



La recherche polaire belge est peu connue en dehors de la communauté scientifique. Néanmoins, elle permet de comprendre bien des aspects des crises environnementales du 21ème siècle. Pour cette raison, une communication efficace de la communauté scientifique vers le grand public est nécessaire.

C'est précisément à ce souci que répond BE-POLES, un groupement de scientifiques polaires belges visant à mettre davantage en lumière la recherche en milieu polaire.

De plus, en mars 2007, a commencé l'Année Polaire Internationale, dont le but est de promouvoir la recherche sur les régions polaires et de conscientiser le public à leur importance.

A l'occasion de ce congrès, nous vous présenterons :

Atelier pour le Printemps des Sciences 2007

LL27

[Les cyanobactéries : comment exploiter au mieux la lumière ?](#)

Dr Annick Wilmotte
CIP, Université de Liège
awilmotte@ulg.ac.be

Merci à Mme Marchesini (Athénée d'Alleur), Fabrice Franck, Cédric Lassence et Frédéric Zakhia (Ulg)

Les cyanobactéries : comment exploiter au mieux la lumière ?

1. Qui sont les cyanobactéries ?

Les cyanobactéries sont des bactéries qui réalisent la photosynthèse qui libère de l'oxygène (comme les plantes, et pour cause, les ancêtres des chloroplastes appartiennent au lignage des cyanobactéries !). Ce sont probablement les 'architectes' de notre atmosphère. En effet, il y a environ 3 milliards d'années, elles ont produit de l'oxygène pendant des centaines de millions d'années, de sorte que l'atmosphère primitive de la Terre riche en gaz carbonique, méthane, etc s'est enrichie en oxygène jusqu'à atteindre les concentrations actuelles. Ceci était indispensable pour permettre aux autres organismes (dont nous-mêmes, les humains) d'évoluer.

Actuellement, on observe des cyanobactéries dans pratiquement tous les milieux où il y a de la lumière, de l'eau, du gaz carbonique et des minéraux. Elles se retrouvent ainsi dans des milieux qu'on dit 'extrêmes' comme les souches thermales d'eau chaude (jusqu'à 70°C), les milieux hypersalins, et les environnements polaires.

2. Comment exploitent-elles la lumière ?

Une des clefs de leur succès, est leur équipement en pigments capables de capter le plus possible de photons dans un spectre étendu de longueur d'onde. Elles sont donc équipées non seulement de chlorophylle et de caroténoïdes, comme les algues et les plantes, mais aussi de pigments spéciaux appelés 'phycobiliprotéines' et qui captent la lumière dans les longueurs d'onde où la chlorophylle n'est pas efficace

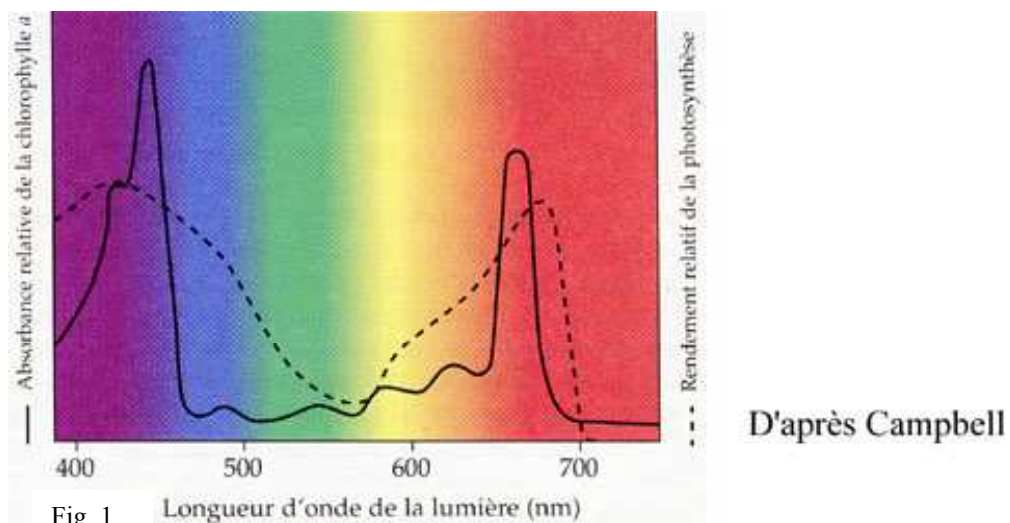


Fig. 1 http://www.ens-lyon.fr/DSVT/AGREG_SVT/Ressources/sujetDavid/Lum-ev1.htm

Dans la Figure 1, la ligne continue montre les zones du spectre de la lumière où la chlorophylle est capable de capter l'énergie des photons. La ligne en pointillé donne le rendement de la photosynthèse. Comme on peut le voir, il y a une zone allant de 480 à 650 nm, où la chlorophylle n'absorbe pas et où le rendement de la photosynthèse avec ce pigment est très bas. C'est là qu'interviennent les phycobiliprotéines, qui incluent deux pigments majeurs : la phycoérythrine (absorption entre 490 et 570 nm) et la phycocyanine (absorption entre 610 et 655 nm).

Voici un spectre de phycoérythrine :

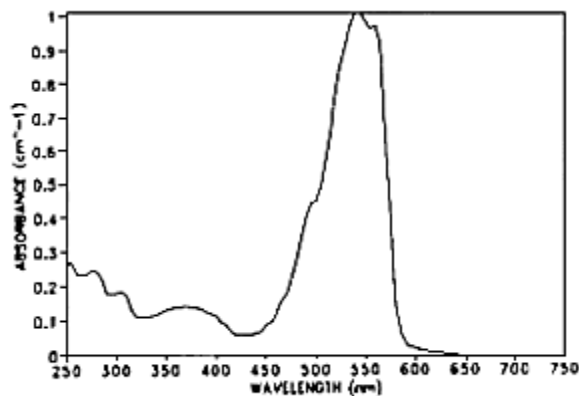


Fig. 2. spectre d'absorption de phycoérythrine
(<http://www.prozyme.com/technical/pbvrwdata.html#SPECIFICATIONS>)

Voici un spectre de phycocyanine :

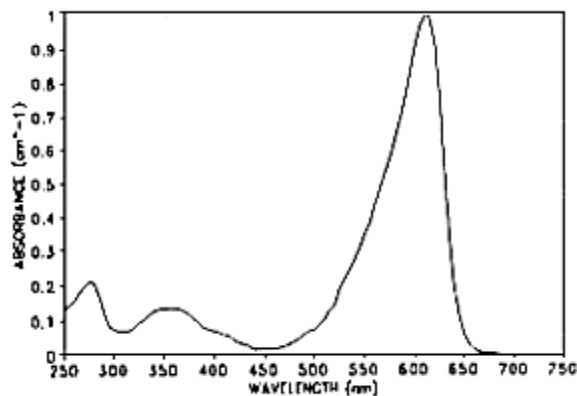


Fig. 3 ; spectre d'absorption de phycocyanine
(<http://www.prozyme.com/technical/pbvrwdata.html#SPECIFICATIONS>)

3. Comment les pigments coopèrent pour une photosynthèse plus efficace ?

La chlorophylle a est le pigment primordial qui participe à la photosynthèse. Les autres pigments sont des pigments 'accessoires' ou 'antennes' qui capturent la lumière aux autres longueurs d'onde que la chlorophylle a et qui sont capables de lui transférer cette énergie lumineuse:

pigments 'antennes' $\xrightarrow{\text{énergie de la lumière}}$ chlorophylle a

Tous les végétaux qui font la photosynthèse possèdent de la chlorophylle a. Certains possèdent aussi de la chlorophylle b (ex. les épinards).

Les caroténoïdes sont une autre famille de pigments 'antennes', qui absorbent vers 450 nm (Fig. 4). On les trouve aussi dans tous les végétaux photosynthétiques et certaines bactéries.

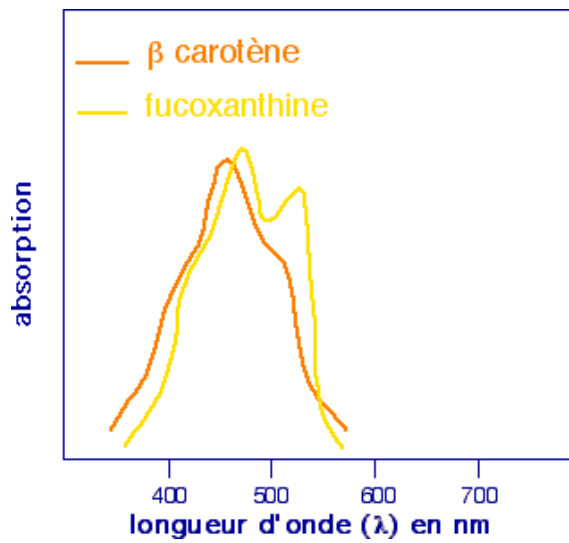


Fig. 4. Spectre d'absorption du bêta-carotène et de la fucoxanthine (amiens.fr/pedagogie/svt/infoprat/EvCapExp/04EvI)

Voici donc le résultat final montrant que les cyanobactéries qui ont de la phycoerythrine (toujours) et de la phycoérythrine (parfois, selon les souches), peuvent exploiter l'énergie présente tout le long du spectre de la lumière visible (Fig. 5) :

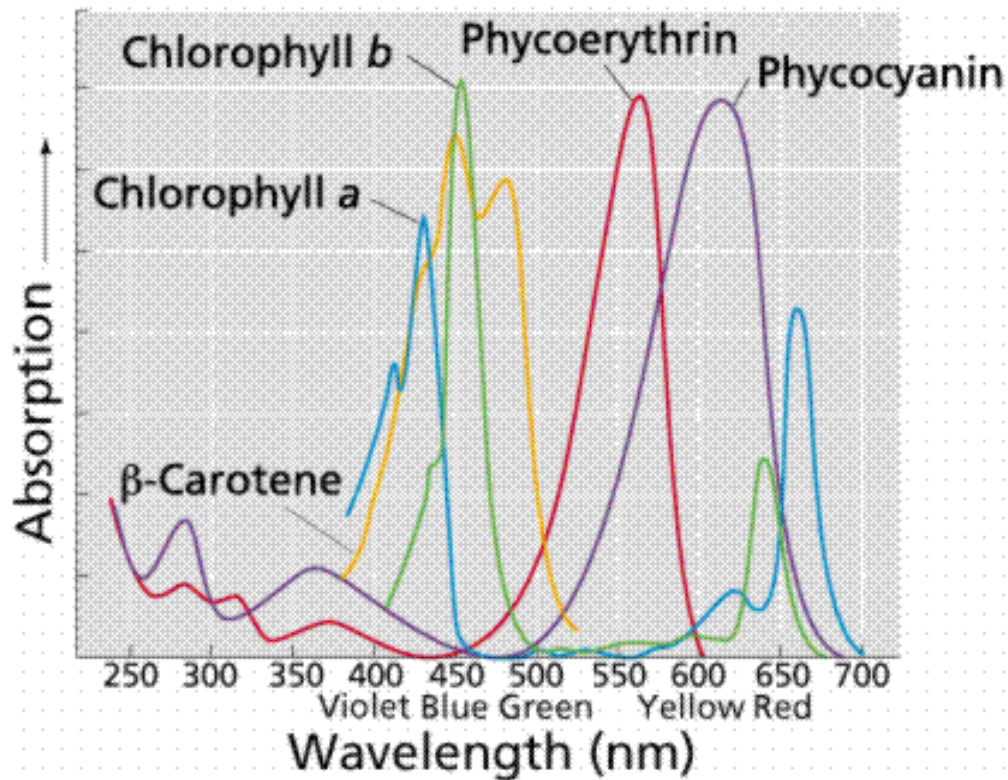


Fig. 5. Spectres d'absorption des différents pigments de cyanobactéries

4. Qu'est ce qui distingue ces pigments au point de vue chimique ?

Voici les structures (a) de la chlorophylle, (b) de 2 phycobiliprotéines : phycocyanine et phycoérythrine, (c) de 3 caroténoïdes : beta-carotène, lutéine et fucoxanthine.

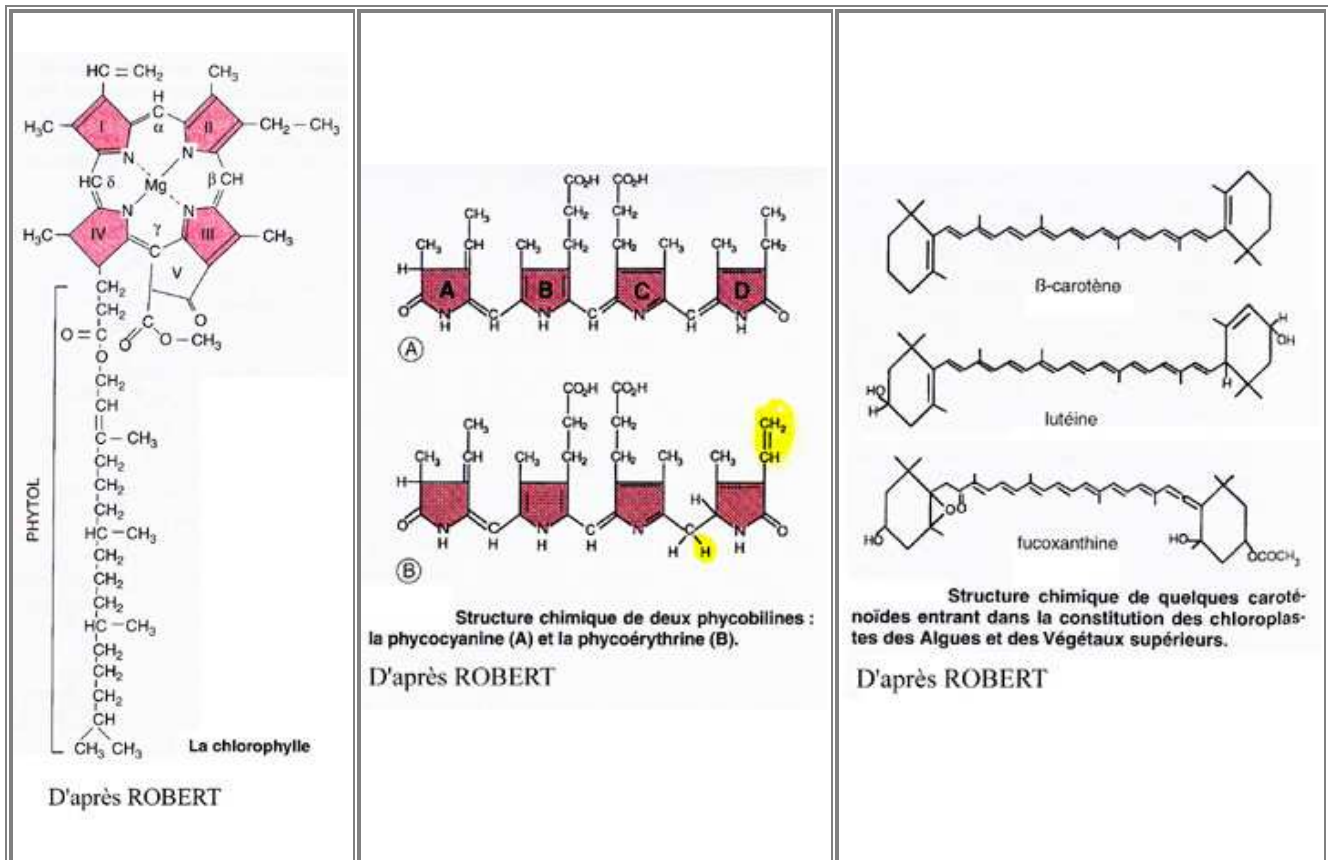


Fig. 5. Structure de quelques pigments photosynthétiques (http://www.ens-lyon.fr/DSVT/AGREG_SVT/Ressources/sujetDavid/Lum-ev1.htm)

Il est intéressant de noter que toutes ces molécules contiennent des liaisons doubles conjuguées qui sont essentielles pour l'absorption et le transport de l'énergie lumineuse.

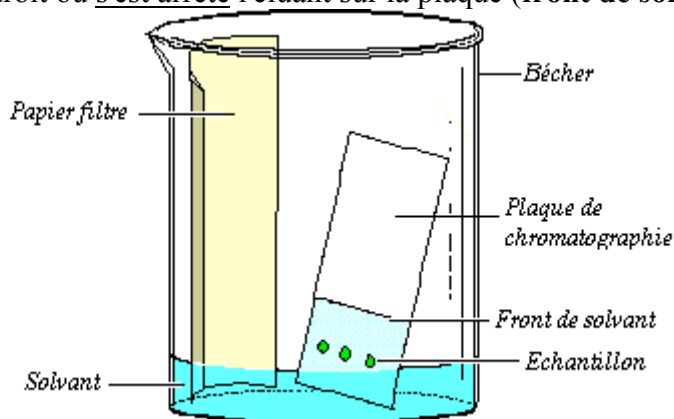
Pour pouvoir les séparer, on utilise le fait que les phycobiliprotéines sont solubles dans les solvants aqueux, ce qui n'est pas le cas des chlorophylles et caroténoïdes. Pour cet atelier, on les extrait dans un tampon phosphate dont le rôle est de simplement stabiliser les pigment. Par contre, les pigments solubles dans les solvants organiques sont séparés par chromatographie sur silice, grâce au fait qu'ils ont des polarités différentes dans ces solvants (éther de pétrole, acétone, etc).

Les organismes utilisés seront des plantes utilisées comme points de comparaison (épinards et carottes) et des cultures de cyanobactéries provenant de l'Antarctique et l'Arctique. Ces cultures ont été rassemblées dans une collection de cyanobactéries polaires, en cours d'élaboration, pour un projet de recherche des BCCM (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms) (<http://bccm.belspo.be/index.php>).

5. Principe de la chromatographie

(http://formation.etud.u-psud.fr/chimie/experiences/tps1sm/documents_TP/c_epinards.htm)

Un solide adsorbant est fixé sur un support rigide (plaque de chromatographie). Ici, c'est une fine couche de silice. La solution à analyser (l'extrait de cyanobactéries ou de plantes) est déposée goutte à goutte en un point à l'une des extrémités de la plaque. Le solvant (ici l'acétone) s'évapore et seuls restent sur la plaque les produits à analyser. La plaque est alors mise en contact avec un autre solvant (appelé éluant) choisi en fonction des produits à analyser et qui par capillarité s'élève dans l'adsorbant. Au passage, les produits à analyser sont entraînés par l'éluant: les produits très polaires, fortement "accrochés" à l'adsorbant ont peu tendance à passer dans l'éluant et sont peu entraînés; ils restent donc près du point initial où ils ont été déposés. Les produits moins polaires, moins adsorbés, sont plus facilement entraînés et migrent sur la plaque. Ils s'élèvent (ou s'éluent) d'autant plus qu'ils sont moins adsorbés et s'ils ne le sont pas ils migrent en même temps que le solvant. On les trouve alors à l'endroit où s'est arrêté l'éluant sur la plaque (**front de solvant**).



Les chlorophylles possédant des groupements polaires sont peu éluées alors que les caroténoïdes peu polaires le sont plus. La chromatographie permet même de distinguer les caroténoïdes entre eux.

Protocole expérimental

(Adapté du protocole pour la chromatographie sur papier de pigments de plantes de Mme Marchesini, Athénée d'Alleur)

Matériel biologique :

- Feuilles de *Tradescantia* ('misère'), morceau de carotte
- Cultures de cyanobactéries polaires lyophilisées



Cultures de cyanobactéries (souches 2, 40, 54, 61 et 80)

Matériel :

- 1 cuve à chromatographie
- une plaque de chromatographie sur couche mince de silice
- des tubes eppendorf et pistons en plastique adaptés



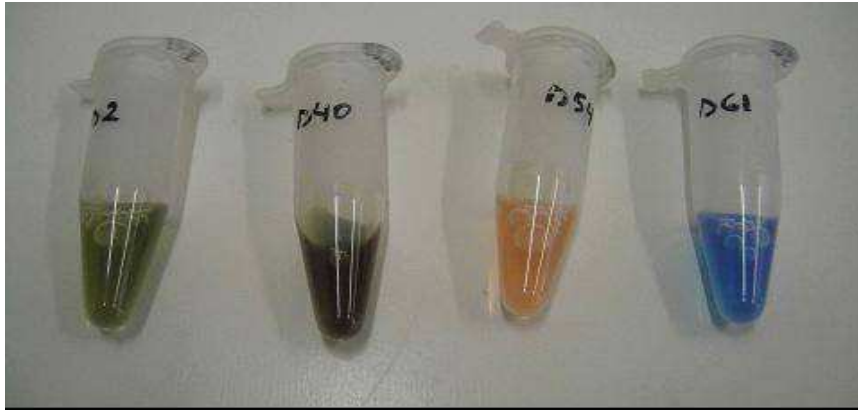
Plaques de silice en couche mince

Produits :

- Solvant (85% éther de pétrole, 10% acétone, 5 % isopropanol ou isobutanol)
- Tampon PBS (pour 1 litre : 8 gr NaCl, 0.2 gr KH_2PO_4 , 1,15 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 gr KCl, pH 7.2)

A. Extraction des pigments hydrosolubles de cyanobactéries : phycoérythrine et phycocyanine

1. Ajouter environ 300 μ l de tampon PBS au culot de cellule lyophilisé , casser les cellules avec les pistons en plastique en pressant fortement sur le culot pendant 1-2 minutes.
2. Centrifuger pour enlever les débris cellulaires et observer la couleur du surnageant



Mélange de phycoérythrine et phycocyanine chez les souches S2 et S40, phycoérythrine chez la souche S54 et phycocyanine chez la souche S61.

B. Extraction des chlorophylles et caroténoïdes de souches de cyanobactéries

1. Ajouter quelques gouttes d'acétone (pour arriver au milieu du tube) au culot de cellules lyophilisés et casser les cellules avec les pistons en plastique en pressant fortement sur le culot.
2. Centrifuger (ou décanter/filtrer) pour enlever les débris cellulaires
3. Utiliser le surnageant pour la chromatographie

C. Extraction des chlorophylles et caroténoïdes de plantes

1. Couper en petits morceaux des carottes rapées ou des feuilles de plante
2. Introduire les petits morceaux de carottes ou de plante dans un microtube, ajouter 400 μ l d'acétone et broyer avec les pistons en plastique jusqu'à l'apparition d'une couleur intense du liquide
3. Centrifuger (ou décanter/filtrer) pour enlever les débris cellulaires
4. Utiliser le surnageant pour la chromatographie

D. Chromatographie sur couche mince de silice

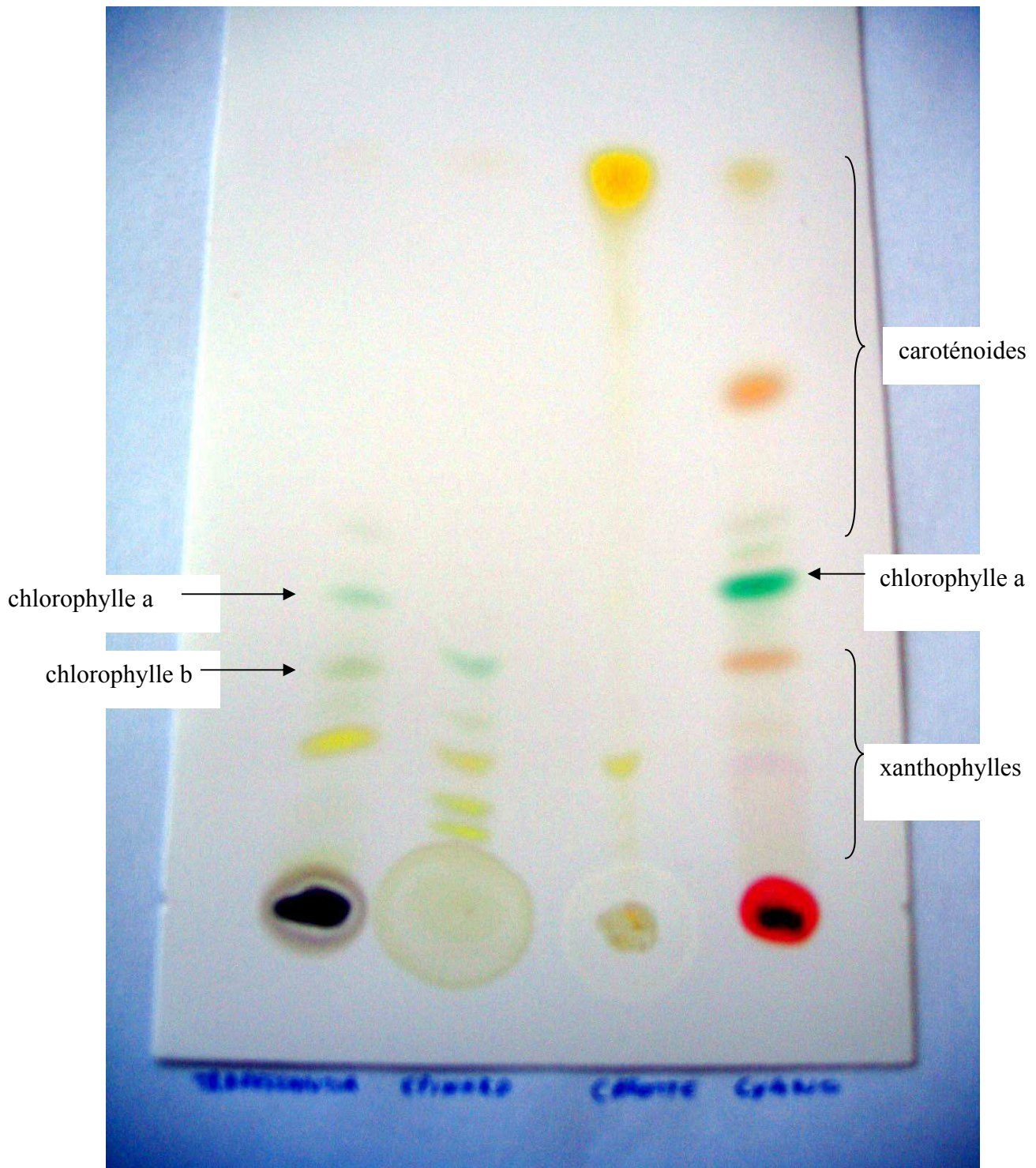
1. Enlever l'humidité résiduelle des plaques de silice en les mettant 2h dans une étuve à 60-80°C
2. Enfiler des gants et découper la surface nécessaire (environ 10 cm pour 5 ou 6 échantillons)
3. Avec un crayon, tracer délicatement une ligne à 2 cm du bord, et indiquer où les échantillons seront déposés

4. Avec une pipette pasteur, prélever par capillarité environ 25 μl des surnageants à analyser et les déposer à l'endroit respectif sur la plaque. Sécher avec un sèche-cheveux (important). Le dépôt ne devra pas avoir une taille trop importante. Recommencer les dépôts 4 à 5 fois en fonction de l'intensité de celui-ci.



Dépôt des échantillons

5. Positionner la plaque dans la cuve (où le solvant arrive à 1 cm du bas de la plaque) et laisser migrer le front de solvant pendant 30 min. Placer la cuve dans un endroit pas trop éclairé.
6. Noter au crayon par un trait la hauteur atteinte par le solvant, entourer chaque tache et noter sa couleur (les couleurs pâliront rapidement).
7. Positionner la plaque dans la cuve (où le solvant arrive à 1 cm du bas de la plaque) et laisser migrer le front de solvant pendant 30 min. Placer la cuve dans un endroit pas trop éclairé.
8. Noter au crayon par un trait la hauteur atteinte par le solvant, entourer chaque tache et noter sa couleur (les couleurs pâliront rapidement).



Comparaison des patrons de pigments de 1) *Tradescantia* ('misère'), 2) Epinard (spot trop gros), 3) Carotte 4) Souche de cyanobactérie S40