGAGAAATCTACCC
 TCCTCTACCGTAGTGCCAGGCGATAAATTCGATACTGTCTGGGATACCGTCTGCGAATGGGGCAACGTCACCAAGTTAGTACATACTGCCGATGTAATCCTCGA
 ATTTAGCGGCGAACTGCCTTCGGGTTTCCATCGCCACGGCTATTTCAACCTACGCGGAAAGCACGGCATGTCCGGGCATATCAAAGCAGAAAACTGCACGCATA
 TTGCCTTAATCGAACGTAATTTATGGGCATGGACACCGGCTCCATTCTCTTTTCAACAAGAAGGCAGCGCCATGCTGAAAACTTCTCTCGGCAGGGATGAC
 CATCGTCAGCTCCTGAGCGAACAAAGTCAGCGCCTTCCATACTCTGGCGGCATCGTTAAAGGAACACGCCTGA stop

Figure 46 : Promoteur et séquence codant pour le gène *chuX* dans pASK-IBA5+

promoteur T7 RBS étiquette histidine
 TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGATAACAATTCOCCTCTAGAAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCACCATCAOCATCAC
chuX
 CATGGATCCATGAGCCATGCTCTCGTTACAAGAAATTTTGA AACCGGAGCCGGACGGTACGCTGGAGGTGGTAGCCGAACAATACAAACCACACTGCTGGAGGTAGTGAGAAAT
 CTACCCTCCTCTACCGTAGTGCCAGGCGATAAATTCGATACTGTCTGGGATACCGTCTGCGAATGGGGCAACGTCACCAAGTTAGTACATACTGCCGATGTAATCCTOGAATTT
 AGCGGCGAACTGOCCTTCGGGTTTCCATCGCCACGGCTATTTCAACCTACGCGGAAAGCACGGCATGTCCGGGCATATCAAAGCAGAAAACTGCACGCATATTGCCTTAATCGAA
 CGTAAATTTATGGGCATGGACACCGGCTCCATTCTCTTTTCAACAAGAAGGCAGCGCCATGCTGAAAACTTCTCTCGGCAGGGATGAOCATGCTCAGCTCCTGAGOGAACAA
 CTCAGCGCCTTCCATACTCTGGCGGCATCGTTAAAGGAACACGCCTGA stop

Figure 47 : Promoteur et séquence codant pour le gène *chuX* dans pET15b

promoteur tet RBS étiquette streptavidine chuY
 ATGAATAGTTCGACAAAAATCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAAATGGCTAGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAGGCGCCACGCGTGGC
 TACTCTTTGGCGCAGGCGGAAAAAGGTGTGGGTGCCAGAAOGCTTGA ACTGGCGCTGGGGAACAACGTCGGGTGCTGTGCTCATTGCTCATGCCGATGCCGCCACGAAACTGG
 CGCAACAAGGCGTACAGGTTTTTACAGGCGACGCCTGTGATGCCAGCGTAGTCGCGGCTGCTTGC CGGCAGCTGGCCCGGATGCGCTTATCATCTCAACAATGGGAGAGCTC
 AGGATTATCTGGGCGACAGAACAGTGATTGATGAGGCCGAAAAAGGCCCGCATCAGTCGCATGATTCTGGTGACCTCTTTGGGATGCGGCGATAGCTGGCOGTTTTTATCGGAGC
 GGGCAAAGGCTGOGTTTGGTCAGGCGGTACGGGAAAAAOGCTGGCGGAAAGCTGGCTGCAAAACCGCCAGCTAGACTACGCCATTCTCOGCCCTGGTGTCTGCTTGACGGCG
 CAGCAACAGGCAAAGCACAAACGGATACAAAATCAGGAGTGTCAATGGTTTTGTCCGCGTGCCGATGTGCGCCGACATATCCATGAACTGGCAAATGCGOCAGCACTTAACCAGC
 AGGTCTACAGTCTGATTGAACCGGACCTGAAACCGGCGTGA stop

Figure 48 : Promoteur et séquence codant pour le gène *chuY* dans pASK-IBA5+

