



HAL
open science

Caractérisations biochimiques et génétiques des complexes pigment-protéines dans le procaryote marin Prochlorococcus : origine évolutive et rôle dans l'adaptation phosynthétique aux conditions lumineuses

Laurence Garczarek

► **To cite this version:**

Laurence Garczarek. Caractérisations biochimiques et génétiques des complexes pigment-protéines dans le procaryote marin Prochlorococcus : origine évolutive et rôle dans l'adaptation phosynthétique aux conditions lumineuses. Biochimie, Biologie Moléculaire. Institut National Agronomique de Paris-Grignon, 2000. Français. NNT: . tel-01115741

HAL Id: tel-01115741

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01115741v1>

Submitted on 12 Feb 2015

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

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

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Soutenue le 27 juin 2000 par

Laurence GARCZAREK

**CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET GENETIQUE DES COMPLEXES PIGMENT-
PROTEINES CHEZ LE PROCARYOTE MARIN *PROCHLOROCOCCUS* : ORIGINE
EVOLUTIVE ET ROLE DANS L'ADAPTATION DE L'APPAREIL
PHOTOSYNTHETIQUE AUX CONDITIONS LUMINEUSES**

Laboratoire d'accueil

UPR9042/UFR937 : STATION BIOLOGIQUE DE ROSCOFF

Directeur de Thèse : **Frédéric PARTENSKY**

Composition du jury

Mme Lise Caron, Chargé de Recherche CNRS, ENS Paris	<i>Rapporteur</i>
Mme Susan Loiseaux DeGoër, Directeur de Recherche CNRS, SBR Roscoff	<i>Rapporteur</i>
Mr Hans C. P. Matthijs, Professeur associé, Université d'Amsterdam	<i>Examineur</i>
Mr Jean Claude Meunier, Professeur de l'INA-PG	<i>Président</i>
Mr Frédéric Partensky, Chargé de Recherche CNRS, SBR Roscoff	<i>Examineur</i>
Mme Nicole Tandeau de Marsac, Directeur de Recherche CNRS, Pasteur	<i>Rapporteur</i>

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier très chaleureusement Frédéric Partensky qui a dirigé ce travail de thèse. Je le remercie pour m'avoir entraînée avec enthousiasme et dynamisme dans ses idées florissantes et pour avoir encouragé les miennes. Sa disponibilité, sa confiance et son ouverture aux discussions argumentées m'ont permis de trouver tout le soutien qui m'était nécessaire au cours de ces quatre années.

Mes remerciements s'adressent également à André Toulmond pour m'avoir ouvert les portes de la Station Biologique de Roscoff et à Daniel Vaultot pour son accueil au sein de l'équipe Diversité du phytoplancton, ses conseils toujours pertinents et le support matériel de ce travail de thèse.

Je remercie Jean Claude Meunier pour m'avoir donné accès à la formation de spécialisation de biochimie de l'INA-PG qu'il dirige et pour avoir accepté d'être membre de ce jury.

J'adresse un remerciement tout particulier à Wolfgang Hess et Georg van der Staay pour leur très précieuse collaboration. L'intérêt et l'enthousiasme qu'ils ont tous deux porté à ce travail ont été d'une aide inestimable.

Merci à tous ceux qui ont contribué plus ou moins directement à ces travaux de recherche lors d'expériences diverses : Jean Claude Thomas pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à l'ENS (Paris), Julia Holzendorff pour le temps qu'elle m'a consacré lors de ma visite à l'Université de Humbolt (Berlin), l'équipage de la Thalassa pour leur disponibilité à toute épreuve, Nicole Guyard et Maryse Colin pour leur efficacité à dénicher les articles aux références souvent incomplètes et enfin Olivier Colin et Claude Leroux pour leurs multiples assistances dans le maniement d'Unix et des logiciels de biologie moléculaire.

Je remercie également l'ensemble de l'équipe des Green's, qui plus encore que n'importe qui a permis de faire de cette thèse un moment agréable aussi bien scientifiquement qu'humainement.

Enfin je remercie les membres du jury : Lise Caron, Susan Loiseaux DeGoër, Nicole Tandeau de Marsac, Jean Claude Meunier et Hans Matthijs qui ont accepté de juger ce travail de thèse.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I : INTRODUCTION	11
I- LES PROTEINES DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE LIANT LA CHLOROPHYLLE.....	13
I.1- PHOTOSYNTHESE OXYGENIQUE.....	13
I.2- LA PIGMENTATION DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE.....	16
I.3- PROTEINES PIGMENTAIRES DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE.....	18
I.3.1- Les complexes du centre	19
I.3.1.1- Le complexe du centre du photosystème II.....	20
<i>Le centre réactionnel du PS II (D1/D2) : CR II.....</i>	<i>20</i>
<i>CP47 et CP43.....</i>	<i>22</i>
<i>CP43' (IsiA).....</i>	<i>23</i>
I.3.1.2- Le centre réactionnel du PS I (PsaA/ PsaB) : CR I.....	24
I.3.2- Les complexes antennaires	26
I.3.2.1- Les phycobilisomes des cyanobactéries et des algues rouges	26
I.3.2.2- Les protéines à Chl <i>a/b</i> des plantes supérieures	28
<i>Antenne collectrice associée au PS II.....</i>	<i>29</i>
<i>Antenne collectrice associée au PS I.....</i>	<i>31</i>
I.3.2.3- Les antennes collectrices procaryotiques à Chl <i>a/b</i>	32
I.3.2.4- Les antennes collectrices des algues	33
<i>Les algues à Chl a/b.....</i>	<i>33</i>
<i>Les algues à Chl a et phycobiliprotéines (Rhodophyta).....</i>	<i>34</i>
<i>Les Algues à Chl a/c</i>	<i>34</i>
I.3.2.5- Protéines apparentées aux Lhc.....	35
<i>Protéines induites par le stress (ELIP, HLIP).....</i>	<i>35</i>
<i>Gènes putatifs présentant des homologies avec les Lhcs.....</i>	<i>36</i>
I.4- ADAPTATION AUX VARIATIONS LUMINEUSES	37
I.4.1- Adaptation à court terme	38
I.4.1.1- Transition Etat1-Etat2.....	38
I.4.1.2- Le cycle des xanthophylles	40
I.4.1.3- Agrégation de l'antenne LHC II.....	40
I.4.2- Adaptation à long terme	41

I.4.2.1- Réponses physiologiques à la lumière.....	41
I.4.2.2- Réponses moléculaires à la lumière	42
<i>Régulation des protéines des centres réactionnels par la lumière.....</i>	<i>42</i>
<i>Régulation des protéines d'antenne par la lumière.....</i>	<i>44</i>
<i>Expression des protéines photosynthétiques en lumière jour-nuit.....</i>	<i>45</i>
II- PRESENTATION DU MODELE D' ETUDE, <i>PROCHLOROCOCCUS</i>	47
II.1- MISE EN EVIDENCE DE <i>PROCHLOROCOCCUS</i> ET POSITION PHYLOGENETIQUE.....	48
II.1.1- Découverte de <i>Prochlorococcus</i>	48
II.1.2- Position phylogénétique par rapport aux cyanobactéries typiques.....	49
II.2- PARTICULARITES CELLULAIRES	50
II.2.1- Ultrastructure.....	50
II.2.2- Taille du génome et composition en bases.....	50
II.3- CARACTERISTIQUES PHOTOSYNTHETIQUES.....	51
II.3.1- Composition pigmentaire	51
II.3.1.1- Chlorophylle	51
II.3.1.2- Caroténoï des.....	53
II.3.1.3- Phycoérythrine	53
II.3.2- Photoacclimatation et photoadaptation	53
II.3.3- Caractérisation de l'appareil photosynthétique	55
II.4- DISTRIBUTION OCEANIQUE DE <i>PROCHLOROCOCCUS</i>	57
II.5- DIVERSITE GENETIQUE DE <i>PROCHLOROCOCCUS</i>	59
II.5.1- Diversité des souches de <i>Prochlorococcus</i> en culture.....	59
II.5.2- Diversité des populations naturelles de <i>Prochlorococcus</i>	61
III- DEMARCHE ADOPTEE AU COURS DE CE TRAVAIL DE THESE.....	62
IV- LISTE DE PUBLICATION EFFECTUEES PENDANT LA THESE.....	63
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	64
I- DESCRIPTION ET CULTURE DES SOUCHES DISPONIBLES AULABORATOIRE.....	64
I.1- SOUCHES CULTIVEES A LA STATION BIOLOGIQUE DE ROSCOFF	64
I.2- METHODES DE CULTURE.....	65

II- METHODE DE CARACTERISATION DES COMPLEXES PIGMENTS-PROTEINES	66
II.1- METHODE D'ISOLEMENT ET DE CARACTERISATION DU PHOTOSYSTEME I.....	66
II.1.1- Extraction des thylacoïdes.....	66
II.1.2 - Isolement du photosystème I.....	66
II.1.2.1- Solubilisation des thylacoïdes.....	66
II.1.2.2- Séparation des complexes Chl-protéines.....	67
<i>Séparation des complexes Chl-protéines sur gel non dénaturant.....</i>	<i>67</i>
<i>Isolement des complexes protéiques par gradient de saccharose.....</i>	<i>67</i>
II.1.3- Analyse du photosystème I.....	68
II.3.1.1- Analyse de la composition protéique du PS I sur gel d'électrophorèse.....	68
II.3.1.2- Détection immunologique.....	68
II.3.1.3- Caractérisation des fractions enrichies en PS I.....	69
<i>Spectrofluorimétrie.....</i>	<i>69</i>
<i>Spectrophotométrie.....</i>	<i>69</i>
<i>Chromatographie liquide à haute pression (HPLC).....</i>	<i>69</i>
<i>Microscopie électronique.....</i>	<i>69</i>
III- OUTILS MOLECULAIRES	70
III.1- TECHNIQUES D'EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES	70
III.1.1- Extraction de l'ADN total.....	70
III.1.2- Extraction d'ADN plasmidique à l'aide du kit "Flexiprep".....	71
III.1.3- Extraction des ARN totaux	71
III.1.4- Extraction de l'ADN bicaténaire des bactériophages	72
III.2- AMPLIFICATION D'ADN PAR REACTION EN CHAÎNE DE LA POLYMERASE (P.C.R.).....	72
III.3- ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES	72
III.3.1- Analyse électrophorétique.....	72
III.3.1.1- Analyse de l'ADN sur gel d'agarose 0.8 %	72
III.3.1.2- Analyse de l'ADN sur gel de polyacrylamide	73
III.3.1.3- Analyse de l'ADN par électrophorèse en champs pulsé (PFGE).....	73
III.3.1.4- Analyse des réactions de séquence sur gel de polyacrylamide 6%	73
III.3.1.5- Analyse des ARN sur gel d'agarose 1.5 % / formaldéhyde 4 % / MEN 1X.....	74
III.3.1.6- Purification de fragments d'ADN sur gel d'agarose avec le kit "Wizard" (Pharmacia Biotech)	74

III.4- TECHNIQUE D'HYBRIDATION DES ACIDES NUCLEIQUES	74
III.4.1- Marquage radioactif d'une sonde ADN par amorçage aléatoire ("Random Priming").....	74
III.4.2- Marquage radioactif d'une sonde ARN.....	75
III.4.3- Southern blot	75
III.4.4- Northern blot	76
III.4.5- Méthode de protection à la RNase ("R.P.A.")	76
III.4.6- Criblage d'une banque phagique	77
III.4.6.1- Préparation de bactéries compétentes	78
III.4.6.2- Titrage de la banque de phages	78
III.4.6.3- Criblage de la banque de phages	78
III.5- SEQUENÇAGE	79
III.5.1- Clonage du produit de PCR.....	79
III.5.2- Réaction de séquence.....	79
III.6- ALIGNEMENT ET ANALYSE PHYLOGENETIQUE DE SEQUENCES.....	79
IV- ANALYSES STRUCTURALES DES SEQUENCES PROTEIQUES	80
IV.1- PRINCIPE DE L'ANALYSE DE GROUPES HYDROPHOBES ("HCA").....	80
IV.1.1- La représentation HCA.....	80
IV.1.2- Interprétation des diagrammes	81
IV.1.3- Intérêt de l'HCA dans l'alignement de séquences primaires.....	82
CHAPITRE III : LE PHOTOSYSTEME I.....	83
Article 1 : Isolation and characterization of the photosystem I from two strains of the	86
marine oxychlorobacterium <i>Prochlorococcus</i> .	
CHAPITRE IV : L'ANTENNE MAJEURE A CHL A/B	100
Article 2 : Multiplication of antenna genes as a major adaptation to low light in a marine prokaryote.	102
Article 3 : Expression and phylogeny of the multiple antenna genes of the low-light adapted <i>Prochlorococcus</i> strains CCMP1375.	107

CHAPITRE V : DYNAMIQUE DES GENES PHOTOSYNTHETIQUES..... 119

Article 4 : Differential expression of antenna and core genes in the oxychlorobacterium *Prochlorococcus* PCC 9511 strains grown under L/D cycle 120

CHAPITRE VI : ORIGINE EVOLUTIVE DES PROTEINES PIGMENTAIRES 130

Article 5 : A revisited scheme for the evolution of transmembrane Chl-binding proteins using Hydrophobic Cluster Analysis 132

CHAPITRE VII : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... 145

Mise en évidence des particularités de l'appareil photosynthétique de Prochlorococcus et conséquences sur les propriétés de photoadaptation..... 145

Spéciation chez Prochlorococcus et estimation de la diversité génétique..... 148

Origine et évolution des protéines photosynthétiques de Prochlorococcus..... 150

BIBLIOGRAPHIE 152

ANNEXES 179

Annexe 1 (Article 6) : Photosynthesis apparatus of *chl b* and *d*-containing oxyphotrophic bacteria.

Annexe 2 (Article 7) : Characterization of the photosystem I subunits PsaI and PsaL from two strains of the marine oxyphototrophic prokaryote *Prochlorococcus*.

Annexe 3 (Article 8) : Rapid evolutionary divergence of photosystem I core subunits PsaA and PsaB in marine prokaryotes.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Fig. 1: Représentation générale des centres réactionnels des complexes photosynthétiques connus parmi les phyla des eubactéries et des plantes supérieures	13
Fig. 2 : Diagramme schématique de la chaîne de transport d'électron dans les membranes thylacoïdales eucaryotiques.....	14
Fig. 3 : Schéma en "Z" représentant le transfert d'électrons dans la membrane des thylacoïdes depuis l'eau jusqu'au NADP.....	15
Fig. 4 : Formules structurales des chlorophylles, des chromophores des phycobilines et des caroténoïdes des algues.....	16
Fig. 5 : Modèle structural du complexe protéique du PSII incluant les cofacteurs du transfert d'électrons.....	20
Fig. 6 : Modèles topologiques des polypeptides D1 et D2.	21
Fig. 7 : Schéma représentant l'origine supposée des différentes sous-unités des centres réactionnels photosynthétiques de type II.	22
Fig. 8 : Modèles topologiques du CP43 et CP47 établis à partir de séquences consensus de 10 espèces.	22
Fig. 9 : Modèle d'organisation des polypeptides et des cofacteurs du PS I chez les cyanobactéries...	24
Fig. 10 : Représentation schématique des hélices α de PsaA et PsaB.....	25
Fig. 11 : Schéma représentant l'origine supposée des différentes sous-unités des centres réactionnels photosynthétiques de type I.....	26
Fig. 12 : Structure d'un phycobilisome.	27
Fig. 13 : Structure du LHClI de pois déterminé par cristallographie.....	30
Fig. 14 : Représentation schématique des réponses de l'appareil photosynthétique à l'absorption d'intensités lumineuses croissantes.....	37
Fig. 15 : Schéma de la distribution latérale des complexes protéiques supramoléculaires dans la membrane thylacoïdale.....	39
Fig. 16 : Changements transcriptionnels et post-transcriptionnels dans l'expression des différents gènes <i>psbA</i> après transfert d'une culture de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 de faible éclaircissement ("low light") à forte intensité lumineuse ("high light").....	43
Fig. 17 : Analyse par cytométrie en flux d'un échantillon prélevé dans le Pacifique équatorial	48
Fig. 18 : Arbre phylogénétique non raciné de 53 cyanobactéries et 10 séquences de plastes de la petite sous-unité de l'ARNr élaboré selon la méthode de maximum de likelihood.....	49
Fig. 19 : Photographie en microscopie électronique d'une coupe de <i>Prochlorococcus</i>	50
Fig. 20 : Comparaison des structures de la chlorophylle (A ; Chl a_1 et Chl b_1) et de la divinyle (DV)-chlorophylle <i>a</i> et <i>b</i> (B ; Chl a_2 et Chl b_2).....	52

Fig. 21 : Distribution verticale des populations de <i>Prochlorococcus</i> à forte et faible fluorescence rouge dans le Pacifique subtropical près d'Hawaï	54
Fig. 22 : Gel SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie des protéines thylacoï dales des souches de <i>Prochlorococcus</i> MED4 et SS120 cultivées sous différentes conditions de lumière.....	55
Fig. 23 : Distribution mondiale de <i>Prochlorococcus</i> sur la base de 8400 mesures effectuées en milieu naturel par cytométrie en flux.	58
Fig. 24 : Distributions verticales typiques de <i>Prochlorococcus</i> et <i>Synechococcus</i>	59
Fig. 25 : Arbre phylogénétique des isolats de <i>Prochlorococcus</i> basé sur la séquence du gène de l'ARNr 16S.....	60
Fig. 26 : Lieu d'isolement des principales souches cultivées de <i>Prochlorococcus</i>	64
Fig. 27: Méthode de détection immunologique.....	68
Fig. 28 : Méthode d'extraction des ADN de <i>Prochlorococcus</i>	70
Fig. 29 : Méthode d'extraction des ARN de <i>Prochlorococcus</i>	71
Fig. 30 : Méthode d'extraction d'ADN bicaténaire de bactériophages.....	72
Fig. 31 : Analyse de l'ADN par électrophorèse en champs pulsé (PFGE)	73
Fig. 32 : Synthèses d'une sonde ARN pour Northern blot ou protection RNase.....	75
Fig. 33 : Analyse des ARN par protection Rnase.....	76
Fig. 34 : Solutions et milieux utilisés pour la bactériologie.....	77
Fig. 35 : Criblage d'une banque de phages.....	78
Fig. 36 : Principe de la méthode d'analyse de clusters Hydrophobes.....	82
Fig. 37 : Diagramme montrant l'appareil photosynthétique et son organisation potentielle par homologie avec l'appareil photosynthétique des cyanobactéries.	145
Fig. 38 : Répartition spectrale de la lumière en fonction de la profondeur dans les eaux oligotrophes.....	147
Fig. 39 : Schéma hypothétique de l'évolution des procaryotes et des eucaryotes photosynthétiques oxygéniques à partir d'un ancêtre commun possédant de la Chl <i>b</i> et des phycobilisomes.....	150
Tab. 1 : Principaux pigments caractéristiques des plantes supérieures, des procaryotes photosynthétiques et des différentes classes ou divisions d'algues.....	17
Tab. 2 : Complexes du centre contenant de la Chl <i>a</i> chez les cyanobactéries et les chloroplastes.....	19
Tab. 3 : Protéines antennaires à Chl <i>a/b</i> des plantes supérieures	29
Tab. 4 : Caractéristiques pigmentaires et cytologiques des principaux groupes d'algues eucaryotes...	33
Tab. 5 : Comparaison de la pigmentation des oxchlorobactéries, d' <i>Acaryochloris</i> , des cyanobactéries contenant des phycobilisomes et de <i>Dunaliella tertiolecta</i>	52
Tab. 6 : Liste des souches cultivées de <i>Prochlorococcus</i> pour lesquelles des données ont été publiées.....	65
Tab. 7 : Composition du milieu utilisé pour la culture de <i>Prochlorococcus</i>	65

TABLE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr 16S	ADN codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal
ADP	Adénosine diphosphate
A _{max}	Absorption maximum
AP	Allophycocyanine
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ARNr 16S	Sous-unité 16S de l'ARN ribosomal
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine tri-phosphate
BSA	Bovine serum albumine
Car	Caroténoïdes
Chl	Chlorophylle
Chl a1	Monovinyle chlorophylle <i>a</i>
Chl a2	Divinyle chlorophylle <i>a</i>
Chl b1	Monovinyle chlorophylle <i>b</i>
Chl b2	Divinyle chlorophylle <i>b</i>
CR	Centre réactionnel
Da	Dalton
DDM	n-dodécyl-β-D-maltoside
dNTP	Déoxynucléotide tri-phosphate
DsLi	Dodécyl sulfate de Lithium
EDTA	Acide tétra-acétique diaminoéthylène
ELIP	"Early light inducible proteins" (protéine induites de façon précoce par la lumière)
Fd	Ferredoxine
GbRC	"Green sulfur bacteria reaction center" (centre réactionnel des bactéries vertes sulfureuses)
HL	"High light-adapted clade" (clade adapté à forte lumière)
HLIP	"High light inducible proteins" (protéines induites par une forte lumière)
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
IPTG	Isopropylthio-β-D-galactoside
K	Degré Kelvin
Kb	Kilobases
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LHC	Light harvesting complex (complexe collecteur de lumière)
LL	"Low light-adapted clade" (clade adapté à faible lumière)
Mn	Manganèse
min.	Minute
mM	Milli molaire
MPa	Milli Pascal

MSH	"membrane spanning helices" (hélices transmembranaires)
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OEC	"Oxygen evolving complex" (complexe de dégagement d'oxygène)
OG	Octylglucoside (n-Octyl- β -D-glucopyranoside)
ORF	"Open reading frame" (cadre ouvert de lecture)
PAGE	"Polyacrylamide gel electrophoresis" (gel d'électrophorèse de polyacrylamide)
pb	Paire de bases
PBS	Phycobilisomes
PbRC	"Purple bacteria reaction center" (centre réactionnel des bactéries pourpres)
PC	Phycocyanine
Pcb	"Prochlorophyte chlorophyll-b binding protein" (Protéine liant la chlorophylle la Chl <i>b</i> des prochlorophytes)
PCR	"Polymerase chain reaction" (réaction de polymérisation en chaîne)
PE	Phycoérythrine
PEC	Phycoérythrocyanine
PFGE	"Pulse field gel electrophoresis" (électrophorèse en champs pulsé)
Phe	Phéophytine
PMSF	phenylmethylsulfonylfluoride
m/v	Masse à volume
PSC	Photosystème de <i>Chlorobium</i> (bactéries vertes Sulfureuses)
PSH	Photosystème des héliobactéries
PQ	Plastoquinone
PS I	Photosystème I
PS II	Photosystème II
P700	1er donneur d'électron du PS I
QA	Quinone acceptrice primaire du photosystème II
QB	Quinone acceptrice secondaire du photosystème II
RFLP	"Random fragment length polymorphism" (polymorphisme de longueur de fragment de restriction)
SB14	Zwittergent 3-14 (, n-tétradécyle-N, N-diméthyle-3ammonio-1-propanesulfonate)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSC	"Side scatter" (diffusion de la lumière à 90° qui est fonction de la taille cellulaire)
TAE	Tampon Tris/ammonium/EDTA
TBE	Tampon Tris/borate/EDTA
TE	Tampon Tris/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetraméthyle-éthylènediamine
v/v	Volume à volume
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
Δ pH	Différence de pH de par et d'autre de la membrane thylacoïdale du fait du gradient de proton transmembranaire

CHAPITRE I

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La diversité des moyens mis en œuvre par les organismes photosynthétiques pour recueillir et utiliser la lumière disponible dans leur environnement constitue l'un des facteurs prépondérants expliquant la très large distribution des végétaux à la surface de notre planète. Cependant, les éléments déterminant cette capacité d'adaptation aux conditions lumineuses naturelles restent encore fortement méconnus. En effet, le processus de photosynthèse implique la coordination d'un grand nombre de réactions qui sont séparées aussi bien d'un point de vue spatial que temporel. Ces processus débutent au niveau des membranes thylacoïdales par l'absorption de la lumière par les pigments de l'antenne et par la photochimie primaire par les pigments des centres réactionnels. Ils aboutissent à la répartition de l'énergie et du pouvoir réducteur accumulés, vers les différentes voies métaboliques de l'organisme. Ainsi, la photosynthèse peut être représentée comme un réseau de réactions étroitement interconnectées participant à la production de l'énergie, à la fixation du carbone et à la réduction du potentiel d'oxydoréduction. Il en résulte une interconnexion similaire des mécanismes de régulation de ces différents processus, qui rend difficile la perception des réponses induites par un facteur environnemental particulier tel que la lumière.

Au cours de cette étude, nous nous sommes concentrés sur les complexes protéiques liant des pigments chlorophylliens de l'appareil photosynthétique. Ils sont responsables de l'absorption de l'énergie lumineuse et de la première étape de sa conversion en énergie chimique. De par ces propriétés, les protéines pigmentaires apparaissent particulièrement intéressantes pour aborder l'étude des processus d'adaptation de l'appareil photosynthétique à l'environnement lumineux.

L'organisme sur lequel est basé le travail de cette thèse est un procaryote photosynthétique appartenant au groupe des cyanobactéries. Cet organisme a la particularité de posséder un système collecteur de lumière (antenne) liant des dérivés divinylés de chlorophylle *a* (Chl a_2) et *b* (Chl b_2) (Chisholm et al. 1992, Chisholm et al. 1988, Goericke and Repeta 1992). Cette antenne constitue une originalité importante par rapport aux cyanobactéries communes qui possèdent une antenne constituée de structures complexes, les phycobilisomes. De ce fait, *Prochlorococcus* et les autres procaryotes à Chl *b* seront désignés dans la suite de ce manuscrit par le terme cyanobactéries à Chl *b* (Burger-Wiersma et al. 1989), sans que cela implique une quelconque relation phylogénétique entre ces organismes. L'étude d'un procaryote tel que *Prochlorococcus*, possédant une pigmentation inhabituelle, devrait permettre de mieux appréhender la plasticité de l'appareil photosynthétique, en fonction des pigments impliqués dans la capture de l'énergie lumineuse et dans les fonctions photochimiques. De plus, *Prochlorococcus* constitue un modèle écologiquement représentatif puisqu'il s'agit du procaryote oxyphototrophique le plus abondant à l'heure actuelle dans l'océan. Sa très large

distribution écologique, à la fois verticale et horizontale, en font un modèle de choix pour étudier l'impact des contraintes environnementales et en particulier de la lumière, sur l'appareil photosynthétique. Enfin, *Prochlorococcus* et les autres cyanobactéries à Chl *b* ont joué un rôle important dans le débat concernant la nature de l'ancêtre procaryotique, à l'origine des plastes des algues vertes et des plantes supérieures. Nous avons également essayé d'apporter quelques éléments de réponse à ce débat.

Les paragraphes suivants feront un bilan des connaissances concernant les aspects évolutifs et structuraux des protéines pigmentaires photosynthétiques et détailleront les principales caractéristiques de *Prochlorococcus* qui font de ce genre un modèle intéressant de ce point de vue.

* * * * *

Les protéines pigmentaires

I- LES PROTEINES DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE LIANT LA CHLOROPHYLLE

I.1- PHOTOSYNTHESE OXYGENIQUE

En dehors des eucaryotes photosynthétiques, les organismes phototrophiques sont aussi largement répartis entre les phyla du domaine eubactérien y compris les bactéries vertes sulfureuses, les bactéries vertes filamenteuses, les bactéries pourpres, les héliobactéries et les cyanobactéries (Fig. 1 ; Woese 1987, Woese et al. 1990).

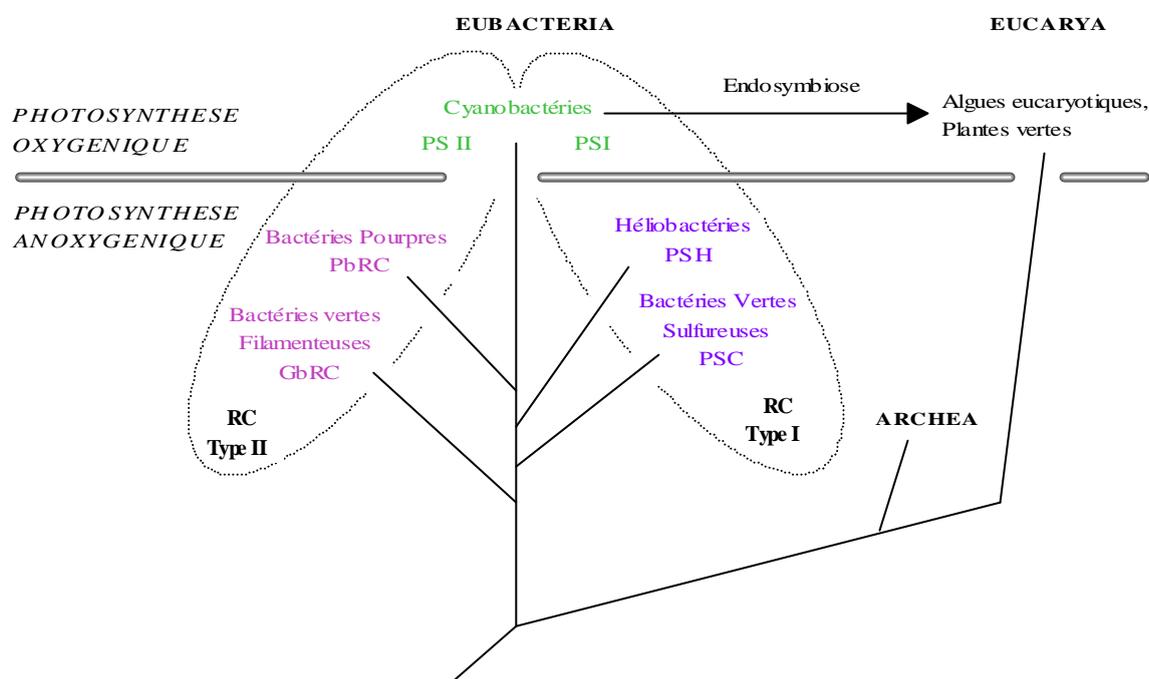


Fig. 1 : Représentation générale des centres réactionnels des complexes photosynthétiques connus parmi les phyla des eubactéries et des plantes supérieures (d'après Schubert et al. 1998).

Parmi ces organismes, seules les plantes supérieures, les algues et les cyanobactéries sont capables de photosynthèse oxygénique qui nécessite la coopération de deux photosystèmes (PS). Les bactéries photosynthétiques autres que les cyanobactéries sont anoxygéniques et ne fonctionnent qu'avec l'un ou l'autre des deux photosystèmes (Schubert et al. 1998). Selon la théorie endosymbiotique, une cellule de type cyanobactérien aurait été incorporée dans une cellule eucaryote, à une ou plusieurs reprises au cours de l'évolution, ce qui aurait progressivement conduit à l'apparition des plastides des algues et des plantes supérieures, étendant ainsi la photosynthèse oxygénique aux eucaryotes (Loiseaux-de Goër 1994, Margulis 1996, Selosse and Loiseaux-de-Goër 1997, Stiller and Hall 1997).

Chez les organismes photosynthétiques oxygéniques, les deux complexes membranaires photosynthétiques que sont les photosystèmes (PS), coopèrent pour produire des molécules de haute énergie telles que l'ATP et le NADPH. Chaque photosystème est en général constitué de deux parties : les complexes de l'antenne périphérique capturant la lumière et les composants du complexe du centre qui comprend le centre réactionnel (CR) en lui-même et une antenne interne permettant le transfert de l'énergie d'excitation de l'antenne externe au CR. Cependant, chez les cyanobactéries, les antennes collectrices sont absentes au niveau du photosystème I (PS I). Ces complexes membranaires sont associés à des molécules de chlorophylles (Chl) et de caroténoïdes qui permettent l'absorption et le transfert de l'énergie solaire (Gantt 1996). Jusqu'aux années 60, on a pensé que les molécules de Chl formaient une couche entre les deux épaisseurs de lipoprotéines de la membrane (Weier et al. 1966). Cependant un transfert maximum d'énergie nécessite un contact étroit et une orientation favorable entre les molécules de Chl et les composants des centres réactionnels. On sait maintenant que les membranes photosynthétiques sont en fait constituées de complexes intrinsèques transmembranaires et que les molécules de Chl sont liées par des liaisons faibles à un ensemble de polypeptides constituant ces complexes (Kühlbrandt et al. 1994).

L'énergie lumineuse est tout d'abord captée par les pigments situés au niveau de l'antenne associée au photosystème II (PS II), puis est transférée au centre réactionnel du PS II en passant par les molécules de Chl *a* associées aux antennes mineures du PS II (CP47 et CP43). Le centre réactionnel du PS II est essentiellement composé des protéines D1 et D2 qui sont associés à tous les pigments et les cofacteurs nécessaires à la séparation initiale de charge (Fig. 2 ; Diner and Babcock 1996, Gounaris et al. 1989).

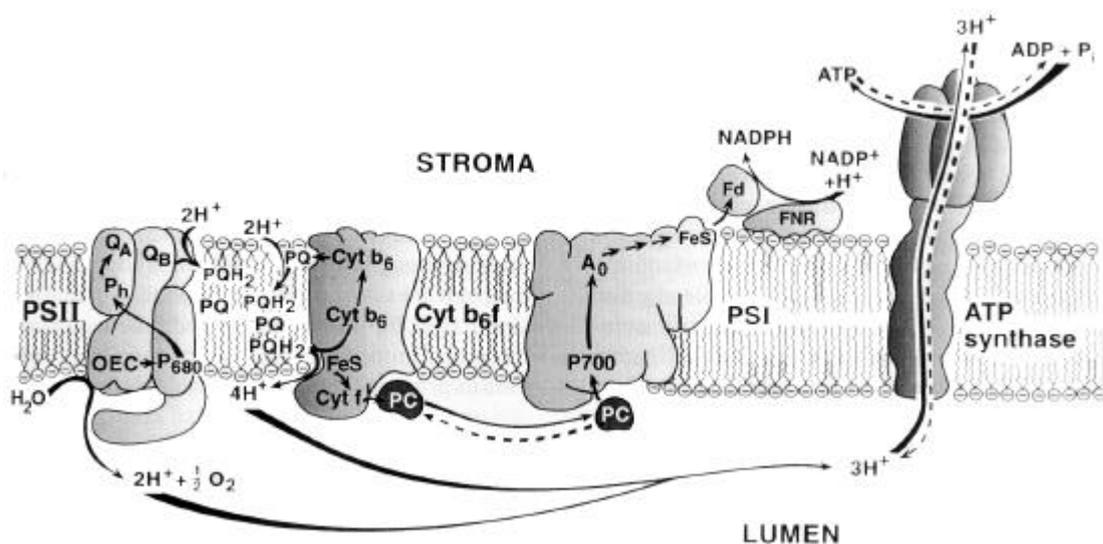


Fig. 2: Diagramme schématisé de la chaîne de transport d'électron dans les membranes thylacoïdales eucaryotes (Ort et Yocum, 1996)

Le premier donneur d'électrons du PS II est constitué d'un dimère de Chl *a* absorbant à environ 680 nm et liés aux protéines D1 et D2 : le P680 (Barber and Kühlbrandt 1999). Il reçoit des électrons d'un complexe de dégagement d'oxygène (OEC : "Oxygen Evolving Complex"), dont le groupement Mn_4 en position centrale permet l'oxydation des molécules d'eau par la lumière. Les électrons issus de l'oxydation de l'eau sont tout d'abord utilisés pour réduire la plastoquinone (PQ) par l'intermédiaire de la phéophytine (Phe) et passent ensuite le long d'une chaîne de transfert d'électrons via le complexe cytochrome *b₆/f* et le PS I. Ce dernier est le réducteur final de la chaîne de transfert d'électrons et fonctionne comme une oxydoréductase plastocyanine (PC)-ferrédoxine (Fd), impliquant la Chl *a*, la phylloquinone et des groupement Fer-Soufre comme cofacteurs (Scheller et al. 1997). Deux protéines de 80 kDa (PsaA et PsaB) constituent les sous-unités majeures du PS I et lient la plupart des pigments et des donneurs et accepteurs d'électrons (A_0 (Chl *a*), A_1 (phylloquinone), F_A , F_B et F_X (3 clusters [4Fe-4S])) (Brettel 1997, Golbeck 1987, Malkin 1996, Nugent 1996, Setif 1992). Le premier donneur d'électrons du PS I, le P700, a été identifié comme étant un dimère de Chl qui absorbe à environ 700 nm (Krauss et al. 1993).

Les protons ainsi transportés à travers la membrane thylacoïdale établissent un gradient électrochimique qui est ensuite utilisé pour permettre la synthèse d'ATP et la production de réductants. L'isolement des différents transporteurs d'électrons et la détermination de leur potentiel d'oxydoréduction a permis d'établir le schéma en Z qui rend compte de leur organisation au sein de la membrane photosynthétique (Fig. 3 ; Hill and Bendall 1960).

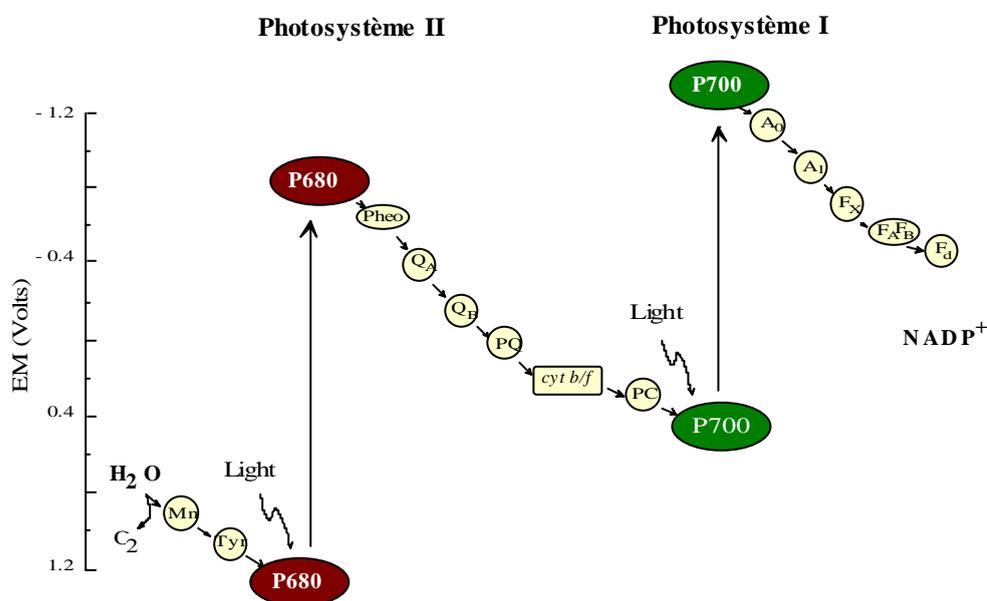
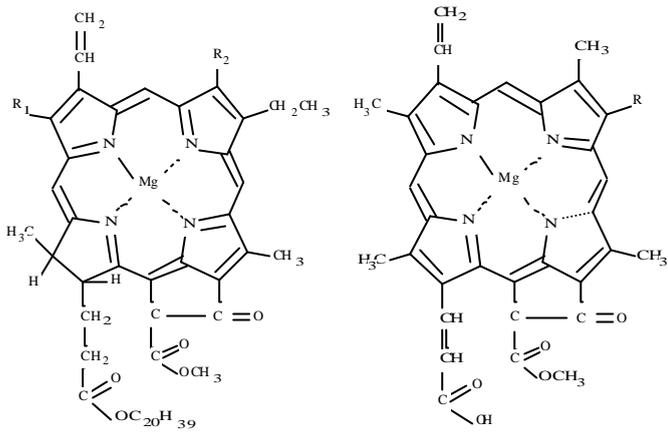


Fig. 3 : Schéma en "Z" représentant le transfert d'électrons dans la membrane des thylacoïdes des eucaryotiques depuis l'eau jusqu'au NADP. L'échelle des ordonnées permet de situer la valeur moyenne du potentiel redox des transporteurs d'électrons (d'après Hill et Bendall, 1960). Mn : Cluster Manganèse ; Tyr : Tyrosines ; Q_A et Q_B : Quinones ; Pheo : Phaeophytine ; PQ : Plastoquinone ; cyt *b₆/f* : cytochrome *b₆/f* ; PC : plastocyanine ; A₀ et A₁ : Accepteurs ; F_A, F_B et F_X : Centre Fer-Soufre.

CHLOROPHYLLES



Chlorophylle *a*:

R1: CH₃ R2: CH₃

Chlorophylle *b*:

R1: CH₃ R2: CHO

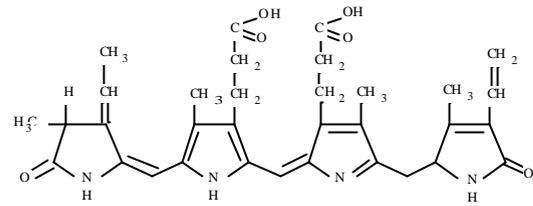
Chlorophylle *c*₁:

R: CH₂CH₃

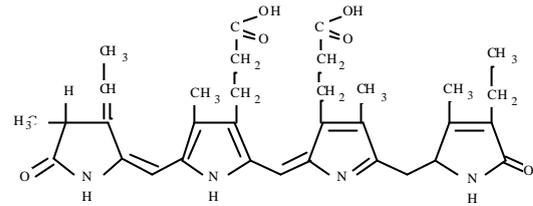
Chlorophylle *c*₂:

R: CH=CH₂

PHYCOBILINES

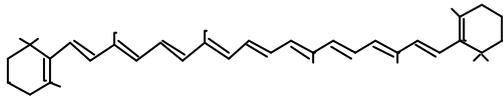


Phycoérythrobiline

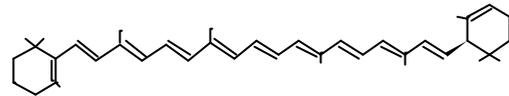


Phycocyanobiline

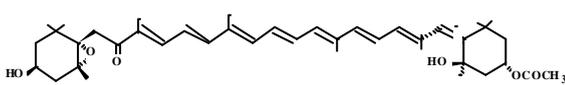
CAROTENES



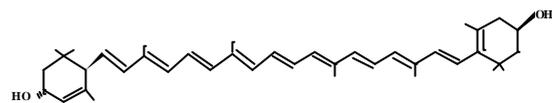
beta-carotène



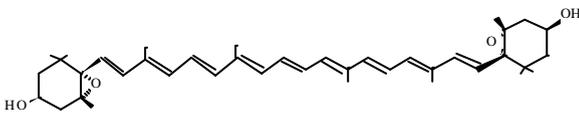
alpha-carotène



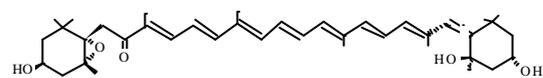
Fucoxanthine



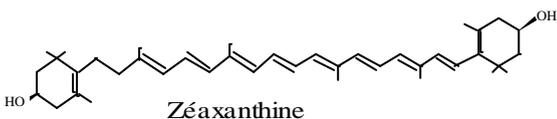
Lutéine



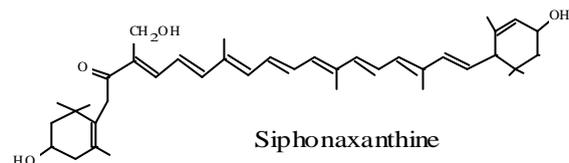
Violaxanthine



Néoxanthine



Zéaxanthine



Siphonaxanthine

Fig. 4 : Formules structurales des chlorophylles, des chromophores des phycobiliprotéines et des caroténoïdes des algues (d'après Ragan, 1981).

On estime que ce processus de photosynthèse oxygénique doit être apparu il y a environ 3 500 millions d'années (Awramik 1992). De ce fait, il est remarquable de constater que les comparaisons de séquences, aussi bien parmi les espèces eucaryotiques que procaryotiques, révèlent pour de nombreuses protéines photosynthétiques clés, un très fort degré de conservation (Ort and Yocum 1996). Par ailleurs, la cristallisation du PS I a permis d'élucider sa structure et d'établir des modèles hypothétiques d'organisation du centre réactionnel du PS II (Green and Durnford 1996, Schubert et al. 1997). La similitude dans la cinétique de séparation de charge entre les systèmes des bactéries anoxygéniques et les photosystèmes I et II des organismes oxyphototrophes suggère que les processus fondamentaux qui guident le transfert des électrons d'un composant à l'autre sont probablement les mêmes dans chacun des deux types de centres réactionnels (Reith 1996). Les principales différences entre les organismes photosynthétiques actuels résident donc plutôt au niveau de la composition en pigments associés aux antennes capturant la lumière et/ou de la nature des antennes elles-mêmes.

I.2- LA PIGMENTATION DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE

Il existe une formidable diversité de pigments au sein des plantes supérieures, des différentes classes d'algues et des cyanobactéries, répartis entre les centres réactionnels I et II et les antennes capturant la lumière (Tableau 1). Tous les pigments photosynthétiques, y compris ceux des centres réactionnels, sont capables d'une absorption directe de la lumière solaire (Owens 1996). Leur capacité d'absorption de la lumière est déterminée par la section optique d'absorption dépendant de la longueur d'onde, qui est spécifique de chaque pigment. Il semble que dans certains cas, de très faibles modifications des voies métaboliques soient nécessaires pour induire la synthèse d'un pigment plutôt que d'un autre (Sayre and von Wrobelboerner 1994, von Wettstein et al. 1995). Ainsi, la conversion de la Chl *a* en Chl *b* nécessite uniquement l'oxydation d'un groupement méthyl en formyl et la conversion de la Chl *a* en Chl *d*, l'oxydation d'un groupement vinyl en formyl (Fig. 4).

Toutes les protéines pigmentaires à Chl lient à la fois des Chl et des caroténoïdes (Green and Durnford 1996). Les Chl assurent l'essentiel de la capture de l'énergie lumineuse, alors que les caroténoïdes jouent le plus souvent un rôle de protection de l'appareil photosynthétique contre l'excès d'énergie lumineuse (cf. section I.4-adaptations aux variations lumineuses ; Frank and Cogdell 1996, Vishnevetsky et al. 1999, Yamamoto and Bassi 1996). Cependant, les caroténoïdes peuvent aussi contribuer de façon significative à la stabilisation de la structure de la protéine (Havaux 1998) ou à la capture de l'énergie lumineuse comme cela a été observé chez certains organismes marins (Frank and Cogdell 1996, Hiller et al. 1991). Dans tous les cas, l'association des Chl et des caroténoïdes semble essentielle pour obtenir un repliement correct des protéines qui les lient (Paulsen 1995).

Des protéines liant spécifiquement des caroténoïdes ont cependant récemment été mises en évidence dans la membrane plasmique, dans le cytosol ou à la surface des cellules de certains organismes, où elles auraient aussi un rôle de photoprotection (Vishnevetsky et al. 1999, Wu and Krogmann 1997).

Tous les eucaryotes photosynthétiques et les cyanobactéries possèdent de la Chl *a* qui se caractérise par un pic d'absorption à environ 440 nm dans le bleu et à environ 675 nm dans le rouge. L'incorporation de pigments accessoires tels que la Chl *b*, la Chl *c*, les phycobiliprotéines ou certains caroténoïdes, dont les pics d'absorption sont situés à des longueurs d'onde où l'absorption de la Chl *a* est faible, permet ensuite d'élargir la gamme spectrale dans laquelle l'absorption de la lumière est possible. Ainsi, la fucoxanthine et la péridinine, présentes chez certaines algues, permettent d'étendre la capacité de capture de la lumière d'environ 80 à 100 nm vers la partie rouge du spectre (Lüning 1990). Les contributions photosynthétiques de nombreux autres caroténoïdes tels que la diadinoxanthine, la diatoxanthine, l'hétéroxanthine ou encore la néofucoxanthine sont beaucoup moins évidentes.

La détermination de structures protéiques au niveau atomique a permis de montrer qu'il existe une homologie substantielle parmi les complexes d'antenne à Chl du point de vue de leur composition pigmentaire, de l'orientation et de la distance des pigments les uns par rapport aux autres, ainsi que des sites permettant la liaison des molécules de Chl (Kühlbrandt et al. 1994). En particulier, les résidus histidine au niveau des hélices transmembranaires sont de très bons candidats pour lier les molécules de Chl (Krauss et al. 1993, Kühlbrandt and Wang 1991, Kühlbrandt et al. 1994). De même, les résidus glutamine et asparagine, les groupements carbonyle et les molécules d'eau peuvent fournir des ligands supplémentaires des molécules de Chl (Kühlbrandt et al. 1994). Ces propriétés communes à l'ensemble des protéines pigmentaires supposent par ailleurs une conservation de la séquence et de la structure de ces protéines.

1.3- PROTEINES PIGMENTAIRES DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE

Les protéines liant les pigments sont essentiellement constituées de polypeptides transmembranaires présentant un nombre variable d'hélices α transmembranaires (MSH's pour "membrane spanning helices") selon les familles de protéines. De par leurs caractéristiques fonctionnelles, elles peuvent être divisées en deux groupes : les complexes du centre et les complexes capturant la lumière (antenne intrinsèque ou phycobilisomes).

I.3.1- Les complexes du centre

Les complexes du centre des deux photosystèmes PS I et PS II sont formés d'une part par le centre réactionnel proprement dit et d'autre part par une antenne interne (ou proximale, CP47/CP43) qui lie la majorité des molécules de Chl *a* et permet le transfert de l'énergie d'excitation de l'antenne au CR. Les CR sont les composants des photosystèmes où interviennent la photochimie primaire de séparation de charge et les processus de transfert d'électrons. Ils sont très conservés d'un point de vue structural et fonctionnel chez tous les organismes photosynthétiques oxygéniques (Nitschke and Rutherford 1991, Rutherford and Nischke 1996). Chez les eucaryotes et la plupart des cyanobactéries, les protéines pigmentaires constituant ces complexes lient presque exclusivement de la Chl *a* et du β -carotène (cf. Tableau 2), et ces protéines sont toutes codées par le génome chloroplastique chez les eucaryotes (Green and Durnford 1996). En revanche, le β -carotène est remplacé par de l' α -carotène chez *Prochlorococcus* et *Acaryochloris marina* qui utilise la Chl *d* comme pigment majeur (Chisholm et al. 1988, Miyashita et al. 1997).

Tableau 2 : Complexes du centre contenant de la Chl *a* chez les cyanobactéries et les chloroplastes (Valeurs consensus de différentes sources, d'après Green et Durnford, 1996)

Complexe	Pigment/cofacteurs	Gène	Polypeptide	Masse apparente
<i>Photosystème I</i> Complexe de centre (CP1)	75-100 Chl <i>a</i> 12-15 β -carotènes phylloquinone Cluster 4Fe-4S	<i>psaA</i> <i>psaB</i>	PsaA ou PSI-A PsaB ou PSI-B	58 à 70 kDa 58 à 70 kDa
<i>Photosystème II</i> Centre réactionnel (CR)	4-6 Chl <i>a</i> 2 phéophytine 2 plastoquinone 1 Fe sans hème 1-2 β -carotène	<i>psbA</i> <i>psbD</i>	D1 ou PsaA D2 ou PsbD	dimère d'environ 60 kDa
CP47 (CPa-1)	20-22 Chl <i>a</i> 2-4 β -carotènes	<i>psbB</i>	CP47 ou PsbB	47 kDa
CP43 (Cpa-2)	20 Chl <i>a</i> 5 β -carotènes	<i>psbC</i>	CP43 ou PsbC	43 kDa
<i>Autres</i> CP43' (CPIV-4)		<i>isiA</i>	CP43' ou IsiA	34 kDa

I.3.1.1- Le complexe du centre du photosystème II

Le complexe du centre du PS II comprend toutes les protéines, les pigments et les cofacteurs nécessaires pour transférer les électrons de l'eau à la plastoquinone réduite (Diner and Babcock 1996, Ghanotakis and Yocum 1990). Ce complexe est composé de 10 sous-unités protéiques principales (Fig. 5) : les polypeptides D1 et D2, les sous-unités α (*psbE*) et β (*psbF*) du *cyt b₅₅₉*, 2 protéines transmembranaires CP43 et CP47, le produit du gène *psbI* (environ 4kDa), et 3 polypeptides extrinsèques de 17, 23 et 33 kDa, associés du côté lumen de la membrane (Irrgang et al. 1995, Satoh 1993, Seibert 1993, Stewart and Brudvig 1998).

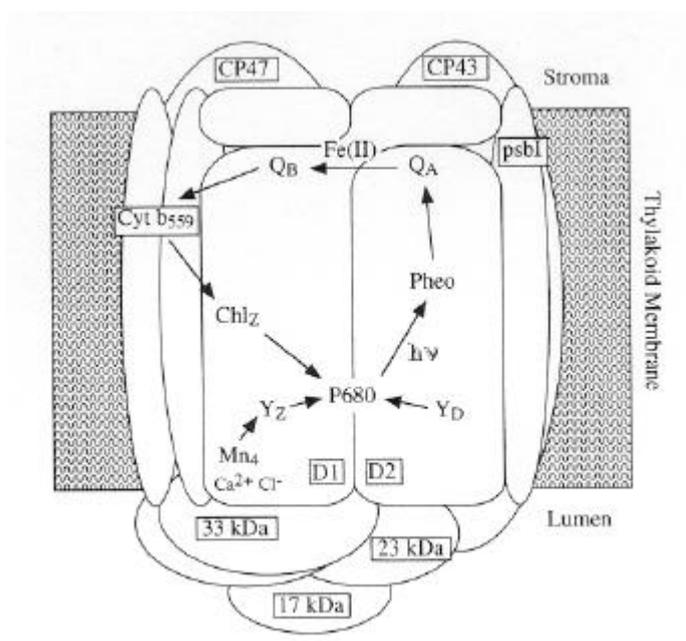


Fig. 5 : Modèle structural du complexe protéique du PSII chez les cyanobactéries incluant les cofacteurs du transfert d'électrons (Stewart et Brudvig, 1998).

Les protéines de 17 et 23 kDa sont absentes chez les cyanobactéries où elles sont remplacées par le *cyt c₅₅₀* et une protéine de 12 kDa (Shen and Inoue 1993). Parmi ces polypeptides, seuls 4 d'entre eux fixent des pigments : ceux formant le centre réactionnel (D1 et D2) et les deux protéines d'antennes du centre, CP47 et CP43 (Barber and Kühlbrandt 1999, Satoh 1996). Les autres protéines du PS II ne semblent pas fixer de molécules de Chl, mais elles pourraient avoir un rôle important dans l'assemblage du centre réactionnel du PS II *in vivo* (Tang et al. 1990).

Le centre réactionnel du PS II (D1/D2) : CR II

Les deux polypeptides majeurs du centre réactionnel, D1 (codé par *psbA*) et D2 (codé par *psbD*), possèdent une masse moléculaire d'environ 30 kDa (Diner and Babcock 1996). L'origine de la lettre D est due au profil de migration "diffus" dans les premiers SDS-PAGE réalisés avec ces

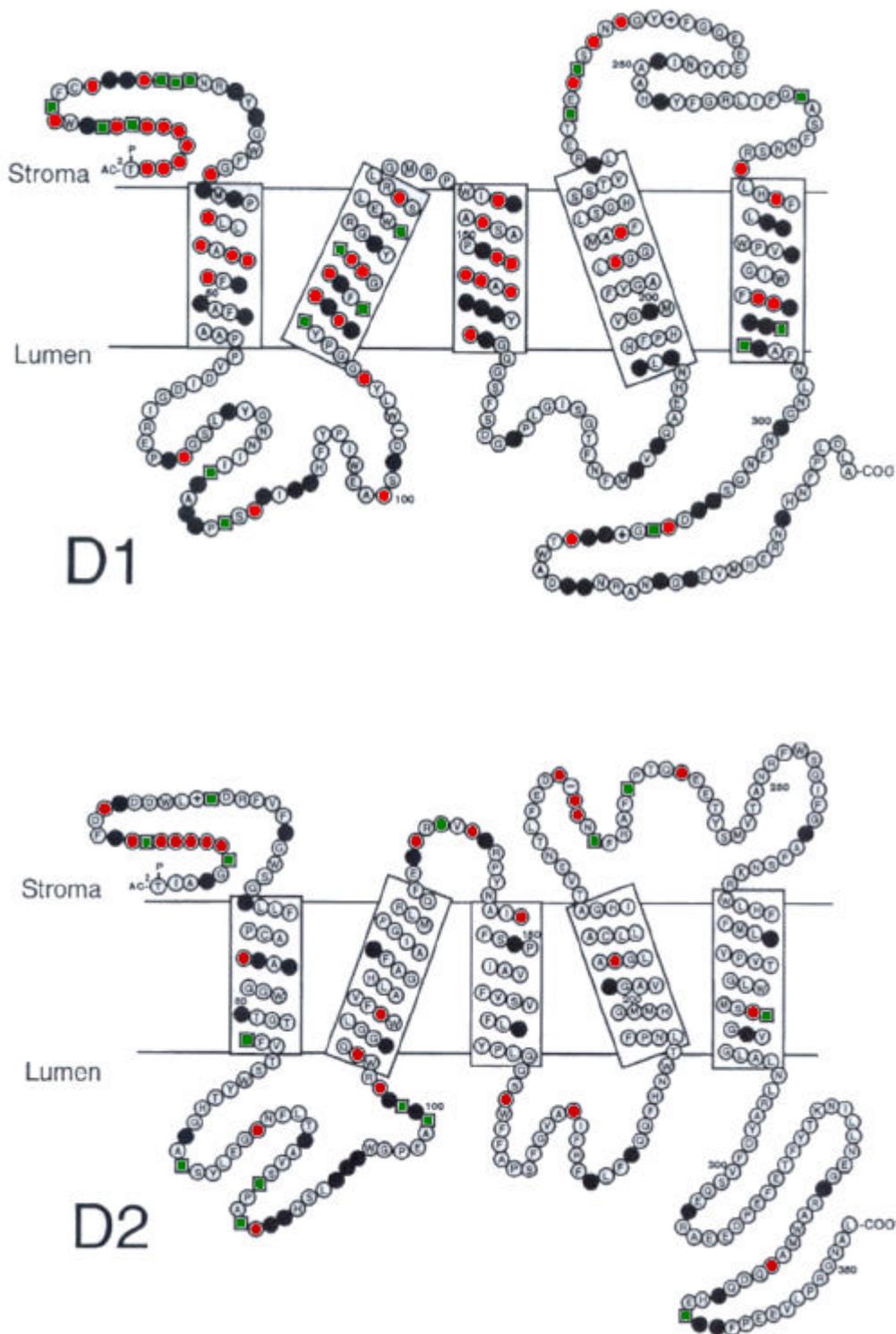


Fig. 6 : Modèles topologiques des polypeptides D1 et D2 et mise en évidence des acides aminés conservés. La séquence consensus a été établie à partir de 38 espèces différentes. Les acides aminés conservés sont indiqués selon leur code à une lettre, les cercles rouges correspondent aux acides aminés non conservés, les cercles noirs aux résidus hydrophobes remplacés de façon conservative et les carrés verts aux résidus hydrophiles remplacés de façon conservative (Bricker et Ghanotakis, 1996).

protéines (Satoh 1982). Ces deux sous-unités ont tendance à former un dimère que l'on détecte sur SDS-PAGE aux alentours de 60 kDa.

De nos jours, un grand nombre de gènes codant pour D1 et D2 ont été séquencés à partir d'une variété importante d'organismes allant des cyanobactéries aux plantes supérieures. Chez les plantes, *psbA* est présent sous la forme d'une copie unique ininterrompue, alors que deux copies contenant des introns semblent présentes chez les algues vertes et 3 copies ininterrompues chez la plupart des cyanobactéries (*psbA1* à 3 ; Golden 1994, Golden et al. 1986, Schaefer and Golden 1989a). Pour les cyanobactéries à Chl *b*, deux copies ont été mises en évidence chez *Prochlorothrix hollandica* (Morden and Golden 1989) et seulement une copie chez *Prochlorococcus* SS120 (Hess et al. 1995). Par ailleurs, deux copies du gène *psbD* sont présentes chez les cyanobactéries à phycobilisomes et chez *Prochlorothrix* (Golden 1994). L'une d'entre elles est individualisée dans le génome, alors que la seconde est en opéron et chevauche le gène *psbC* codant pour l'antenne interne CP43, de la même façon que dans les chloroplastes des plantes supérieures (Holschuh et al. 1984).

Malgré la variabilité du nombre de copies de chacun de ces gènes, les variations des séquences au niveau protéique sont très faibles puisque plus de 60 à 70 % des acides aminés de D1 et D2 sont conservés entre les cyanobactéries et les plantes supérieures (Svensson et al. 1991). De plus, les zones les plus variables sont essentiellement situées aux extrémités 5' et 3' des protéines. Seul le produit supposé de *psbA1* chez *Synechocystis* PCC 6803 et PCC 6714 présente des variations de séquence importantes par rapport aux autres copies du gène *psbA* (Ajani et al. 1989, Jansson et al. 1987), mais il a été montré que ce gène n'était pas transcrit dans ces souches (Mohamed et al. 1993). Les gènes multiples codent pour deux formes distinctes de la protéine D1, excepté chez *Prochlorothrix hollandica*. Le plus fort degré de conservation de ces protéines est trouvé au niveau des 5 hélices transmembranaires prédites par graphe d'hydropathie (Trebst 1986 ; Fig. 6). Dans ces régions, les acides aminés susceptibles d'intervenir dans la fixation des pigments et des cofacteurs sont presque tous conservés. Il en est de même pour certains résidus susceptibles d'intervenir dans la liaison du cluster manganèse (Debus 1992, Rutherford and Nischke 1996, Rutherford et al. 1992, van der Bolt and Vermaas 1992).

Bien que les similitudes soient moindres, ces protéines présentent aussi des homologies avec les CR des bactéries pourpres et des bactéries vertes filamenteuses (Blankenship 1992, Deisenhofer and Michel 1989, Michel and Deseinoffer 1988). Ces CR sont hétérodimériques et sont regroupés sous le terme centre de type quinone (Type II) dans lesquels la phéophytine (ou la bacteriophéophytine) et une paire de quinones servent d'accepteurs d'électrons terminaux. Les similarités de séquence entre les sous-unités protéiques D1/D2 du CR II et les sous-unités correspondantes du CR des bactéries pourpres (L et M) sont de l'ordre de 20-25 % (Hearst and Sauer 1984, Michel et al. 1986, Rhee et al. 1998, Williams et al. 1984). De plus, d'après les données cristallographiques du CR de *Rhodospseudomonas viridis*, les protéines L et M possèdent également 5

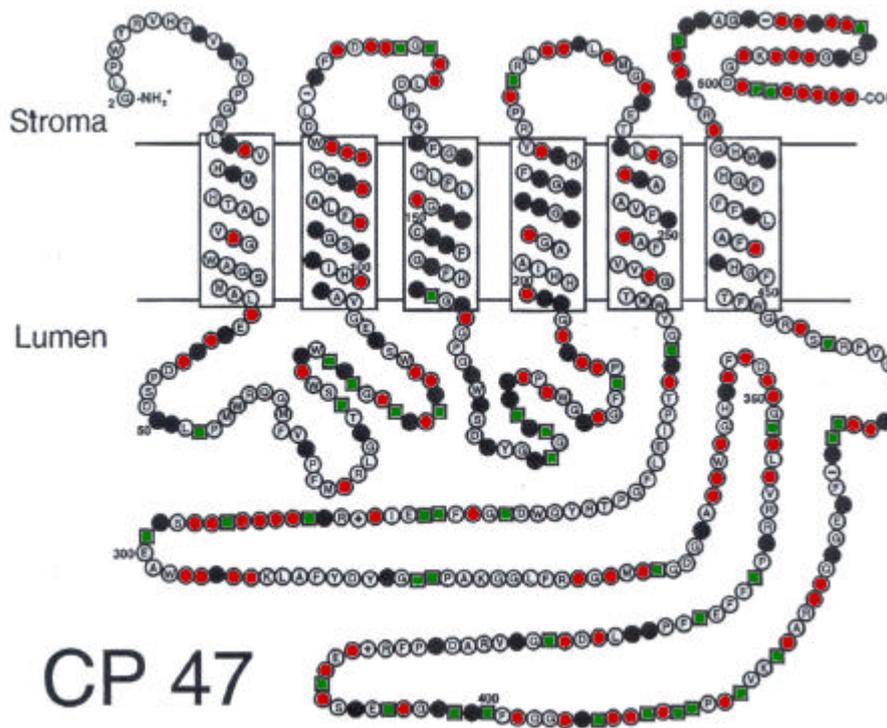
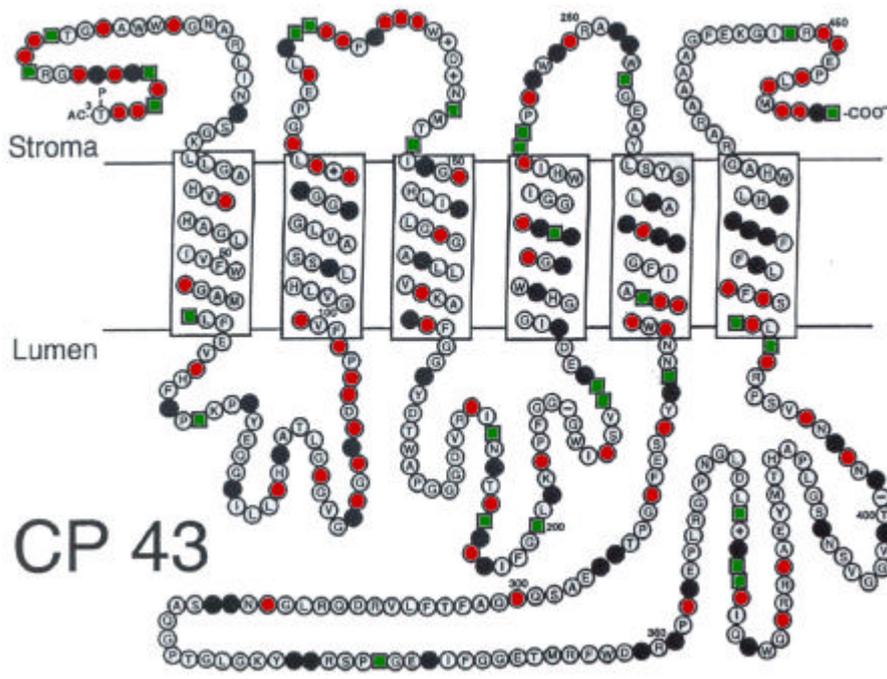


Fig. 8 : Modèles topologiques du CP43 et CP47 établis à partir de séquences consensus de 10 espèces. Les acides aminés conservés sont indiqués selon leur code à une lettre, les cercles rouges correspondent aux résidus non conservés, les cercles noirs aux résidus hydrophobes remplacés de façon conservative et les carrés verts aux résidus hydrophiles remplacés de façon conservative (Bricker et Ghanotakis, 1996).

hélices transmembranaires. Enfin, les deux sous-unités de ces CR (L/M et D1/D2) possèdent aussi d'importantes similarités de séquence (Michel et al. 1986, Svensson et al. 1991). C'est pourquoi, il a été suggéré que les deux polypeptides constituant ces CR hétérodimériques sont issus de la duplication d'un gène ancestral unique (cf. Fig.7 ; Michel et al. 1986, Svensson et al. 1991). D1 et D2 étant beaucoup plus semblables que ne le sont L et M, les deux sous-unités de chacun des CR sont probablement issues d'une duplication de gènes indépendante ayant eu lieu après la divergence du PS II et des lignées bactériennes anoxygéniques (Coleman and Youvan 1993, Williams et al. 1986).

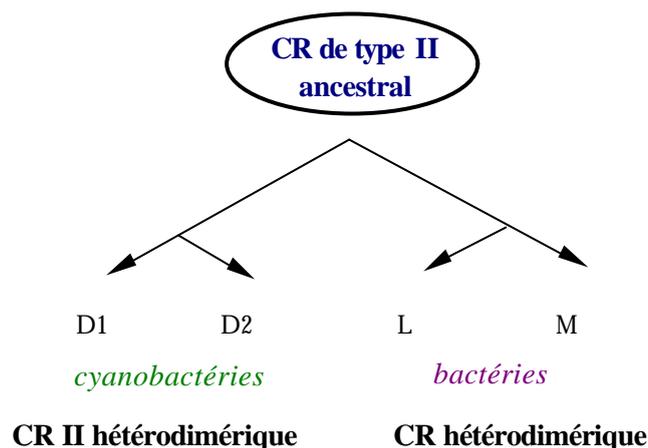


Fig. 7 : Schéma représentant l'origine supposée des différentes sous-unités des centres réactionnels photosynthétiques de type II.

CP47 et CP43

CP47 (CPa-1) et CP43 (CPa-2) sont des composants protéiques membranaires du PS II qui fonctionnent comme des antennes internes (Pakrasi 1995). Ces deux protéines lient la plupart de la Chl *a* (12 à 25 molécules) et du β -carotène du complexe du centre PS II (Bricker 1990, Rhee et al. 1998) et transfèrent l'énergie d'excitation issue des antennes majeures vers les Chl du centre réactionnel P680 (Pakrasi 1995). Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que ces protéines pigmentaires ont également un rôle structural et fonctionnel important (Pakrasi and Vermaas 1992, Vermaas 1993). De plus, CP43 et CP47 pourraient lier de petites quantités de lutéine en plus du β -carotène (Bassi et al. 1993).

D'un point de vue structural, CP47 et CP43 présentent des similitudes importantes (Bricker 1990, Sayre and von Wrobelboerner 1994). Chacune de ces protéines possède six hélices transmembranaires et les extrémités N- et C-terminales sont situées au niveau de la surface stromale (Fig.8 ; Bricker 1990, Sayre and von Wrobelboerner 1994, Vermaas et al. 1987). La principale différence entre ces protéines est la taille de la boucle entre les hélices transmembranaires 5 et 6 qui est plus longue de 151 résidus dans le CP47 (Bricker 1990). La boucle du CP47 est en contact avec le polypeptide de 33 kDa (produit du gène *psbO*) et serait impliquée dans la stabilisation du cluster manganèse (Bricker 1990, Enami et al. 1997, Frankel and Bricker 1995, Sayre and von Wrobelboerner 1994, Vermaas et al. 1987).

De même, le CP43 qui semble localisé du côté opposé au complexe D1-D2-cytochrome b559, pourrait avoir un rôle similaire (Enami et al. 1997, Harrer et al. 1998). Ces caractéristiques structurales ont récemment été confirmées par la détermination de la structure 3D du CR II à une résolution de 8 Å (Rhee et al. 1998).

Le séquençage chez plusieurs espèces des gènes *psbB* et *psbC*, codant respectivement CP47 et CP43, a montré la très forte conservation de ces protéines. En effet pour CP47, 80 % des acides aminés sont identiques ou remplacés de façon conservative entre les différents organismes examinés, contre 85 % pour CP43 (Bricker and Ghanotakis 1996). De plus, les résidus potentiellement impliqués dans la liaison des molécules de Chl sont très bien conservés dans les six hélices transmembranaires des protéines CP43 (8 résidus H) et CP47 (12 résidus H) de différentes espèces (Deisenhofer et al. 1985, Kühlbrandt and Wang 1991, Shen et al. 1993). De même que pour les autres protéines pigmentaires, ces résidus sont groupés du côté stroma ou lumière des surfaces membranaires (Zuber et al. 1987).

CP43' (IsiA)

Une protéine de 34 kDa associée au complexe du PS II est synthétisée en abondance chez certaines cyanobactéries en conditions de stress dû à une carence en fer (Riethman and Sherman 1988a, Riethman and Sherman 1988b, Strauss 1994). Elle présente des homologies de séquence importantes avec le CP43 (Laudenbach and Straus 1988, Leonhardt and Straus 1992). Pour cette raison, elle a été nommée CP43' mais les termes CPVI-4, CPIIIb ou encore IsiA sont aussi employés. La structure de cette protéine diffère du CP43 par la longueur de la boucle entre les hélices transmembranaires prédites 5 et 6, qui est plus courte de 92 résidus chez IsiA. De plus, la conservation des résidus histidines dans les hélices transmembranaires prédites par profil d'hydropathie suggère que la capacité de liaison des molécules de Chl est certainement similaire au CP43 (Bricker 1990, Laudanbach and Straus 1988, Vermaas and Ikeuchi 1991).

Puisque les phycobilisomes sont rapidement dégradés en conditions de stress nutritionnel, il a été proposé que cette protéine fonctionne comme un complexe d'antenne auxiliaire qui compenserait la perte des phycobilisomes pendant le stress dû au fer (Pakrasi et al. 1985). Cette protéine pourrait également constituer une réserve de Chl qui contribuerait à l'assemblage des complexes du centre réactionnel dans les premiers stades de récupération du stress dû au fer (Burnap et al. 1993, Riethman and Sherman 1988b). En fait, l'inactivation d'IsiA par mutagenèse dirigée chez *Synechococcus* PCC 7942 a montré que cette protéine a plus probablement un rôle de photoprotection (Park et al. 1999). IsiA permettrait en effet de protéger le PS II d'une excitation excessive en condition de limitation en fer en agissant comme un dissipateur non radiatif de l'énergie lumineuse.

I.3.1.2- Le centre réactionnel du PS I (PsaA/ PsaB) : CR I

Dans le photosystème I, le centre réactionnel et l'antenne interne sont combinés en un seul "super-complexe" pigment-protéine qui accepte les électrons de la plastocyanine ou du cytochrome c_6 pour les transférer à une molécule de type ferrédoxine codée par le gène *psaC* (Chitnis et al. 1995, Golbeck 1992, Golbeck 1993). Les cofacteurs du PS I qui participent à la chaîne de transfert d'électrons sont liés aux protéines PsaA, PsaB et PsaC (Chitnis et al. 1995, Scheller et al. 1997). Le complexe PS I contient aussi 8 autres polypeptides dont certains contiennent des segments transmembranaires, mais aucune de ces protéines ne semblent fixer de molécules de Chl (cf. Fig. 9 ; Chitnis et al. 1995, Green and Durnford 1996).

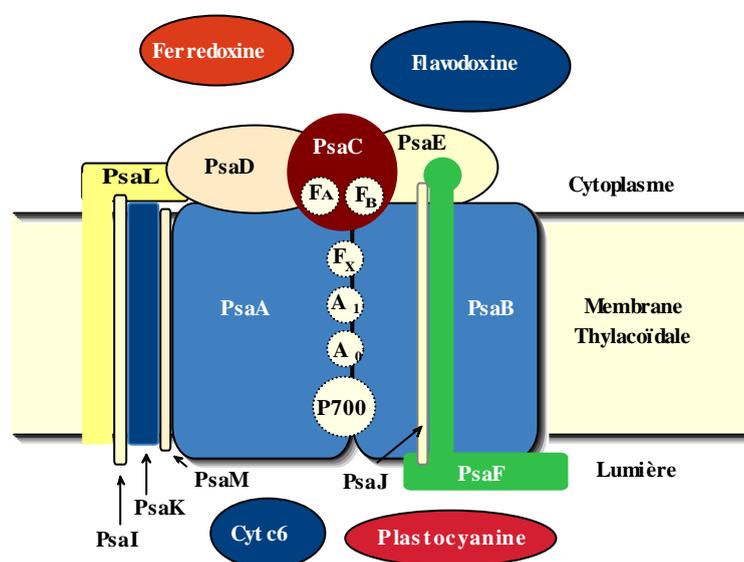


Fig. 9 : Modèle d'organisation des polypeptides et des cofacteurs du PS I chez les cyanobactéries. La position exacte du PsaM par rapport aux autres sous-unités n'est pas connue. Les transporteurs d'électrons identifiés par spectroscopie comprennent le donneur primaire d'électrons, P700 (une paire spéciale de Chl a), les accepteurs primaires et secondaires d'électrons, A₀ (Chl a) et A₁ (phylloquinone) et 3 clusters Fer-Soufre, F_A, F_B et F_X (d'après Chitnis et al. 1995 et Krauss et al. 1996).

PsaA et PsaB constituent les deux sous-unités majeures du centre. Il s'agit de deux polypeptides hydrophobes qui possèdent une masse moléculaire apparente similaire, qui varie de 58 à 70 kDa selon les organismes. Ces deux protéines lient un total de 75-100 molécules de Chl *a* et 12-15 molécules de β -carotène (cf. Tableau 2 ; Green and Durnford 1996). La structure d'un complexe PS I de cyanobactérie a été déterminée récemment à une résolution de 4,0 Å par cristallographie aux rayons X (Schubert et al. 1997). PsaA et PsaB possèdent chacun 11 hélices transmembranaires renfermant la majorité des résidus chargés de ces protéines (Fig.10 ; Krauss et al. 1993) et deux larges hélices de surface parallèles au plan de la membrane (Schubert et al. 1997).

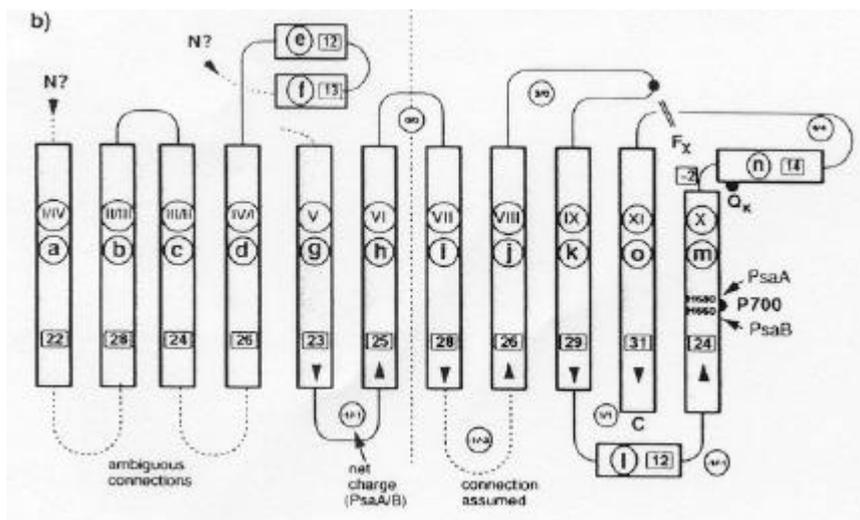


Fig. 10 : Représentation schématique des hélices a de PsaA et PsaB. Les boucles inter-hélices identifiées avec certitude sont représentées en trait continu et celles supposées ou ambiguës en pointillés. La longueur des hélices a individuelles (+/- 3 acides aminés) est indiquée en caractère gras (Schubert et al. 1997).

Les gènes codant pour ces protéines ont été séquencés chez plusieurs organismes procaryotiques et eucaryotiques (Fish et al. 1985, Mühlhoff et al. 1993, Smart and McIntosh 1991). Les similitudes de séquences entre les cyanobactéries d'eau douce et les eucaryotes sont d'environ 95 % pour PsaA et plus de 95 % pour PsaB. De plus, *psaA* et *psaB* présentent entre eux un pourcentage d'identité de 40-45 %, ce qui suggère qu'ils sont issus de la duplication d'un gène ancestral qui aurait ensuite divergé (Pakrasi 1995). La comparaison de ces séquences a permis de mettre en évidence que deux résidus cystéines présents à la fois dans PsaA et PsaB pourraient fournir des sites de fixation du cluster Fer-Soufre F_x ($[4Fe-4S]$; McDermott et al. 1989, Petrouleas et al. 1989, Scheller et al. 1997). Ces sites semblent également essentiels pour l'assemblage du CR I (Smart and McIntosh 1993). En revanche, les sites de fixation des cofacteurs P700, A_0 et A_1 sur les polypeptides PsaA et PsaB ne sont pas encore connus. Cependant, plusieurs résidus histidine sont particulièrement bien conservés dans PsaA et PsaB (His522, 523 et 530 dans PsaB de *Chlamydomonas*) et il a été proposé que l'His 522 ou 523 coordonne le P700, alors que l'His 530 coordonnerait A_0 (Cui et al. 1995).

Par ailleurs, la comparaison des séquences de ces protéines avec celles des CR homodimériques des bactéries vertes sulfureuses (Buttner et al. 1992a, Buttner et al. 1992b) et des héliobactéries (Liebl et al. 1993) suggère une lignée commune de ces CR avec les CR I des organismes photosynthétiques oxyphototrophes (Lockau and Nitschke 1993, Trost et al. 1992). En effet, tous ces organismes ont des CR de type Fer-Soufre (Type I) qui possèdent des clusters Fe_4-S_4 à haut potentiel comme accepteurs terminaux d'électrons (Blankenship 1992, Nitschke et al. 1987, Trost

et al. 1992). De plus, d'après les analyses d'hydrophatie, chacun des polypeptides composant ces CR possède également 11 hélices transmembranaires (Liebl et al. 1993). Enfin, les protéines constituant les CR des bactéries vertes sulfureuses et des héliobactéries présentent 14 à 17 % d'homologie avec les deux sous-unités PsaA et PsaB du maïs (Buttner et al. 1992b, Golbeck 1993, Liebl et al. 1993, Nitschke and Rutherford 1991). Il semble donc que *psaA* et *psaB* soient apparus par duplication de gène et que la divergence de la lignée PS I par rapport aux CR bactériens soit intervenue avant l'événement de duplication conduisant aux centres hétérodimériques (cf. Fig.11 ; Trost et al. 1992, Wolfe and Hooper 1996).

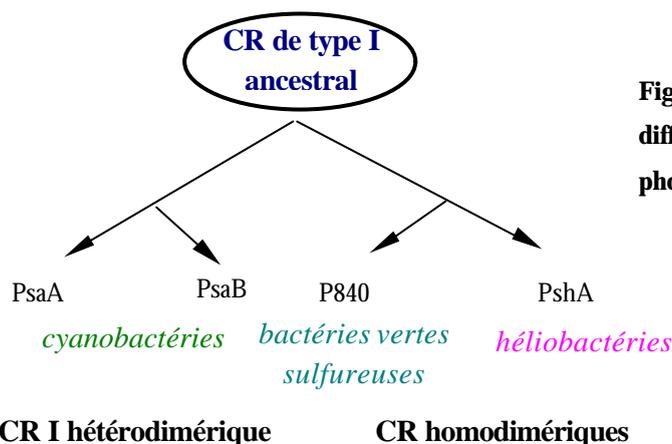


Fig. 11 : Schéma représentant l'origine supposée des différentes sous-unités des centres réactionnels photosynthétiques de type I.

I.3.2- Les complexes antennaires

Les protéines pigmentaires des complexes d'antenne sont responsables de l'absorption de l'énergie lumineuse et de la première étape de sa conversion en énergie chimique chez les organismes photosynthétiques oxygéniques. A l'inverse des centres réactionnels, il existe une très grande diversité de pigments et de protéines constituant les complexes pigments-protéines d'antenne, particulièrement au sein des classes algales (Hiller et al. 1991).

I.3.2.1- Les phycobilisomes des cyanobactéries et des algues rouges

Chez les cyanobactéries et les rhodophytes, la capture de l'énergie lumineuse est assurée par des complexes extrinsèques à phycobiliprotéines sous forme d'aggrégats moléculaires fixés à la surface externe des thylacoïdes : les phycobilisomes (Gantt and Conti 1966, Sidler 1994). Ces complexes supramoléculaires sont constitués de deux principaux éléments structuraux (cf. Fig. 12 ; MacColl 1998). La partie centrale de l'édifice est composée de deux, trois ou parfois quatre structures cylindriques qui permettent le contact et l'ancrage des phycobilisomes à la membrane thylacoïdale (Porter et al. 1978, Searle et al. 1978). Ces éléments permettent le transfert de l'énergie des régions

distales des phycobilisomes aux complexes CP47 des membranes thylacoïdales. La partie externe des phycobilisomes est généralement constituée de six projections radiales qui partent du centre et sont formées d'un nombre variable de disques cylindriques.

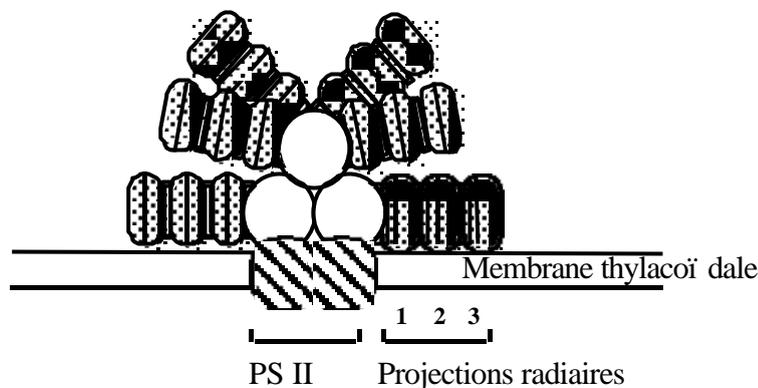


Fig. 12 : Structure d'un phycobilisome. Dans ce schéma, les six projections radiales sont constituées de trois jeux de double disque, indiqués de 1-3, liés entre eux par des polypeptides de liaison (zones noires ; d'après Sidler, 1994).

Ces complexes supramoléculaires sont constitués à 85 % d'une famille de protéines pigmentées et solubles dans l'eau, les phycobiliprotéines (Glazer and Fang 1973, Klotz et al. 1986, Tandeau de Marsac and Cohen-Bazire 1977). Les 15 % restant sont formés de polypeptides de liaison, qui ne lient pas de chromophores. Chaque phycobiliprotéine est un hétérodimère constitué de sous-unités α et β qui présentent des homologies de séquence importantes (Tandeau de Marsac et al. 1990, Tandeau de Marsac et al. 1988). Il existe 4 classes prédominantes de phycobiliprotéines. L'allophycocyanine (AP ; absorption maximum (A_{\max}) \sim 650 nm) est trouvée exclusivement dans le centre des phycobilisomes, alors que les projections radiales peuvent contenir selon les espèces et les conditions environnementales de la phycocyanine (PC ; $A_{\max} \sim$ 620 nm), ainsi que de la phycoérythrine (PE ; $A_{\max} \sim$ 560 nm) ou de la phycoérythrocyanine (PEC ; $A_{\max} \sim$ 540 nm). Les phycobilisomes absorbent donc la lumière visible dans une gamme de longueur d'onde de 540 à 660 nm, où l'absorption liée aux pigments chlorophylliens est faible (Porter et al. 1978, Searle et al. 1978, Sidler 1994). La migration de l'énergie lumineuse captée est très rapide et s'effectue depuis l'extrémité distale des projections radiales vers la portion proximale, et enfin vers le cœur des phycobilisomes (Sidler 1994). Cette énergie est ensuite transférée à la Chl *a* des centres réactionnels photosynthétiques. L'isolement de complexes phycobilisomes-PS II a permis de vérifier que l'énergie est transférée vers le CR II (Gantt et al. 1986). Cependant, il semble que l'attachement des phycobilisomes au PS I soit également possible et permettrait d'augmenter l'efficacité du PS I chez *Synechococcus* (Mullineaux 1992, Mullineaux 1999). La confirmation de ces résultats nécessiterait l'isolement de complexes phycobilisomes-PS I fonctionnels similaires aux particules phycobilisomes-PS II déjà isolées (Gantt et al. 1986).

Chez les cyanobactéries possédant des phycobilisomes, la Chl *a* est le seul type de Chl présent et aucune antenne transmembranaire associée aux centres réactionnels I et II n'a été mise en évidence (Tan et al. 1995, Wolfe et al. 1994a). A l'inverse, les algues rouges possèdent en plus des phycobilisomes, une antenne transmembranaire à Chl *a* associée au PS I (cf. section I.3.2.4-antenne collectrice des algues, Tan et al. 1995, Wolfe et al. 1994b). Les Cryptophycées constituent aussi un cas unique car elles synthétisent à la fois des complexes intrinsèques à Chl *a/c* (cf. section I.3.2.4-antenne collectrice des algues, Ingram and Hiller 1983, Rhiel et al. 1989) et des phycobiliprotéines (PC ou PE) localisées dans la lumière des thylacoïdes (Lichtlé et al. 1987). Dans cette classe d'algues, les phycobiliprotéines sont plus petites que celles des algues rouges et des cyanobactéries et ne possèdent pas les séquences d'acides aminés nécessaires à l'aggrégation sous forme de phycobilisomes (Gantt 1996).

Enfin, au sein même de la radiation des cyanobactéries, trois oxyphototrophes (*Prochloron*, *Prochlorothrix* et *Prochlorococcus*) utilisent une antenne à Chl *a/b* comme principal complexe collecteur de lumière (Partensky et al. 1999). L'absence de phycobiliprotéines a longtemps été considérée comme le principal caractère unissant ces trois organismes (Lewin, 1975, 1977 ; Burger-Wiersma et al., 1986 ; Chisholm et al., 1988, 1992). Cependant, les gènes codant les sous unités α et β des phycobiliprotéines ont récemment été mis en évidence et séquencés chez plusieurs souches de *Prochlorococcus* adaptées à faible lumière (cf. section II.3.3-appareil photosynthétique ; Hess et al. 1996, Ting et al. 1998, Hess et Campbell, pers. com.). De plus, bien que les recherches effectuées pour mettre en évidence d'autres types de phycobiliprotéines (PC ou AP) soient restées infructueuses jusqu'à maintenant (Hess, pers. com.), des études par immunocytochimie ont montré que la phycoérythrine est probablement localisée dans la lumière des thylacoïdes et semble fonctionnelle pour la capture de la lumière (Hess et al. 1999, Lokstein et al. 1999). De même, la présence de "mini-phycobilisomes" a été observée chez le procaryote oxyphototrophe *Acaryochloris marina* qui utilise la Chl *d* comme pigment majeur (Marquardt et al. 1997). Ces structures visibles en microscopie électronique sont essentiellement constituées de phycobiliprotéines fixant la phycocyanine et l'allophycocyanine. A l'inverse, l'étroit resserrement des membranes thylacoïdales chez *Prochlorococcus*, *Prochlorothrix hollandica* et *Prochloron*, observé en microscopie électronique à transmission, semble confirmer l'absence de phycobilisomes chez ces organismes (Partensky et al. 1999).

I.3.2.2- Les protéines à Chl *a/b* des plantes supérieures

Chez les plantes supérieures, six complexes pigments-protéines principaux ("Light harvesting complex" (LHC) II, LHC Ia, LHC Ib, CP29, CP26 et CP24) ont été identifiés (Green and Durnford 1996). Chacun de ces complexes est constitué de protéines intrinsèques à la membrane, codées au

niveau du génome nucléaire. Ces protéines lient la Chl *a* et la Chl *b* dans des rapports variables, ainsi que la lutéine, des xanthophylles, la néoxanthine et la violaxanthine (cf. Tableau 3 ; Green and Durnford 1996).

Tableau 3 : Protéines des antennes à Chl *a/b* des plantes supérieures (d'après Green et Durnford, 1996)

Complexe pigment-protéine	Gène	Rapport Chl <i>a/b</i>	Référence
LHCI-680A	<i>lhca3</i>	1.4	(Preiss et al., 1993)
		1.9	(Tjus et al., 1995)
		3.1	(Palsson et al. 1995)
LHCI-680B	<i>lhca2</i>		
LHCI-730	<i>lhca1</i> <i>lhca2</i>	2.3	(Preiss et al., 1993)
		2.9	(Tjus et al., 1995)
		3.2	(Palsson et al. 1995)
LHCII	<i>lhcb1</i> <i>lhcb2</i> <i>lhcb3</i>	1.4	(Dainesse et Bassi, 1991)
		1.33	(Peter et Thornber, 1991)
CP29	<i>lhcb4</i>	2.3	(Peter et Thornber, 1991)
		2.8	(Dainesse et Bassi, 1991)
		3.1	(Henrysson et al., 1989)
CP26	<i>lhcb5</i>	1.8	(Peter et Thornber, 1991)
		2.2	(Dainesse et Bassi, 1991)
		3.3	(Van Amerongen et al. 1994)
CP24	<i>lhcb6</i>	0.9	(Peter et Thornber, 1991)
CP22	<i>psbS</i>	1.6	(Dainesse et Bassi, 1991)
		6	(Funk et al. 1995)

Antenne collectrice associée au PS II

Le premier complexe Chl-protéine à avoir été découvert est le LHC II ("Light Harvesting Complex II") qui constitue l'antenne majeure à Chl *a/b* du PS II (Green 1988). Les protéines de ce complexe possèdent une masse moléculaire comprise entre 24 et 29 kDa et représentent environ un tiers du contenu total en protéines des membranes thylacoïdales et environ 50 % de la Chl totale. Chez les plantes supérieures, le LHC II est constitué de trois types de polypeptides étroitement reliés (codés par les gènes *Lhcb1*, 2 et 3 ; Jansson 1994) dont les rapports varient selon les conditions de croissance (Machold 1991). Depuis 1983, il a été suggéré à plusieurs reprises que ces protéines seraient constituées de trois hélices transmembranaires, avec la partie N-terminale exposée du côté stroma et la partie C-terminale dans la lumière des thylacoïdes (Burgi et al. 1997, Green et al. 1991, Mullet 1983). La détermination à une résolution de 6 Å (Kühlbrandt and Wang 1991), puis à 3,4 Å (Kühlbrandt et al. 1994) de la structure cristallographique du LHC II purifié de pois a confirmé cette hypothèse (cf. Fig. 13). Les hélices I et III sont homologues et reliées par un pont salin Arg-Glu. Parmi les 12 molécules de Chl mises en évidence au niveau de ces hélices, 7 ont été attribuées à la Chl *a* car leur proximité avec les molécules de caroténoïdes permet un transfert efficace de l'énergie. Les 5 autres dont 3 sont liées par l'hélice II, ont été assignées à la Chl *b* (Kühlbrandt et al. 1994).

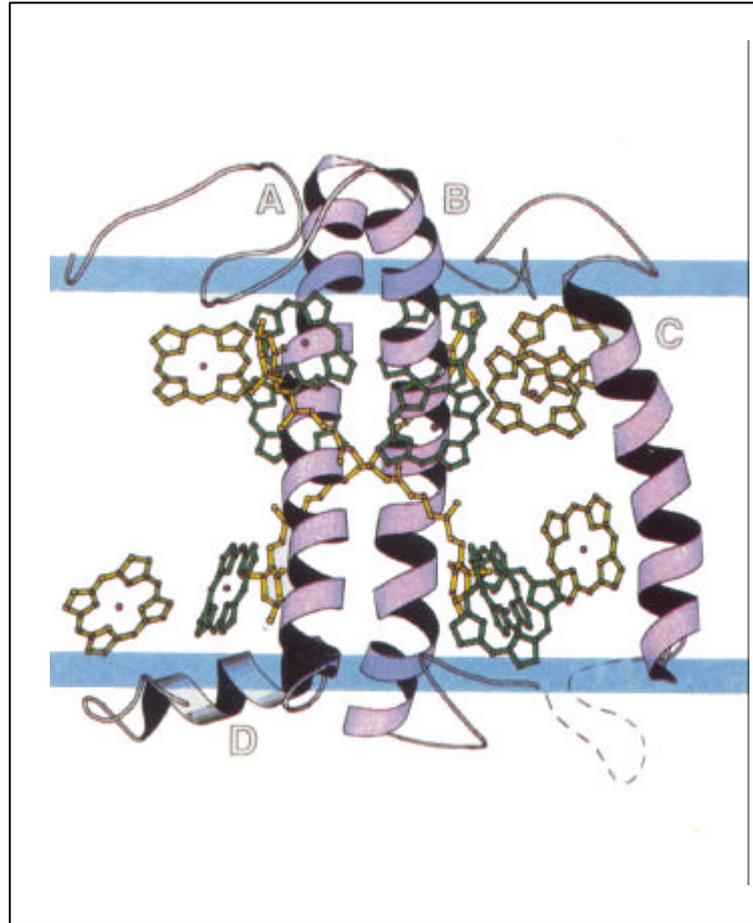


Fig. 13 : Structure du LHCII de pois déterminé par cristallographie électronique (Kühlbrandt et al. 1994). Les bandes bleues indiquent la position approximative de la bicouche lipidique. Sur cette représentation, les hélices sont nommées A à D et les hélices B, C et A correspondent aux hélices 1, 2 et 3 respectivement. Les molécules de chlorophylle sont représentées par des anneaux porphyrines et les molécules supposées être des Chl *a* ont été noircies.

En dehors des polypeptides du LHC II proprement dit, il existe trois autres protéines à Chl *a/b* qui possèdent une structure similaire : Lhcb4, Lhcb5 et Lhcb6, aussi respectivement connues sous les noms de CP29, CP26 et CP24 (Green and Durnford 1996, Grossman et al. 1995). Ces molécules lient une quantité plus faible de Chl *b* que les protéines constituant le LHC II et constituent 5 à 10 % de la Chl totale associée au PS II (cf. Tableau 3 ; Allen 1992, Barber and Kühlbrandt 1999, Peter and Thorbner 1991, Pickersky et al. 1991). Ces protéines semblent situées à la périphérie du LHC II et leur étroite association avec le centre du PS II pourrait permettre le transfert de l'énergie d'excitation du trimère de LHC II au CR, par l'intermédiaire de CP43 et CP47 (Camm and Green 1989, Harrer et al. 1998).

Enfin, plus récemment mis en évidence chez les plantes supérieures et les cyanobactéries (Kim et al. 1992, Nilsson et al. 1990, Wedel et al. 1992), le CP22 est un polypeptide de 22 kDa codé par le gène *psbS*. Cette protéine est reliée aux autres protéines à Chl *a/b* par des homologies de séquence importantes bien qu'il possède 4 domaines hydrophobes transmembranaires au lieu de 3 chez la plupart des protéines à Chl *a/b* (Funk et al. 1995b, Kim et al. 1992, Wedel et al. 1992). Les hélices I et III présentent également de fortes homologies entre elles, de même que les hélices II et IV (Green and Pichersky 1994, Kim et al. 1992, Wedel et al. 1992). Cette découverte a amené Green et Pichersky (1994) à proposer un scénario évolutif dans lequel les Lhc seraient issues de la duplication d'une protéine ancestrale à deux hélices transmembranaires dont l'hélice 4 aurait été ultérieurement éliminée (Green and Pichersky 1994). Deux copies du CP22 (PsbS) sont présentes pour chaque PS II et pourraient lier chacune 5 molécules de Chl (*a* et *b*) et différents types de caroténoïdes (Funk et al. 1995a). Il a été proposé que ce polypeptide intervienne dans la liaison du LHC II avec le PS II (Ghanotakis et al. 1987, Kim et al. 1994) ou encore joue un rôle de réservoir ou de transporteur de Chl durant la biogenèse ou la dégradation des protéines liant la Chl (Funk et al. 1995a, Funk et al. 1995b). Cependant, aucune variation significative de la quantité relative de protéine PsbS n'a pu être observée pendant les phases de synthèse ou de dégradation de l'antenne LHC II (Lindahl et al. 1997). Plus récemment, des expériences de mutagenèse dirigée ont mis en évidence que l'absence de PsbS n'affecte ni la capture de l'énergie lumineuse, ni la photosynthèse en lumière modérée, mais que cette protéine est indispensable pour l'atténuation ("quenching") non photochimique du rendement de fluorescence de la chlorophylle, lors de la photoinhibition (Li et al. 2000). Cette protéine pourrait donc contribuer à la dissipation photoprotectrice de l'énergie plutôt qu'à la capture de l'énergie photosynthétique.

Antenne collectrice associée au PS I

Deux complexes Chl-protéine sont associés au PS I. L'un d'entre eux semble responsable de la fluorescence du PS I à 730 nm à basse température (LHC I-730) alors que le second fluoresce à plus courte longueur d'onde (LHC I-680), suggérant une organisation différente des molécules de Chl associées (Bassi and Simpson 1987, Palsson et al. 1995). Le LHC I-680 peut être lui-même subdivisé en deux sous-complexes pigmentaires, LHC I-680A et LHC I-680B, qui diffèrent par leur composition peptidique (Knoetzel et al. 1992, Tjus et al. 1995). De plus, des données obtenues à partir d'*Arabidopsis* suggèrent que deux autres protéines de type Lhc (Lhca5 et Lhca6) seraient potentiellement associées au PS I, bien que leur localisation n'ait pas été déterminée expérimentalement (Jansson 1999). Ainsi, bien qu'un plus faible nombre de molécules de Chl soient associées au CR I qu'au CR II, ces complexes d'antenne associées au PS I contribuent pour 100-120 Chl *a* sur un total de 210 molécules de Chl *a* associées au PS I (Jansson 1994).

I.3.2.3- Les antennes collectrices procaryotiques à Chl *a/b*.

Bien que les cyanobactéries utilisant les phycobilisomes comme principal complexe collecteur de lumière constituent la très large majorité des procaryotes oxyphototrophiques, les cyanobactéries à Chl *b* utilisent pour cette même fonction une antenne à Chl *a/b*. *Prochloron* et *Prochlorothrix* possèdent de la Chl *a* et *b* (monovinyl Chl *a*₁ et *b*₁), comme pigment majeur, alors que *Prochlorococcus* utilise des dérivés divinylés de la Chl *a* et *b* (Chl *a*₂ et *b*₂, cf. section II.3.1-composition pigmentaire de *Prochlorococcus* ; Goericke and Repeta 1992). Un pigment de type Chl *c* intervenant dans la collecte de l'énergie lumineuse a aussi été mis en évidence chez *Prochlorococcus* en quantité mineure (Goericke and Repeta 1992) et chez *Prochloron* où il représente 4 à 15 % du contenu total en Chl (Larkum et al. 1994). De plus, certaines souches de *Prochlorococcus* (SS120, NATL1) synthétisent aussi de la Chl *b*₁ (Moore et al. 1995, Partensky et al. 1993). En ce qui concerne les caroténoïdes, les cyanobactéries à Chl *b* ont en commun avec les cyanobactéries à phycobilisomes la zéaxanthine comme xanthophylle majeure. Le second caroténoïde majeur est le β-carotène chez *Prochlorothrix* et *Prochloron*, tout comme chez les cyanobactéries à phycobilisomes et l'α-carotène chez *Prochlorococcus*.

La découverte de la présence d'une antenne à Chl *a/b* chez les cyanobactéries à Chl *b* a tout d'abord amené à spéculer sur une éventuelle relation entre ces organismes procaryotiques et les chloroplastes des plantes supérieures et des algues vertes (Matthijs et al. 1994, Post and Bullerjahn 1994). Cependant, les analyses phylogénétiques regroupent sans équivoque les cyanobactéries à Chl *b* avec les cyanobactéries possédant des phycobilisomes et montrent que les trois genres *Prochloron*, *Prochlorothrix* et *Prochlorococcus* ne forment pas un groupe monophylétique au sein de la radiation des cyanobactéries (cf. section II.1.2-phylogénie des cyanobactéries à Chl *b* ; Lewin 1976, Palenik and Haselkorn 1992, Urbach et al. 1992). L'antenne à Chl *a/b* des procaryotes photosynthétiques semble en fait avoir évolué par duplication de gènes et divergence à partir de la famille des protéines d'antenne à Chl *a* du centre qui comprend CP43, CP47 et IsiA (van der Staay et al. 1998). Ceci suppose que de très faibles changements, si ce n'est même aucun, dans la séquence primaire de l'ancêtre commun ont été nécessaires pour permettre la liaison de Chl *b* au lieu de la Chl *a*, ainsi que de pigments de type Chl *c* (LaRoche et al. 1996). Un seul gène codant pour cette antenne collectrice (*pcb*) a été identifié chez *Prochloron* et *Prochlorococcus* (LaRoche et al. 1996), mais trois copies de ce gène ont été mises en évidence chez *Prochlorothrix* (van der Staay et al. 1998). Les *pcbA*, *B* et *C* présents chez *Prochlorothrix* sont co-transcrits et codent respectivement pour des polypeptides de 32, 33 et 38 kDa. Le gène *pcbC* diverge significativement des deux autres et pourrait être apparu par une duplication de gènes indépendante de celle qui a donné *isiA*, ainsi que les gènes *pcb* des autres cyanobactéries à Chl *b*. Par ailleurs, les caractéristiques pigmentaires et la composition polypeptidique de l'antenne majeure de *Prochlorococcus* varient selon les souches examinées (cf. section II.3- Caractéristiques photosynthétiques de *Prochlorococcus* ; Partensky et al. 1997).

Tableau 4 : Caractéristiques pigmentaires et cytologiques des principaux groupes d'algues eucaryotes (d'après Simon et Cabioch, non publié).

<i>Divisions</i>		<i>Classes (éventuellement exemples)</i>	<i>Pigments photosynthétiques</i>	<i>Cytologie : flagelles, réserves, parois</i>	<i>Organes reproducteurs</i>
GLAUCOCYSTOPHYTA			Chl <i>a</i> et phycobiliprotéines	2 flagelles inégaux	sporocyste et/ou gamétocystes
RHODOPHYTA		Rhodophycées	Chl <i>a</i> et phycobiliprotéines	- Pas de cellules flagellées - Amidon extraplastidial - Galactanes sulfatés dans les parois	
HETEROKONTOPHYTA		Fucophycées* Eustigmatophycées Chrysophycée* Pélagophycées* Xanthophycées* Diatomophycées* Dictyochophycées* Raphidophycées*	Chl <i>a</i> (* et <i>c</i>)	- Cellules flagellées hétérocontées - Parois très variables (écailles, frustule siliceux, cellulose..)	
PRYMNESIOPHYTA		Prymnesiophycées	Chl <i>a</i> et <i>c</i>	- 2 flagelles égaux, 1 haptonème - écailles (et/ou coccolithes)	
DINOPHYTA		Dinophycées	Chl <i>a</i> et <i>c</i>	- 2 flagelles inégaux - Plaques cellulósiques	
CRYPTOPHYTA		Cryptophycées	Chl <i>a</i> et <i>c</i> phycobiliprotéines	- 2 flagelles inégaux - Périplaste	
EUGLENOPHYTA		Euglenophycées	Chl <i>a</i> et <i>b</i>	- 2 flagelles inégaux - « cuticule »	
CHLORARACHNIOPHYTA		Chlorarachniophycées	Chl <i>a</i> et <i>b</i>	- 1 flagelle	
CHLOROBIONTES	CHLOROPHYTA	10 classes dont: Prasinophycées Ulvophycées Chlorophycées ...	Chl <i>a</i> et <i>b</i>	- Cellules flagellées isocontées ou absentes - Amidon dans les plastes	
	STREPTOPHYTA CHAROPHYTA BRYOPHYTA TRACHETOPHYTA		Chl <i>a</i> et <i>b</i>		

I.3.2.4- Les antennes collectrices des algues

La plus grande diversité de pigments accessoires liés aux antennes collectrices se situe au niveau des divisions algales (van den Hoek et al. 1995). Ces pigments constituent l'un des éléments majeurs de leur classification, mais la nature chimique des produits de stockage, des parois cellulaires et les organes reproducteurs ont aussi joué un rôle important dans la définition des différents groupes d'algues (cf. Tableau 4 ; Lüning 1990). C'est pourquoi les différents systèmes collecteurs de lumière sont ici répertoriés en tenant compte à la fois des pigments majeurs impliqués dans la collecte de l'énergie lumineuse et de la classification de ces organismes.

Les algues à Chl a/b

CHLOROPHYCEES

Les algues vertes semblent posséder environ le même nombre de protéines à Chl *a/b* associées au LHC I et II que les plantes supérieures (Allen and Staehelin 1994, Bassi and Dainese 1992, Bassi and Wollman 1991). Cependant, assez peu de séquences sont disponibles et malgré la présence d'homologies au niveau des hélices transmembranaires, leur classification dans les différents types de Lhc définis chez les plantes (Lhca1 à 4, Lhcb1 à 3) reste difficile (Green and Pichersky 1994, Jansson 1994). Chez certaines algues vertes marines, les complexes LHC à Chl *a/b* lient aussi de la siphonaxanthine et de la siphonéine qui participent de façon significative à l'absorption de la lumière (Anderson 1986). A l'inverse, la lutéine, la violaxanthine, la néoxanthine et la loroxanthine présentes chez les algues vertes ont un rôle de photoprotection de l'appareil photosynthétique et de stabilisation des molécules de Chl dans les complexes (Plumley and Schmidt 1987).

EUGLENOPHYCEES

Les Euglènes possèdent elles aussi des antennes à Chl *a/b* reliées à celles des algues vertes et des plantes supérieures (Houlné and Schantz 1988, Muchhal et Scharwzbach, 1992). Cependant, les protéines des complexes LHC I et II présentent la particularité d'être tout d'abord synthétisées sous forme de polyprotéines et ensuite clivées après importation dans les chloroplastes (Houlné and Schantz 1988, Muchhal et Scharwzbach, 1992).

PRASINOPHYCEES

On a pu mettre en évidence chez les Prasinophycées la présence d'au moins deux polypeptides de 20-21 kDa qui sont organisés en complexes oligomériques (Hiller et al. 1991, Rhiel et Mörschel, 1993). Malgré la présence de Chl *c* et bien que ces deux protéines ne montrent aucune réaction immunologique avec les autres protéines à Chl *a/b* (Fawley et al. 1986), des homologies de séquences avec les antennes des plantes supérieures ont pu être mises en évidence au niveau des domaines correspondant aux hélices transmembranaires I et III (Rhiel and Mörschel 1993, Schmitt et al. 1994).

Les algues à Chl a et phycobiliprotéines (Rhodophyta)

Bien que les algues rouges soient pourvues de phycobilisomes fonctionnels pour collecter la lumière, elles possèdent également une antenne de type LHC I liant de la Chl *a*. Cette antenne permet d'augmenter la capacité d'absorption du CR I d'au moins 70 Chl pour un total d'environ 170 Chl par P700 (Tan et al. 1995, Wolfe et al. 1994b). On a pu estimer que chez *Porphyridium cruentum*, 75 à 80 % de la Chl *a* était associée au PS I, le reste au PS II. De plus, le PS I des algues rouges présente aussi la particularité de lier de la zéaxanthine et du β -carotène, et de contenir davantage de polypeptides d'antenne que le LHC I des plantes vertes. Ainsi, les algues rouges possèdent une antenne associée au PS I constituée de 4 à 5 polypeptides immunologiquement reliés aux protéines d'antenne à Chl *a/b* et à Chl *a/c*, même si ces polypeptides lient uniquement de la Chl *a* (Durnford et al. 1999, Wolfe et al. 1994a, Wolfe et al. 1994b). Ces polypeptides sont par ailleurs suffisamment proches de ceux des plantes supérieures pour être attribués à l'un des 4 types de Lhca (Green and Durnford 1996).

Les Algues à Chl a/c

HETEROKONPHYTA, PRYMNESIOPHYTA ET CRYPTOPHYTA

La plus grande variété de pigments accessoires se situe au niveau des algues à Chl *a/c*. En plus de la Chl *a*, ces algues possèdent plusieurs types de Chl *c* et de nombreuses xanthophylles dont la plus abondante est en général la fucoxanthine (Buchel and Wilhelm 1993, Caron et al. 1988, Hiller et al. 1991, Hiller et al. 1988, Hiller et al. 1993). Pour cette raison, les antennes collectrices sont souvent nommées FCP pour "Fucoxanthine Chl *a/c* proteins". Les protéines à Chl *a/c* sont plus petites (15-24 kDa) et semblent aussi moins nombreuses (1-3 polypeptides) que les protéines à Chl *a/b* correspondantes (Caron et al. 1988, Hiller et al. 1991). Cependant, le nombre d'antennes FCP répertoriées tend à augmenter avec l'amélioration des méthodes de détection biochimique. En effet, 8 polypeptides immunologiquement distincts ont depuis peu été mis en évidence chez le raphidophyte *Heterosigma* (Durnford and Green 1994). De même, des protéines-Chl mineures ont été récemment détectées chez une diatomée (*Cyclotella cryptica*) et semblent impliquées dans les processus d'adaptation à la lumière (Rhiel et al. 1997). Sur la base d'études immunologiques, il a été suggéré que les protéines à Chl *a/c* soient affiliées aux protéines à Chl *a/b* (Caron et al. 1988, Durnford and Green 1994, Passaquet et al. 1991, Paulsen 1995). Cette hypothèse est maintenant confirmée par un grand nombre de données de séquençage, qui ont permis de prédire la présence de trois hélices transmembranaires comme pour leurs analogues chez les plantes supérieures et les algues vertes (Apt et al. 1995, Bhaya and Grossman 1993, Durnford and Green 1994, Grossman et al. 1990, Hiller et al. 1991, Hiller et al. 1993). De plus, des données de dichroïsme circulaire à partir d'algues cryptophytes ont suggéré que la Chl *a* est organisée de la même façon que chez les complexes à Chl *a/b* (Hiller et al. 1992, Paulsen 1995). Cependant, ces complexes à Chl *a/c* semblent plus proches des LHC I, CP24 et

CP29 que du LHC II des algues vertes et des plantes supérieures (LaRoche et al. 1994).

Toutefois, les algues à Chl *a/c* constituent le groupe qui présente le plus de variabilité au niveau de leurs antennes collectrices. L'antenne majeure FCP des diatomées est essentiellement représentée par un complexe Chl *a/c*-fucoxanthine-protéine (Owens and Wold 1986). Au contraire, les algues brunes possèdent un complexe fucoxanthine-Chl *a/c*₂-protéine associé au PS II et un complexe protéique violaxanthine-Chl *a/c*_{1/c}₂ relié au PS I (Anderson 1986). Enfin, les cryptophytes possèdent des complexes à Chl *a/c* intrinsèques à la membrane thylacoïdale mais aussi des phycobiliprotéines dans la lumière des thylacoïdes (Lichtlé et al. 1987).

DINOPHYTA

Les Dinoflagellés constituent un cas à part parmi les algues à Chl *a/c*. En général, le caroténoïde photosynthétiquement actif est la péridinine, dont le fonctionnement serait comparable à celui des phycobilisomes (Knötzel and Rensing 1990). En effet, les Dinoflagellés possèdent deux types de complexes collecteurs (Hiller et al. 1991) : un complexe péridinine-Chl *a/c* intrinsèque à la membrane (*i*PCP) et un complexe péridinine-Chl *a* soluble dans l'eau (*s*PCP). Les séquences polypeptidiques des complexes *i*PCP sont reliées à celles des protéines FCP et aux Lhc des plantes supérieures et des algues vertes (Hiller et al. 1993, Iglesiasprieto et al. 1993). Cependant les *i*PCP sont tout d'abord synthétisées sous forme de polyprotéines qui sont ensuite clivées en nombreux polypeptides individuels d'environ 19 kDa (Hiller et al. 1993, Hiller et al. 1995). Il a été suggéré que ces polypeptides seraient ensuite transportés dans les chloroplastes de façon similaire à ce qui est observé chez les Euglènes (Sulli and Schwartzbach 1995). Au contraire, les polypeptides *s*PCPs ne sont phylogénétiquement proches d'aucun autre type de protéine pigmentaire et ne sont pas non plus synthétisés sous forme de polyprotéines (Norris and Miller 1994).

I.3.2.5- Protéines apparentées aux Lhc

Protéines induites par le stress (ELIP, HLIP)

Plusieurs protéines procaryotiques et eucaryotiques impliquées dans les réponses aux stress environnementaux possèdent des similitudes de séquence avec les protéines d'antenne liant la Chl *a/b* et la Chl *a/c* eucaryotiques.

Les ELIP ("Early light-inducible proteins") sont des protéines à trois hélices transmembranaires qui ont été découvertes de par leur expression transitoire pendant les premiers stades de maturation des étioplastes en chloroplastes ("greening" ; Grimm and Kloppstech 1987, Grimm et al. 1989). Par la suite, il a été rapporté que les ELIP étaient aussi induites chez les plantes soumises à des stress lumineux (Lers et al. 1991, Levy et al. 1992). Plusieurs fonctions ont été

proposées. Etant donnée leur association avec des quantités massives de caroténoïdes, les ELIP pourraient jouer un rôle de liaison des caroténoïdes ou encore de dissipation de l'excès d'énergie de l'appareil photosynthétique en liant la zéaxanthine (Lers et al. 1991, Levy et al. 1993). Les ELIP pourraient également fonctionner comme des transporteurs de Chl durant la biogenèse de l'appareil photosynthétique, ou comme éradicateur des Chl libres après dégradation de complexes Chl-protéines (Adamska et al. 1992). L'étroite corrélation entre l'accumulation de polypeptides ELIP et la protéolyse du complexe LHC II lors de l'acclimatation à un fort éclaircissement semble confirmer cette dernière hypothèse (Lindahl et al. 1997).

Jusqu'à maintenant, les ELIP ont seulement été mises en évidence chez les plantes supérieures et les algues vertes. Cependant, une protéine à une seule hélice phylogénétiquement liée aux ELIP et exprimée dans des conditions de stress lumineux, a récemment été trouvée chez une cyanobactérie, *Synechococcus* PCC 7942 (Miroshnichenko Dolganov et al. 1995). Cette protéine a été nommée HLIP pour "High Light Inducible Protein". Puisque deux hélices sont nécessaires pour mettre en place les paires d'ions réciproques et lier les Chl, il a été suggéré que ces protéines à une seule hélice pourraient former des dimères (Green and Kühlbrandt 1995, Miroshnichenko Dolganov et al. 1995). L'hélice transmembranaire de cette protéine est similaire aux hélices I et III des Lhcs, et 5 acides aminés sur les 8 potentiellement impliqués dans la fixation des molécules de Chl sont conservés (Kühlbrandt et al. 1994). Cependant la capacité de fixation des molécules de Chl par ces protéines n'a pas été clairement démontrée.

Gènes putatifs présentant des homologies avec les Lhcs

L'analyse d'une base de données contenant plus de 1 000 clones EST d'*Arabidopsis* a permis d'identifier six nouvelles séquences présentant des homologies significatives avec les gènes *Lhcs* (Jansson 1999). Ces nouveaux membres ont été dénommés Lil, pour "light-harvesting like" proteins. Les protéines codées par ces gènes possèdent une (Lil1, Lil2, Lil3) ou deux (Lil4, Lil5, Lil6) hélices transmembranaires et le niveau des ARNm semble accru lorsque la plante est soumise à une forte lumière (excepté pour Lil3). De même, 5 ORFs ("open reading frame" pour cadre ouvert de lecture) homologues des gènes *Lhcs* ont été mis en évidence dans le génome de *Synechocystis* PCC 6803 (Funk and Vermaas 1999). Ces gènes sont exprimés préférentiellement dans des souches mutantes dépourvues de PS I, mais une forte intensité lumineuse ne semble pas accroître de façon significative le niveau des ARN messagers. Pour les distinguer de l'HLIP de *Synechococcus* PCC 7942 induit par un stress lumineux, les protéines correspondantes ont été nommées Scp (A à E) pour "Small Cab-like proteins". Chez ces deux organismes, les homologues les plus proches de ces petits gènes sont les *hliA* codant pour les HLIPs (Funk and Vermaas 1999, Jansson 1999). Un autre point commun est la présence chez la ferrocyclase d'un motif de type Lhc en C-terminal (Chow 1998, Funk and Vermaas 1999, Jansson 1999). Ce motif pourrait remplir une fonction importante pour la ferrocyclase

(ancrage à la membrane ou photoprotection) qui justifierait son maintien au cours de l'évolution (Jansson 1999). Cette extension de type Lhc semble cependant absente des ferrocyclases de tous les organismes non photosynthétiques.

I.4- ADAPTATION AUX VARIATIONS LUMINEUSES

L'absorption de l'énergie lumineuse fournit la force motrice du transport d'électrons photosynthétique. D'un côté, une quantité importante de photons doit être capturée afin de générer une énergie suffisante pour le maintien et la croissance de l'organisme. D'un autre côté, un excès de lumière peut endommager l'appareil photosynthétique (cf. Fig.14).

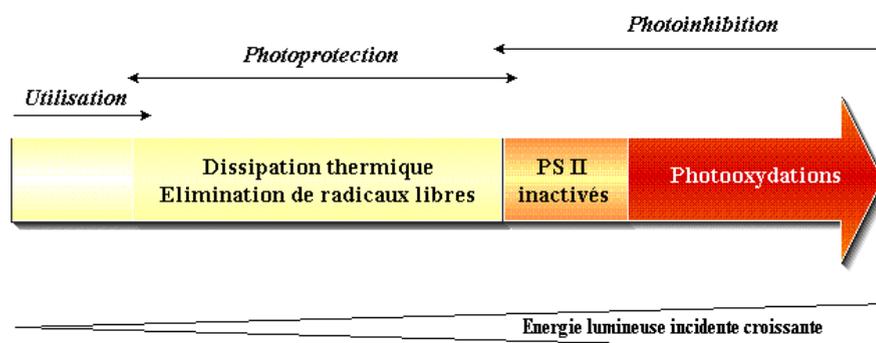


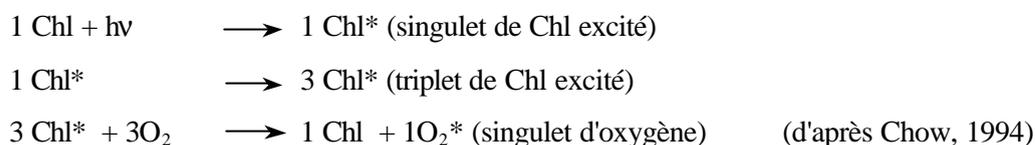
Fig. 14 : Représentation schématique des réponses de l'appareil photosynthétique à l'absorption d'intensités lumineuses croissantes (D'après Demmig-Adams et Adams, 1992).

Cependant, la disponibilité en lumière dans l'environnement naturel est un facteur hautement variable et les organismes doivent donc réguler la distribution de la lumière à l'échelle de quelques minutes. De tels changements correspondent à une adaptation à court terme aux modifications des conditions environnementales, mais il existe aussi des adaptations à long terme (30 min. à quelques jours) qui impliquent des ajustements de la composition des membranes photosynthétiques et de la taille et de la composition de l'antenne périphérique. La limite entre ces deux échelles de temps a été fixée en fonction d'un paramètre biologique majeur, correspondant au temps nécessaire pour permettre la synthèse de nouvelles protéines (>30-60 min.).

I.4.1- Adaptation à court terme

Dans des situations de variation rapide de l'intensité lumineuse (secondes à minutes), ces processus représentent la première ligne de défense contre une absorption lumineuse excessive. L'absorption d'un excès de lumière solaire se produit de façon journalière pour de nombreux

organismes photosynthétiques et plus particulièrement lorsque la croissance est limitée par des stress environnementaux (Li et al. 2000). La capture de l'énergie lumineuse est sujette à une rétrorégulation par les changements de pH (Δ pH) générés par le transport d'électrons à travers la membrane thylacoïdale. Lorsque l'absorption de lumière excède la capacité de fixation du CO₂ de l'organisme, l'accumulation de protons dans la lumière des thylacoïdes résulte en la dissipation de l'énergie lumineuse absorbée dans les pigments de l'antenne associée au PS II. Cette dissipation thermique photoprotectrice est mesurée par le "quenching" non photochimique de la fluorescence de la chlorophylle. Cette réaction permet d'éviter un endommagement photo-oxydatif des centres réactionnels par la formation d'oxygène singulet, espèce radicalaire hautement réactive, formée par la réaction des états triplets excités de la chlorophylle avec l'oxygène (Aro et al. 1993, Barber and Anderson 1992, Li et al. 2000).



Trois principaux mécanismes permettant de réguler l'absorption d'énergie lumineuse ont été décrits dans la littérature : la transition Etat1-Etat2 (Williams and Allen 1987), le cycle xanthophylle-zéaxanthine (Björkmann and Demmig-Adams 1994, Demmig-Adams 1990) et l'agrégation contrôlée des complexes LHC II (Chow 1994, Horton and Ruban 1992, Horton et al. 1991).

I.4.1.1- Transition Etat1-Etat2

Les thylacoïdes sont divisés en deux régions : les vésicules empilées (grana, "appressed") qui sont interconnectées par des régions vésiculaires uniques (lamelles du stroma ; "non appressed" ; cf. Fig. 15). Chez les cyanobactéries, les photosystèmes sont distribués de façon aléatoire au niveau de la membrane thylacoïdale. Au contraire, chez les plantes, les algues vertes et les cyanobactéries à Chl *b*, une hétérogénéité latérale des deux photosystèmes a été démontrée (Anderson and Anderson 1988, Staehelin and van der Staay 1996). Le PS I et l'ATP synthase sont presque exclusivement trouvés au niveau stromatique, alors que le PS II est localisé au niveau des grana (Anderson and Anderson 1988). La fonction de ces empilements dans la photosynthèse reste encore controversée (Anderson and Anderson 1988).

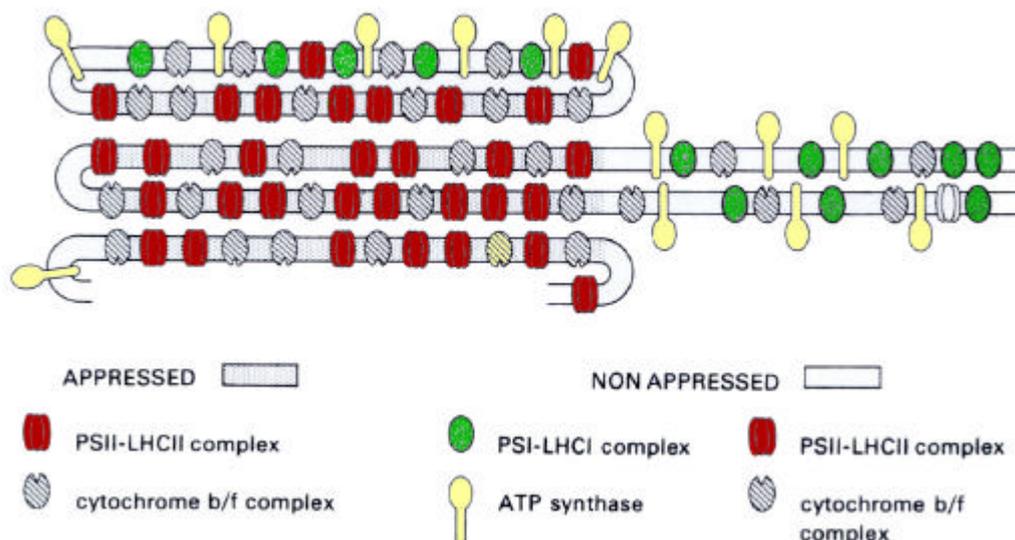


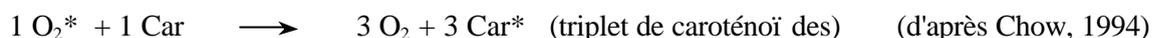
Fig. 15 : Schéma de la distribution latérale des complexes protéiques supramoléculaires dans la membrane thylacoïdale (d'après Anderson et al. 1988).

Chez les plantes supérieures et les algues, les antennes de type LHC II sont trouvées dans les deux régions de membranes thylacoïdales et elles peuvent transférer l'énergie d'excitation aussi bien au PS I qu'au PS II. En fonction de l'intensité et de la qualité de la lumière reçue, les transitions d'état impliquent le déplacement d'une partie des complexes LHC II (environ 30 %) du PS II au PS I (Allen 1992, Allen 1995, Bassi and Dainese 1992). Cette migration dont le principal objectif est de réduire la taille de l'antenne du PS II, semble contrôlée par l'état de phosphorylation des polypeptides Lhcb1 et Lhcb2 (Allen 1992, Bennett 1991). Ce mécanisme de régulation entraîne aussi une légère augmentation de la taille de l'antenne fonctionnelle du PS I, ainsi que des changements dans la répartition latérale d'autres composants de la chaîne de transfert d'électrons (complexe Cyt *b₆f*, plastocyanine ; Haehnel et al. 1989, Staehelin and van der Staay 1996, Vallon et al. 1991). Ces réarrangements permettent certainement d'optimiser l'efficacité de la chaîne de transfert des électrons en fonction de la lumière ambiante (Anderson 1992).

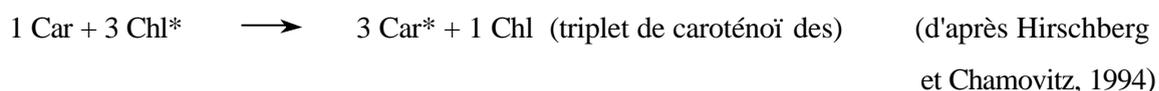
En ce qui concerne les algues rouges et les cyanobactéries, deux hypothèses ont été proposées qui se rapprochent des mécanismes de changement d'état de transition. Selon la première hypothèse, les phycobilisomes seraient capables de se déplacer du PS II au PS I en fonction de leur état de phosphorylation (Allen et al. 1985, Mullineaux 1999). Une deuxième hypothèse, contredisant la première, est apportée par le modèle du "spill-over", selon lequel il se produirait un transfert direct de Chl du PS II au PS I sans déplacement des phycobilisomes (Myers 1963, Mullineaux 1999).

I.4.1.2- Le cycle des xanthophylles

Différentes xanthophylles associées avec les LHCs des algues et des plantes supérieures participent à la dissipation de l'excès d'énergie lumineuse par une série de réactions communément appelées "le cycle des xanthophylles" (Björkmann and Demmig-Adams 1994, Demmig-Adams 1990, Lee and Thornber 1995). Ce cycle semble déclenché par un faible pH luménal dû à un excès de lumière. La dé-époxydation de la violaxanthine conduit alors à la formation d'anthéranthine et de zéaxanthine qui permettraient d'intercepter et de dissiper l'excès d'énergie lumineuse (Gilmore and Yamamoto 1993). En effet, la zéaxanthine serait capable de désactiver les molécules de Chl excitées (singulets ou triplets) et de provoquer un changement conformationnel de l'antenne et des membranes thylacoïdales (Chow 1994, Frank and Cogdell 1996). Ces changements structuraux favoriseraient le "quenching" de l'excès d'énergie d'excitation induisant une baisse du transfert d'énergie vers les centres (Demmig-Adams and Adams 1992).



A l'inverse des algues et des plantes, les cyanobactéries (y compris les cyanobactéries à Chl *b*) ne possèdent pas de cycle des xanthophylles (Hirschberg and Chamovitz 1994). Cependant, elles contiennent des quantités importantes de zéaxanthine et d'autres xanthophylles qui interviennent dans la photoprotection de l'appareil photosynthétique. L'absorption de l'énergie à l'état de triplet des molécules de Chl permet ainsi de prévenir la formation de radicaux d'oxygène à l'état de singulet :



Cependant, le temps de réponse nécessaire à un changement rapide de lumière est beaucoup plus long que chez les eucaryotes puisqu'il nécessite la synthèse de novo de zéaxanthine au lieu d'une simple dé-époxydation d'un pigment préexistant (Siefermann-Harms 1985).

I.4.1.3- Agrégation de l'antenne LHC II

L'agrégation des antennes LHC II constitue un troisième mécanisme de photoprotection de l'appareil photosynthétique qui permettrait la dissipation non radiative de l'énergie d'excitation (Horton and Ruban 1992, Horton et al. 1991). Ce procédé serait déclenché conjointement avec le cycle des xanthophylles par l'acidification du lumen dans des conditions d'éclairement excessif. Par ailleurs, cette agrégation serait favorisée par la conversion de la violaxanthine en zéaxanthine (Chow 1994, Horton and Ruban 1992, Horton et al. 1991).

I.4.2- Adaptation à long terme

Avant de s'acclimater aux variations rapides de l'intensité et de la qualité de la lumière, l'appareil photosynthétique doit s'adapter aux conditions de lumière qui prédominent dans son environnement. Par exemple, les plantes d'ombre des forêts tropicales poussent souvent avec moins de 0,5 % de l'intensité lumineuse incidente au sommet de la canopée (Björkmann and Ludlow 1972). A l'intérieur d'une simple feuille, les chloroplastes sont soumis à un gradient de lumière (Terashima and Inoue 1985). De façon similaire, les plantes supérieures et les algues qui poussent plusieurs mètres en dessous de la surface de l'océan reçoivent une lumière de qualité spectrale différente de la surface, puisque seules les longueurs d'onde basses (de plus haute énergie) pénètrent en profondeur dans la colonne d'eau (Neale 1987).

I.4.2.1- Réponses physiologiques à la lumière

Plusieurs phénomènes d'adaptation à long terme ont été mis en évidence. Les plantes qui poussent dans des environnements sombres produisent typiquement d'avantage de thylacoïdes par chloroplaste et ont des rapports grana:stroma et PS I/PS II supérieurs à ceux mesurés chez les plantes de haute lumière (Anderson et al. 1988, Melis 1991). De même, il est maintenant bien établi que les plantes qui poussent dans des conditions de faible intensité lumineuse possèdent davantage de protéines d'antenne par rapport à la quantité de centres réactionnels (Anderson 1986).

Par ailleurs, bien que la plupart des organismes photosynthétiques soient génétiquement adaptés à pousser dans un environnement d'ombre ou de lumière, ils ont aussi la possibilité de s'adapter aux changements de luminosité dans une certaine gamme de variation. Ainsi, la stœchiométrie des photosystèmes et le rapport LHC/CR de certaines plantes ou feuilles varient en réponse aux changements de l'intensité ou de la qualité de la lumière (Anderson et al. 1988). La capacité des organismes photosynthétiques à répondre aux changements de leur environnement est variable d'une espèce à l'autre et dictée par le génotype de l'espèce. Comparées aux organismes photosynthétiques marins, les plantes supérieures semblent avoir une capacité réduite à s'adapter physiologiquement à de larges variations d'intensité lumineuse (Falkowski and LaRoche 1991, Falkowski and Owens 1980). La plupart des plantes supérieures sont en effet génétiquement adaptées aux fortes ou aux basses lumières, alors que les conditions d'éclairement auxquelles sont soumis les organismes marins, sont beaucoup plus variables (Falkowski and Owens 1980).

I.4.2.2- Réponses moléculaires à la lumière

La réponse induite par l'environnement commence tout d'abord par la perception du signal ou du stress environnemental et conduit à l'altération du phénotype de l'organisme en jouant sur l'expression des gènes impliqués. Ainsi, l'expression des gènes photosynthétiques est régulée de façon à assurer des quantités appropriées de polypeptides, au moment et dans la partie de la cellule appropriés, de façon à permettre l'assemblage d'un appareil photosynthétique présentant en permanence une efficacité optimale. L'expression de ces gènes peut être régulée à différents niveaux au cours des étapes nécessaires à l'accumulation des protéines matures, incluant l'initiation de la transcription, la stabilité des ARNm, l'initiation de la traduction et la dégradation des protéines (Raines and Lloyd 1996). De plus, la biogenèse de l'appareil photosynthétique des eucaryotes requiert l'interaction coopérative de deux ensembles d'information génétique, localisés dans deux compartiments cellulaires distincts (Bruick and Mayfield 1999) : les génomes nucléaires et chloroplastiques. De par cette caractéristique, le mode de régulation des protéines photosynthétiques procaryotiques et eucaryotiques diffère de façon importante.

Régulation des protéines des centres réactionnels par la lumière

Chez les eucaryotes, les protéines constituant les CR des deux photosystèmes sont codées au niveau des chloroplastes (Grossman et al. 1995). Comme tous les gènes chloroplastiques, les gènes codant pour les CR semblent transcrits à des taux relativement constants en lumière continue et le niveau d'accumulation des transcrits est semblable quelle que soit l'intensité lumineuse (Bruick and Mayfield 1999, Green and Salter 1996, Herrmann et al. 1992, Mayfield et al. 1995). Cependant, une augmentation du flux de photons provoque une induction à très court terme de la traduction des ARNm. En effet, le facteur prépondérant affectant l'accumulation des protéines chloroplastiques semble être la synthèse protéique en elle-même. La traduction d'ARNm spécifiques peut être par exemple accrue d'un facteur 100 durant la biogenèse des chloroplastes induite par la lumière (Gillham et al. 1994). Bien que le processus de traduction comporte des similitudes entre les chloroplastes et les procaryotes (fort degré d'homologie des ARNs ribosomiaux, similitude du motif Shine-Delgarno), il existe aussi des différences importantes qui font que le mode de contrôle de la régulation de la traduction est certainement différent (Mayfield et al. 1995). En particulier, il a été démontré à plusieurs reprises que des produits codés par le génome nucléaire s'associent spécifiquement avec des ARNm chloroplastiques et interviennent dans la régulation de la traduction en interagissant avec la 5'-UTR de ces ARNm (Bruick and Mayfield 1999, Mayfield et al. 1995, Rochaix 1992).

Chez les procaryotes, la possibilité de transformer certaines souches de cyanobactéries (*Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC 7942) a permis une avancée considérable dans l'étude des mécanismes de régulation de l'expression des gènes photosynthétiques vis à vis de la

lumière. En effet, la construction de gènes rapporteur fusionnés avec le promoteur du gène à étudier permet de mesurer aisément l'expression de différents gènes photosynthétiques en fonction des conditions environnementales. Ainsi, plusieurs groupes ont rapporté que l'expression des gènes *psbA* était variable en fonction de l'intensité lumineuse chez les cyanobactéries (Bouyoud et al. 1993, Lönneborg et al. 1988, Mohamed et al. 1993). En particulier, l'équipe de S. Golden a observé que les copies du gène *psbA* étaient différenciellement affectées par la lumière chez *Synechococcus* PCC 7942. L'expression de *psbAI* est inversement reliée à l'intensité de la lumière alors que les niveaux d'accumulation des transcrits de *psbAII* et *psbAIII* augmentent en fonction de l'intensité lumineuse (Fig. 16 ; Bustos et al. 1990, Schaefer and Golden 1989a).

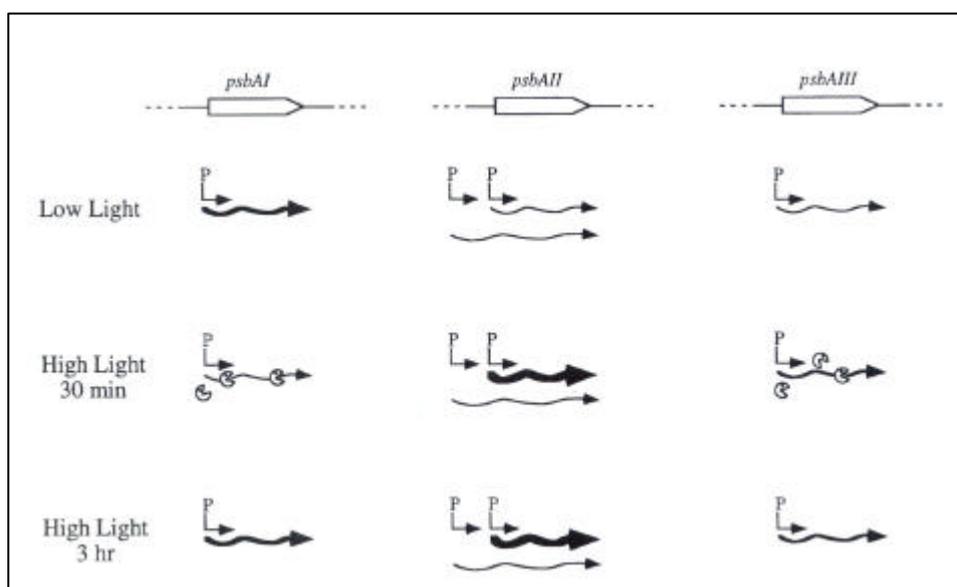


Fig. 16 : Changements transcriptionnels et post-transcriptionnels dans l'expression des différents gènes *psbA* après transfert d'une culture de *Synechococcus* sp. PCC 7942 de faible éclairement ("low light") à forte intensité lumineuse ("high light"). Les gènes *psbA* sont représentés par des flèches. L'épaisseur des flèches courbes indique l'abondance relative du transcrit et la lettre P représente l'emplacement du promoteur (Golden, 1994).

L'utilisation d'inhibiteurs de transcription et de traduction a permis de montrer un contrôle transcriptionnel de l'induction de *psbAII* et *psbAIII* à forte lumière, alors que la synthèse rapide d'un facteur permettrait d'accélérer la dégradation du transcrit *psbAI* lorsque les cellules sont placées en haute lumière (Kulkarni et al. 1992). De plus, le transcrit *psbAIII* subirait aussi un contrôle post-transcriptionnel de par la synthèse d'un facteur de dégradation de ce messenger (Kulkarni et al. 1992).

D'un point de vue fonctionnel, les trois copies du gène *psbA* codent pour deux formes différentes de la protéine D1 (Golden et al. 1986, Schaefer and Golden 1989b). Une forte augmentation de l'intensité lumineuse se fera donc en faveur de la forme II de la protéine D1 issue de la transcription des messagers *psbAII* et *psbAIII* (Bustos et al. 1990). La prédominance de cette forme de protéine semble donc primordiale pour la croissance des cyanobactéries à forte intensité lumineuse (Golden 1994).

L'un des membres de la famille *psbD* de *Synechococcus* PCC 7942 (codant D2) présente aussi des variations de l'expression en fonction de l'intensité lumineuse. Des expériences de fusion d'un gène rapporteur avec les promoteurs des gènes *psbDI*, *psbC* et *psbDII* ont montré que seul *psbDII* répondait à une augmentation de l'intensité lumineuse. Cette réaction se manifeste par une rapide augmentation de l'expression du gène *psbDII* ainsi que de la quantité de la protéine D2 (Bustos and Golden 1992). Les séquences d'acides aminés de D2 prédites à partir des gènes *psbDI* et *psbDII* étant identiques, l'induction de *psbDII* à forte intensité lumineuse ne modifie donc certainement pas la composition qualitative du PS II (Bustos and Golden 1992). Cependant, l'induction de ce gène chez les souches sauvages permet de maintenir la synthèse de protéine D2 à un niveau suffisant sous des conditions de forte luminosité (Bustos and Golden 1992).

De par les variations de leur expression en fonction de l'intensité lumineuse, la famille des gènes *psbA/psbD* offre donc la possibilité d'altérer de façon importante la composition qualitative du PS II chez les cyanobactéries. Les modifications de l'expression de ces gènes ont pour conséquence une augmentation de la quantité de messagers codant pour les polypeptides D1 et D2 à forte lumière (Bustos and Golden 1992). Ces réactions sont en accord avec le turnover accéléré de ces polypeptides dans les mêmes conditions chez les chloroplastes (Matto et al. 1984, Virgin et al. 1988). La régulation de la synthèse et du turnover de D1 semble faire partie d'un système de réparation qui permettrait le remplacement rapide des CR endommagés par un excès de lumière (Andersson and Barber 1996, Barber and Anderson 1992, Campbell et al. 1998, Ohad et al. 1984, Oquist et al. 1995). Ce phénomène de photoprotection semble particulièrement important chez les cyanobactéries, qui ne possèdent pas de mécanisme par l'intermédiaire des antennes permettant de dissiper l'énergie excessive sous forme de chaleur (Oquist et al. 1995).

Régulation des protéines d'antenne par la lumière

En général les gènes *Lhcs*, codés au niveau nucléaire chez les eucaryotes, sont fortement régulés par la lumière à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Green and Salter 1996, Grossman et al. 1995, Silverstone and Tobin 1987, Thompson and White 1991, Tobin and Silverstone 1985). Chez la plupart des espèces étudiées, le niveau des ARNm des différents gènes Lhc augmente avec l'intensité lumineuse. Cependant la réponse à la lumière du niveau de transcrit est spécifique des cellules, des tissus et du stade de développement des chloroplastes (White et al. 1992).

Il semble que cette augmentation du taux des ARNm de *Lhc* soit le résultat d'une augmentation du niveau de transcription plutôt que d'un changement dans la stabilité des transcrits (Marrs and Kaufman 1989, Mösinger et al. 1985, Sylversthorpe and Tobin 1984, Warpeha and Kaufman 1990, Warpeha et al. 1989). Par ailleurs, le niveau d'accumulation des protéines *Lhc* est seulement partiellement déterminé par le niveau d'ARNm (Mathis and Burkey 1987). Il semble que le second facteur primordial soit la stabilité des protéines (Burgess and Taylor 1987, Burgess and Taylor 1988, Mayfield and Taylor 1984, Oelmüller and Mohr 1986). Celle-ci est elle-même étroitement liée à la disponibilité en molécules de Chl et à l'intégration des protéines à la membrane thylacoïdale, qui influencent ainsi le niveau de transcription de plusieurs gènes photosynthétiques (Thompson and White 1991).

Expression des protéines photosynthétiques en lumière jour-nuit

La capacité à anticiper les événements à venir, et en particulier les changements répétitifs avec une périodicité de 24 h, est apparemment avantageuse pour survivre dans l'environnement naturel, puisque les mécanismes qui permettent à ces organismes de prédire ces changements sont conservés au cours de l'évolution (Piechulla 1999). En effet, plusieurs rapports récents ont montré que les cyanobactéries régulaient également certains processus cellulaires par des stimulateurs circadiens, alors que l'on pensait que ce mécanisme était présent uniquement chez les eucaryotes (Chen et al. 1991, Huang et al. 1990, Kondo and Ishiura 1999, Kondo et al. 1993, Mitsui et al. 1986). La photosynthèse nécessite un contrôle endogène journalier précis, de façon à optimiser en permanence l'efficacité de l'appareil photosynthétique (Piechulla 1999).

Ainsi, de nombreux gènes codant pour des protéines thylacoïdales sont sujets à des fluctuations régulières jour-nuit du point de vue de leur niveau de transcrits, bien que cela n'implique pas forcément une fluctuation des niveaux des protéines *in vivo* (Oelmüller et al. 1995, Piechulla et al. 1998). Ces gènes soumis à un contrôle circadien comprennent les gènes codant pour les protéines des antennes mineures et majeures (*Lhca* et *Lhcb*), des gènes codant pour des protéines de stress telles que les ELIP, et les gènes codant pour les protéines extrinsèques du PS I et du PS II (Adamska et al. 1991, Kay 1993, Kay and Millar 1993, Oelmüller et al. 1995, Piechulla 1993). Dans le cas des *Lhc*, ces oscillations circadiennes de l'accumulation des transcrits semblent contrôlées essentiellement au niveau de la transcription (Hwang and Herrin 1994, Millar and Kay 1991, Piechulla 1993, Taylor 1989), alors que la stabilité des ARNm ne jouerait qu'un rôle mineur (Hwang and Herrin 1994). En général, il semble que les niveaux des ARNm codant pour des protéines appartenant au même complexe multi-protéique oscillent en parallèle et présentent un maximum spécifique de complexe (Oelmüller et al. 1995). En particulier, les ARNm des protéines du PS I apparaissent avant ceux des polypeptides du PS II, eux même précédant les ARNm des trois polypeptides constituant les complexes-évoluant-oxygène (Oelmüller et al. 1995).

Enfin, à l'inverse de ce que l'on observe en lumière continue, il semble que la transcription de nombreux gènes chloroplastiques varie de façon importante durant les cycles jour-nuit (Mayfield et al. 1995). Cependant, certains gènes photosynthétiques tels que l'opéron *psbD-psbC* ou encore *psbA*, semblent être exprimés différemment par rapport aux autres gènes chloroplastiques. La protéine D1 est par exemple exclusivement synthétisée pendant la phase lumineuse (Riesselmann and Piechulla 1992) et cette synthèse s'accompagne d'une oscillation du niveau d'accumulation des molécules de Chl (Beator and Kloppstech 1993, Beator et al. 1992). Contrairement aux *Lhcs*, la maturation des ARNm des gènes chloroplastiques et leur stabilité semblent jouer un rôle important dans la régulation de leur expression, bien que ces mécanismes soient encore assez peu connus (Green and Salter 1996, Mayfield et al. 1995).

* * * * *

Prochlorococcus



II- PRESENTATION DU MODELE D'ETUDE, *PROCHLOROCOCCUS*

Au cours des 15 dernières années, le très fort développement des méthodes structurales, de biologie moléculaire et de génomique, ont montré que les différents complexes photosynthétiques sont fortement conservés parmi les organismes oxyphototrophes. Parmi les principales différences mises en évidence, les stratégies de capture de la lumière et de photoprotection tiennent une place particulièrement importante. Les mécanismes impliqués dans ces processus divergent nettement entre les cyanobactéries et les eucaryotes photosynthétiques, bien que les liens évolutifs entre ces différents processus tendent à se préciser avec la découverte d'organismes aux caractéristiques intermédiaires.

Dans ce contexte, l'appareil photosynthétique du procaryote marin *Prochlorococcus* paraît intéressant à plusieurs titres. En effet, les cyanobactéries à Chl *b* ont développé un troisième type d'antenne collectrice intrinsèque à la membrane thylacoïdale, comme chez les plantes supérieures, mais qui possède six hélices transmembranaires potentielles au lieu de trois pour les Lhc eucaryotiques. De plus, *Prochlorococcus* possède une composition pigmentaire unique qui inclut des dérivés divinylés des Chl *a*, *b* ou *c* (ou Chl *a*₂, Chl *b*₂ et Mg,3-8 divinyl-phéoporphyrine *a*₅), de l' α -carotène, de la zéaxanthine (Chisholm et al. 1988, Goericke and Repeta 1992) et de petites quantités d'un nouveau type de phycoérythrine (Hess et al. 1996). Ce dernier pigment est apparemment couplé au photosystème et pourrait intervenir dans la capture de l'énergie lumineuse. Ainsi, *Prochlorococcus* constitue un modèle de choix pour l'étude des bactéries photosynthétiques ancestrales qui ont donné lieu aux cyanobactéries et aux chloroplastes (Tomitani et al. 1999).

Par ailleurs, cet organisme est aussi étonnant d'un point de vue phylogénétique. Plusieurs études moléculaires récentes suggèrent qu'il a évolué à partir d'une cyanobactérie ancestrale en réduisant sa taille cellulaire et celle de son génome (Partensky et al. 1999). En effet, avec une taille de 0,5 à 0,7 μm et un génome de moins de 2 Mb, *Prochlorococcus* est l'organisme photosynthétique le plus petit, connu à l'heure actuelle (Partensky et al. 1999, Strehl et al. 1999). Il semble que les contraintes environnementales caractérisant ses habitats aient joué un rôle prédominant dans son évolution. En particulier, la présence d'écotypes génétiquement distincts à différentes profondeurs dans les zones où la colonne d'eau est stratifiée, semble indiquer que les populations naturelles de *Prochlorococcus* ont subi une spéciation verticale en fonction du gradient lumineux.

Pour finir, cet organisme est fortement représentatif d'un point de vue écologique. Il s'agit sans doute de l'organisme photosynthétique le plus abondant sur terre et il est responsable d'une fraction significative de la photosynthèse de l'océan mondial (Partensky et al. 1999). Dans le Pacifique subtropical, il peut représenter jusqu'à 50 % de la Chl totale (Campbell et al. 1994). Sa distribution est très ubiquiste dans la bande latitudinale 40°S-45°N des océans et en zone intertropicale oligotrophe et il est présent à forte densité, de la surface, jusqu'à des profondeurs d'environ 150 à 200 m. De ce fait, *Prochlorococcus* peut être trouvé dans des endroits variés du point de vue de la

disponibilité en éléments nutritifs, de l'intensité lumineuse, de la qualité de la lumière et de la température.

Les informations réunies dans cette section sont essentiellement issues de deux revues : l'une d'entre elle porte sur l'appareil photosynthétique des cyanobactéries à Chl *b* et *d* (cf. annexe 1 ; Partensky et Garczarek, 2000, in prep) et la deuxième concerne spécifiquement *Prochlorococcus* (Partensky et al. 1999).

II.1- MISE EN EVIDENCE DE PROCHLOROCOCCUS ET POSITION PHYLOGENETIQUE

II.1.1- Découverte de *Prochlorococcus*

Le premier indice de l'existence de *Prochlorococcus* a été une photographie en microscopie électronique à transmission d'un organisme que les auteurs ont alors identifié comme étant une cyanobactérie du genre *Synechococcus*, le deuxième procaryote photosynthétique le plus abondant dans les océans (Johnson and Sieburth 1979, Waterbury et al. 1979). Gieskes et Kraay (1983) ont alors mis en évidence la présence d'un dérivé de Chl *a* dans les eaux antarctiques subtropicales (Gieskes and Kraay 1983). L'introduction de la cytométrie en flux dans le domaine de l'océanographie a permis de distinguer *Prochlorococcus* de *Synechococcus* de par la faible fluorescence orange (due à la phycoérythrine) de *Prochlorococcus* en comparaison avec *Synechococcus* et la présence de Chl (fluorescence rouge) chez ces deux organismes (Chisholm et al. 1988 ; Fig. 17).

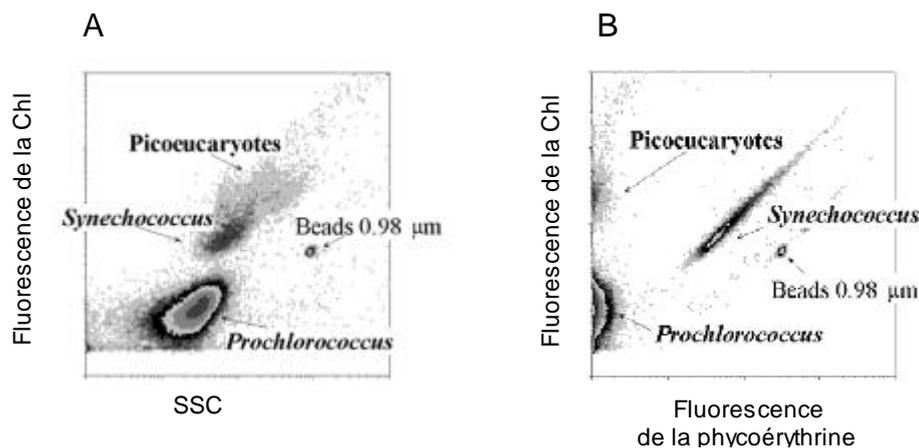


Fig. 17 : Analyse par cytométrie en flux d'un échantillon prélevé dans le Pacifique équatorial (45 m). *Synechococcus* est distingué sur la base de son contenu en phycoérythrine et en Chl et peut être discriminé sur les cytogrammes "A : fluorescence de la Chl en fonction de SSC (side scatter : diffusion de la lumière à 90° qui est fonction de la taille cellulaire)" ou "B : fluorescence de la phycoérythrine versus fluorescence de la Chl". Les cellules de *Prochlorococcus* sont identifiées sur les mêmes cytogrammes par leur faible fluorescence orange (due à la phycoérythrine) et leur plus faible SSC alors que les picoeucaryotes présentent une quantité de Chl et un SSC par cellule plus fort (Partensky, 1999).

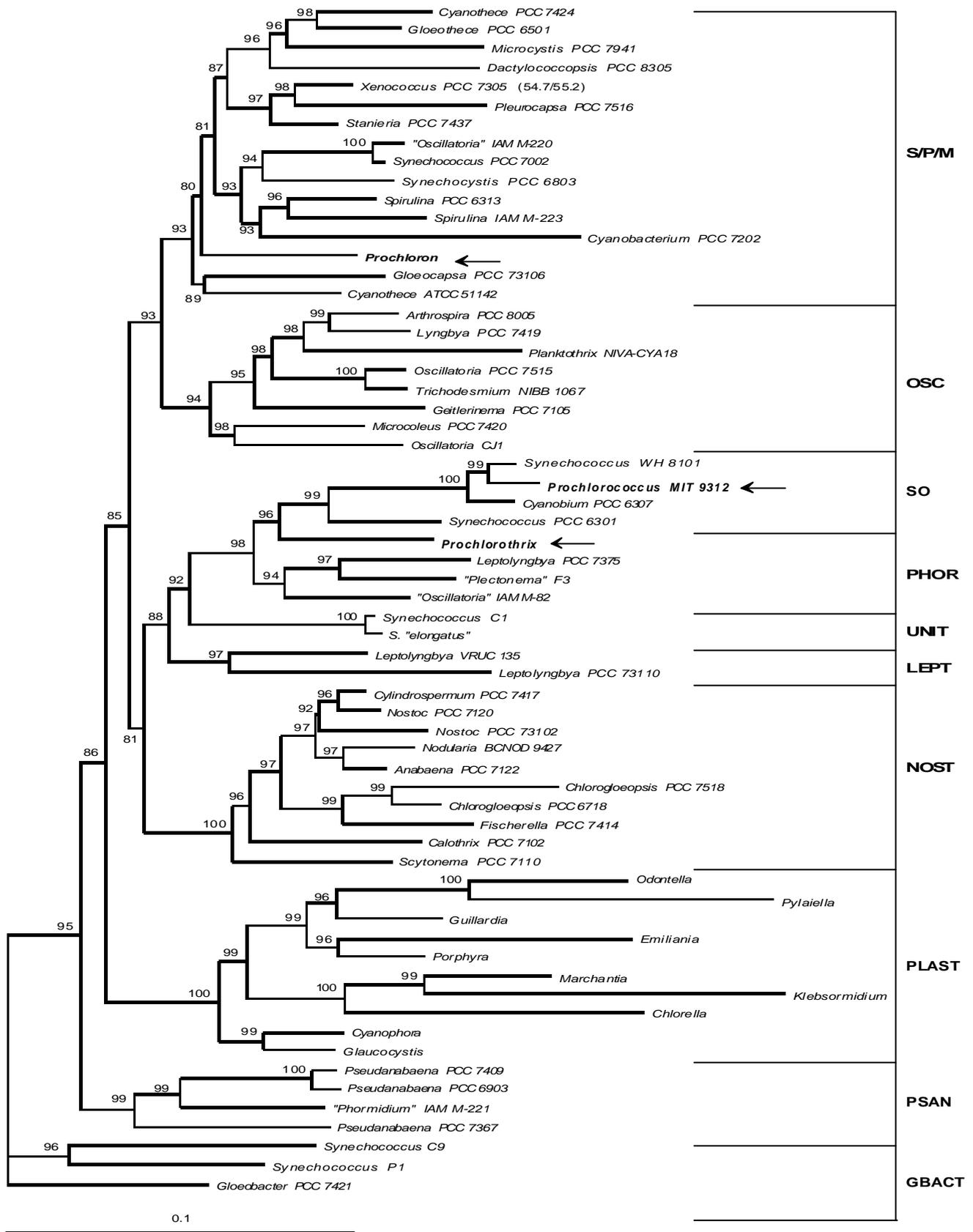


Fig. 18 : Arbre phylogénétique non raciné de 53 cyanobactéries et 10 séquences de plastes de la petite sous-unité de l'ARNr élaboré selon la méthode de maximum de likelihood (Turner et al., 1999).

Les deux premières souches de *Prochlorococcus* isolées sont la souche SARG (clone SS120) dans le bas de la couche euphotique de la Mer de Sargasses (120 m ; Palenik and Haselkorn 1992, Partensky et al. 1993), et la souche MED (clone MED4) dans les eaux de surface de la Méditerranée (Chisholm et al. 1992). Ces deux souches sont très différentes au niveau de leur composition pigmentaire et de leurs particularités écophysiologicals (Moore et al. 1995, Partensky et al. 1993), et elles ont été utilisées de ce fait comme modèles dans de nombreuses études réalisées par la suite.

II.1.2- Position phylogénétique par rapport aux cyanobactéries typiques

Du fait de sa pigmentation très originale, *Prochlorococcus* a tout d'abord été classifié parmi la division des "Prochlorophyta" (pro = ancêtre ; chlorophyte = chloroplastes à Chl *b*) (Chisholm et al. 1988, Lewin 1976), qui regroupe également deux autres procaryotes oxyphototrophes possédant de la Chl *b* mais pas de phycobiline : *Prochloron* sp., un symbionte obligatoire des ascidies marines (Lewin and Withers 1975) et *Prochlorothrix hollandica*, un procaryote filamenteux libre identifié dans un lac hollandais (Burger-Wiersma et al. 1986). Une nouvelle espèce du genre *Prochlorothrix* a été récemment découverte en Suède (Pinevich et al. 1999). Cependant, les trois "Prochlorophytes" connus à l'heure actuelle diffèrent de façon importante de par leur habitat et leur morphologie. En effet, chacune de ces cyanobactéries à Chl *b* est très proche, à la fois d'un point de vue écologique et morphologique, d'un groupe de cyanobactéries en particulier : *Prochloron didemni* de *Synechocystis didemni*, *Prochlorothrix hollandica* d'*Oscillatoria limnetica*, et *Prochlorococcus marinus* des *Synechococcus* spp marins. De plus, les études moléculaires utilisant des alignements de l'ARNr 16S (Fig. 18 ; Urbach et al. 1992), du *rpoCI* (Palenik and Haselkorn 1992) ou du *psbA* (Hess et al. 1995), ont clairement démontré que ces organismes se situent sur des branches très séparées au sein de la radiation des cyanobactéries.

Prochlorococcus est phylogénétiquement le plus proche des *Synechococcus* du groupe marin A (Waterbury and Rippka 1989), tels que *Synechococcus* WH 8103 représentatif des régions oligotrophes (Urbach et al. 1992). Les limites phylogénétiques plutôt floues existant entre *Prochlorococcus* et les *Synechococcus* marins suggèrent une diversification quasi simultanée de ces deux genres à partir d'un ancêtre commun (Urbach et al. 1998). Ainsi, étant donné l'absence d'unité phylogénétique entre ces organismes et la découverte récente d'un procaryote contenant de la Chl *d*, *Acaryochloris marina* (Miyashita et al. 1996), ces 4 organismes pourraient bientôt être re-classifiés comme Oxyphotobacteria, avec toutes les cyanobactéries typiques (Pinevich et al. 1997).

II.2- PARTICULARITES CELLULAIRES

II.2.1- Ultrastructure

En microscopie électronique à transmission, *Prochlorococcus* présente une architecture cyanobactérienne typique ressemblant à celle de *Synechococcus* (Fig. 19). Le cytoplasme contient des fibrilles d'ADN, des carboxysomes et des granules de glycogène, situés près ou entre les thylacoïdes (Lichtlé et al. 1995). Les thylacoïdes, au nombre de 2 à 4 en général, se situent parallèlement à la membrane cellulaire et sont fortement accolés entre eux, à l'inverse des cyanobactéries typiques qui possèdent un vaste espace inter-thylacoïdal (Shimada et al. 1995). Selon les souches de *Prochlorococcus*, les thylacoïdes peuvent être circulaires ou en forme de fer à cheval (Lichtlé et al. 1995, C. Ting, com. pers).

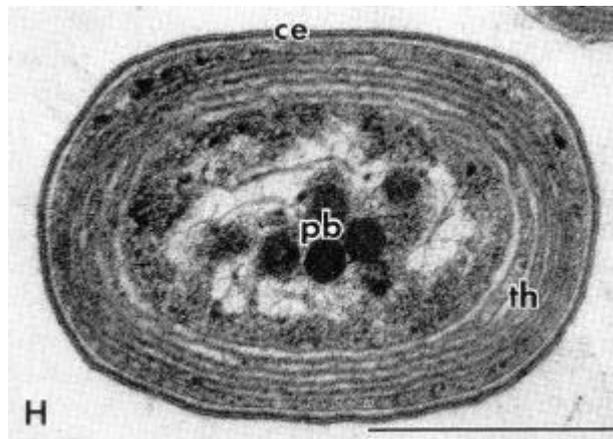


Fig. 19 : Photographie en microscopie électronique d'une coupe de *Prochlorococcus* provenant d'échantillons profonds de l'Atlantique Nord (Johnson et Sieburth, 1979). ce = enveloppe cellulaire ; pb = corps polyédrique ; th = thylacoïdes. Echelle = 0,5 µm.

II.2.2- Taille du génome et composition en bases

Le séquençage récent du génome complet de la souche MED4 de *Prochlorococcus* (disponible à l'adresse internet suivante : http://bbrp.llnl.gov/jgi/microbial/Prochlorococcus_homepage.html) devrait permettre une avancée considérable dans la connaissance de cet organisme. A l'heure actuelle, la taille de génome séquencé est d'environ 1,7 Mb, ce qui est légèrement inférieur aux estimations préalablement réalisées par cytométrie en flux (1,89 Mb ; Marie et al. 2000) ou par électrophorèse en champs pulsé (PFGE pour "pulse field gel electrophoresis" ; 1,90 Mb ; Strehl et al. 1999). Pour comparaison, les génomes cyanobactériens caractérisés jusqu'à maintenant possèdent une taille qui varie de 2,55 à 13,2 Mb (Herdman et al. 1979). La seule cyanobactérie entièrement séquencée (*Synechocystis* PCC 6803) possède un génome deux fois plus grand (3,6 Mb) que celui de *Prochlorococcus* (Kaneko et al. 1996). Ainsi, bien que davantage de données seraient nécessaires à

propos des cyanobactéries marines, il semblerait que *Prochlorococcus* posséderait le plus petit génome de tous les procaryotes photosynthétiques. Cet organisme présente en effet de nombreux exemples de compaction du génome (Strehl et al. 1999), comme par exemple une seule copie du gène *psbA* et de l'ARNr 16S, contre 3 copies du gène *psbA* et plusieurs de l'ARNr 16S chez la majorité des cyanobactéries (Hess et al. 1995). De même, la mise en évidence de gènes ou de zones promotrices se chevauchant semble confirmer l'hypothèse d'une compaction particulière du génome de ce micro-organisme (Lorenz et al. 1995, Strehl et al. 1999).

Une autre particularité génomique de *Prochlorococcus* est constituée par son faible contenu en bases G+C en comparaison des cyanobactéries marines de type *Synechococcus*, caractérisées par un fort contenu en G+C (47,4-69,5 % ; Waterbury et al. 1986). Le pourcentage en G+C (G+C %) correspondant à l'ensemble des séquences disponibles de *Prochlorococcus* marinus SS120 est de l'ordre de 36,8 % sur une longueur nucléotidique accumulée de 25 083 nucléotides (W. Hess, Pers. Com.). Par comparaison, le génome total de *Synechocystis* PCC 6803 possède un G+C % de 43 % en comptabilisant à la fois les séquences codantes et les régions intergéniques (Kaneko and Tabata 1997). En accord avec son faible contenu en G+C, la table d'usage de codon de *P. marinus* SS120 (cf. annexe 1 ; Partensky et al. 1999) est décalée vers les A+T en troisième position, suggérant un biais mutationnel (Jukes and Bushan 1986, Sharp and Matassi 1994, Sueoka 1992). Ce biais pourrait être lié à des taux de mutation plus élevés que chez les autres procaryotes, dus à une plus grande sensibilité des séquences aux dommages occasionnés par les rayonnements UV (Wei et al. 1998). De plus, les souches adaptées à de fortes intensités lumineuses, phylogénétiquement les plus récentes (cf. section II.5-Diversité génétique de *Prochlorococcus*), semblent posséder un G+C % plus faible que les autres (Partensky et al. 1999). Il existerait donc une corrélation entre le G+C % des souches de *Prochlorococcus* et leur position phylogénétique les unes par rapport aux autres.

II.3- CARACTERISTIQUES PHOTOSYNTHETIQUES

II.3.1- Composition pigmentaire

L'ensemble des pigments répertoriés dans les trois cyanobactéries à Chl *b* sont présentés dans le tableau 5.

II.3.1.1- Chlorophylle

La présence de dérivés divinylés de Chl *a* et *b* (Chl a_2 et b_2) est une caractéristique commune à l'ensemble des souches de *Prochlorococcus* examinées à ce jour (Goericke and Repeta 1992, Moore et al. 1995, Partensky et al. 1993, Urbach and Chisholm 1998). Auparavant, cette forme de Chl (8-desethyl, 8-vinyl Chl *a*) n'avait été observée que chez un mutant du maï s (Bazzaz and Brereton 1982). La différence de structure chimique entre la Chl et la divinyl Chl consiste en un remplacement d'un

Tableau 5 : Comparaison de la pigmentation des oxychlorobactéries, d'*Acaryochloris*, des *Synechococcus marins*, des cyanobactéries d'eau douce contenant des phycobilisomes (cyanobactéries à PBC) et de *Dunaliella tertiolecta* (représentatif des eucaryotes contenant de la Chl *b*). +++ , pigment majeur ; ++, abondant; +, présent en faible quantité (1-10% de la Chl ou des caroténoï des totaux); (+) traces (<1% de la Chl ou des caroténoï des totaux); absent ou non détecté; *à forte lumière uniquement. La présence d'allomères et de chlorophylle démétallisée (phaeophytins) n'est pas mentionnée (Partensky et Garczarek, in prep, annexe 1).

<i>Pigments</i>	<i>Prochloron</i>	<i>Prochlorothrix</i>	<i>Prochlorococcus</i>		<i>Acaryochloris</i>	<i>Synechococcus marins</i>	Cyanobactéries a PBC	<i>Dunaliella tertiolecta</i>
			LL écotype	HL écotype				
Chlorophylles								
<i>a</i> ₁	+++	+++	-	-	++	+++	+++	+++
<i>a</i> ₂	-	-	+++	+++	-	-	-	-
<i>b</i> ₁	++	++	++*	-	-	-	-	++
<i>b</i> ₂	-	-	+++	++	-	-	-	-
<i>c</i> (Pchl <i>a</i> ₂)	+	-	+	(+)	+	-	-	-
<i>d</i>	-	-	-	-	+++	-	-	-
Caroténoï des								
β-ε-carotène	-	-	++	++	++	-	-	(+)
β-β-carotène	+++	+++	(+)	-	-	++	++	+
β-ψ-carotène	-	-	-	-	-	-	-	+
β-β-carotène monoépoxyde	(+) ou -	-	-	-	-	-	(+)	-
Anthéranthine	-	-	-	-	-	-	-	+
Canthaxanthine	-	-	-	-	-	-	(+)	-
Cryptoxanthine	+	-	(+)?	-	-	-	(+)	-
Echinénone	+ ou (+)	-	-	-	-	-	(+)	-
Isocryptoxanthine	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-
Lutéine	-	-	-	-	-	-	-	+++
Myxoxanthophylle	-	-	-	-	-	-	+	-
Mutatochrome	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-
Néoxanthine	-	-	-	-	-	-	-	++
Parasiloxanthine	-	-	+ § ou -	-	-	-	-	-
Trihydroxy-carotène	(+) ou -	-	-	-	-	-	-	-
Violaxanthine	-	-	-	-	-	-	-	++
Zéaxanthine	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	-
Inconnu	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-
	xantho-phyll-1							
Phycobilines								
Allophycocyanine	-	-	-	-	+	++	++	-
Phycoérythrine	-	-	(+) ou -	-	- ?	+++	+++	-
Phycoérythrocyanine	-	-	-	-	-	-	++	-
Phycocyanine	-	-	-	-	+	++	++	-

groupement éthyl par un groupement vinyl en position C-8 du macrocycle chlorine (cf. Fig. 20). Dans les solvants organiques et *in vivo*, cette modification provoque un décalage vers le rouge d'environ 10 nm du pic bleu d'absorption des dérivés divinylés de Chl par rapport à celui de la monovinyl Chl (Bazzaz 1981, Morel et al. 1993).

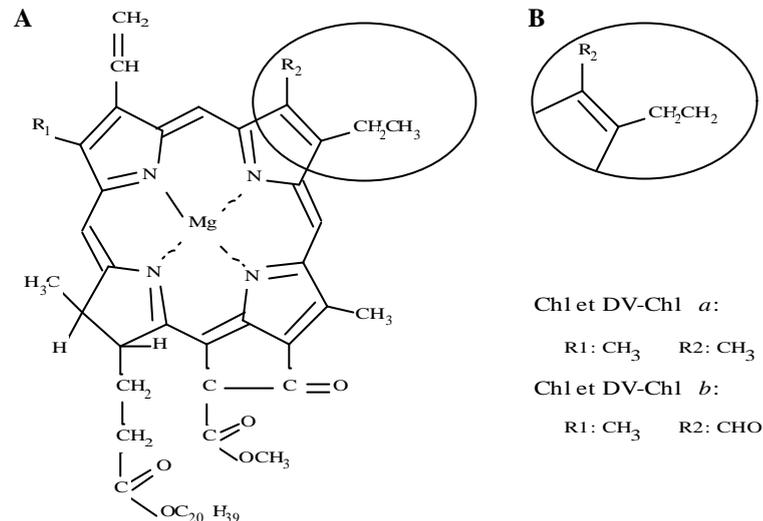


Fig. 20 : Comparaison des structures de la chlorophylle (A ; Chl *a*₁ et Chl *b*₁) et de la divinyle (DV)-chlorophylle *a* et *b* (B ; Chl *a*₂ et Chl *b*₂; d'après Goericke et Repeta, 1992).

Une particularité remarquable de *Prochlorococcus* est la différence très importante de rapport pigmentaire entre les différents isolats. Plusieurs souches dont la SS120 ont un rapport Chl *b*₂/*a*₂ supérieur ou égale à 1 alors que d'autres souches possèdent un rapport bien inférieur, le plus faible étant trouvé chez la souche MED4 (0,13 ; Moore and Chisholm 1999, Moore et al. 1995, Moore et al. 1998, Partensky et al. 1993). Certaines souches de *Prochlorococcus* (SS120, NATL1, NATL2) synthétisent également de la monovinyl Chl (Chl *b*₁) et il a été montré que le rapport Chl *b*₂/Chl *b*₁ diminuait avec l'intensité lumineuse (Moore et al. 1995, Partensky et al. 1993). Ceci suggère que la transformation de la Chl *b*₁ en Chl *b*₂ chez ces organismes se produit en une seule étape et que la vinyle réductase responsable de cette réaction est étroitement contrôlée par la lumière. De plus, des quantités mineures de protochlorophyllide *a*₂, un dérivé de la Chl *c*, connu dans la nomenclature de Fischer sous le nom de Mg,3-8 divinyl-phéoporphyrine *a*₅, ont aussi été trouvées chez *Prochlorococcus* (Goericke and Repeta 1992). Ce pigment est également présent chez la bactérie pourpre *Rhodobacter sphaeroides* et chez les Prasinophyceae telles que *Micromonas pusilla* (Goericke and Repeta 1992, Helfrich et al. 1999).

II.3.1.2- Caroténoï des

Tout comme les autres cyanobactéries, *Prochlorococcus* possède de la zéaxanthine comme xanthophylle majeure dans des quantités comparables aux cyanobactéries (Moore et al. 1995). Le deuxième caroténoï de majeur présent est l' α -carotène, alors que *Prochloron*, *Prochlorothrix* et les cyanobactéries typiques possèdent du β -carotène. Auparavant, la présence d' α -carotène n'avait été mise en évidence que chez les eucaryotes (Goodwin and Britton 1988). Des traces d'autres caroténoï des (cf. Tableau 5) ont détectées chez *Prochlorococcus* mais leur rôle demeure non élucidé.

II.3.1.3- Phycoérythrine

La présence de phycoérythrine a aussi été mise en évidence chez certaines souches de *Prochlorococcus* (Hess et al. 1996). Ce pigment est difficilement visible sur les spectres d'absorption car la principale phycobiline associée à cette phycoérythrine est la phycourobiline, dont le maximum d'absorption (495 nm) est très proche de la Chl b_2 (480 nm). La présence du gène de la phycoérythrine et des régions adjacentes semble indiquer qu'il existe une structure fonctionnelle capturant la lumière (cf. section II.3.3- Caractérisation de l'appareil photosynthétique ; Hess et al. 1996, Hess et al. 1999).

II.3.2- Photoacclimatation et photoadaptation

Prochlorococcus est réparti sur une couche très profonde de l'océan (150 à plus de 200 m), lorsque les conditions hydrologiques sont suffisamment stables pour que la colonne d'eau se stratifie (Campbell and Vaultot 1993, Partensky et al. 1999). Cette stratification est quasi permanente dans l'Atlantique ou le Pacifique tropical et saisonnière dans la Mer des Sargasses et en Mer Méditerranée. Le long de ce gradient naturel de lumière, qui s'étend d'environ $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ près de la surface jusqu'à moins de $1 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en dessous de 150 m, les cellules subissent de nombreux changements. Les plus évidents sont un accroissement concomitant de la taille cellulaire et du contenu en pigments, ainsi qu'une variation des rapports des pigments accessoires à la Chl a_2 . Ces variations ont généralement lieu en dessous de la couche de mélange.

Goericke et Repeta ont été parmi les premiers à mesurer par HPLC en phase reverse simultanément le contenu en Chl a_2 et b_2 des populations naturelles de *Prochlorococcus*, fournissant ainsi une information directe sur la réponse de ces cellules aux changements de lumière avec la profondeur (Goericke and Repeta 1993). Les rapports Chl b_2 sur a_2 mesurés varient de 0,15 en surface à 2,9 sous le maximum profond de chlorophylle. Cependant, ces variations concernent l'ensemble des cellules de *Prochlorococcus*, considérées comme formant une population homogène. Les valeurs excèdent considérablement celles obtenues pour des souches individuelles de *Prochlorococcus* (Goericke and Welschmeyer 1993, Moore et al. 1995, Partensky et al. 1993).

Les histogrammes de distribution de la fluorescence rouge de populations naturelles de *Prochlorococcus* ont révélé que plusieurs populations peuvent coexister sur le gradient vertical de lumière (Fig. 21). En effet, des distributions bimodales de la fluorescence rouge ont été souvent reportées vers le maximum profond de chlorophylle dans les zones oligotrophes (Binder et al. 1996, Blanchot and Rodier 1996, Campbell and Vaultot 1993, McManus and Dawson 1994, Olson et al. 1991, Partensky et al. 1996). Dans ce type de distribution, l'intensité de la population la moins fluorescente est 2 à 3 fois plus faible.

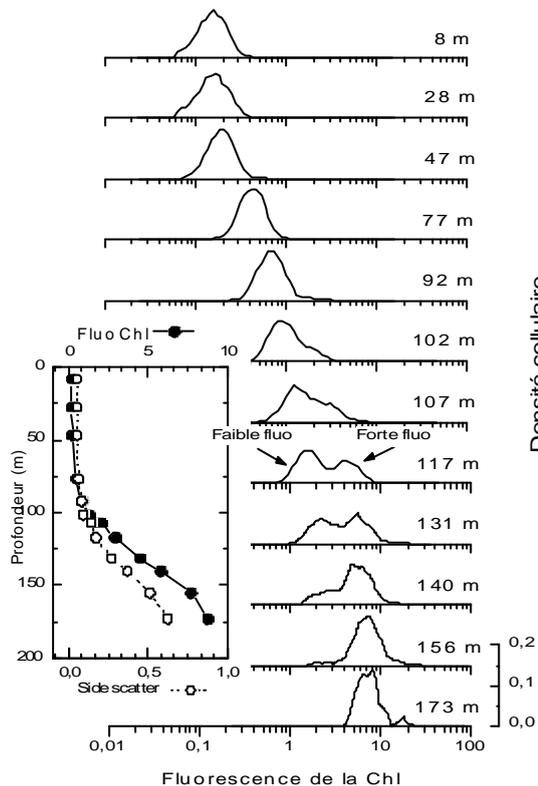


Fig. 21 : Distribution verticale des populations de *Prochlorococcus* à forte et faible fluorescence rouge dans le Pacifique subtropical près d'Hawaï . L'insert représente les profils verticaux de diffusion à angle droit (indicatif de la taille cellulaire) et de fluorescence rouge de la population totale de *Prochlorococcus* mesurée par cytométrie en flux (d'après Campbell et Vaultot, 1993).

L'accroissement de la fluorescence de deux populations avec la profondeur suggère que chacune d'entre elle est capable de photoacclimatation, dans le sens physiologique du terme (Fig. 21, insert). De plus, il a récemment été démontré que les populations à faible et forte fluorescences rouge correspondaient à des populations génétiquement distinctes et ayant des optima lumineux de croissance différents. Pour cela, Moore et al. (1998) ont trié les deux types de populations par cytométrie en flux à partir d'échantillons naturels et ont cultivé séparément les isolats obtenus (Moore et al. 1998). Après deux ans de culture, ces co-isolats ont conservé leurs caractères physiologiques d'origine. Les souches correspondant aux populations à forte fluorescence rouge ont un plus haut rapport Chl b_2/a_2 et sont adaptées à croître et photosynthétiser à plus faible lumière que les souches venant de populations faiblement fluorescentes. De plus, les séquences d'ARNr 16S des co-isolats à faible et forte fluorescences présentent moins de 98 % d'identité.

Cette découverte a par la suite été complétée par l'analyse d'un grand nombre d'isolats de *Prochlorococcus* d'origines diverses, amenant la notion "d'écotypes de haute et basse lumière" (cf. section II.5-Diversité génétique ; Moore and Chisholm 1999, Moore et al. 1998). Les souches de basse lumière (de type SS120) ont des rapports Chl b_2 sur a_2 qui sont de 2 à 10 fois plus forts que les souches de forte lumière (de type MED4) à toute intensité lumineuse (Moore and Chisholm 1999, Moore et al. 1998). D'autres études ont également montré qu'aucun isolat de *Prochlorococcus* n'est capable de supporter des variations de plus de 2,5 ordres de magnitude de lumière en culture au laboratoire (Moore et al. 1995). La capacité apparente des populations naturelles de *Prochlorococcus* à supporter une très large gamme de conditions de lumière semble donc résulter à la fois d'une diversité physiologique et génétique au sein du genre *Prochlorococcus*.

II.3.3- Caractérisation de l'appareil photosynthétique

L'appareil photosynthétique de *Prochlorococcus* a été pour le moment peu étudié. La présence commune de Chl a/b dans les chloroplastes et chez les cyanobactéries à Chl b a tout d'abord attiré l'attention sur l'antenne collectrice fixant ces pigments. Les protéines de ce complexe antennaire possèdent des masses moléculaires apparentes sur gel dénaturant de 32,5 et 34 à 38 kDa chez MED4 et SS120 (cf. Fig. 22).

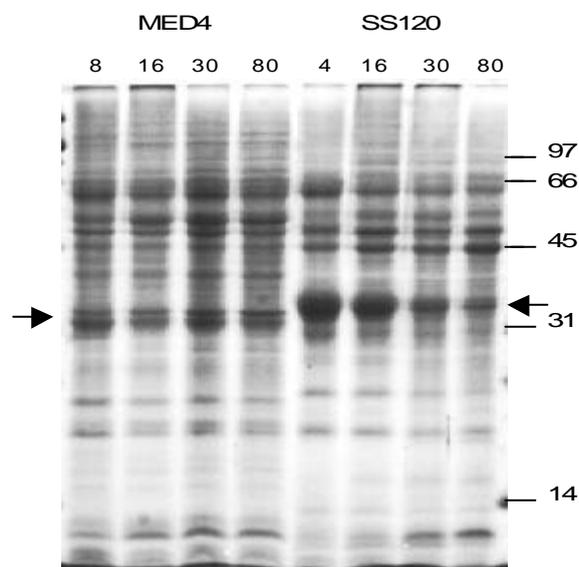


Fig. 22 : Gel SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie des protéines thylacoïdales des souches de *Prochlorococcus* MED4 et SS120 cultivées sous différentes conditions de lumière (4-80 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; d'après Partensky et al., 1997). Les flèches indiquent la position des protéines d'antenne pour chacune des deux souches.

Chez les deux souches, la quantité d'apoprotéines diminue à forte intensité lumineuse, mais de façon beaucoup plus marquée pour la souche SS120. Ces polypeptides sont également plus abondants dans la souche SS120 où ils fixent 7 fois plus de Chl b_2 que chez la MED4 (Partensky et al. 1997). Une seule copie du gène *pcb*, codant pour ces protéines, a été mise en évidence dans ces deux souches. Parmi les deux autres genres de cyanobactéries à Chl b , seul *Prochlorothrix* semble posséder trois copies de ce gène, alors que *Prochloron* n'en a qu'une copie unique (LaRoche et al. 1996, van der Staay et al. 1998). Ces protéines sont phylogénétiquement proches de CP43 et CP47, présents chez tous les organismes photosynthétiques et de IsiA, une protéine induite chez les cyanobactéries carencées en Fer (LaRoche et al. 1996).

En plus de cette antenne à Chl a_2/b_2 , certaines souches de *Prochlorococcus* possèdent, tout comme les cyanobactéries marines, de la phycoérythrine (Hess et al. 1996). Les gènes codant pour les sous-unités α et β de cette phycobiliprotéine (*cpeA* et *cpeB*-like) ont été séquencés chez la souche SS120 (Hess et al. 1996), ainsi que chez deux autres souches à fort rapport Chl b_2/a_2 : MIT 9303 (Ting et al. 1998) et PAC1 (Hess W. R. et Campbell L., pers. com.). À l'inverse, toutes les tentatives de détecter les gènes de la phycoérythrine chez la souche MED4 et d'autres à bas rapport Chl b_2 sur a_2 se sont avérées infructueuses (Hess et al. 1996). L'examen du génome de MED4, disponible depuis peu, montre qu'il existe une forme très dégénérée et probablement non fonctionnelle du gène de la phycoérythrine puisque le reste de l'opéron, ainsi que le cluster de gènes spécialisés qui l'entoure sont absents ou fortement dégénérés. Cela suggère que les souches appartenant au "clade de haute lumière" pourraient avoir éliminé en grande partie les gènes devenus inutiles dans la niche écologique qu'elles occupent dans l'océan. Ce processus irait dans le sens de la réduction de taille du génome de *Prochlorococcus* (Strehl et al. 1999).

Récemment, l'ensemble de la région génomique entourant l'opéron *cpeA-cpeB* a été séquencée chez les souches SS120 de *Prochlorococcus* (Hess et al. 1999). L'organisation de l'opéron phycoérythrine et de la zone qui l'entoure ressemble à celui de la cyanobactérie marine *Synechococcus* WH8020, et les analyses phylogénétiques placent la phycoérythrine de type III de *Prochlorococcus* légèrement plus près de la phycoérythrine de type II que du type I (Hess and Partensky 1998). Cette zone comprend deux gènes codant pour des lyases impliquées dans l'attachement des phycobilines (*cpeY* et *cpeZ*), un gène probablement impliqué dans la biosynthèse de la phycobiline (*mpeX*) et un gène codant pour un polypeptide de liaison de la PE (*ppeC*). Ainsi, *Prochlorococcus* SS120 possède le set de gènes minimum, nécessaires pour former une structure de capture des photons fonctionnelle. En effet, en utilisant le glycérol pour découpler la PE III du centre réactionnel du PS II, Lokstein et al. (1998) ont montré que la PE III de SS120 semble avoir une fonction réelle de capture de la lumière. De plus, une étude immuno-cytochimique montre qu'elle se situe au niveau des thylacoïdes et probablement dans leur lumen (Hess et al. 1999). La phycoérythrine pourrait donc être directement liée au CR II de la même manière que chez les cryptophytes (Gantt 1996). Par contre, la recherche de gènes codant pour d'autres types de phycobiliprotéines (phycocyanine, allophycocyanine) s'est avérée

infructueuse jusqu'à ce jour (W. Hess, com. pers.).

La plupart des autres gènes photosynthétiques séquencés chez une ou plusieurs souches de *Prochlorococcus* ont peu de particularités par rapport aux cyanobactéries, algues ou plantes supérieures connues. Le gène *psbA* est cependant présent en une seule copie chez *Prochlorococcus* SS120 (Hess et al. 1995) et MED4 (Scanlan et al. 1996), alors que chez *Synechococcus* PCC 7942 il existe deux isoformes de la protéine D1 (D1:1 et D1:2) différenciellement régulées par la lumière (cf. section I.4.2.2-réponses moléculaires à la lumière ; Golden 1995, Kulkarni and Golden 1995, Oquist et al. 1995). L'unique protéine D1 de *Prochlorococcus* SS120 est phylogénétiquement plus proche de D1:1 de *Synechococcus* PCC 7942 que de D1:2 (Hess et al. 1995). Chez les cultures de SS120 et MED4 acclimatées à différents éclairagements, les niveaux des transcrits *psbA* sont proportionnels à l'intensité lumineuse (Garcia-Fernandez et al. 1998). Ainsi, la protéine D1 des deux souches semble avoir un mode de régulation plus proche de celui de D1:2 que de D1:1. Comme le turnover de D1 joue un rôle important dans les phénomènes de réparation de l'appareil photosynthétique après photoinhibition, cette particularité de *Prochlorococcus* pourrait jouer un rôle dans la sensibilité de ces organismes aux brusques changements de lumière.

II.4- DISTRIBUTION OCEANIQUE DE PROCHLOROCOCCUS.

Depuis les années 90, de nombreuses observations ont été réalisées par cytométrie en flux sur les populations naturelles de *Prochlorococcus* (Partensky et al. 1999). La constitution d'une base de données regroupant nombre de ces observations a permis de déterminer les grandes lignes de la distribution de cet organisme dans l'océan mondial (Li and Wood 1988, Marie et al. in press, Neveux et al. 1989, Partensky et al. 1996, Vaultot and Marie 1999). Il apparaît d'après une modélisation fondée sur plus de 8 400 mesures réalisées par cytométrie en flux, que *Prochlorococcus* présente une très vaste répartition à travers l'océan mondial (Fig. 23 ; Partensky et al. 1999).

Ce procaryote est très ubiquiste sur une bande latitudinale qui s'étend de 40°S à 45°N où les concentrations mesurées peuvent atteindre 700 000 cellules.ml⁻¹. La densité de cellules décroît rapidement au-delà de ces limites mais la présence de *Prochlorococcus* a été rapportée jusqu'au large de l'Islande à 60 °N (Buck et al. 1996). Cette distribution océanique suggère que les faibles températures sont défavorables au développement de cet organisme (Moore et al. 1995), alors que les concentrations maximales sont trouvées dans des eaux ayant une température de surface comprise entre 26 et 29 °C. A l'inverse, *Synechococcus* semble moins sensible à la température, puisqu'il a déjà été mis en évidence dans des eaux à 2 °C (Shapiro and Haugen 1988).

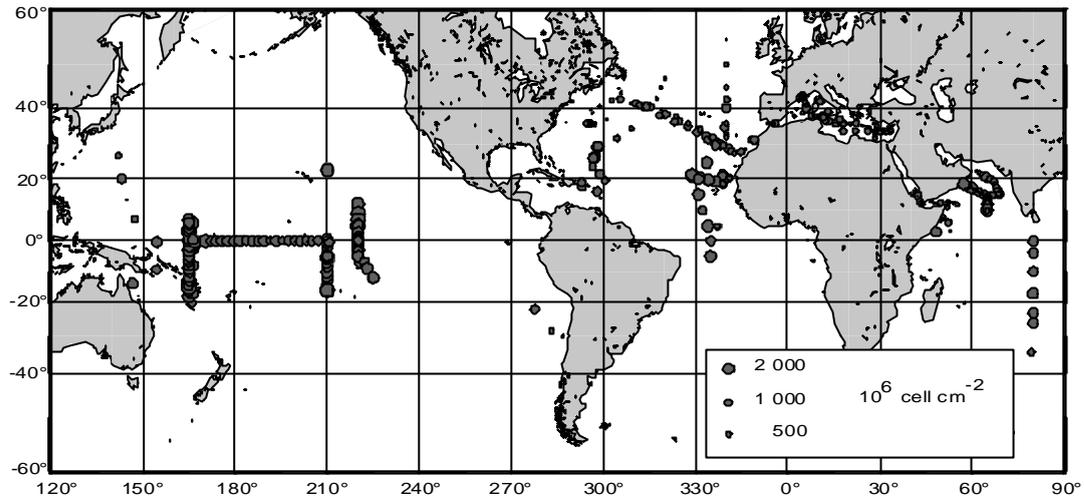


Fig. 23 : Distribution mondiale de *Prochlorococcus* sur la base de 8400 mesures effectuées en milieu naturel par cytométrie en flux. Les cercles représentent les concentrations intégrées sur la colonne d'eau (Partensky et al., 1999).

La mesure des concentrations de *Prochlorococcus* et *Synechococcus* dans différents milieux montrent que ces deux organismes sont caractérisés par des distributions verticales bien distinctes (Fig. 24). En moyenne, les concentrations de *Synechococcus* sont inférieures d'environ un ordre de magnitude et la distribution de *Prochlorococcus* s'étend beaucoup plus en profondeur, *Synechococcus* étant en général très peu abondant en dessous de 100 m. Trois types majeurs de répartition verticale peuvent être observés (Partensky et al. 1999). Le premier type est principalement rencontré dans les eaux côtières, où *Prochlorococcus* et *Synechococcus* présentent une distribution verticale similaire (Fig. 24A). Les deux genres sont alors concentrés dans la couche de surface et leur abondance chute brusquement sous la thermocline où un maximum peut parfois être observé (Fig. 24B). Dans le deuxième type de distribution, *Prochlorococcus* présente un maximum de 10^5 cellules.ml⁻¹ à la base de la zone euphotique et sa concentration est environ un ordre de grandeur plus faible en surface (Fig. 24C-D). Cette configuration se retrouve souvent en fin d'efflorescence, lorsque les sels nutritifs deviennent limitants (Olson et al. 1990). Le profil vertical le plus souvent rencontré dans les eaux océaniques du large est celui où *Prochlorococcus* s'étend de la surface au bas de la zone euphotique à des concentrations quasi constantes, avant de chuter exponentiellement en dessous du maximum profond de chlorophylle (Fig. 24E-F). L'abondance de *Synechococcus* est alors plus faible d'environ deux ordres de grandeur. Enfin, lorsque la colonne d'eau est mélangée de manière saisonnière jusqu'à des profondeurs dépassant celle de la zone euphotique, comme il est couramment observé en hiver dans les eaux tempérées, *Prochlorococcus* disparaît presque complètement (Lindell and Post 1995).

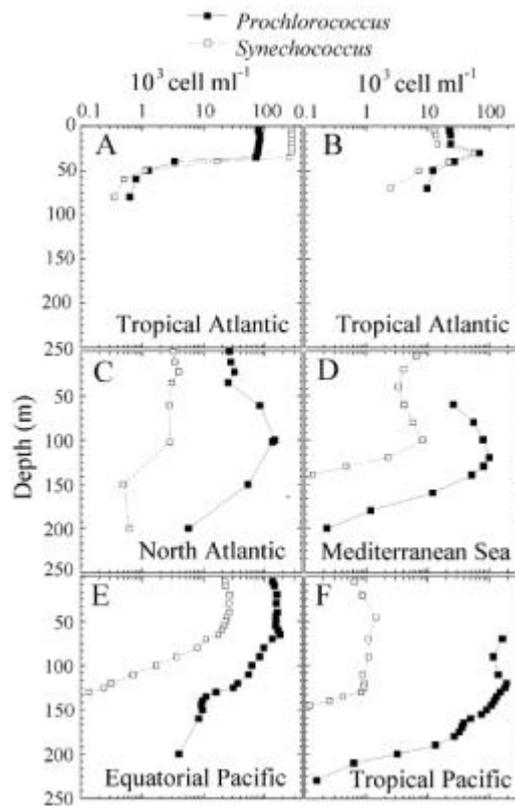


Fig. 24 : Distributions verticales typiques de *Prochlorococcus* et *Synechococcus*. A-B : Atlantique tropical Nord, EUMELI3. A: site eutrophe au large de la Mauritanie (20°N, 18°W). B: site mésotrophe (18°N, 21°W). C: Atlantique N, 30°N, 23°W. D: Méditerranée E, 34°N 18°E, MINOS. E: Pacifique Equatorial, 150°W, 5°S (Partensky et al., 1999).

II.5- DIVERSITE GENETIQUE DE PROCHLOROCOCCUS

II.5.1- Diversité des souches de *Prochlorococcus* en culture

De nombreuses souches ont été isolées aussi bien en surface qu'en profondeur dans la plupart des régions où les populations de *Prochlorococcus* ont été échantillonnées (Fig. 25). La diversité génétique de ces isolats a été étudiée par comparaison de profils de polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP pour "random fragment length polymorphism" ; Scanlan et al. 1996) ou de séquences du gène de l'ARNr 16S (Urbach and Chisholm 1998). Ces études moléculaires suggèrent qu'il n'existe pas de corrélation entre la distance génétique et la distance géographique entre les sites d'où ces souches ont été isolées. Par exemple, la distance génétique entre des souches isolées de la couche mélangée de sites aussi distants que la Mer Méditerranée et la Mer des Sargasses, apparaît beaucoup plus faible qu'entre les isolats de surface et ceux provenant des couches profondes

(>100 m) d'un même site (Partensky et al. 1999). Ainsi, les gradients naturels de lumière et de sels nutritifs semblent constituer des conditions plus stringentes que la distance géographique pour induire une spéciation à l'intérieur du genre *Prochlorococcus*.

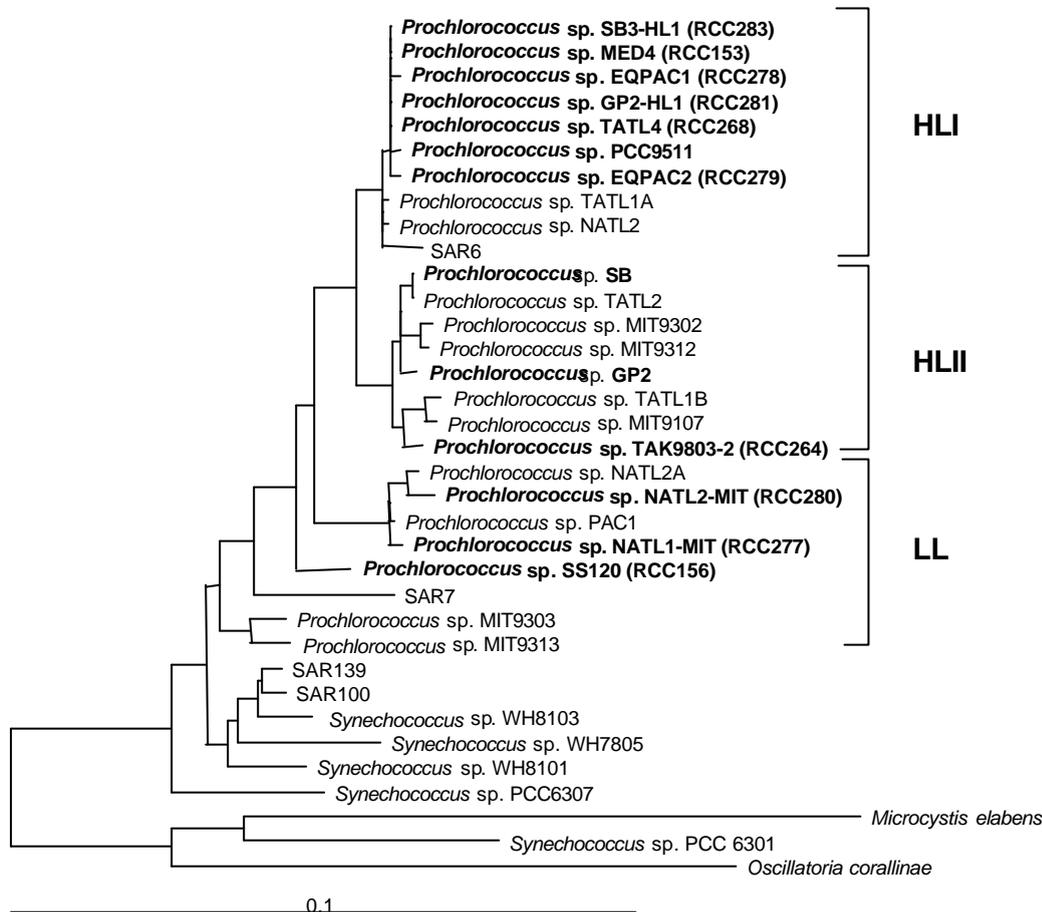


Fig. 25 : Arbre phylogénétique basé sur la séquence du gène de l'ARNr 16S, montrant les relations entre les isolats de *Prochlorococcus* (HLI et HLII = clades de souches adaptées à forte lumière ; LL = clade de souches adaptées à faible lumière) et les cyanobactéries (West et al., non publié ; d'après Urbach et al., 1998). En gras, les souches maintenues à Roscoff, avec leur numéro RCC dans la collection (cf. section matériel et méthodes).

Par ailleurs, il existe une étroite relation entre la distance génétique et le rapport Chl b_2 sur a_2 mesuré. En fonction de ces paramètres, Urbach et al. (1998) ont défini un clade adapté aux fortes lumières (HL pour "high light-adapted clade") ayant des rapports Chl b_2 sur a_2 compris entre 0,1 à 0,6 et un second clade adapté aux faibles lumières pour lequel ce rapport varie de 0,4 à 2,5 (LL pour "low light-adapted clade" ; voir Fig.25). Bien que l'on distingue deux sous-clades au sein des isolats à faible rapport Chl b_2 sur a_2 (HLI et HLII), les variations génétiques à l'intérieur de ce clade sont relativement faibles. A l'inverse, une variation génétique beaucoup plus forte semble exister parmi les souches à fort rapport Chl b_2 sur a_2 (Urbach et al. 1998), ce qui est cohérent avec le fait que les populations de

surface subissent des taux de mélanges physiques bien plus intenses. De plus, leur position dans l'arbre phylogénétique suggère que les membres du clade de haute lumière sont probablement les plus récents d'un point de vue évolutif, au sein du genre *Prochlorococcus*.

II.5.2- Diversité des populations naturelles de *Prochlorococcus*

Les études moléculaires sur la diversité génétique de *Prochlorococcus* dans la nature ont confirmé la plupart des conclusions tirées à partir des cultures (Palenik 1994, Urbach and Chisholm 1998). Les analyses phylogénétiques réalisées à partir des séquences de l'ARNr 16S, correspondant au marqueur génétique le plus couramment utilisé pour les échantillons naturels, ont montré qu'il existe une forte variabilité génétique des populations individuelles de *Prochlorococcus* (Fuhrman et al. 1993, Giovannoni et al. 1990, Schmidt et al. 1991). Le gène *rpoC1*, codant pour la sous-unité γ de l'ARN polymérase, a également été utilisé comme marqueur génétique pour des études concernant les populations naturelles photosynthétiques de la Mer des Sargasses et le courant Californien (Ferris and Palenik 1998, Palenik 1994). Au cours de ces études, aucune séquence génique du gène *rpoC1* ne s'est avérée absolument identique à celles des isolats cultivés. Les clones environnementaux se séparaient en deux clades A et B, génétiquement distincts, qui semblent correspondre aux clades de haute et de basse lumière identifiés en utilisant l'ARNr 16S (Urbach et al. 1998). Les clones environnementaux de surface et de profondeur, pris dans des conditions bien établies de stratification, tombaient clairement dans les clades A et B, respectivement (Ferris and Palenik 1998). A l'inverse, les clones obtenus à partir de colonnes d'eau faiblement stratifiées tombaient dans l'un ou l'autre des deux clades, suggérant que les populations de surface et de profondeur coexistent dans la colonne d'eau lorsqu'elle est mélangée et ne se séparent que lorsque la stratification est suffisamment établie.

De plus, Urbach et Chisholm (Urbach and Chisholm 1998) ont utilisé comme marqueur génétique la région intergénique séparant les gènes *petB* et *petD*, particulièrement variable, et une partie de ces gènes. Afin d'isoler spécifiquement les populations de *Prochlorococcus*, les échantillons prélevés à différentes profondeurs dans deux sites stratifiés de l'Atlantique Nord ont préalablement été triés par cytométrie en flux. Parmi 68 séquences de *Prochlorococcus* analysées, seulement 16 ont été trouvées plus d'une fois, et de ces 16, seulement 12 sont apparues dans plus d'un échantillon. Il semble donc que d'autres études en milieu naturel soient nécessaires pour estimer la variabilité génétique de ces micro-organismes.

* * * * *

III- DEMARCHE ADOPTEE AU COURS DE CE TRAVAIL DE THESE

Etant donné la présence des différents types pigmentaires chez *Prochlorococcus* et la répartition verticale des populations naturelles, nous nous sommes posés quelques questions fondamentales : Est-ce que les populations caractéristiques des eaux de surface et de la base de la zone euphotique ne diffèrent que par leur pigmentation et leurs caractéristiques écophysiologiques ou existe-t-il également des différences structurales au niveau de l'appareil photosynthétique des différentes souches ? D'autre part, les particularités de l'appareil photosynthétique de *Prochlorococcus* peuvent elles apporter des informations supplémentaires sur les capacités d'adaptation à la lumière des organismes photosynthétiques en général ? D'un point de vue évolutif, quels sont les liens qui unissent les différents systèmes d'acquisition de la lumière et de photoprotection mis en place chez les cyanobactéries et les plantes supérieures ?

Dans un premier temps, nous avons abordé ces questions à travers la caractérisation des complexes pigments-protéines des clones MED4 et SS120. Pour cela, nous nous sommes tout d'abord focalisés sur le photosystème I de *Prochlorococcus*, qui n'avait jusqu'à présent jamais été caractérisé. Dans la mesure où ce complexe pourrait intervenir dans la différente capacité d'adaptation à la lumière de ces deux souches, une des questions importantes était l'éventuelle présence d'une antenne associée spécifiquement à ce complexe (**Chapitre III**). Etant donné que ces souches diffèrent essentiellement par leur rapport Chl b_2 sur a_2 et puisque la majorité de la Chl b est localisée dans les systèmes antennaires, nous nous sommes alors intéressés aux principaux complexes collecteurs de la lumière de *Prochlorococcus* et à leur spécificité chez les différentes souches (**Chapitre IV**). Pour en tirer des conclusions physiologiques sur l'adaptation des différentes souches de *Prochlorococcus* dans le milieu naturel, l'expression des gènes codant pour cette antenne majeure a été étudiée dans différentes conditions lumineuses (**Chapitre IV et V**). Finalement, l'analyse structurale de ces protéines pigmentaires nous a conduit à les comparer aux autres protéines photosynthétiques liant la chlorophylle dans une perspective globale d'évolution de ces protéines (**Chapitre VI**).

* * * * *

IV- LISTE DE PUBLICATION EFFECTUEES PENDANT LA THESE

- En prep **Garczarek, L.**, van der Staay, G. W. M., Hess, W. R., Le Gall, F. and Partensky, F., Expression and phylogeny of the multiple antenna genes of the low-light adapted *Prochlorococcus* strains CCMP1375. **Publication présentée dans le Chapitre IV.**
- En prep Partensky, F. and **Garczarek, L.**, Photosynthesis apparatus of chl *b* and *d*-containing oxyphotrophic bacteria. *Chapter in Photosynthesis in algae*. **Publication présentée en Annexe I.**
- Soumis **Garczarek, L.**, Hess, W. R., Holtzendorff, J., Partensky, F., Differential expression of antenna and core genes in the oxchlorobacterium *Prochlorococcus* PCC 9511 strains grown under L/D cycle. Soumis à *Environmental Microbiology*. **Publication présentée dans le Chapitre V.**
- Soumis **Garczarek, L.**, Poupon, A., Partensky, F., Origin and evolution of transmembrane Chl-binding proteins : is there a common ancestor for the eukaryotic antenna (LHC) and the core Chl *a* antenna protein superfamilies ? Soumis à *Molecular Biology and Evolution*. **Publication présentée dans le Chapitre VI.**
- Soumis van der Staay, G. W. M., Moon-van der Staay, S. Y., **Garczarek L.** and Partensky F. Rapid evolutionary divergence of photosystem I core subunits PsaA and PsaB in marine prokaryotes. Soumis à *Photosynthesis Research*. **Publication présentée en Annexe III.**
- 2000 **Garczarek, L.**, Hess, W. R., Holtzendorff, J., van der Staay, G.W.M., Partensky, F., Multiplication of antenna genes as a major adaptation to low light in a marine prokaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 97:4098-4101. **Publication présentée dans le Chapitre IV.**
- 1998 **Garczarek, L.**, van der Staay, G. W. M., Thomas, J.C., Partensky, F. Isolation and characterization of the photosystem I from two strains of the marine oxchlorobacterium *Prochlorococcus*. *Photosynthesis Research* 56: 131-141. **Publication présentée dans le Chapitre III.**
- 1998 van der Staay, G. W. M, Moon-van der Staay S. Y., **Garczarek, L.**, Partensky, F. Characterization of the photosytem I subunits PsaI and PsaL from two strains of the marine oxyphotrophic prokaryote *Prochlorococcus*. *Photosynthesis Research* 57: 183-181. **Publication présentée en Annexe II.**

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I- DESCRIPTION ET CULTURE DES SOUCHES DISPONIBLES AU LABORATOIRE

I.1- SOUCHES CULTIVEES A LA STATION BIOLOGIQUE DE ROSCOFF

Les souches de *Prochlorococcus* utilisées proviennent de la plupart des régions du globe, grâce aux prélèvements effectués lors de campagnes océanographiques, et ce aussi bien en surface qu'en profondeur (Tableau 6 et Fig. 26). L'essentiel des travaux porte sur les souches MED4 (clone CCMP 1378 ou RCC153) et SS120 (CCMP 1375 ou RCC156) qui présentent l'avantage d'être clonales et de constituer les deux extrêmes pigmentaires des souches de *Prochlorococcus*, en terme de rapport Chl a_2/b_2 .

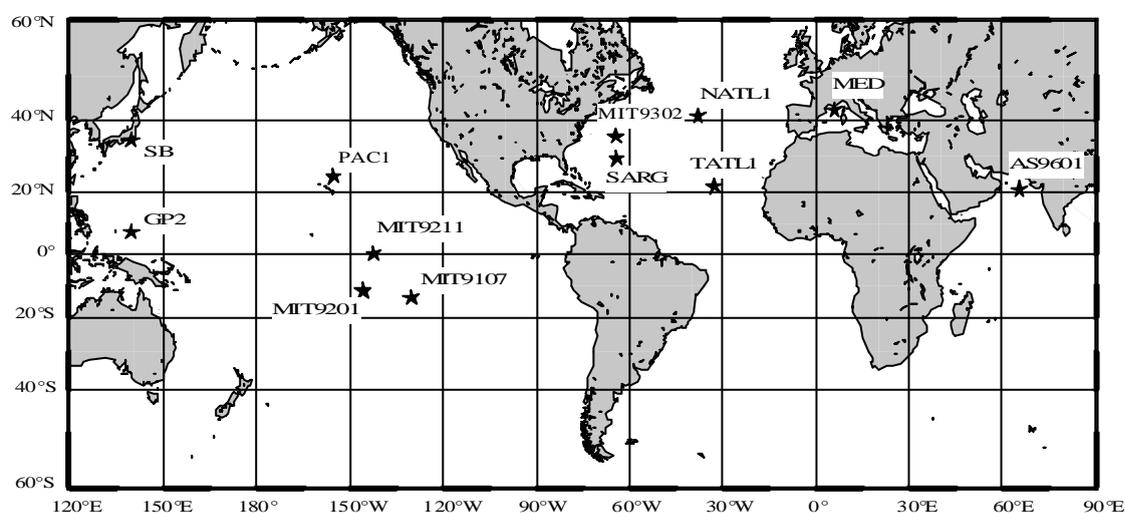


Fig. 26 : Lieu d'isolement des principales souches cultivées de *Prochlorococcus* (Partensky et al., 1999). Lorsque plusieurs souches ont été isolées au même endroit, un seul nom est donné (cf. Tableau 6)

Tableau 6 : Liste des souches cultivées de *Prochlorococcus* pour lesquelles des données ont été publiées. *Souches entretenues à Roscoff

Souche	Clone dérivé	Autre Nom	Origine	Date	Latitude	Longitude	Prof.	Isolateur	Remarques	Bibliographie
SARG*		LG	Mer des Sargasses	30/5/88	28 59 N	64 21 W	120	B. Palenik	première souche à avoir été isolée	Partensky et al., 1993
	SS120	CCMP 1375						L.R. Moore	obtenue par dilution sériée	Chisholm et al., 1992 Moore et al., 1995
MED*	PCC 9511	DV	Méditerranée NO	8/1/89	43 12 N	6 52 E	5	R. Rippka D. Vaultot, F. Partensky	souche axénique	Rippka et al., soumis Partensky et al., 1993
	MED4*	CCMP 1378						L.R. Moore	obtenue par dilution sériée	Chisholm et al., 1992 Moore et al., 1995
NATL1*		FP12	Atlantique N	1/4/90	37 39 N	40 1 W	30	F. Partensky		Partensky et al., 1993
NATL2*		FP5	Atlantique N	1/4/90	38 59 N	40 33 W	30	F. Partensky		Scanlan et al., 1996 Urbach et al., 1998
MIT9107			Pacifique S	8/8/91	14 60 S	134 60 W	25	J.A. Dusenberry		Urbach et al., 1998
TATL 1		EUM11	Atlantique tropical E	19/10/91	20 57 N	31 6 W	20	F. Partensky	souche perdue	Scanlan et al., 1996 Urbach et al., 1998
TATL 2		EUM17	Atlantique tropical E	21/10/91	20 25 N	31 8 W	30	F. Partensky	souche perdue	Scanlan et al., 1996 Urbach et al., 1998
GP2*			Pacifique O	10/9/92	8 32 N	136 31 E	150	A. Shimada		Shimada et al., 1995, 1996
SB*			Sugura Bay, Japon	21/10/92	35 0 N	138 30 E	40	A. Shimada		Shimada et al., 1995, 1996
PAC 1			Pacifique tropical N	1/4/92	22 45 N	158 0 W	100	L. Campbell		Scanlan et al., 1996 Urbach et al., 1998
MIT9201			Pacifique S	26/9/92	11 60 S	145 25 W	0	B. Binder		Rocap et al., 1999 Moore et Chisholm, 1999
MIT9202			Pacifique S	26/9/92	11 60 S	145 25 W	79	B. Binder		Rocap et al., 1999 Moore et Chisholm, 1999
MIT9211			Pacifique équatorial	10/4/92	0	140 W	83	R.J. Olson		Rocap et al., 1999 Moore et Chisholm, 1999
MIT9215			Pacifique équatorial	3/9/92	0	140 W	0	B. Binder		Rocap et al., 1999 Moore et Chisholm, 1999
MIT9302			Mer des Sargasses	15/7/93	34 45 N	66 11 W	100	L. Moore	isolée par tri au cytomètre en flux	Rocap et al., 1999 Moore et al., 1998, 1999
MIT9303			Mer des Sargasses	15/7/93	34 45 N	66 11 W	100	L. Moore	idem	Moore et al., 1998 Urbach et al., 1998
MIT9312			Atlantique N	17/7/93	37 30 N	68 14 W	135	L. Moore	idem	Moore et al., 1998
MIT9313			Atlantique N	17/7/93	37 30 N	68 14 W	135	L. Moore	idem	Moore et al., 1998
AS9601			Mer d'Arabie	1/11/95	19 12 N	67 10 E	50	R.J. Olson		Shalapyonok et al., 1998
TAK9803-2			Atoll de Takapoto	6/2/98	14 30 S	145 20 W	20	S. Le Gall		Garczarek et al., soumis

I.2- METHODES DE CULTURE

Les souches de *Prochlorococcus* sont cultivées dans un milieu mis au point par Rosmarie Rippka, le PCR-S11, qui contient une solution de métaux "Gaffron" modifiés (Rippka 1988 ; Tableau. 7). Les rendements maximaux obtenus avec ce milieu sont de $2-3 \cdot 10^8$ cellules.ml⁻¹, correspondant à un rendement de Chl *a*₂ d'environ 0,2-4 mg.l⁻¹. Les cultures sont entretenues à 19 °C dans des flacons en polycarbonate (Nalgène) sous des conditions de lumière bleue continue obtenues par la superposition de filtres neutres et bleus. En dehors des expériences d'acclimatation lumineuse, les souches sont cultivées à une intensité lumineuse de 15 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour la souche SS120 ou 30 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour la souche MED4, conditions proches de leur optimum de croissance (Moore et al. 1995).

Tableau 7 : Composition du milieu utilisé pour la culture de *Prochlorococcus*.

Solutions	Volume (ml)	Con. Finale
Eau de mer	1000	
Hepes-NaOH 1M, pH 7,5	1	1 mM
Tampon Phosphate (Na ₂ HPO ₄ pH 7,5)	1	50 μM
Na ₂ -EDTA, FeCl ₃	1	32 μM
(NH ₄) ₂ SO ₄ 100mM	1	400 μM
Vitamines B12	1	1 $\mu\text{g} / \text{l}$
Traces métaux "Gaffron+Se" 1/10	0,1	voir ci-dessous

"Gaffron+Se"	Référence Merck.	Concentration Stockl (mg/l)	Conc. finale (nM)
H ₃ BO ₃	165	168	150
MnSO ₄ .H ₂ O	5963	101	30
Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	6673	1,98	0,3
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1182	5,16	1,45
KBr	4905	7,14	3
KI	5043	4,98	1,5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8883	17,25	3
Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	2019	9,25	1,5
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	2554	8,76	1,5
CuSO ₄ .5H ₂ O	2790	7,5	1,5
NiCl ₂ .6H ₂ O	6717	7,1	1,5
Cr(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	2481	2,4	0,3
VOSO ₄ .5H ₂ O	8503	1,5	0,3
KA ₁ (SO ₄) ₂ .12H ₂ O	1047	28,4	3
SeO ₂	800653	3,3	1,5

II- METHODE DE CARACTERISATION DES COMPLEXES PIGMENTS-PROTEINES

II.1- METHODE D'ISOLEMENT ET DE CARACTERISATION DU PHOTOSYSTEME I

II.1.1- Extraction des thylacoï des

Afin de prévenir toute dégradation, les manipulations sont effectuées à 4 °C et les tampons utilisés contiennent une solution d'antiprotéase (1 mM benzamidine hydrochloride, 5 mM d'acide ϵ -caproïque, et 100 μ M phenylmethylsulfonylfluoride ou PMSF). Les cellules en croissance exponentielle (environ $1,5 \cdot 10^8$ cellules.mL⁻¹) sont récoltées par centrifugation à $13\,700 \times g$ pendant 15 mn, puis lavées deux fois dans le tampon d'extraction A (voir ci-après). Les cellules sont ensuite cassées par deux passages successifs dans une presse de French (20 MPa) en présence de 100 μ M de PMSF. Après élimination des débris cellulaires par une courte centrifugation à $3\,000 \times g$, l'homogénat est déposé à la surface d'un gradient de saccharose discontinu (30% m/v et 50% m/v de saccharose) dans le tampon d'extraction B (voir ci-après). Après 1 heure d'ultracentrifugation à $100\,000 \times g$ (rotor Beckman SW28), les thylacoï des sont récoltés à l'interface des deux couches de saccharose et centrifugés à $80\,000 \times g$ pendant 30 min. (rotor Beckman SW27.1). Le culot est resuspendu dans le tampon d'extraction A et la concentration en chlorophylle totale (= DV Chl $a + b$) déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UVIKON, après extraction des pigments dans 80 % v/v d'acétone selon la méthode de Arnon (1949). Les thylacoï des sont ensuite aliquotés et conservés à -80 °C après congélation rapide dans l'azote liquide.

Tampon d'extraction A : Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0 ; NaCl, 10mM ; EDTA, 1 mM ; Sorbitol, 200mM.

Tampon d'extraction B : Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0 ; NaCl, 10mM ; EDTA, 2 mM.

II.1.2 - Isolement du photosystème I

II.1.2.1- Solubilisation des thylacoï des

Les membranes thylacoï dales sont rapidement décongelées et lavées trois fois dans un tampon Tris-Maléate, 2 mM, pH 8,0. Les complexes sont ensuite dissous par action de détergent. Ce protocole n'ayant pas été réalisé dans la littérature sur *Prochlorococcus*, l'action conjuguée d'octyl glucoside (OG, n-Octyl- β -D-glucopyranoside), de dodécyl maltoside (DDM, n-Dodécyl- β -D-maltoside), de Zwittergent 3-14 (SB14, n-Tétradécyl-N, N-diméthyl-3ammonio-1-propanesulfonate) et de dodécyl sulfate de lithium (DsLi) ont été testés dans les proportions suivantes :

1 = OG : DDM : DsLi	= 10 : 20 : 5	(m/m/m)
2 = OG : SB14 : DsLi	= 10 : 20 : 5	(m/m/m)
3 = OG : DDM : SB14 : DsLi	= 10 : 10 : 10 : 5	(m/m/m/m)
4 = OG : DDM : SB14 : DsLi	= 10 : 10 : 20 : 5	(m/m/m/m)
5 = DDM : SB14 : DsLi	= 10 : 20 : 5	(m/m/m)

Après 30 min, les thylacoïdes non solubilisés sont éliminés par 10 min de centrifugation à $17\,000 \times g$ à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (centrifugeuse Jouan MR 1812). Avant le dépôt sur gel non dénaturant ou sur gradient de saccharose, du DsLi dans un rapport Chl:DsLi de 1:5 est ajouté à chacun des échantillons pour améliorer la solubilisation.

II.1.2.2- Séparation des complexes Chl-protéines

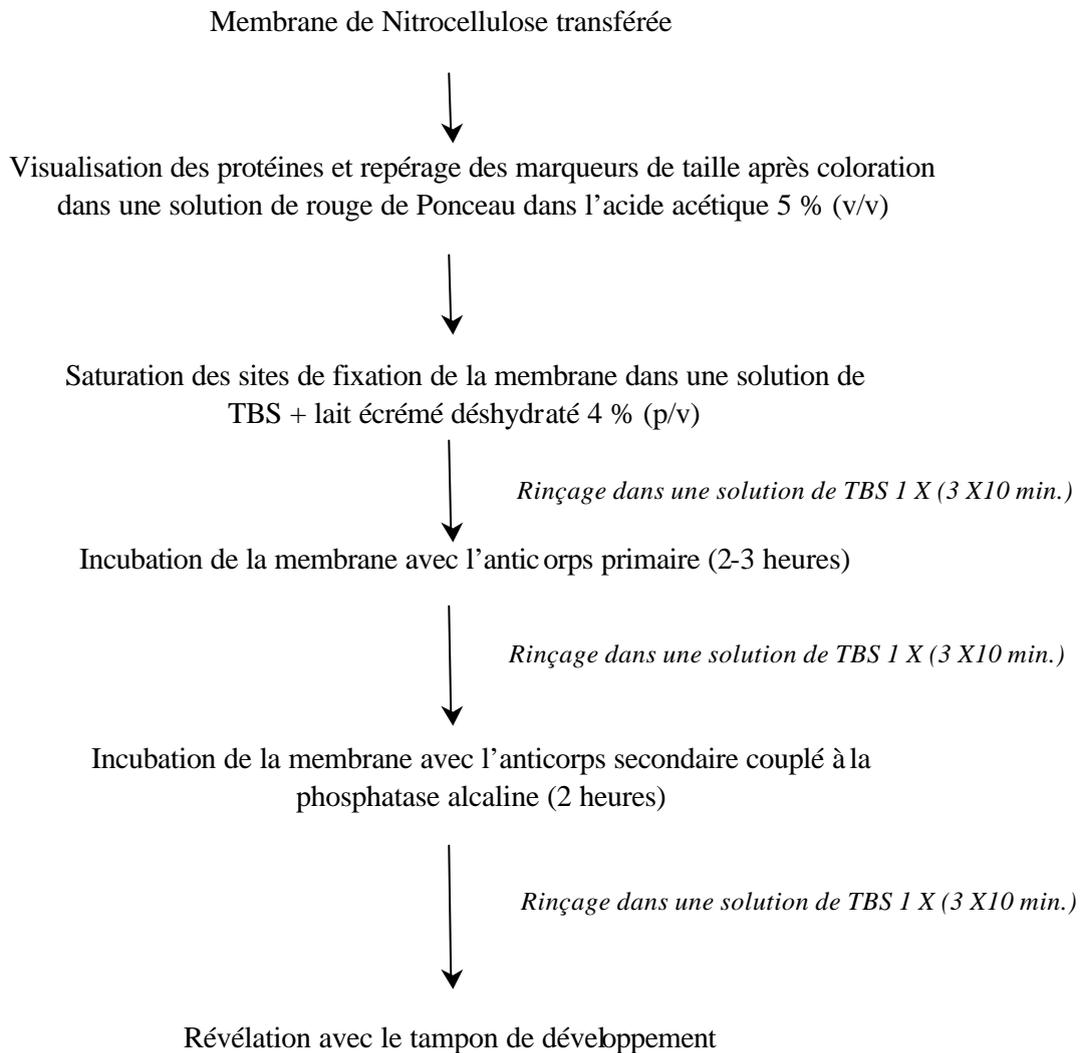
Les conditions de solubilisation optimales ont tout d'abord été testées en séparant les différents complexes protéiques sur gel non dénaturant. Par la suite, les complexes protéiques ont été séparés sur gradient de saccharose, afin d'obtenir des rendements protéiques supérieurs.

Séparation des complexes Chl-protéines sur gel non dénaturant

Après solubilisation des thylacoïdes, les différents composants de l'appareil photosynthétique sont séparés sur un gradient de gel non dénaturant (3 mm d'épaisseur) allant de 5 à 15 % (m/v) d'acrylamide/bisacrylamide (30/0,3 (v/v) ; Allen and Staehelin 1991, van der Staay and Staehelin 1994). Ce gradient continu permet de séparer aussi bien l'ensemble des complexes de l'antenne que les photosystèmes I et II. Les différents complexes sont ensuite isolés par découpage des bandes de gel.

Isolement des complexes protéiques par gradient de saccharose

Les différents composants de l'appareil photosynthétique sont séparés sur gradient discontinu de 0 à 40 % de saccharose (m/v). Les gradients sont préparés en superposant des couches de saccharose dans un tampon Tris-Maléate 2 mM pH 8,0 en présence de 0,05 % (v/v) de DDM, par pas de 5 % de saccharose. Les échantillons solubilisés sont ensuite déposés à la surface du gradient et centrifugés pendant 22 h, à $80\,000 \times g$ et à 4°C . Les bandes vertes sont prélevées à l'aide d'une seringue et des aliquots de chaque fraction sont réservés pour les analyses de spectrophotométrie, spectrofluorimétrie et analyse de la Chl.



Tampon TBS (« Tris Buffered Saline ») : Tris-HCl, 20 mM; NaCl, 0,5 M, pH 7,5.

Tampon de développement (Biorad) : 300 ml de tampon de développement alcaline phosphatase, 300 µl de réactif A (p-nitrobleu tétrazolium chloride (NBT) dans du diméthylformamide 70 %), 300 µl de réactif B (5bromo-4bromo-3indolyphosphate (BCIP) dans du diméthylformamide).

Fig. 27 : Méthode de détection immunologique

II.1.3- Analyse du photosystème I

II.3.1.1- Analyse de la composition protéique du PS I sur gel d'électrophorèse.

La composition peptidique des complexes isolés est déterminée sur SDS-PAGE à 12 % (m/v) d'acrylamide:bisacrylamide (37,5:1 (v/v)) selon la méthode de Fling et Gregerson (Fling and Gregerson 1986), modifiée par l'addition d'urée (6 M) afin d'augmenter la résolution du gel. La concentration en protéines est estimée à l'aide du kit BCA (Pierce), basé sur la méthode de Lowry (Lowry et al. 1951). Les échantillons sont tout d'abord dénaturés dans un tampon de solubilisation à 50 °C pendant 15 minutes. Après SDS-PAGE, les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie (R250, Biorad) ou au nitrate d'argent (van der Staay and Staehelin 1994) ou encore transférées sur membrane pour identifier les protéines par détection immunologique (Towbin et al. 1979).

Tampon de solubilisation : Tris-HCl, 125 mM, pH 6,8 ; SDS, 1,5 % (m/v) ; glycérol, 10 % (v/v) et bleu de Bromophenol, 0,0005 % (m/v).

Gel de migration : Acrylamide/bis acrylamide (37,5:1), 12 % ; Tris-HCl pH 8,8, 0,75 M ; SDS, 0,1 % (m/v) ; Urée, 6 M ; Persulfate d'ammonium (APS), 0,05 % ; N, N, N', N'-Tetraméthyl-éthylènediamine (TEMED) 0,005 % (m/v).

Gel de séparation : Acrylamide/bis acrylamide (37,5:1), 4 % ; Tris-HCl pH 8,8, 0,125 M ; SDS, 0,1 % (m/v) ; APS, 0,05 % ; TEMED 0,005 % (m/v).

Tampon de migration : Tris, 50 mM ; Glycine, 192 mM ; SDS, 0,1 % (m/v)

II.3.1.2- Détection immunologique.

La détection est réalisée après transfert sur membrane de nitrocellulose avec le système Biorad (Mini Trans-blot Electrophoresis Transfer Cell ; 200 mA, 12 V, 16 H ; Fig. 27). Afin de vérifier le niveau de pureté des fractions enrichies en PS I et d'identifier les protéines constitutives de ce complexe, plusieurs anticorps ont été testés. Les anticorps dirigés contre les sous-unités PsaA/B, PsaD, PsaF et PsaF ont été fournis par le Dr P. R. Chitnis (Université du Kansas, KA, USA) et le Dr B. R. Green (Université de British Columbia, Vancouver, Canada). Les blots ont été révélés en utilisant un anticorps secondaire (Anti-Rabbit IgG (H+L)) couplé à la phosphatase alcaline (BioRad). Les résultats ont été systématiquement comparés à ceux obtenus avec des fractions de PS I de *Spirulina maxima* ou *Synechococcus* sp. WH 8103, isolées sur gradient de saccharose de la même manière que pour *Prochlorococcus* (thylacoï des des fournis par J.C. Thomas, ENS Paris). Cependant, les thylacoï des des deux espèces de cyanobactéries ont été solubilisés avec du DDM dans des proportions de détergent:Chl de 12:1 (m/m). Le microséquençage des parties N-Terminales et internes des protéines du PS I sélectionnées ont été réalisées l'Institut Pasteur (Paris).

Tampon de solubilisation : Tris-HCl, 125 mM, pH 6,8 ; SDS, 1,5 % (m/v) ; glycérol, 10 % (v/v) et bleu de Bromophénol, 0,0005 % (m/v).

II.3.1.3- Caractérisation des fractions enrichies en PS I

Différentes méthodes ont permis d'analyser les fractions obtenues par gradient de saccharose, les thylacoïdes et dans certains cas les cellules entières :

Spectrofluorimétrie

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence ont été réalisés à l'ENS (Paris) à la température de l'azote liquide (77 °K) à l'aide d'un spectrofluorimètre Hitachi F3010 en utilisant une ouverture de 5 nm pour les spectres d'excitation et 3 nm pour les spectres d'émission (Delphin et al. 1996). Les échantillons analysés ont été préalablement déposés sur des préfiltres de Type AP20 (Millipore).

Spectrophotométrie

Les spectres d'absorption à température ambiante ont été mesurés à l'ENS (Paris) à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau sur simple cuve (Aminco DW2C). La quantité de centres réactionnels du PS I (P700) a été mesurée par la différence d'absorbance entre 700 et 730 nm après 20 à 40 s d'éclairement saturant en présence d'un donneur (4 mM d'ascorbate de sodium) et d'un accepteur d'électrons (0,1 mM de méthyl violagène ; Newman and Sherman 1978). Le coefficient d'extinction molaire utilisé est de $64\,000\text{ l.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Hiyama and Ke 1972), et la concentration en chlorophylle est estimée à 15 µg/ml pour une DO à 680 nm de 1.

Chromatographie liquide à haute pression (HPLC)

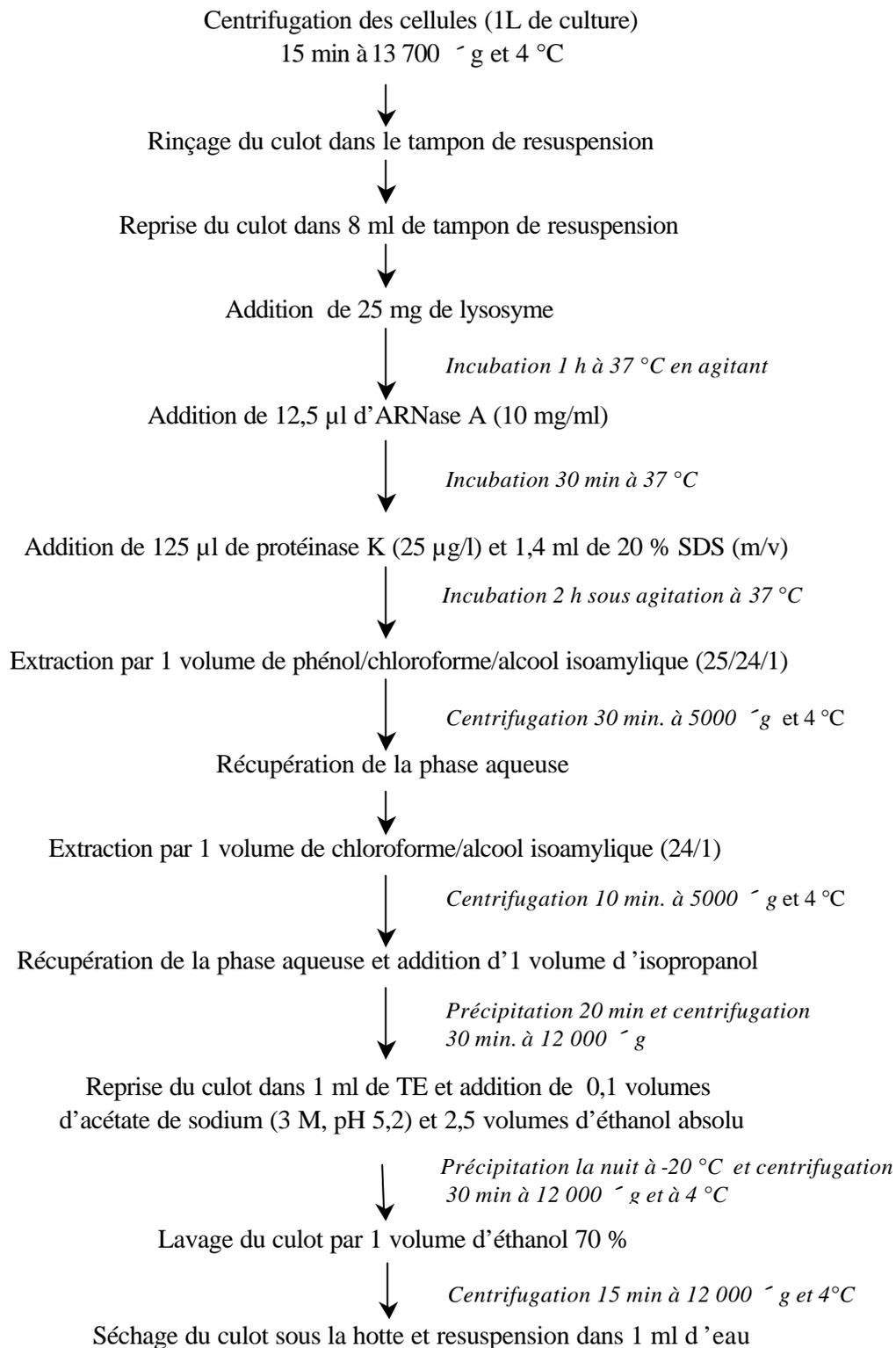
La composition pigmentaire est déterminée par HPLC en phase inverse à l'aide d'une colonne en C18 Zorbax ODS (25 × 4,6 cm) selon la méthode de Kraay et al. (1992) avec les modifications suivantes (Kraay et al. 1992) : les échantillons sont extraits avec 9 volumes d'une solution de méthanol:acétone (50:50 v/v). L'extrait est ajouté à un volume égal de diéthyl éther, puis à deux volumes d'une solution de NaCl 10 % (m/v). Lorsque la séparation de phase est terminée, la phase supérieure est évaporée sous flux d'azote. Les échantillons sont alors dissous dans le méthanol, filtrés et centrifugés. L'élution en gradient est alors effectuée par un mélange linéaire d'une phase A et d'une phase B. Le flux utilisé est de $1,3\text{ ml.min}^{-1}$ et le 100 % de phase B est atteint en 23 min.

Phase A : méthanol, 51 % ; acétonitrile, 36 % ; H₂O, 13 % ; acétate d'ammonium 0,3 M

Phase B : acétonitrile, 30 % ; acétate d'éthyl, 70 %.

Microscopie électronique

Cette expérience a été réalisée par J. C. Thomas (ENS, Paris). Les particules de PS I de fractions enrichies obtenues par centrifugation sur gradient de saccharose ont tout d'abord été rincées



Tampon de resuspension : Saccharose, 25 % (m/v) ; Tris HCl, 50 mM, pH 7,5 ; EDTA, 1 mM.

TE : Tris HCl, 10 mM, pH 7,5 ; EDTA, 1 mM .

Fig. 28 : Méthode d'extraction des ADN de *Prochlorococcus*

dans une solution de Tris-Maléate, puis dans l'acétate d'ammonium 10 mM, en utilisant un centricon concentrateur 10 (seuil de coupure 10 kDa ; Amicon Inc ; Beverly, MA, USA). De petites gouttes de suspension de particules dans l'acétate d'ammonium ont été déposées sur une grille de nickel recouverte de carbone/Formvar pendant 60 s. Après élimination du liquide par prélèvement avec une seringue, les grilles sont trempées dans une solution d'acétate d'uranyl (2 %) pendant 60 s. Les particules de PS I sont observées immédiatement après préparation sur un microscope électronique Jeol 100 CX 2 à 80 kV.

III- OUTILS MOLECULAIRES

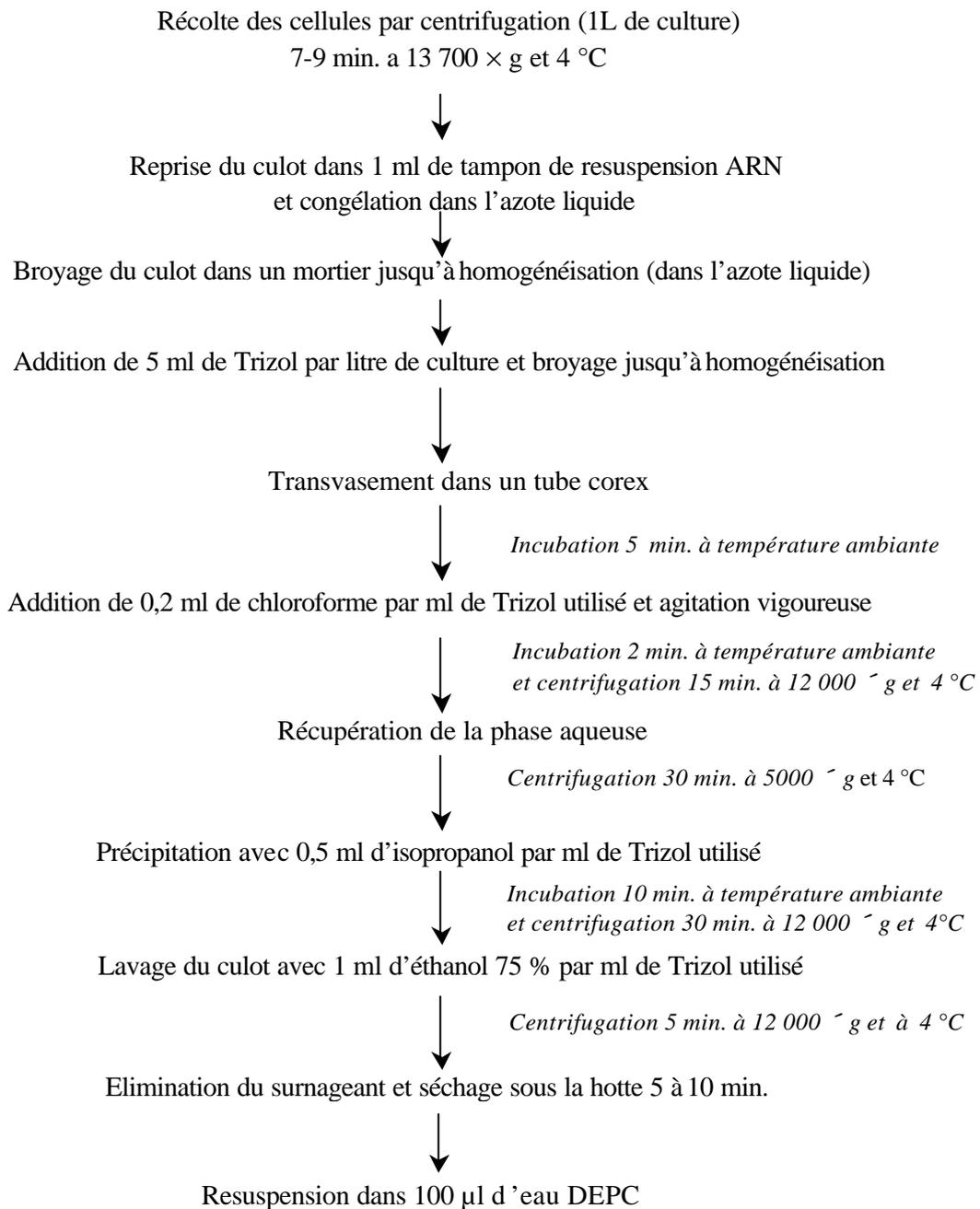
Les méthodes de biologie moléculaire sont ici décrites en terme plus général car elles ont été appliquées dans différentes conditions correspondant aux expériences réalisées dans les chapitres IV à VI.

III.1- TECHNIQUES D'EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES

III.1.1- Extraction de l'ADN total

L'extraction de l'ADN total de *Prochlorococcus* est réalisée selon la méthode de Franche et Damerval (1988) mise au point pour les cyanobactéries et adaptée à *Prochlorococcus* (Fig. 28).

Les cellules sont récoltées en croissance exponentielle ($1-1,5 \cdot 10^8$ cell/ml) par 15 min. de centrifugation à $13\,700 \times g$ et reprises dans un tampon de resuspension (voir ci-après). Après rinçage dans ce même tampon, les cellules sont lysées par l'action de lysosyme et la majeure partie des protéines contaminantes est éliminée par traitement à la protéinase K (enzyme protéolytique). Les acides nucléiques sont purifiés par extraction de la phase aqueuse avec un mélange phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1), suivi d'un chloroforme:alcool isoamylique (24:1) pour éliminer toute trace de phénol. Les acides nucléiques sont précipités en présence d'isopropanol et collectés par centrifugation. Après reprise du culot dans du TE, une seconde précipitation avec de l'éthanol améliore la purification de l'ADN. Cette est particulièrement important pour optimiser l'efficacité de la digestion de l'ADN total par des enzymes de restriction en vue de préparation de Southern (cf. section III.4-Technique d'hybridation des acides nucléiques). Après centrifugation, le culot d'ADN est repris dans de l'eau.



Tampon de resuspension ARN : acétate de sodium, 10 mM, pH 4,5 ; saccharose, 200 mM ; EDTA, 5 mM

Fig. 29 : Méthode d'extraction des ARN de *Prochlorococcus*

La quantité d'ADN est déterminée par mesure de la densité optique (DO) à 260 nm (1 unité de DO correspondant à 50 µg/ml d'ADN). La contamination protéique de l'ADN est estimée par la mesure du rapport DO_{260 nm}/DO_{280 nm}.

Tampon de resuspension de l'ADN : Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5 ; EDTA, 1mM, pH 8,0 ; saccharose 25 % (m/v).

TE : Tris HCl, 10 mM, pH 7,5 ; EDTA, 1 mM .

III.1.2- Extraction d'ADN plasmidique à l'aide du kit "Flexiprep".

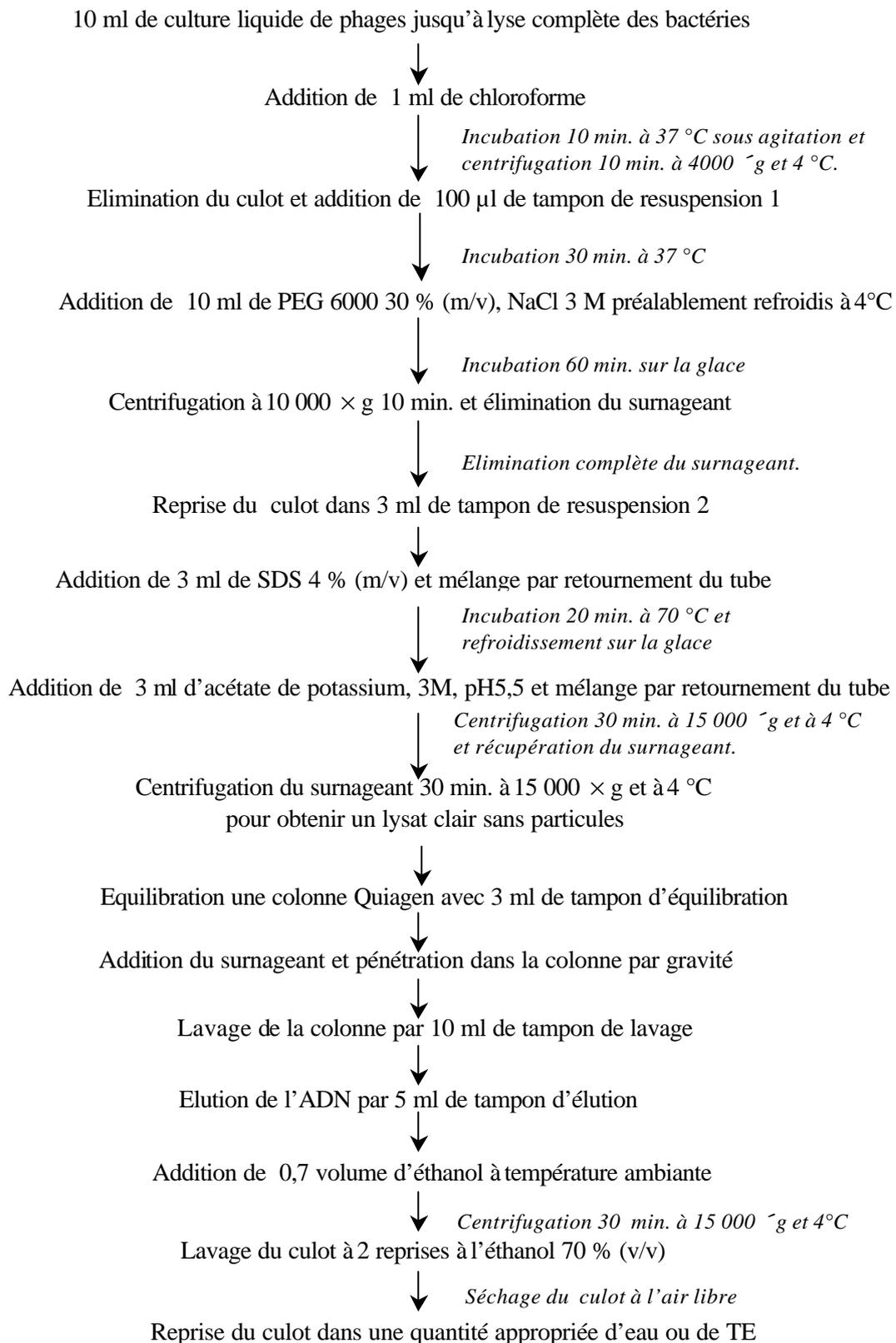
Les extractions des ADN plasmidiques sont réalisées selon le protocole du fabricant (Pharmacia Biotech). Après resuspension dans une solution isotonique, les cellules sont lysées selon une procédure standard de lyse alcaline décrite par Ish-Horowicz et Burke (1981). L'ADN chromosomal, les protéines et les débris cellulaires sont précipités et éliminés par centrifugation. L'ADN plasmidique est ensuite concentré par précipitation à l'isopropanol et purifié par fixation sur une résine, puis élution par de l'eau. Cette étape de purification supplémentaire par rapport aux protocoles classique de mini-préparation est particulièrement efficace pour le séquençage ultérieur des produits clonés.

III.1.3- Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN est réalisée avec des solutions traitées au diéthylpyrocarbonate (DEPC) contre l'action des RNases, puis autoclavées pour inactiver le DEPC. Le matériel a été préalablement stérilisé à 200 °C une nuit.

900 ml de cellules en phase exponentielle ($1-1,5 \cdot 10^8$ cell/ml) sont récoltées par 7 à 10 min. de centrifugation à $13\,700 \times g$ (Fig. 29). Le temps de centrifugation est ici réduit au maximum de façon à limiter les risques de dégradation des ARNm. La méthode d'extraction des ARN est modifiée de Logemann et al. (1987). Le culot est repris dans 1 ml de tampon de resuspension ARN et rapidement congelé dans l'azote liquide. Le culot encore congelé est broyé dans l'azote liquide, dans un mortier préalablement refroidi à - 80 °C, jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette étape est suivie d'une extraction des acides nucléiques par une solution de Trizol (Life technologies) à base d'un mélange de phénol:chloroforme. Après centrifugation, les acides nucléiques sont précipités à l'isopropanol et lavés à l'éthanol 75 % (v/v) avant d'être repris dans de l'eau DEPC.

La qualité de l'ARN est vérifiée sur gel dénaturant d'agarose 1.5 %-formaldéhyde (cf. section III.3-analyse des acides nucléiques). La quantification s'effectue par spectrophotométrie à 260 nm (1 unité de DO correspondant à 40 µg/ ml d'ARN)



Tampon de resuspension 1 : NaCl, 300mM ; Tris Cl, 100mM, pH7,5 ; EDTA, 10 mM ; BSA 0,2 mg/ml ; Rnase A, 20 mg/ml ; Dnase I, 6 mg/ml.

Tampon de resuspension 2 : NaCl, 100mM ; Tris Cl, 100mM, pH7,5 ; EDTA, 25 mM.

Tampon d'équilibration : NaCl, 750 mM ; MOPS, 50 mM, pH7,0 ; Ethanol, 15 % ; Triton X-100 0,15 %

Tampon de lavage : NaCl, 1 M ; MOPS, 50 mM, pH7,0 ; Ethanol, 15 %

Tampon d'élution : NaCl, 1,25 M ; Tris-Cl, 50 mM, pH8,5 ; Ethanol, 15 %

Fig. 30 : Méthode d'extraction d'ADN bicaténaire de bactériophages

III.1.4- Extraction de l'ADN bicaténaire des bactériophages

L'extraction de l'ADN de bactériophage est réalisé avec le Kit Lambda Midi (Quiagen) dont la méthode est basée sur celle de Sambrook et al., selon les consignes du fabricant (Sambrook et al. 1989) (Fig. 30).

Après élimination des débris bactériens par centrifugation, les phages sont précipités en présence de polyéthylèneglycol (PEG) 6 000 et de chlorure de sodium. Après dissolution du culot de phages, les protéines phagiques sont éliminées par traitement au SDS/Protéinase K et extraction au phénol chloroforme, puis au chloroforme. L'ADN phagique est ensuite purifié par passage sur une colonne de chromatographie d'échange d'anions.

III.2- AMPLIFICATION D'ADN PAR REACTION EN CHAÎNE DE LA POLYMERASE (P.C.R.)

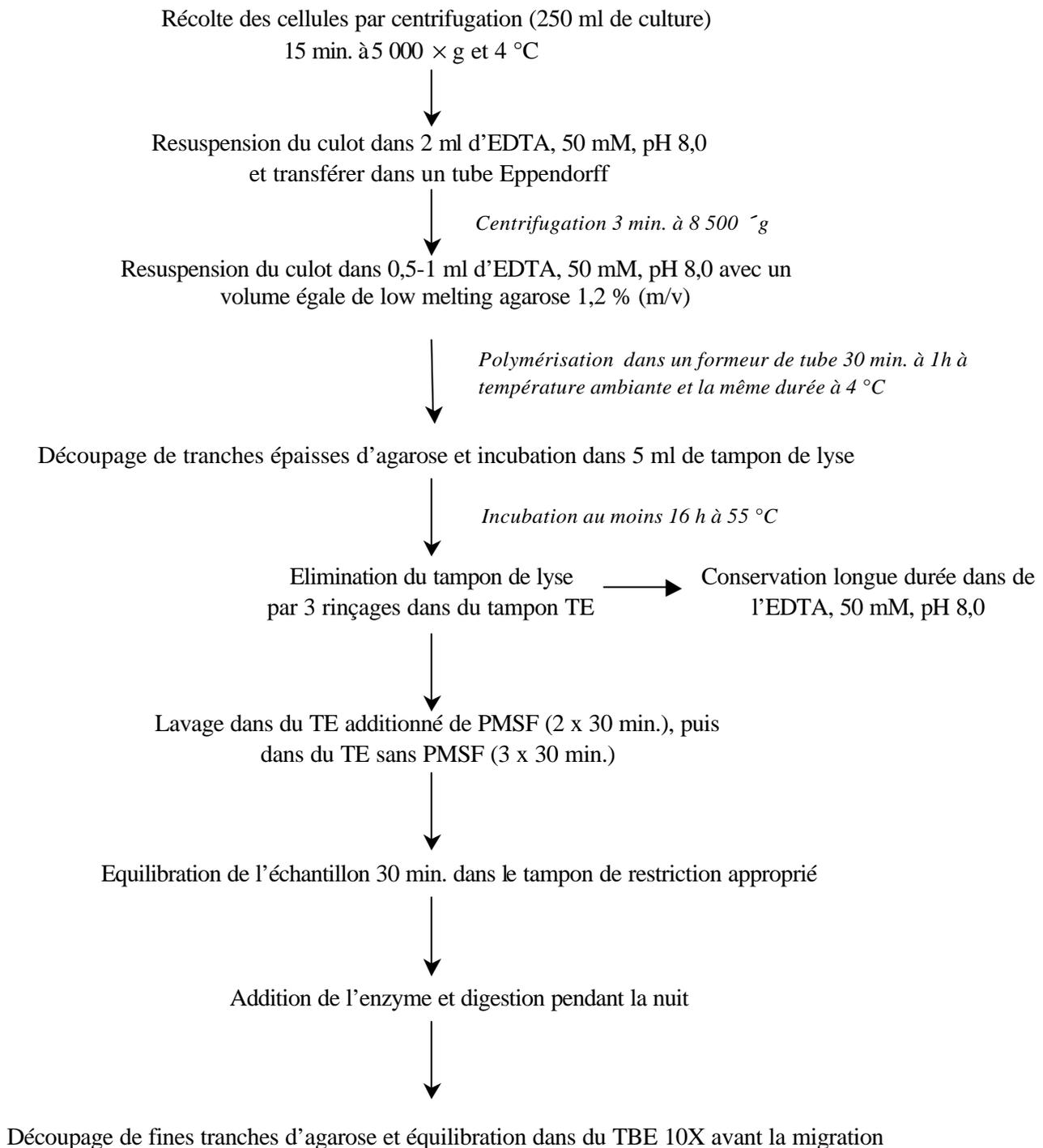
La technique de PCR a été utilisée pour mettre en évidence et séquencer de nouveaux gènes appartenant à une famille de gènes connus, ou afin de synthétiser des sondes utilisées dans les méthodes d'hybridation (cf. section III.4-Techniques d'hybridation des acides nucléiques). Les PCR ont été réalisées à partir d'ADN total de *Prochlorococcus* extrait selon les conditions décrites précédemment ou directement à partir de cellules entières. Dans ce dernier cas, le nombre de cellules de *Prochlorococcus* ajouté au mélange de PCR est environ de 10 000 pour un volume réactionnel total de 50 μ l. Cette méthode présente l'avantage d'éviter l'étape d'extraction d'ADN qui est longue et introduit des risques supplémentaires de contamination des échantillons. De plus, la mise au point de cette procédure a également pour but de développer une technique facilement réalisable à bord d'un bateau océanographique. Dans une première approximation la température d'hybridation des amorces a été calculée en utilisant la formule empirique suivante : $T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$.

III.3- ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES

III.3.1- Analyse électrophorétique

III.3.1.1- Analyse de l'ADN sur gel d'agarose 0.8 % (m/v)

Les gels d'agarose dissout dans du tampon d'électrophorèse (TAE 1 X) sont les plus couramment utilisés pour la séparation des ADN selon leur taille. La concentration en agarose varie de 0,8 à 2 % selon la taille des fragments d'ADN à séparer (Sambrook et al. 1989). La migration s'effectue dans le tampon d'électrophorèse TAE 1X entre 50 et 100 volts. Le gel est ensuite visualisé sous UV après coloration au bromure d'éthidium (BET, 30 ng/ml) ou au SYBR green (dilution au 1/10 000^{ième} de la solution mère, Molecular Probes), qui permet d'obtenir une meilleure résolution.



Tampon de lyse : EDTA, 50 mM, pH8,0 ; SDS, 1 % ; Protéinase K, 0,5 mg.

TE : Tris-HCl, 10 mM, pH 7,5 ; EDTA, 1 mM

TBE 10X : Tris-Borate-EDTA (TBE) 10X : Tris Borate, 445 mM ; EDTA, 20 mM.

PMSF : phenylmethylsulfonylfluoride, 100 µM

Fig. 31 : Analyse de l'ADN par électrophorèse en champ pulsé (PFGE)

Tampon d'électrophorèse: Tris-Acétate-EDTA (TAE) 1X : Tris acétate 40 mM, EDTA 2 mM

Tampon de charge : Orange G 0,25 % (m/v), saccharose 40 % (m/v).

Marqueur Moléculaire : "Smart ladder" (10 kb à 100 pb ; Eurogentec)

III.3.1.2- Analyse de l'ADN sur gel de polyacrylamide

La séparation des produits de PCR sur gel de polyacrylamide permet d'obtenir une meilleure résolution pour l'étude des fragments de petites tailles. Elle a été essentiellement utilisée pour séparer des fragments d'ADN inférieurs à 1 000 pb. La concentration d'acrylamide/bis acrylamide (37,5:1) utilisée est de 10 % (m/v) dans du tampon d'électrophorèse Tris-Borate-EDTA (TBE) 1 X. De façon à éviter la dénaturation des petits fragments d'ADN due au chauffage, la migration s'effectue à 1-8 Volts/cm dans du TBE 1X.

Tampon d'électrophorèse: Tris-Borate-EDTA (TBE) 1X : Tris borate 44,5 mM, EDTA 2 mM.

III.3.1.3- Analyse de l'ADN par électrophorèse en champ pulsé (PFGE)

Cette expérience a été réalisée par Julia Holtzendorff et Wolfgang Hess (Université de Humbolt, Berlin). Cette méthode permet la séparation d'ADN double brin de grande taille qui ne peuvent être séparés sur gel d'agarose (Sambrook et al. 1989). La PFGE consiste à appliquer à un gel un champ électrique pulsé alternatif et orthogonal. Au bout d'un certain temps, les longues molécules d'ADN sont bloquées dans leur progression à travers le gel. Un changement de direction du champ électrique permet de réorienter les molécules dans une autre direction. La migration s'effectue très lentement, permettant un déplacement "reptilien" des fragments d'ADN. Les molécules d'ADN dont le temps de réorientation est inférieur à la période du champs pulsé seront séparées en fonction de leur taille. Cette méthode permet la séparation de fragments d'ADN supérieurs à 750 Kb.

Afin d'éviter les coupures au cours de l'extraction de longues molécules d'ADN, les cellules sont lysées dans un tube d'agarose. Pour cela, les cellules intactes sont resuspendues dans de l'agarose à faible température de fusion ("low-melting agarose") et solidifié sous forme de bloc, dont la taille correspond à celle des puits du gel de séparation (Fig. 31). Ces blocs sont ensuite placés dans différentes solutions permettant la lyse des cellules, l'élimination des protéines et la digestion par différentes enzymes de restriction. Les amas d'agarose sont ensuite placés dans les puits du gel d'électrophorèse.

III.3.1.4- Analyse des réactions de séquence sur gel de polyacrylamide 6%

La séparation des fragments d'ADN marqués au "Texas Red" obtenus à l'issue de la réaction

de séquence (cf. section III.5-Séquençage) est effectuée sur gel de polyacrylamide 6 % urée m/v /6M préparé à partir d'une solution de "Long Ranger" (50 % m/v polyacrylamide, FMC Bioproducts).

Le mélange constitué d'urée et de solution de "Long Ranger" dilué dans la quantité appropriée d'eau est préalablement désionisé par une résine échangeuse d'ions (5g/100 ml d'échantillon, AG 501-X8, Biorad) sous agitation pendant une heure. Après ajout de TBE 10 X jusqu'à une concentration finale de 1 X TBE, le gel est dégazé pendant 10 min à l'aide d'une pompe à vide.

III.3.1.5- Analyse des ARN sur gel d'agarose 1.5 % m/v / formaldéhyde 4 % v/v / MEN 1X

Les ARN sont séparés en conditions dénaturantes en fonction de leur masse moléculaire selon le protocole adapté de Sambrook et al. (Sambrook et al. 1989). Le formaldéhyde et le tampon MEN 10 X sont ajoutés jusqu'à une concentration finale de 4 % v/v formaldéhyde et 1 X MEN après dissolution de l'agarose, lorsque la solution est environ à 60 °C. Avant chargement, les échantillons sont dénaturés 10 min. à 65 °C dans 1 volume de tampon de charge pour 1,6 volume d'échantillon puis placés dans la glace. La migration s'effectue à environ 5 Volts /cm dans le tampon d'électrophorèse MEN 1X en mélangeant le tampon de chacun des réservoirs toutes les 1-2 heures.

Tampon MEN 10 X : acide MorpholinoPropaneSulfonique (MOPS), 200 mM; Acétate d'ammonium, 80 mM; acide tétra-acétique diaminoéthylène (EDTA), 10 mM pH 8,0.

Tampon de Charge : 570 µl de formamide désionisé, 170 µl de formaldéhyde, 150 µl de 10 X MEN et 8 µl de bromure d'éthidium (BET).

III.3.1.6- Purification de fragments d'ADN sur gel d'agarose avec le kit "Wizard" (Pharmacia Biotech)

La purification d'ADN double brin est réalisée à partir de fragments de gels d'agarose après migration de produits de PCR à l'aide du kit Wizard (Promega). Cette méthode permet d'éliminer les contaminants de PCR, tels que les amorces, les produits d'amplification aspécifiques ou encore le tampon de l'ADN polymérase, par fixation du produit de PCR sur une résine de purification. L'ADN fixé est ensuite lavé et élué dans de l'eau ou du TE.

III.4- TECHNIQUE D'HYBRIDATION DES ACIDES NUCLEIQUES

III.4.1- Marquage radioactif d'une sonde ADN par amorçage aléatoire ("Random Priming")

Les sondes ADN radioactives utilisées pour les Southern ou les Northern blots sont marquées à l'aide des kits "Ready to Go" (Pharmacia Biotech, Uppsala) ou "Ready prime" (Amersham Life Science France, Les Ulis). Ces kits sont basés sur le principe du marquage aléatoire de fragments

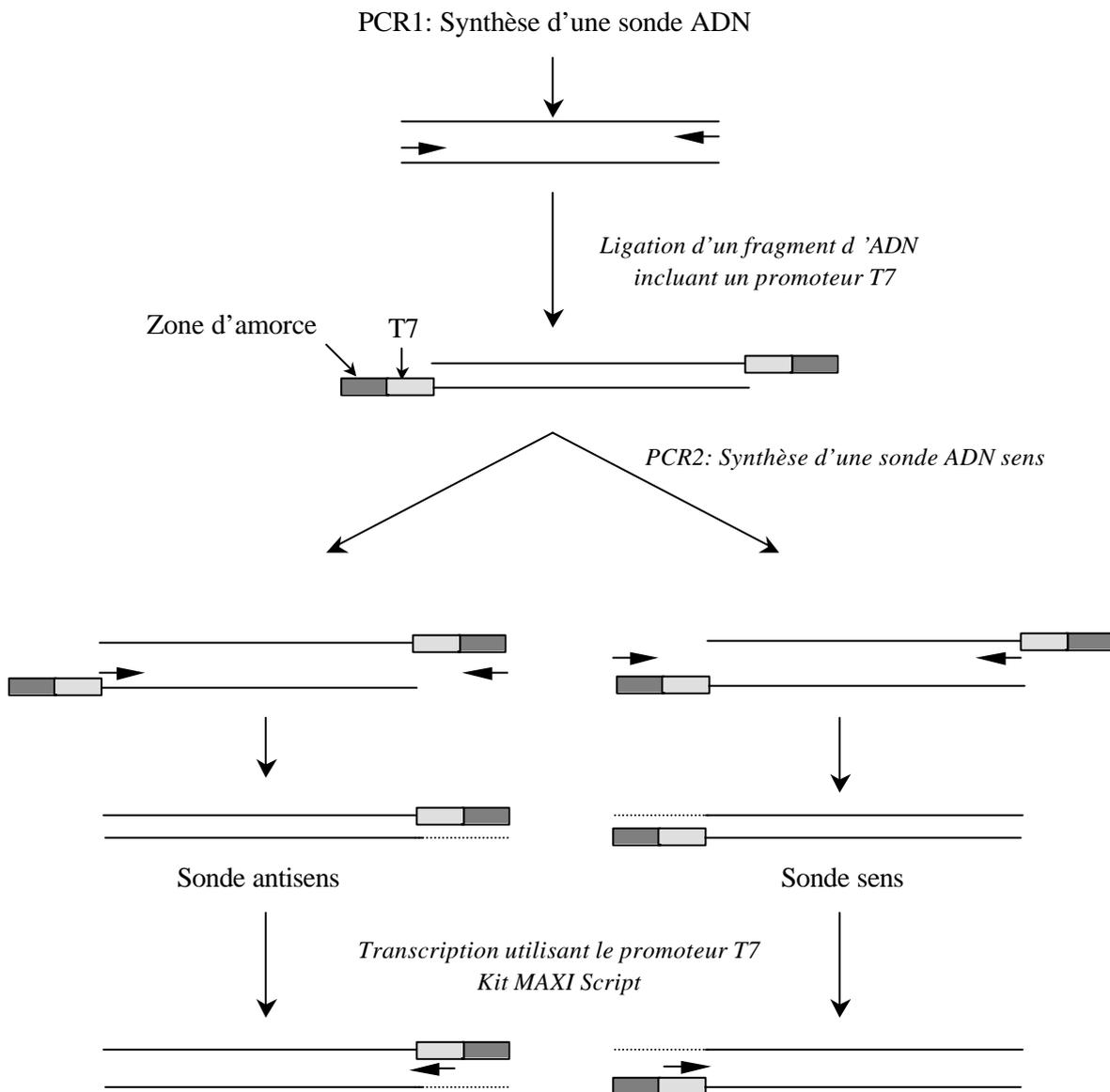


Fig. 32 : Synthèses d'une sonde ARN pour Northern blot ou protection RNase

d'ADN. Après dénaturation du fragment à 95 °C, des hexasnucléotides de synthèse vont s'hybrider à l'ADN monocaténaire et servir d'amorces pour l'enzyme Klenow. Cette dernière synthétise le brin complémentaire de l'ADN matrice grâce à son activité polymérasique 5'-3'. La présence de 50 µCi de [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol) dans le milieu réactionnel permet l'obtention de brins néosynthétisés radioactifs. Les nucléotides libres peuvent ensuite être éliminés par passage sur une colonne Sephadex S-200 (Pharmacia Biotech, Uppsala). Cette dernière étape de purification est facultative mais permet de réduire le bruit de fond des hybridations de façon conséquente.

III.4.2- Marquage radioactif d'une sonde ARN

L'utilisation de sondes ARN présente un certain nombre d'avantages par rapport aux sondes ADN pour la détection de transcrits par Northern blot. En effet, cette méthode est particulièrement efficace pour la mise en évidence d'ARNm faiblement exprimés car elle permet d'augmenter la sensibilité de détection. Par ailleurs, la température d'hybridation peut être élevée de 42 °C pour les sondes ADN à plus de 60 °C avec une sonde ARN, augmentant ainsi la spécificité d'hybridation. Le bruit de fond est fortement réduit dans ces conditions et les signaux obtenus sont plus intenses et plus fins qu'avec une sonde ADN.

La synthèse des sondes ARN a été réalisée à l'aide de 2 kits (AMBION ; cf. Fig. 32) : le kit Lig'n Scrib permet la ligation d'un fragment d'ADN comprenant un promoteur T7 de par et d'autre d'un produit de PCR. L'amplification par PCR de ce fragment en utilisant l'amorce en 3' du brin codant du produit de PCR et une amorce située sur le fragment d'ADN ligué permet de synthétiser une sonde ADN antisens. Le kit MAXIScript permet ensuite la transcription de cette sonde en utilisant le promoteur T7, de façon à synthétiser une sonde ARN simple brin.

III.4.3- Southern blot

Les ADN sont digérés par différentes enzymes de restriction selon les instructions des fabricants (Amersham France SA or Eurogentec France SA). Des enzymes de deux fournisseurs sont utilisées car certaines enzymes présentent une différence d'efficacité sur l'ADN de *Prochlorococcus*. Les ADN sont ensuite séparés selon leur taille sur gel d'agarose (0,8 % m/v) à faible voltage (1-2 volts/cm). Après migration, le gel est placé 30 min sous agitation dans une solution de dénaturation et les ADN sont transférés par capillarité sur membrane de nitrocellulose (Hybond N+, Genescreen Plus, Dupont NEN) par transfert alcalin.

La préhybridation et l'hybridation sont réalisées dans le tampon d'hybridation Church (Church and Gilbert 1984) à 61 °C pour les sondes homologues et 50 °C pour les sondes hétérologues. La membrane est ensuite lavée 3 fois 10 min. à température d'hybridation dans des bains de stringence

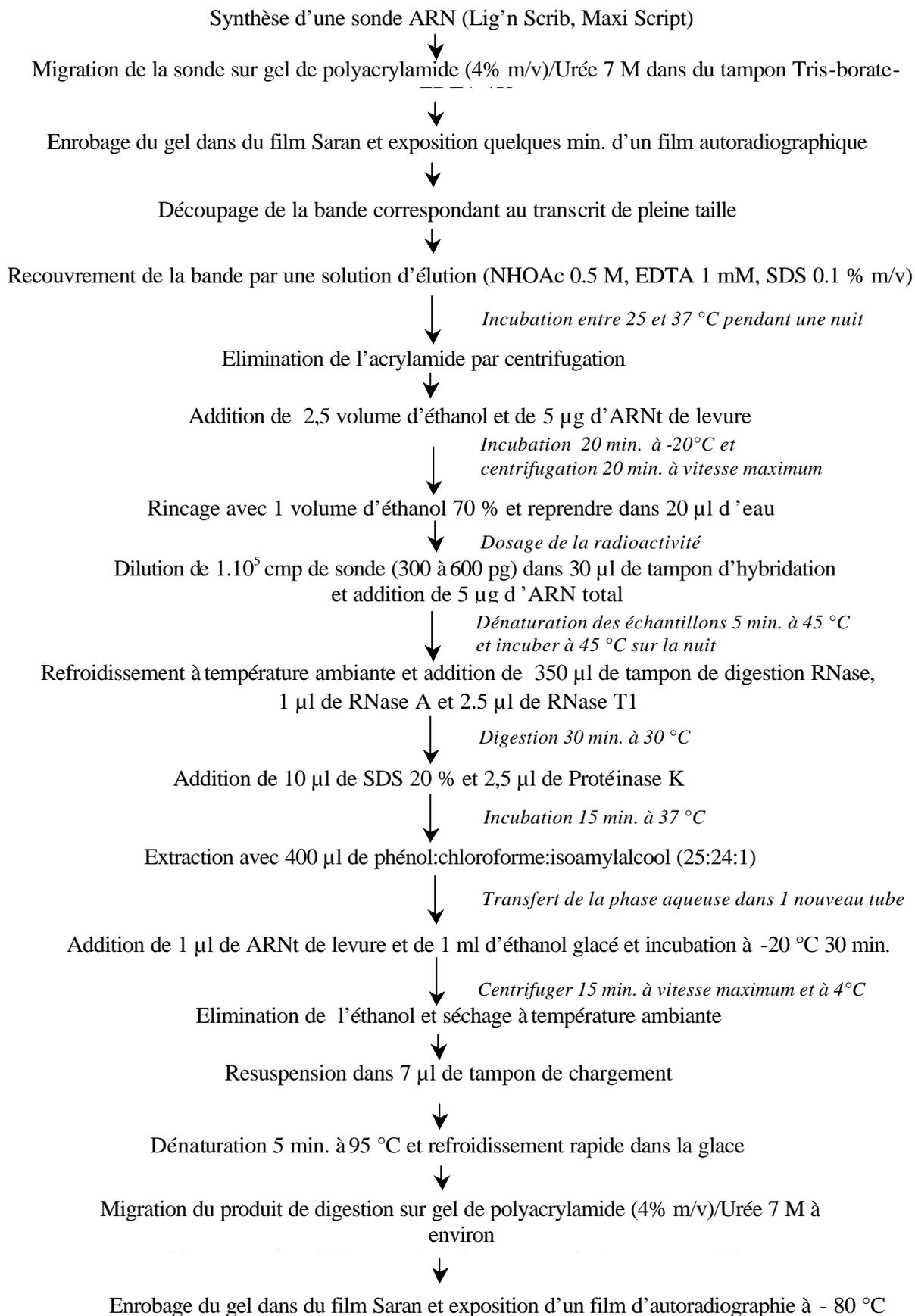


Fig. 33 : Analyse des ARN par protection RNase

croissante (Solution de lavage 1 à 3) afin d'éliminer les hybridations de faible homologie. Seules les deux premières solutions sont utilisées pour les hybridations en conditions hétérologues. La détection est effectuée en utilisant un PhosphorImager Storm (Molecular Dynamics).

Solution de dénaturation : NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M.

Solution de transfert : NaCl 1,5 M, NaOH 0,25 M.

SSC 20X : NaCl 3 M ; Citrate trisodique 0,3 M.

Tampon d'hybridation Church ADN : Na [PO₄] pH 7,2 250 mM ; EDTA 1mM ; SDS 7 % m/v.

Solution de lavage 1 : SSC 2X ; SDS 1 % m/v.

Solution de lavage 2 : SSC 1X ; SDS 0,5 % m/v.

Solution de lavage 3 : SSC 0,1 X ; SDS 0,1 % m/v.

III.4.4- Northern blot

Les ARN sont séparés selon leur taille sur gel d'agarose dénaturant comme précédemment décrit. Après migration, le transfert des ARN sur membrane s'effectue dans les mêmes conditions que le Southern blot mais en utilisant un tampon de transfert spécifique. Suivant les conseils du guide Promega, lorsque le gel présente une épaisseur supérieure à 5 mm ou pour faciliter le transfert des ARN supérieurs à 2,5 kb, les ARN sont partiellement hydrolysés avant le transfert. Pour cela, le gel est placé sous agitation dans une solution NaOH 0,05 N puis lavé 45 min. dans du 20 X SSC. La préhybridation et l'hybridation sont effectuées dans une solution de Church adaptée à l'ARN, qui possède un très fort degré de stringence (Church and Gilbert 1984). L'hybridation est réalisée à 42 °C pour une sonde ADN et jusqu'à 62-63 °C pour une sonde ARN spécifique. Comme pour le Southern blot, les membranes sont lavées uniquement avec les deux premières solutions de lavage dans le cas d'une hybridation de faible stringence (sonde ADN ou hybridation aspécifique).

Tampon d'hybridation Church ARN : formamide désionisé, 50 % v/v ; SDS, 7 % m/v ; NaCl, 250 mM ; Na [PO₄] pH 7,2, 120 mM.

Tampon de transfert : 20 X SSC ; NaCl, 3M ; Citrate disodique, 0,3 M.

Solution de lavage 1 : SSC 2X ; SDS 0,5 % m/v

Solution de lavage 2 : SSC 1X ; SDS 0,2 % m/v

Solution de lavage 3 : SSC 0,2 X ; SDS 0,1 % m/v

III.4.5- Méthode de protection à la RNase ("R.P.A.")

La protection à la RNase est une méthode de détection des transcrits pour laquelle l'hybridation sonde ARN-ARNm s'effectue en milieu liquide (cf. Fig. 33). Ces expériences ont été réalisées en utilisant le kit de Protection à la RNase de Boehringer. Après hybridation, les ARN simple brin restant sont digérés par l'action conjuguée de deux RNases (RNase A, RNase T1). Les ARN

Solution de stockage des phages :

SM : NaCl 100 mM ; MgSO₄, 4 H₂O, 8 mM ; Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5 ; gélatine, 0,01 % m/v

Milieu de culture liquide :

Luria-Bertani (LB) : bactotryptone 1 % m/v; bacto-yeast extract 0,5 % m/v; NaCl 170 mM

Milieu de culture solide :

LB solide : LB + "bact-agar" 1,5 %

Top agarose : LB + agarose 0,7 %

Antibiotique :

Ampicilline : Solution stock à 40 mg/ml. Cet antibiotique est utilisé à 40 µg/ml pour les cultures

Autres :

IPTG : Isopropylthio-β-D-galactoside : Solution stock à 100 mM, utilisée à environ 40 µl/ boîte de pétri.

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside : Solution stock 40 mg/ml, environ 40 µl/boîte de pétri.

Fig. 34 : Solutions et milieux utilisés pour la bactériologie

double brin correspondant aux transcrits détectés sont ensuite visualisés par migration sur gel de polyacrylamide et autoradiographie. Cette méthode présente un certain nombre d'avantages par rapport aux Northern blots classiques. En effet, elle permet de détecter des transcrits très faiblement exprimés et de s'assurer que le signal obtenu n'est pas biaisé par d'éventuelles contaminations ou par des hybridations aspécifiques. De par l'utilisation de deux RNases qui présentent une action complémentaire, le mésappariement d'une seule ou de deux paire(s) de bases suffit à ce que le transcrit double brin soit digéré par les RNases au niveau de cette mutation. En effet, la RNase A digère l'ARN simple brin après les nucléotides G et C et la RNase T1 après les T.

De façon à vérifier que la digestion est bien complète et stable, plusieurs contrôles sont réalisés pour chaque échantillon :

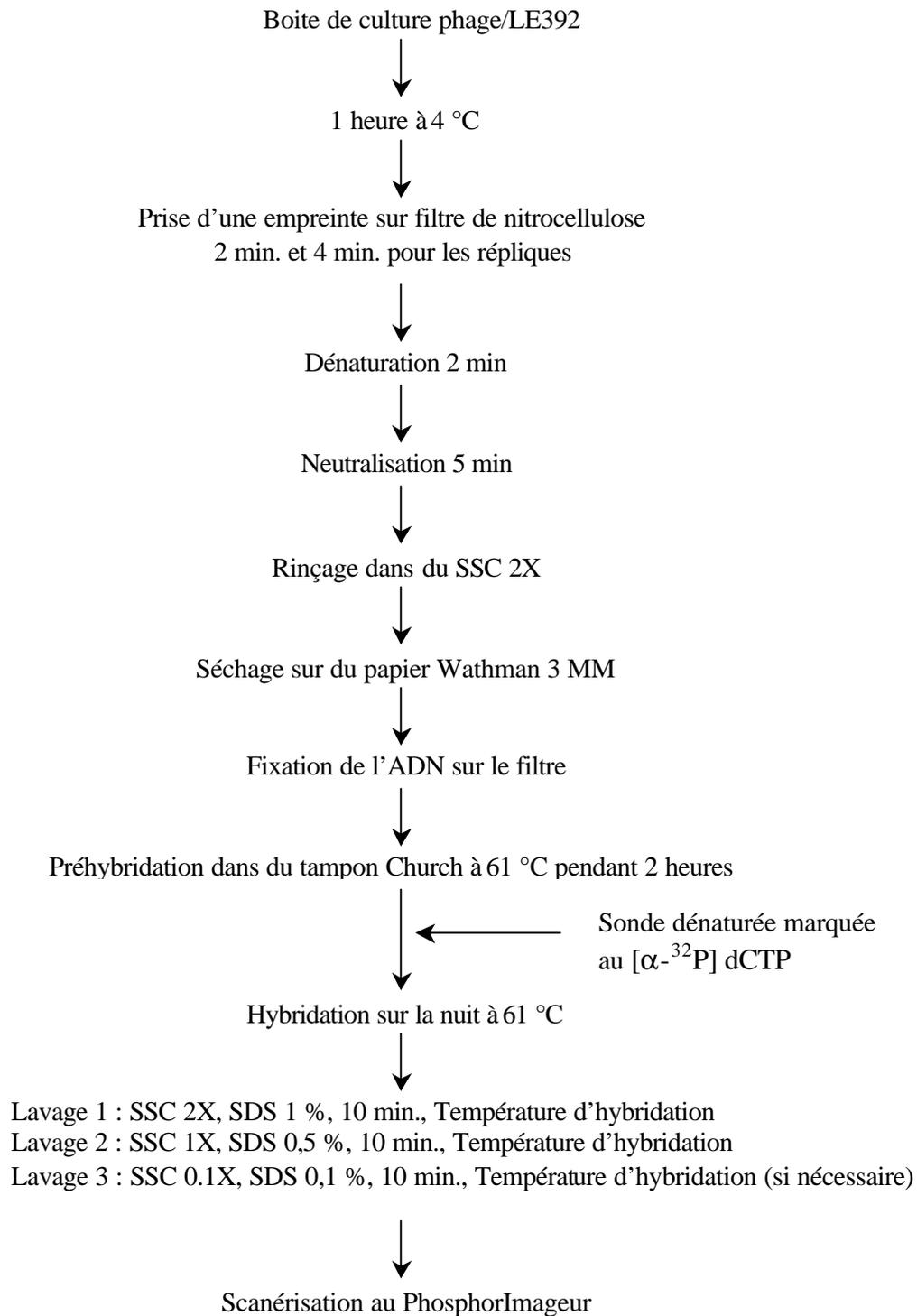
- une digestion par la RNase A
- une digestion par la RNase T1
- une digestion par la RNase A + RNase T1 en divisant par 2 les quantités des deux RNases
- une digestion par la RNase A + RNase T1 en multipliant par 2 les quantités des deux RNases

D'autres contrôles peuvent également être réalisés :

- le dépôt de la sonde non hybridée permet de vérifier que la partie correspondant au promoteur T7 a bien été digérée. On observe alors une différence de 50 à 70 pb par rapport à l'échantillon
- l'hybridation de la sonde avec de l'ARNt de levure permet de vérifier qu'il n'y a pas d'autoprotection de la sonde et que s'il y a hybridation partielle avec l'ARNt, le produit est bien digéré par les RNases
- enfin, une hybridation de la sonde avec un transcrit sens non marqué permet de contrôler la taille de l'ARN double brin et de vérifier si les bandes de taille inférieure au transcrit complet correspondent à des hybridations aspécifiques ou à des produits de dégradation de la sonde.

III.4.6- Criblage d'une banque phagique

Afin d'obtenir les séquences complètes de gènes préalablement amplifiés par PCR, nous avons criblé la banque génomique de *Prochlorococcus* SS120 établie dans le vecteur phagique λ GEM-12 (Promega). Les différents milieux et solutions utilisés en bactériologie sont présentés sur la figure 34.



Solution de dénaturation : NaOH 0,5 M ; NaCl 1,5 M

Solution de neutralisation : NaOH 1,5 M ; Tris-HCl 0,5 M

SSC 20 X : NaCl 3 M ; citrate trisodique 3M

Tampon d'hybridation Church : Na [PO₄] pH 7,2 250 mM ; EDTA 1mM ; SDS 7 %.

Fig. 35 : Criblage d'une banque de phages

III.4.6.1- Préparation de bactéries compétentes

Des bactéries permissives (souche LE392, Promega) sont cultivées dans du milieu liquide Luria-Bertani (LB) additionné de 0,2 % m/v de maltose. Le maltose permet d'induire l'opéron maltose qui contient le gène *lamB* codant le récepteur du bactériophage λ . La culture est prélevée en phase exponentielle de croissance lorsque la DO est voisine de 0,5. Les cellules sont alors centrifugées à $4\ 000 \times g$ pendant 10 min. à température ambiante et le culot est repris dans une solution de $MgSO_4$ 10 mM de façon à obtenir une DO de 2. Cette solution de stockage permet d'augmenter la perméabilité membranaire et de faciliter l'infection des bactéries par les phages. A ce stade, les bactéries peuvent être conservées une semaine à 4 °C.

III.4.6.2- Titration de la banque de phages

Des dilutions appropriées de la banque de phages (de 10^1 à 10^7 fois) sont mises en contact avec des bactéries LE392 rendues compétentes. Après incubation 30 min. à 37 °C, les mélanges phages/bactéries sont additionnés de Top-agarose maintenu liquide à 42 °C et le tout est coulé sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB solide préchauffées à 37 °C. Après une nuit à 37 °C, les plages issues de la lyse des bactéries par les phages sont comptées.

III.4.6.3- Criblage de la banque de phages

Les différentes étapes du criblage sont schématisées sur la figure 35. Différentes dilutions des phages (1 000, 5 000 et 10 000) sont mises en contact avec les bactéries compétentes LE392 et étalées en Top agarose sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB. Après une nuit d'incubation à 37 °C, les boîtes sont placées 1 h à 4 °C pour solidifier le Top-agarose. L'ADN phagique est ensuite transféré sur filtre de nitrocellulose ("Magna Lift", Micron Separation Inc.) par simple contact. Deux répliquats par boîte sont réalisés et la position des filtres sur la boîte est repérée très précisément. Après dénaturation, neutralisation et rinçage dans du 2 X SSC, l'ADN est fixé sur le filtre par la chaleur (2 heures à 80 °C). Les étapes suivantes (hybridation, rinçage et autoradiographie) sont réalisées de la même façon que la technique de Southern blot décrite au paragraphe III.4.3. Les clones positifs sont identifiés par comparaison des "spots" de radioactivité et des plages de lyse sur les boîtes. Ces plages de lyse positives sont alors isolées à l'aide d'une pipette Pasteur et placées dans du tampon SM pour remettre en suspension les phages en vue d'un second et d'un troisième criblage jusqu'à l'obtention d'une plage de lyse parfaitement isolée.

III.5- SEQUENÇAGE

III.5.1- Clonage du produit de PCR

Les produits de PCR destinés à être séquencés sont tout d'abord clonés en utilisant un kit de clonage (TOPO TA Cloning, Invitrogen). L'intérêt de ce kit est de fournir un vecteur présentant des T sortant en 3' (PCR-TOPO), ce qui permet une ligation directe des produits de PCR en 5 min. Ce vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline, pour sélectionner les bactéries ayant incorporé le vecteur, et un segment de l'opéron lactose d'*E. coli* codant pour la partie amino-terminale de la β -galactosidase, afin de sélectionner les clones bactériens, contenant un vecteur avec un fragment d'ADN inséré. Plusieurs colonies positives sont ensuite prélevées et remises en culture en milieu liquide, afin de réaliser un mini-préparation de plasmide (cf. section III.1.2-Extraction d'ADN plasmidique).

III.5.2- Réaction de séquence

Les réactions de séquence sont effectuées avec le kit de séquençage VISTRA pour séquenceur automatique (Amersham, Les Ulis, France), basé sur la technique de terminaison aléatoire de chaînes proposée par Sanger et al. (1977). Les amorces utilisées sont les amorces universelles du plasmide situées de par et d'autre du site de ligation (T7 et M13) ou des amorces internes au fragment cloné qui sont marquées au moyen d'un fluorochrome (Texas Red). Dans certains cas, le séquençage a été réalisé directement sur de l'ADN phagique en utilisant 15 à 30 fmol du fragment à séquencer. L'enzyme utilisée est l'ADN polymérase thermoséquenase qui synthétise un nouveau brin d'ADN jusqu'à l'incorporation aléatoire d'un didéoxynucléoside triphosphate (ddNTP) qui stoppe l'élongation. Les ADN synthétisés sont séparés sur gel de polyacrylamide 6% m/v -Urée 7 M (cf. section III.3.1.4-Analyse des réactions de séquence sur gel de polyacrylamide).

Pour chacun des gènes utilisés en phylogénie, le séquençage a été réalisé dans les deux sens et un minimum de trois clones a été séquencé de façon à détecter les erreurs éventuelles de l'ADN polymérase lors de la PCR.

III.6- ALIGNEMENT ET ANALYSE PHYLOGENETIQUE DE SEQUENCES

Les séquences ont été alignées en utilisant le programme PILEUP du logiciel GCG (Wisconsin Package, version 8, Genetics Computer Group, Madison, Wis.), suivi d'un affinement manuel de l'alignement par les programmes GDE (Smith et al. 1992) et Seaview (Galtier et al. 1996). Les données structurales obtenues par analyse de groupes hydrophobes (HCA, cf. section suivante) ont également été utilisées pour optimiser les alignements.

Les analyses phylogénétiques sont réalisées à partir des séquences protéiques en utilisant les programmes PHYLIP (v.3,57c, Felsenstein 1993) et Phylo_win (Galtier et al. 1996) à l'aide de 2 méthodes d'analyse : **l'analyse des distances** est fondée sur un critère de similitudes sans établir de relation d'ancestralité entre les séquences (méthode phénétique). Les distances ont été calculées selon l'algorithme de Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987) qui est le plus couramment utilisé. La seconde méthode utilisée est le **maximum de parcimonie** qui consiste à minimiser le nombre de mutations pour passer d'une séquence à une autre. Un site est informatif pour la parcimonie s'il comporte au moins deux états et si chacun d'eux est partagé par au moins deux espèces. Le nœud qui relie deux séquences est une séquence commune ou ancestrale (Fitch 1971). On considère que l'analyse phylogénétique est solide lorsque les arbres obtenus par les trois méthodes sont concordants. La robustesse relative des arbres obtenus avec les deux premières analyses a été testée par la méthode bootstrap (Felsenstein 1985) qui représente un tirage aléatoire de sites (emplacement d'un acide aminé dans une séquence) avec remise. Cette analyse utilise le programme "seqboot" de PHYLIP à partir de 500 répétitions. Seules les valeurs supérieures à 60 % ont été reportées sur les arbres.

IV- ANALYSES STRUCTURALES DES SEQUENCES PROTEIQUES

IV.1- PRINCIPE DE L'ANALYSE DE GROUPES HYDROPHOBES ("HCA")

L'analyse de groupes hydrophobes (HCA) est une méthode de prédiction des structures secondaires des protéines basée sur les fondements du repliement des protéines, à savoir une partition entre un cœur hydrophobe et une surface hydrophile (Callebaut et al. 1997, Lemesle-Varloot et al. 1990). De ce fait, elle permet d'aligner des séquences protéiques présentant de très faibles identités (25-30 %). A ce stade, les méthodes classiques d'alignement, basées uniquement sur la maximisation de scores d'identité ou de similitude, sont inefficaces car elles ne peuvent distinguer le bruit de fond de l'information structurale.

IV.1.1- La représentation HCA

Afin de rapprocher les acides aminés qui sont en contact dans la structure 3D de la protéine, les séquences sont représentées sur un support hélicoïdal (Fig. 36). Le cylindre ainsi élaboré est mis à plat et dupliqué de façon à restaurer les connections de chacun des acides aminés. On constate ainsi que les acides aminés hydrophobes ne sont pas distribués au hasard mais tendent à se regrouper en amas qui correspondent le plus souvent aux faces internes des éléments de structure secondaire hélice α et brin β . La mise en évidence des amas hydrophobes est réalisée automatiquement par le logiciel

DRAWHCA (accessible à <http://www.lmcp.jussieu.fr/~soyer/www-hca/hca-form.html>). Deux acides aminés hydrophobes seront considérés comme appartenant au même amas s'ils sont séparés par une proline ou au moins 4 résidus non hydrophobes.

IV.1.2- Interprétation des diagrammes

La méthode HCA repose essentiellement sur l'analyse visuelle des diagrammes par un expert, la reconnaissance des formes étant difficile à automatiser. Plusieurs arguments sont utilisés pour interpréter ces diagrammes.

La forme de l'amas hydrophobe est en général liée à la nature de la structure secondaire. Ainsi, un amas de type vertical, donc court dans le sens de la progression de la chaîne polypeptidique, est souvent représentatif de brin β , à l'opposé d'amas horizontaux correspondant plutôt à des hélices. Par ailleurs, en s'appuyant sur les protéines connues, les 21 acides aminés ont été classifiés en fonction de leur tendance à se situer dans des hélices α , dans des feuilletts β ou dans des boucles. Ces résidus ont ainsi été séparés en trois classes principales :

- V, I, L, F, M, Y et W correspondent aux acides aminés qui ont la plus forte propension à être observés dans des hélices α ou dans des feuilletts β
- P, G, D, N et S sont les résidus principalement trouvés dans les boucles
- la dernière catégorie comprend les acides aminés qui possèdent des propriétés intermédiaires.

Cependant, les acides aminés hydrophobes n'ont pas tous des comportements équivalents. Ainsi le "poids" attribué à des amas à forte propension hydrophobe (V, I, L, F) peut être parfois plus important. La tyrosine (Y), à tendance hydrophobe marquée, se trouve fréquemment dans les boucles. En plus des hydrophobes "par défaut", A, C, G, T et S peuvent également s'accommoder d'environnements hydrophobes, bien que pouvant aussi être exposés aux solvants. De même, des résidus tels que R ou K, bien que chargés, possèdent une longue chaîne aliphatique qui peut remplacer une chaîne hydrophobe (par exemple une leucine) pourvu que leur charge soit exposée au solvant ou neutralisée. H peut également substituer des acides aminés à caractère aromatique tel que Y ou F. L'hydrophobicité de certains résidus doit donc être réévaluée par l'opérateur en fonction du contexte, de l'hypothèse d'alignement et des informations issues des différents représentant de la famille.

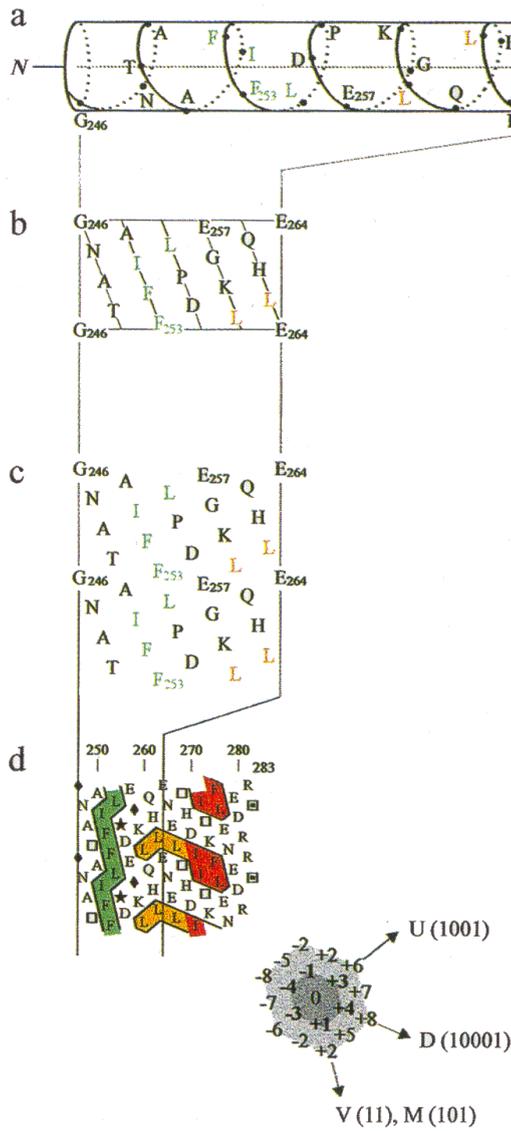
human α 1 antitrypsin

1D

```

246 ...GNATAIIFFLPDEGKLQHLLENELTHDIIITKFLNEDRRS... 283
...◆NA□AIFFL★DEGKLQHLLENEL□HDII□KFLNEDRR□...
...000001111100000100100010001100110000000...
    
```

2D



3D

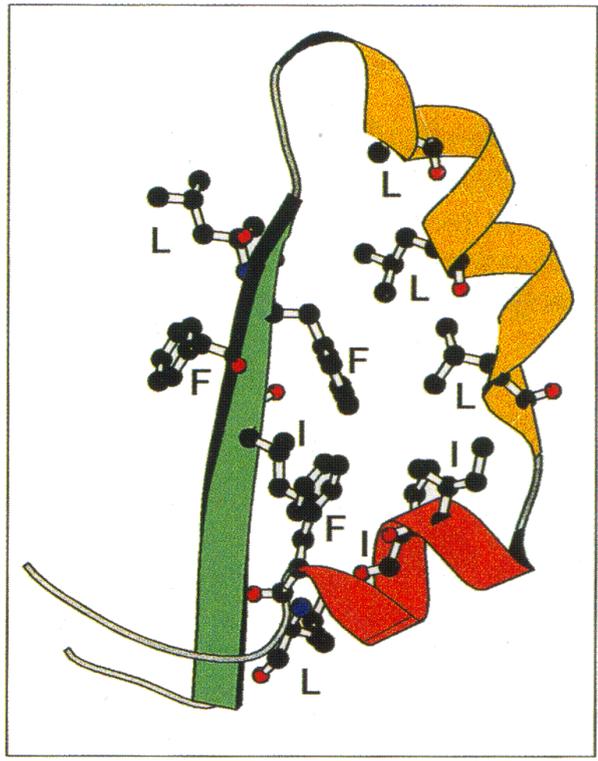


Fig. 36 : Principe de la méthode d'analyse de clusters Hydrophobes (HCA, Callebaut et al., 1997)

IV.1.3- Intérêt de l'HCA dans l'alignement de séquences primaires

Le processus d'alignement de séquences par HCA met en jeu des informations qui ne se limitent pas à la similitude de forme entre les amas. Dans un premier temps, la méthode permet de détecter des points d'ancrage potentiels ou des zones critiques pour le repliement de la protéine. Ces amas forts sont en général bien conservés dans toute la famille et fixent le cadre de l'alignement en focalisant la recherche de similitude autour de ces points d'ancrage. Ces hypothèses sont ensuite confirmées ou réfutées en fonction d'autres informations telles que l'identité de séquence à l'intérieur et en dehors des amas, la conservation de résidus "fonctionnels" ou encore la compatibilité structurale lorsqu'une structure expérimentale existe. L'HCA est donc certainement l'une des approches les plus sensibles pour détecter, à partir des seules séquences, des parentés entre protéines ayant fortement divergé au cours de l'évolution. Cette méthode est particulièrement efficace pour déterminer, au sein d'une même famille de protéines, des duplications ou n-plications de gènes, comme cela a été utilisé au cours du chapitre VI.

* * * * *

CHAPITRE III

LE PHOTOSYSTEME I

LE PHOTOSYSTEME I

I- INTRODUCTION

A l'inverse des nombreuses études concernant les protéines du PS II, les gènes et les protéines du PS I sont encore assez peu connus et la fonction de plusieurs protéines demeure obscure ou controversée (Chitnis 1996). Une caractéristique surprenante de ce photosystème est que les protéines qui le constituent sont renouvelées à un taux considérablement plus faible que celles du PS II. Cette stabilité du PS I est probablement due à l'organisation structurale de ce complexe. En effet, la chaîne de transfert des électrons dans le PS I est entourée par un mur d'hélices transmembranaires qui est lui-même capitonné par de petites sous-unités hydrophobes (Chitnis 1996). Cette nature stable du PS I semble avoir joué un rôle crucial dans l'évolution de ce complexe. Ainsi, la structure primaire des protéines individuelles du PS I et les mécanismes impliqués dans sa fonction sont remarquablement conservés parmi les cyanobactéries, les algues vertes et les plantes supérieures. Dans ce contexte, il nous a paru intéressant d'étudier ce complexe chez *Prochlorococcus*, dont le génome semble avoir évolué très rapidement à partir de son ancêtre cyanobactérien. De plus, la composition protéique de ce photosystème pourrait être impliquée dans les capacités d'adaptation lumineuse étonnantes de cet organisme.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication parue dans *Photosynthesis Research*. Le résumé qui suit inclut également des résultats obtenus lors de travaux complémentaires dont l'auteur principal est Georg van der Staay. Le texte des publications correspondantes est disponible en annexes II et III.

van der Staay, G. W. M, Moon-van der Staay S. Y., Garczarek, L., Partensky, F. Characterization of the photosystem I subunits PsaI and PsaL from two strains of the marine oxyphototrophic prokaryote *Prochlorococcus*. *Photosynthesis Research* 57: 183-181.

van der Staay, G. W.M., Moon-van der Staay, S. Y., Garczarek L. and Partensky F. Rapid evolutionary divergence of photosystem I core subunits PsaA and PsaB in marine prokaryotes. *Soumis à Photosynthesis Research*.

II- RESUME DES RESULTATS

Les complexes du photosystème I de deux souches de *Prochlorococcus*, MED4 (= clone CCMP 1378) et SS120 (= clone CCMP 1375) ont été isolés par centrifugation sur gradient de saccharose après traitement par des détergents. Les fractions enrichies en PS I des deux souches contiennent environ 100 molécules de Chl par P700 et les analyses par microscopie électronique montrent que les complexes du PS I sont sous forme trimérique. L'émission de fluorescence à 77 °K à haute longueur d'onde, caractéristique du PS I des chloroplastes et de la plupart des cyanobactéries, est absente dans les cellules intactes, ainsi que dans les préparations de PS I des deux souches. Les deux protéines majeures des fractions enrichies en PS I ont tout d'abord été identifiées par détection immunologique comme étant PsaA et PsaB, puis séquencées chez les souches MED4 et SS120 de *Prochlorococcus* et chez *Synechococcus* WH7803. La divergence des séquences par rapport à celles des cyanobactéries d'eau douce est remarquablement élevée, si l'on considère la très forte conservation de ces protéines chez les organismes oxyphototrophes. En particulier, le PsaA de ces procaryotes marins montre plusieurs insertions et délétions spécifiques par rapport aux séquences connues de PsaA. De même, le pourcentage d'identité de séquence entre les deux souches de *Prochlorococcus* est seulement de 80,2% et 88,9% respectivement pour PsaA et PsaB. En revanche, les séquences protéiques de la protéine D2 du centre réactionnel du PS II sont beaucoup plus conservées entre les deux souches de *Prochlorococcus*.

Par ailleurs, bien que chez les souches MED4 et SS120 la majeure partie de la Chl b_2 soit associée aux complexes antennaires majeurs, une quantité importante de ce pigment est aussi trouvée dans des fractions de photosystème I (PS I). Cela suggère que la Chl b_2 est soit associée à des complexes protéiques mineurs tant la Chl spécifiques du PS I, soit au centre réactionnel lui-même. Les deux hypothèses impliquent une organisation inhabituelle du PS I de *Prochlorococcus* par rapport aux autres phototrophes puisque: i) les cyanobactéries n'ont pas d'antenne spécifique du PS I ; et ii) chez tous les organismes étudiés à ce jour, le centre réactionnel du PS I ne fixe pas de Chl b . De plus, deux protéines de 21 et 25 kDa mises en évidence dans les fractions enrichies en PS I ne possèdent aucun équivalent en taille chez les cyanobactéries. Du fait de leurs masses moléculaires atypiques, on a tout d'abord pensé que ces protéines pourraient constituer des antennes associées spécifiquement au PS I. Cependant, la protéine de 25 kDa est fortement reconnue par un anticorps hétérologue dirigé contre PsaL alors que celle de 21 kDa a été identifiée comme PsaF par microséquençage. Les données de séquençage montrent que la taille anormale de PsaL, comparée aux molécules équivalentes connues chez les autres phototrophes, est due à une extension N-terminale de cette molécule. Comme chez la plupart des cyanobactéries, le gène *psaL* est en opéron avec le gène *psaI* localisé en amont et les deux gènes sont co-transcrits. Chez les cyanobactéries, le complexe PsaL-PsaI est impliqué dans la formation ou la stabilisation des trimères de PS I (Golbeck, 1994). La présence de tels trimères chez

Prochlorococcus suggère que, malgré sa longueur anormale, la protéine PsaL de *Prochlorococcus* et la protéine qui lui est associée, PsaI doivent avoir une fonction similaire. La fonction de PsaF, qui forme également un complexe avec une autre protéine co-transcrite, PsaJ, n'est pas encore clairement établie chez les cyanobactéries et a fortiori chez *Prochlorococcus*. Cependant, il a été suggéré que le complexe PsaF-PsaJ interviendrait dans la liaison de donneurs chargés négativement, tels que la plastocyanine (Golbeck, 1994). Des études génétiques seraient nécessaires pour savoir si ces modifications des protéines du PS I ont des conséquences sur l'organisation et la fonction de ce photosystème.

CHAPITRE IV

L'ANTENNE MAJEURE A CHL A/B

L'ANTENNE MAJEURE A CHL A/B

I- INTRODUCTION

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'antenne majeure de *Prochlorococcus* dans le but d'utiliser le gène *pcb* comme marqueur génétique de la diversité de ce procaryote marin. Une étude préalable avait déterminé la présence d'une seule copie de ce gène chez les souches MED4 et SS120 de *Prochlorococcus* et montré une variabilité inter-souches importante (LaRoche et al. 1996). De plus, les cyanobactéries marines du genre *Synechococcus* ne semblent pas posséder le gène équivalent au gène *pcb* présent chez les cyanobactéries d'eau douce (*isiA*) et les autres cyanobactéries à Chl *b* (*Prochloron* et *Prochlorothrix*) qui occupent des niches écologiques très différentes. Le gène *pcb* semblait donc constituer un marqueur spécifique de *Prochlorococcus* et donc un très bon candidat pour estimer la diversité des populations naturelles de ce micro-organisme. Cependant, le séquençage du *pcb* dans plusieurs souches du laboratoire a montré la présence de copies multiples chez certaines d'entre elles, ce qui réduit considérablement ses potentialités en tant que marqueur génétique par des techniques classiques d'analyse de la diversité.

Toutefois, la multiplication de ce gène apparaît particulièrement intéressante du point de vue de l'adaptation aux conditions lumineuses variées auxquelles sont soumises les différentes souches de *Prochlorococcus* dans le milieu naturel. En effet, l'un des éléments majeurs différenciant les écotypes de surface et de profondeur est le rapport DV-Chl *a/b*. Alors que plusieurs protéines de l'appareil photosynthétique sont susceptibles de lier la Chl *a*, l'essentiel de la Chl *b* se situe au niveau de l'antenne collectrice chez les organismes oxyphototrophes. Les différences structurales les plus importantes entre les écotypes de haute et de basse lumière doivent donc se situer au niveau de ce complexe. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié ce gène dans plusieurs souches de laboratoire présentant des rapports Chl *a/b* variés.

Ce chapitre est présenté sous la forme de deux articles, l'un publié dans *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* et le second en préparation avancée.

II- RESUME DES RESULTATS ARTICLE 2

Deux écotypes du procaryote *Prochlorococcus* adaptés à des niches lumineuses distinctes dans l'océan ont récemment été décrits. Ces écotypes présentent des rapports (DV-) chlorophylle (Chl) *a* sur Chl *b*, des signatures génétiques (gène de l'ARN 16S), ainsi que des optima lumineux de

croissance et de photosynthèse différents (Moore et al. 1998). Cependant, les bases moléculaires de ces différences physiologiques étaient restées jusqu'alors inexplicées. Cette étude montre que la souche SS120, qui est typiquement un écotype de basse lumière, possède 7 copies du gène *pcb* codant pour l'antenne majeure à Chl *a/b*. En revanche, *Prochlorococcus* sp. MED4, qui est un écotype de forte lumière, possède une seule copie du gène *pcb*. L'examen de deux autres souches, NATL2a et TAK9803-2, un écotype de basse et de forte lumière respectivement, a permis de vérifier que ce phénomène de différenciation du nombre de *pcb* est généralisable. Dans l'article suivant, nous avons étendu l'étude du nombre de *pcb* à deux autres écotypes de forte lumière (GP2 et SB) qui, eux aussi, ne possèdent qu'un seul gène d'antenne. La multiplication des gènes *pcb* semble donc être un facteur clé dans la capacité des populations de *Prochlorococcus* à survivre en profondeur dans des conditions de flux de photons extrêmement faibles.

III- RESUME DES RESULTATS ARTICLE 3

Contrairement aux cyanobactéries typiques, le procaryote *Prochlorococcus* possède une antenne intrinsèque à Chl *a/b* fonctionnellement mais non structuralement analogue à celle des eucaryotes verts phototrophiques. Ces complexes protéines-Chl sont codés par des gènes dont le nombre de copies varie fortement entre les écotypes de *Prochlorococcus*. En effet, les souches adaptées à faible lumière possèdent plusieurs copies du gène *pcb* (5-7), alors qu'une copie unique est présente dans les souches adaptées à forte lumière. Lors de cette étude, nous avons examiné la régulation par la lumière des sept transcrits *pcb* de la souche SS120 de *Prochlorococcus*, cultivée sous différentes conditions de lumière. Bien que toutes les copies de *pcb* soient continuellement exprimées quelle que soit l'intensité lumineuse, le niveau d'accumulation des transcrits varie fortement d'un gène à l'autre. Nous avons également analysé la position phylogénétique de ces gènes par rapport aux autres membres de la famille des protéines-Chl à six hélices α transmembranaires, en prenant en compte plusieurs nouvelles séquences de *pcb* issues de souches de *Prochlorococcus* adaptées aux fortes intensités lumineuses. Ces analyses phylogénétiques suggèrent que les gènes *pcb* ont évolué à des vitesses très différentes dans les deux écotypes de *Prochlorococcus*.

CHAPITRE V

DYNAMIQUE DES GENES PHOTOSYNTHETIQUES

DYNAMIQUE

DES GENES PHOTOSYNTHETIQUES

I- INTRODUCTION

Le mode de régulation de la quantité d'énergie lumineuse absorbée et les mécanismes de photoprotection sont étroitement corrélés au système de capture de la lumière, représentant la partie la plus variable de l'appareil photosynthétique des organismes oxyphototrophes. Ces processus impliquent également les gènes codant pour le centre réactionnel du PS II qui constituent souvent le principal fusible de l'appareil photosynthétique en cas d'excès d'énergie lumineuse. Bien que *Prochlorococcus* soit phylogénétiquement proche des *Synechococcus* marins et colonise des milieux similaires, son antenne principale est de nature totalement différente de celle des phycobilisomes des cyanobactéries et les deux sous-unités majeures du centre réactionnel du PS II sont codées par des copies uniques des gènes *psbA* et *psbD*. Dans ce contexte, il nous a paru intéressant d'étudier la coordination de l'expression de ces gènes dans des conditions reproduisant le cycle jour-nuit auquel sont soumis les souches présentes dans la couche de surface des océans. Cette étude a été réalisée au cours d'un atelier de travail dans le cadre du programme Européen PROMOLEC, permettant ainsi de réaliser sur les mêmes échantillons des analyses de cytométrie en flux, des mesures optiques et des études de l'expression des gènes photosynthétiques et du cycle cellulaire.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication soumise à *Environmental Microbiology*.

II- RESUME DES RESULTATS

L'expression circadienne de gènes photosynthétiques majeurs de la souche PCC 9511 de *Prochlorococcus*, adaptée à de fortes intensités lumineuses, a été analysée au niveau transcriptionnel à partir d'une culture axénique maintenue en condition de cyclostat. Les gènes examinés comprennent le *pcbA*, codant l'antenne majeure, *psbC* codant une protéine de l'antenne du centre du PS II liant la Chl *a* et *psbA* et *psbD*, codant les sous-unités D1 et D2 du centre réactionnel II. Ces gènes sont présents sous forme de copie unique dans le génome de la souche PCC9511, et *psbC* et *psbD* sont organisés en opéron. L'expression de *psbA*, du transcrite monocistronique de *psbD* et du transcrite polycistronique de *psbD/psbC* est fortement corrélée à la variation de l'intensité lumineuse, avec un très faible niveau de transcrite pendant la nuit et un maximum au midi solaire. En revanche, le gène *pcbA* présente une variation bimodale de l'accumulation de ces transcrits avec un maximum en fin de période obscure et un autre avant la fin de la période lumineuse. Ce mode de régulation par la lumière contraste de façon importante avec celui des gènes codant pour l'antenne à Chl *a/b* des chlorophytes.

CHAPITRE VI

ORIGINE EVOLUTIVE DES PROTEINES PIGMENTAIRES

ORIGINE EVOLUTIVE

DES PROTEINES PIGMENTAIRES

I- INTRODUCTION

Durant les 10 dernières années, la recherche des liens évolutifs entre les différentes protéines pigmentaires a énormément progressé et constitue encore un sujet d'actualité. En particulier, l'origine évolutive des complexes antennaires des algues et des plantes supérieures est restée longtemps énigmatique en raison de l'absence de mise en évidence de protéines procaryotiques analogues. La présence d'une antenne spécifique des cyanobactéries à Chl *b* qui, contrairement aux phycobilisomes des cyanobactéries typiques, possède des domaines hydrophobes transmembranaires, a posé la question de sa relation éventuelle avec les Lhcs eucaryotiques. De plus, la présence de protéines induites par des stress aussi bien dans les familles d'antennes procaryotiques (IsiA) qu'eucaryotiques (ELIP) constitue également un lien supplémentaire entre ces familles.

La comparaison des complexes antennaires est rendue difficile de par la petite taille de ces protéines et l'évolution rapide de ces polypeptides entre les différentes lignées évolutives. Ce problème a principalement été abordé par des méthodes d'immunodétection, de comparaison de séquences et d'analyses de structures cristallographiques. Pourtant, les protéines transmembranaires étant difficile à cristalliser, assez peu de structures avec une résolution suffisante sont pour le moment disponibles. Au cours de cette étude, nous avons utilisé l'analyse de clusters hydrophobes (HCA) qui permet d'allier des données structurales aux comparaisons de séquences de ces protéines.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication soumise à *Plant Cell*.

II- RESUME DES RESULTATS

Toutes les protéines liant la chlorophylle de l'appareil photosynthétique des eucaryotes et des procaryotes possèdent des domaines hydrophobes, correspondant aux hélices α transmembranaires (MSHs pour membrane-spanning α helices). Les MSHs constituent les parties les plus conservées des protéines pigmentaires. Ces structures secondaires ont été utilisées à plusieurs reprises pour mettre en évidence une origine évolutive commune entre les différentes protéines constituant les complexes collecteurs de lumière (LHCs) des plantes supérieures et des algues. Des homologies de séquence entre la famille des protéines d'antenne du centre du PS II liant la Chl *a* (6 MSHs) et les six premières hélices du centre réactionnel I (11 MSHs) ont également été mises en évidence. Cependant, aucune relation entre les centres réactionnels et les complexes d'antenne majeurs n'a encore clairement été

démontrée. En permettant d'identifier et de comparer facilement les hélices α des protéines transmembranaires, l'analyse de groupes hydrophobes (HCA) nous a permis de relier la plupart des protéines-Chl connues et de proposer un schéma évolutif global de ces protéines, à partir d'un ancêtre à une MSHs. Deux hypothèses paraissent plausibles quant à l'origine des Lhc à 3 MSHs. Comme précédemment proposé par Green et Pichersky (1994), un précurseur à deux hélices a pu donner lieu à l'antenne eucaryotique par duplication et perte sélective d'une des hélices. D'autre part, la découverte dans le génome de *Prochlorococcus* MED4 d'un groupe de gènes similaires aux protéines procaryotiques induites par un stress lumineux (HLIP) suggère un scénario alternatif. En effet, deux gènes codant l'un pour une protéine à 1 hélice, l'autre pour une protéine à 2 hélices, sont adjacents bien que dans un cadre de lecture différent. Dans ces conditions, un simple événement mutationnel aurait pu permettre de produire un gène codant pour une protéine à trois hélices transmembranaires, similaire au gène *Lhc*. Les protéines procaryotiques induites par le stress pourraient donc être à l'origine de la famille des Lhc modernes par simple ré-arrangement de gènes.

CHAPITRE VII

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

*Mise en évidence des particularités de l'appareil photosynthétique de *Prochlorococcus* et conséquences sur les propriétés de photoacclimatation*

Depuis sa découverte, *Prochlorococcus* s'est avéré être l'un des composants les plus abondants du phytoplancton marin (Partensky et al. 1999). Sa biomasse importante dans des eaux que l'on pensait désertiques il y a 25 ans, a amené de nombreuses questions quant aux facteurs responsables de la capacité d'adaptation de cet organisme. Au cours de cette étude, un certain nombre de gènes et de protéines photosynthétiques de *Prochlorococcus* ont été caractérisés et ont permis de révéler quelques particularités de l'appareil photosynthétique de cet organisme (Fig. 37) par rapport à ses proches cousins, les cyanobactéries du genre *Synechococcus*.

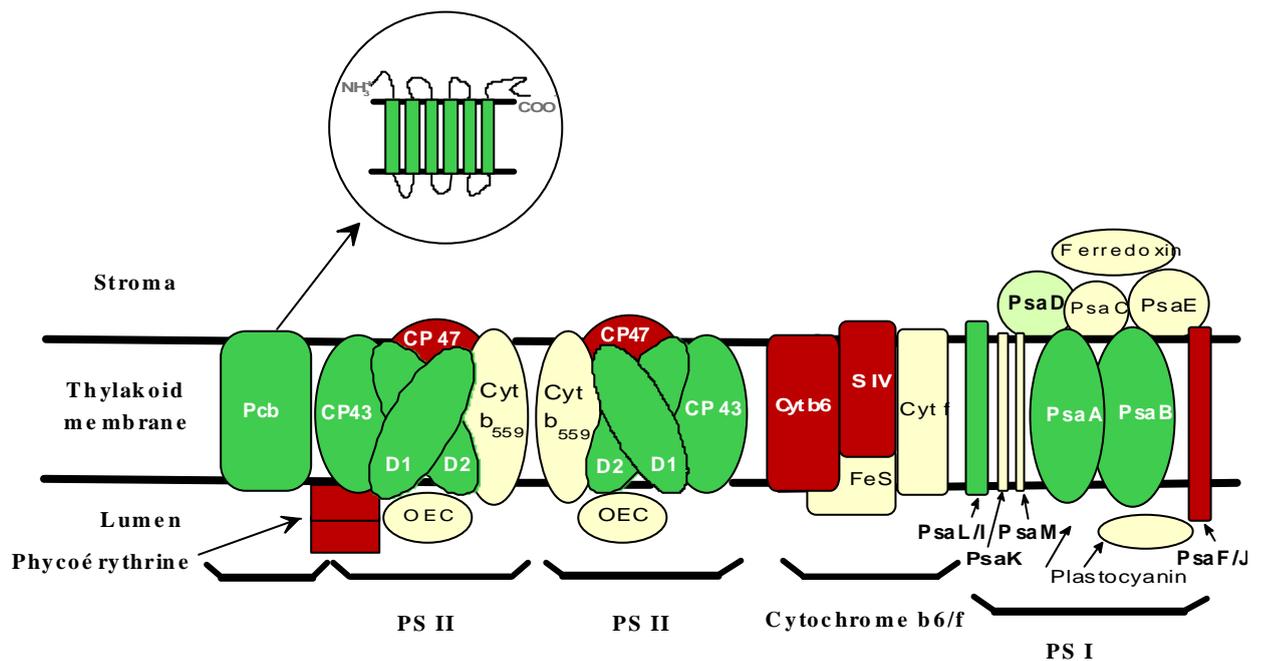


Fig. 37 : Diagramme montrant l'appareil photosynthétique et son organisation potentielle par homologie avec l'appareil photosynthétique des cyanobactéries. Les protéines colorées en rouge ont été séquencées auparavant ou identifiées dans le génome de la souche MED4, celles en vert ont été caractérisées au cours de cette étude, par détection immunologique (vert clair) ou séquençage (vert foncé). La phycoérythrine est présente uniquement chez certaines souches de *Prochlorococcus*. L'insert montre la structure secondaire de la protéine pcb qui comprend six hélices transmembranaires hydrophobes. Abréviations: CP, complexe Chl-protéine ; Cyt, cytochrome (Modifié de Partensky et al., 1999).

Au niveau du photosystème I, deux protéines de taille inhabituelle ont été mises en évidence (PsaL et PsaF). Le séquençage des deux sous-unités du centre réactionnel, PsaA et PsaB, a aussi révélé des variations de séquences majeures par rapport à la majorité des organismes oxyphototrophes. De telles variations par rapport aux cyanobactéries typiques sont d'autant plus surprenantes que le PS I est un complexe particulièrement stable et qui évoluerait beaucoup plus lentement que le PS II (Chitnis 1996). La présence probable de Chl *b* associée à ce complexe constitue également une nouveauté intrigante par rapport aux organismes examinés jusqu'à ce jour. En effet, bien que les pigments associés aux antennes soient très variables d'un organisme à un autre, les centres réactionnels ne fixent généralement que de la Chl *a* (Green and Durnford 1996). Malgré l'absence de fluorescence du PS I de *Prochlorococcus* à la température de l'azote liquide, un transfert efficace d'énergie de la DV-Chl *b* au PS I a été mis en évidence par la mesure du spectre d'action du P700 (Partensky et al. 1997). Ceci semble conforter l'idée que ce pigment a probablement des implications sur les propriétés biophysiques et biochimiques de ce complexe. Le développement des techniques de cristallographie pourrait amener de nouveaux éléments de réponse quant à la fonction exacte de la Chl *b*, à condition que l'on parvienne à distinguer au sein de la structure les molécules de Chl *b* des molécules de Chl *a*.

La spécificité la plus remarquable de l'appareil photosynthétique de *Prochlorococcus* est sans doute la multiplication du nombre de copies du gène codant pour l'antenne collectrice chez les souches adaptées à un faible éclaircissement. Cette multiplication des gènes d'antenne est accompagnée d'une modification de la composition pigmentaire du complexe antennaire, puisque les fractions enrichies en antenne de la souche SS120 fixent environ 7 fois plus de Chl *b* que celles de la souche MED4 (Partensky et al. 1997). Par analogie avec les multiples gènes d'antenne trouvés chez les algues et les plantes supérieures, il n'est pas impossible que certaines de ces protéines soient également associées au PS I chez *Prochlorococcus*, ce qui constituerait une originalité remarquable par rapport aux autres procaryotes photosynthétiques. Cette hypothèse semble confortée par la présence persistante d'une quantité plus importante de protéines d'antennes dans les fractions enrichies en PS I de la souche SS120 par rapport à la souche MED4, malgré l'action de puissants détergents. De même par analogie avec les plantes supérieures, la séparation en deux clusters distincts des copies de *pcb* de la souche SS120 constitue un élément supplémentaire en faveur de la présence d'une LHC1. La mise en évidence d'antennes spécifiques des deux photosystèmes nécessiterait tout d'abord de pouvoir individualiser les différentes protéines d'antennes sur gel d'électrophorèse. Les gels SDS-PAGE classiques n'étant pas suffisamment résolutifs pour séparer ces polypeptides, la méthode la plus prometteuse consiste probablement à faire migrer ces protéines sur gel d'acrylamide bi-dimensionnel. Le pHi des ces polypeptides, déduits des séquences nucléotidiques, varie de 6,34 à 7,06, ce qui paraît suffisant pour les séparer, au moins partiellement, par isoélectrofocalisation. L'individualisation de ces polypeptides et leur identification par microséquençage devrait ainsi permettre de vérifier si des protéines distinctes sont présentes dans les fractions enrichies en PS I ou en PS II séparées par gradient

de saccharose.

Si cette hypothèse se vérifiait, la présence d'une antenne associée au PS I dans les souches que l'on trouve en profondeur permettrait probablement d'accroître la capacité de capture des photons de l'appareil photosynthétique. Cependant, étant donné la tendance à la compaction du génome de cet organisme, la multiplication du nombre de copies de gènes codant pour l'antenne majeure de cet organisme constitue probablement à elle seule un atout décisif pour capturer les rares photons atteignant des profondeurs de 100 à 200 m. De même, les caractéristiques pigmentaires de *Prochlorococcus* lui confèrent un avantage indéniable sur les autres organismes phytoplanctoniques, et notamment *Synechococcus*, pour la croissance dans les eaux océaniques. Les DV-Chl *a* et *b* de la souche SS120 de *Prochlorococcus* permettent en effet une absorption optimale entre 430 et 490 nm. Ces pigments sont donc plus adaptés que les phycobilines des cyanobactéries marines (A_{\max} phycourobiline = 492 nm ; A_{\max} phycoérythrobiline = 542 nm ; Ong and Waterbury 1984) pour absorber la lumière de 460 à 480 nm, qui prédomine en profondeur dans les eaux du large (Fig. 38 ; Morel 1978).

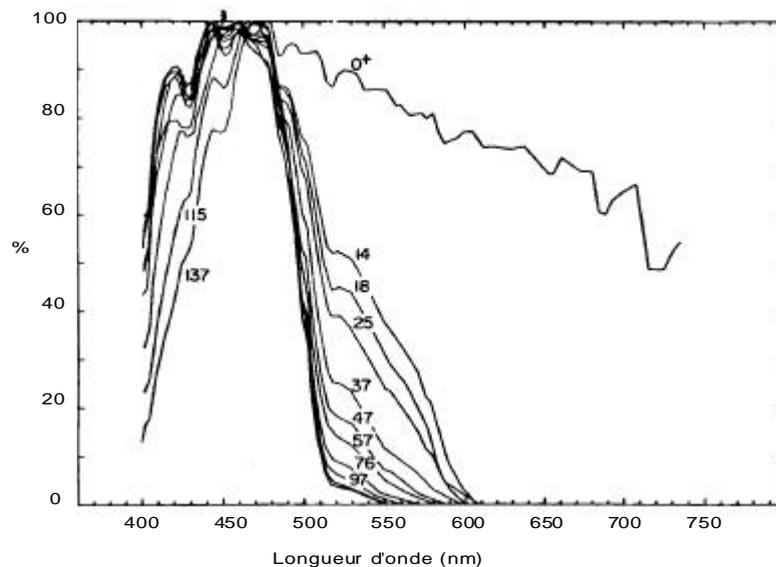


Fig. 38 : Répartition spectrale de la lumière en fonction de la profondeur dans les eaux oligotrophes. La profondeur des mesures est indiquée sur les courbes et pour chaque profondeur, la courbe a été normalisée à son maximum. La notation 0⁺ correspond au spectre de lumière pendant la journée obtenue au dessus de la surface (Morel et al., 1978)

Par ailleurs, l'expérience réalisée en turbidostat sur le clone axénique de la souche MED4 (PCC9511) a montré que le mode de régulation de l'énergie lumineuse absorbée par l'appareil photosynthétique de ce *Prochlorococcus* est probablement très différent de celui adopté par les

cyanobactéries classiques. A première vue, le système de photorégulation de *Prochlorococcus* semble énergiquement plus économique puisqu'il n'implique pas un renouvellement des protéines du CR II à un turnover aussi élevé que chez les cyanobactéries. Les variations de l'expression du gène *pcb* codant pour l'antenne majeure, avec une forte baisse d'expression pendant la journée, complètent cette adaptation, même s'il n'est pas possible de savoir, à partir de cette seule expérience, si cette baisse est le résultat d'une régulation active ou si elle résulte d'un phénomène passif de photoinhibition de l'expression de ces gènes, lorsque l'intensité lumineuse est trop importante. La réponse à cette question nécessiterait de réitérer cette expérience en utilisant une intensité lumineuse maximale inférieure au seuil de photoinhibition de cette souche. Par ailleurs, cultiver la souche SS120 en cyclostat permettrait également de tester si les 7 copies de *pcb* de cette souche sont exprimées différemment au cours des cycles jour-nuit. Enfin, pour aller plus loin dans l'étude de l'expression de ces gènes, il serait nécessaire d'identifier les promoteurs impliqués dans leur régulation et d'utiliser des inhibiteurs de transcription (tels que la rifampicine) et de traduction (tels que le chloramphénicol) pour déterminer à quel niveau l'expression de ces gènes est régulée.

Spéciation chez Prochlorococcus et estimation de la diversité génétique

Un tel phénomène de multiplication de gènes en fonction de la niche lumineuse n'avait jamais été observé au sein d'un même genre parmi les organismes oxyphototrophes. Cependant, chez les populations microbiennes exposées à des conditions de limitation en nutriments, la duplication de gènes d'intérêt semble correspondre à une réponse évolutive assez commune (Brown et al. 1998, Hansche 1974, Yanamaka et al. 1998). Chez la levure cultivée en condition de carence en glucose, seules 450 générations sont nécessaires pour induire la multiplication des gènes impliqués dans le transport des hexoses (*HXT6* et *HXT7* ; Brown et al. 1998). De plus, ce mécanisme adaptatif semble facilement réversible, puisqu'une fois la culture replacée en milieu enrichi, le nombre de copies de ces gènes revient à son état initial en l'espace de 75 générations. De la même manière, des duplications spontanées de gènes pourraient intervenir chez les bactéries presque aussi fréquemment que de simples mutations (Hansche 1974). Ces processus adaptatifs jouent probablement un rôle important dans l'évolution des protéines, en constituant une étape intermédiaire dans l'apparition d'une nouvelle fonction protéique. La multiplication du gène *pcb* suggère l'existence d'un mécanisme évolutif similaire chez *Prochlorococcus*. Toutes les souches isolées étant cultivées à une intensité intermédiaire entre l'optimum de SS120 et de MED4, ce phénomène ne peut résulter d'un artefact créé par les conditions d'entretien des souches au laboratoire. Par conséquent, ce processus évolutif tend à conforter l'hypothèse que la lumière est un facteur primordial dans la spéciation des populations naturelles de ce genre. De même, ce processus de multiplication génique pourrait s'être produit en réponse aux conditions lumineuses pour les ORFs de type HLIP (*scp* 1 à 15). D'après les données

obtenues chez *Arabidopsis*, cette deuxième catégorie de protéines serait impliquée dans les phénomènes de réponse aux stress lumineux (Jansson 1999). Ces protéines ont seulement été mises en évidence dans le génome de la souche de surface MED4 exposée à de très fortes intensités lumineuses, mais si elles remplissent la même fonction que chez *Arabidopsis*, il est probable que ces gènes soient également présents chez toutes les souches de haute lumière. Le séquençage du génome de la souche SS120 de *Prochlorococcus* devrait également permettre de vérifier si ces ORFs sont présentes ou non en plus faible quantité chez les souches de basse lumière.

Par ailleurs, la lumière n'est peut être pas le seul facteur ayant induit une spéciation des souches de *Prochlorococcus*. Le fait que les différences génétiques entre des populations provenant de sites distincts soient faibles (Scanlan et al. 1996, Urbach and Chisholm 1998) soulève un certain nombre de questions. En effet, les populations de surface sont probablement physiologiquement différentes entre les zones mésotrophes, telles que la Méditerranée Nord occidentale en hiver, et les zones subtropicales très oligotrophes. La croissance des premières semble être limitée par l'azote inorganique (Vaulot and Partensky 1992), alors que les secondes maintiennent de forts taux de croissance dans des eaux complètement carencées en azote inorganique (Liu et al. 1997). Il serait surprenant que des populations possédant un système d'acquisition des sels nutritifs et un métabolisme si différents, puissent correspondre à un seul et même génotype.

D'une manière générale, beaucoup reste à faire sur la diversité génétique des populations naturelles de *Prochlorococcus*, afin de mieux comprendre la distribution très ubiquiste de ces organismes. En effet, les marqueurs moléculaires utilisés jusqu'à maintenant ne sont pas spécifiques de *Prochlorococcus* (ex : *rpoC1*), et/ou ne sont pas suffisamment variables pour faire ressortir l'étendue des variations génotypiques de cet organisme (ex : ARNr 16S). Étant donné sa variabilité importante, le gène *pcb* pourrait être un bon candidat pour obtenir une résolution plus fine de la diversité de *Prochlorococcus*. La multiplication de ces gènes chez certaines souches rend difficile l'analyse d'échantillons renfermant un grand nombre de souches par des techniques phylogénétiques classiques. Cependant, une méthode que nous allons bientôt tester sur des échantillons naturels consiste à utiliser la PCR-RFLP sur le gène *pcb* de façon à obtenir des profils de digestion caractéristiques. Les profils obtenus à différentes profondeurs et dans différentes conditions de milieu (oligotrophe, mésotrophe, eutrophe) correspondant à des niveaux variables de stratification de la colonne d'eau pourront ainsi être comparés. Cette technique a d'ores et déjà prouvé son efficacité sur les souches de laboratoire, puisqu'elle est actuellement couramment utilisée pour vérifier la signature génétique des souches de *Prochlorococcus* de la collection de Roscoff. Ces études sur les populations naturelles devraient permettre de compléter les analyses génétiques et apporter des informations supplémentaires sur le mode de régulation de ces protéines.

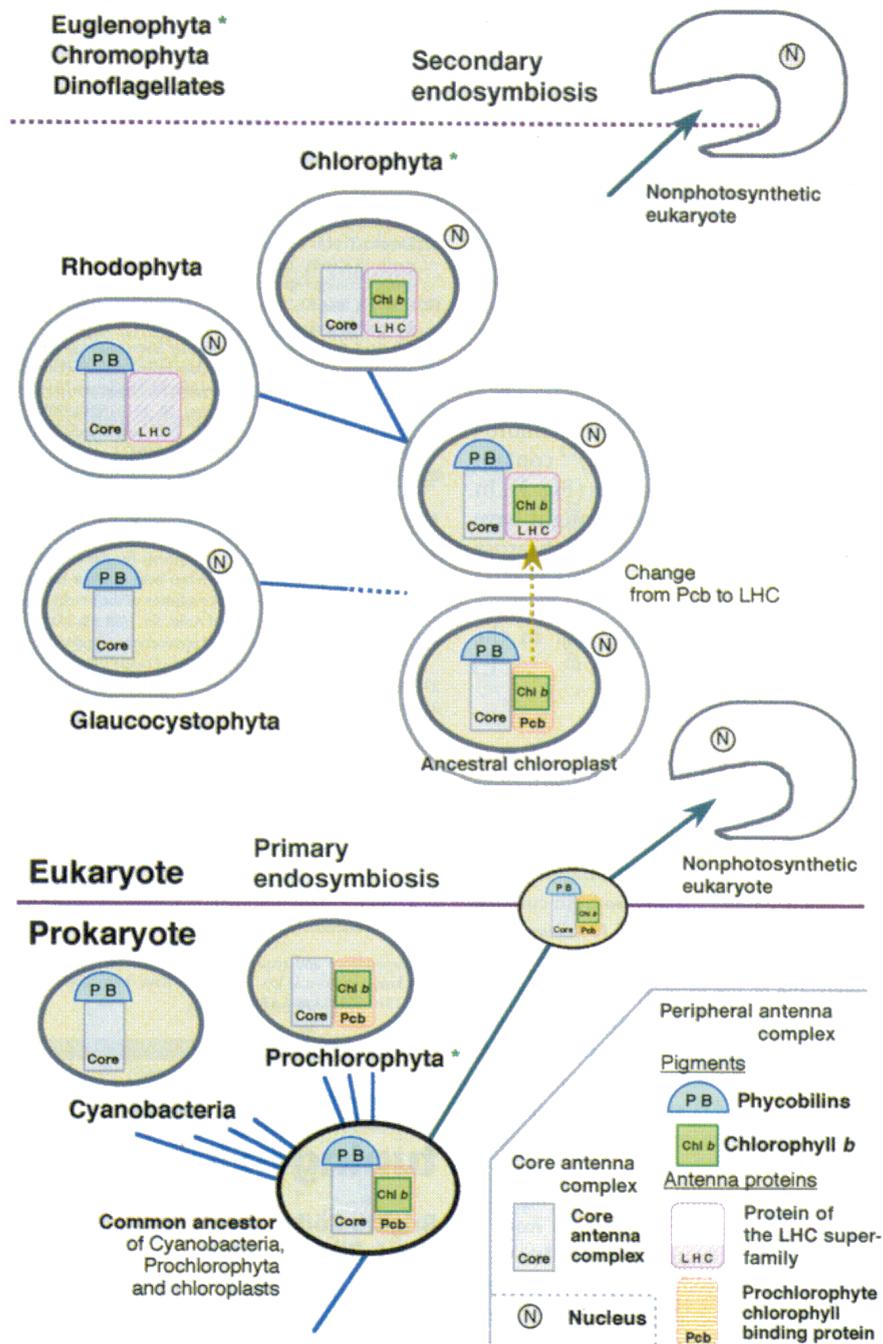


Fig. 39 : Schéma hypothétique de l'évolution des procaryotes et des eucaryotes photosynthétiques oxygéniques à partir d'un ancêtre commun possédant de la Chl *b* et des phycobilisomes (Tomitani et al., 1999). Les astérisques indiquent les organismes possédant de la Chl *b*.

Origine et évolution des protéines photosynthétiques de *Prochlorococcus*

D'après les analyses structurales des protéines pigmentaires, il semble qu'il n'existe pas de relation d'ancestralité directe entre les antennes des cyanobactéries à Chl *b* et celles des chloroplastes contenant de la Chl *b*. En effet, bien que des homologues de séquences aient pu être mises en évidence entre les Pcb et les antennes eucaryotiques, ces dernières présentent des homologues bien plus importantes avec les protéines de stress ou de photoprotection de type PsbS ou HLIP. De plus, la multiplication et la disposition des ORFs de type HLIP mis en évidence dans le génome de *Prochlorococcus* suggère que la différenciation entre ces protéines s'est probablement produite au stade une ou deux hélices et qu'elles ont ensuite suivi une évolution divergente. Par ailleurs, la présence commune de Chl *b* chez ces organismes a récemment été éclaircie par la découverte chez plusieurs groupes, dont des cyanobactéries à Chl *b*, du gène responsable de la conversion de la Chl *a* en Chl *b* (CAO pour Chl *a* oxygénase ; Tomitani et al. 1999). L'ancêtre procaryotique commun aurait donc possédé, en plus des phycobiline, la capacité de synthèse des Chl *a* et *b* ou le précurseur de ces molécules (Fig. 39). Selon le schéma évolutif élaboré par Tomitani et al. (1999), les différentes lignées auraient ensuite évolué par perte sélective de certains de ces éléments. A l'heure actuelle, la force motrice de l'évolution des systèmes antennaires, et en particulier du remplacement des phycobilisomes par les LHCs, reste encore inconnue. Cependant, il est possible que la limitation en nutriments ou en métaux traces ou encore le stress dû à la lumière aient été des facteurs importants (Durnford et al. 1999, LaRoche et al. 1996). Les antennes collectrices intramembranaires eucaryotiques et procaryotiques sont en effet phylogénétiquement proches de protéines induites par des stress environnementaux (IsiA, ELIPs, HLIPs). En particulier, plusieurs représentants parmi ces protéines (IsiA, PsbS) se sont récemment avérés avoir un rôle actif dans les mécanismes de protection de l'appareil photosynthétique en conditions de stress lumineux. Ces processus restent encore assez peu explorés mais l'étude de ces protéines pourrait apporter des informations non seulement sur l'évolution des systèmes collecteurs mais également sur les processus de photoadaptation qui semblent présenter une diversité comparable à celle des antennes collectrices.

Les protéines pigmentaires possèdent un potentiel limité pour résoudre les relations phylogénétiques entre les lignées les plus éloignées. Cette limitation est essentiellement due à la petite taille de ces protéines, à leur importante paralogie, ainsi qu'à l'évolution rapide de certains représentants. Cependant, la divergence de ces protéines en différents membres spécialisés (LHCI, LHCII, CR I, CRII, protéines de stress, ...etc) offre une opportunité unique d'examiner l'évolution des complexes photosynthétiques et de la corrélérer avec la flexibilité photosynthétique des différents groupes d'organismes phototrophes. Étant donné le nombre important de nouvelles protéines

découvertes dans cette famille ces dernières années, l'examen de nouvelles espèces photosynthétiques et le séquençage de nouveaux génomes devraient permettre de préciser encore le schéma évolutif de ces protéines.

* * * * *

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Adamska, I., K. Koppstech, and I. Ohad. 1992. UV light stress induces the synthesis of the early light-induced protein and prevents its degradation. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 24732-24737.
- Adamska, I., B. Scheel, and K. Koppstech. 1991. Circadian oscillations of nuclear-encoded chloroplast proteins in pea (*Pisum sativum*). *Plant Molecular Biology* 17: 1055-1065.
- Ajlani, G., D. Kirilovsky, M. Picaud, and C. Astier. 1989. Molecular analysis of *psbA* mutations responsible for various herbicide resistant phenotypes in *Synechocystis* 6714. *Plant Molecular Biology* 13: 469-479.
- Allen, J. F. 1992. Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1098: 275-335.
- Allen, J. F. 1995. Thylakoid protein phosphorylation, state 1 state 2 transitions, and photosystem stoichiometry adjustment: redox control at multiple levels of gene expression: minireview. *Physiologia Plantarum* 93: 196-205.
- Allen, J. F., C. E. Sanders, and N. G. Holmes. 1985. Correlation of membrane protein phosphorylation with excitation energy distribution in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. *FEBS Letters* 193: 271-275.
- Allen, K. D., and L. A. Staehelin. 1991. Resolution of the 16 to 20 chlorophyll-protein complexes using a low ionic strength native green gel system. *Analytical Biochemistry* 194: 214-222.
- Allen, K. D., and L. A. Staehelin. 1994. Polypeptide composition, assembly, and phosphorylation patterns of the photosystem II antenna systems of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 194: 42-54.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Anderson, J. M. 1986. Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes. *Annual Review of Plant Physiology* 37: 93-136.
- Anderson, J. M. 1992. Cytochrome *b6/f*-complex - dynamic molecular organization, function and acclimation. *Photosynthesis Research* 34: 341-357.
- Anderson, J. M., and P. A. Anderson. 1988. The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion. *Trends in Biochemical Sciences* 13: 351-355.
- Anderson, J. M., W. S. Chow, and D. J. Goodchild. 1988. Thylakoid membrane organization in sun/shade acclimation. *Australian Journal of Plant Physiology* 15: 11-26.
- Andersson, B., and J. Barber. 1996. Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. Pages 101-121 in N. R. Baker, ed. *Photosynthesis and the environment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Apt, K. E., J. L. Collier, and A. R. Grossman. 1995. Evolution of phycobiliproteins. *Journal of Molecular Biology* 248: 79-96.
- Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15.

- Aro, E. M., I. Virgin, and B. Andersson. 1993. Photoinhibition of photosystem 2 - Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* 1143: 113-134.
- Awramik, S. M. 1992. The oldest records of photosynthesis. *Photosynthesis Research* 33: 75-79.
- Barber, J., and B. Anderson. 1992. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* 17: 61-66.
- Barber, J., and W. Kühlbrandt. 1999. Photosystem II. *Current Opinion in Structural Biology* 9: 469-475.
- Baroli, I., and A. Melis. 1998. Photoinhibitory damage is modulated by the rate of photosynthesis and by the photosystem II light-harvesting chlorophyll antenna size. *Planta* 205: 288-296.
- Bassi, R., and P. Dainese. 1992. A supramolecular light-harvesting complex from chloroplast Photosystem II membranes. *European Journal of Biochemistry* 204: 317-326.
- Bassi, R., B. Pineau, P. Dainese, and J. Marquardt. 1993. Carotenoid-binding protein of the photosystem II. *European Journal of Biochemistry* 212: 297-303.
- Bassi, R., and D. Simpson. 1987. Chlorophyll protein complexes of Barley photosystem I. *European Journal of Biochemistry* 163: 221-230.
- Bassi, R., and F. A. Wollman. 1991. The chlorophyll a/b-protein of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*: isolation, characterization and immunological cross-reactivity to higher-plant polypeptides. *Planta* 183: 423-433.
- Bazzaz, M. B. 1981. New chlorophyll chromophores isolated from a chlorophyll-deficient mutant of maize. *Photobiochemistry and Photobiophysic* 2: 199-207.
- Bazzaz, M. B., and R. G. Brereton. 1982. 4-vinyl-4-desetyl chlorophyll *a* : a new naturally occurring chlorophyll. *FEBS Letters* 138: 104-108.
- Beator, J., and K. Kloppstech. 1993. The circadian oscillator coordinates the synthesis of apoproteins and their pigments during chloroplast development. *Plant Physiology* 103: 191-196.
- Beator, J., E. Pötter, and K. Kloppstech. 1992. The effect of heat shock on morphogenesis in Barley. *Plant Physiology* 100: 1780-1786.
- Bengis, C., and N. Nelson. 1975. Purification and properties of the photosystem I reaction center from chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* 250: 2783-2788.
- Bennett, J. 1991. Protein phosphorylation in green plant chloroplasts. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 281-311.
- Bhaya, D., and A. R. Grossman. 1993. Characterization of gene cluster encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Nucleic Acids Research* 21: 4458-4466.
- Binder, B. J., S. W. Chisholm, R. J. Olson, S. L. Frankel, and A. Z. Worden. 1996. Dynamics of picophytoplankton, ultraphytoplankton and bacteria in the central equatorial Pacific. *Deep - Sea Research II* 43: 907-931.
- Björkmann, O., and B. Demmig-Adams. 1994. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion and dissipation in leaves of higher plants. Pages 17-47 in E. D. Schulze and M. Caldwell, eds. *Ecophysiology of photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Björkmann, O., and M. M. Ludlow. 1972. Characterization of the light climate on the floor of a Queensland rainforest. *Carnegie Institution Yearbook* 71.
- Blanchot, J., and M. Rodier. 1996. Picophytoplankton abundance and biomass in the western tropical Pacific

- Ocean during the 1992 El Nino year: results from flow cytometry. *Deep - Sea Research Part I - Oceanographic Research Papers* 43: 877-895.
- Blankenship, R. E. 1992. Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynthesis Research* 33: 91-111.
- Boekema, E. J., A. F. Boonstra, J. P. Dekker, and M. Rögner. 1994. Electron microscopic structural analysis of photosystem I, photosystem II, and the cytochrome *b6/f* complex from green plants and cyanobacteria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26: 17-29.
- Bollivar, D. W., J. Y. Suzuki, J. T. Beatty, J. M. Dobrowolski, and C. E. Bauer. 1994. Directed mutational analysis of bacteriochlorophyll alpha biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Molecular Biology* 237: 622-640.
- Bouyouf, A., C. Vernotte, and C. Astier. 1993. Functional analysis of the two homologous *psbA* gene copies in *Synechocystis* PCC6714 et 6803. *Plant Molecular Biology* 21: 249-258.
- Brettel, K. 1997. Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta* 1318: 322-373.
- Bricker, T. M. 1990. The structure and function of CPa-1 and CPa-2 in photosystem II. *Photosynthesis Research* 24: 1-13.
- Bricker, T. M., and D. F. Ghanotakis. 1996. Introduction to oxygen-evolving complex. Pages 113-136 in D. R. Ort and C. F. Yocum, eds. *Oxygenic photosynthesis: the light reaction*. Kluwer Academic Publisher, Netherland.
- Brown, C. J., K. M. Todd, and R. F. Rosenzweig. 1998. Multiple duplications of yeast hexose transport genes in response to selection in a glucose-limited environment. *Molecular Biology and Evolution* 15: 931-942.
- Bruick, R. K., and S. P. Mayfield. 1999. Light-activated translation of chloroplast mRNAs. *Trends in Plant Sciences* 4: 190-195.
- Buchel, C., and C. Wilhelm. 1993. Isolation and characterization of a photosystem I-associated antenna (LHC I) and a photosystem I core complex from the chlorophyll *c*-containing alga *Pleurochloris meiringensis*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B - Biology* 20: 87-93.
- Buck, K. R., F. P. Chavez, and L. Campbell. 1996. Basin-wide distributions of living carbon components and the inverted trophic pyramid of the central gyre of the North Atlantic Ocean, summer 1993. *Aquatic Microbial Ecology* 10: 283-298.
- Burger-Wiersma, T., L. J. Stal, and L. R. Mur. 1989. *Prochlorothrix hollandica* gen. nov., sp. nov., a filamentous oxygenic photoautotrophic prokaryote containing chlorophylls *a* and *b*: assignment to Prochlorotrichaceae fam. nov. and Order Prochlorales Florenzano, Balloni and Materassi 1986, with emendation of the ordinal description. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 250-257.
- Burger-Wiersma, T., M. Veenhuis, H. J. Korthals, C. C. M. Van de Wiel, and L. R. Mur. 1986. A new prokaryote containing chlorophylls *a* and *b*. *Nature, London* 320: 262-264.
- Burgess, D. G., and W. C. Taylor. 1987. Chloroplast photooxydation affects the accumulation of cytosolic mRNAs encoding chloroplast proteins in maize. *Planta* 170: 520-527.
- Burgess, D. G., and W. C. Taylor. 1988. The chloroplast affects the transcription of a nuclear gene family. *Molecular & General Genetics* 214: 89-96.
- Burgi, R., F. Suter, and H. Zuber. 1997. Arrangement of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein complex in the thylakoid membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 890: 346-351.

- Burnap, R. L., T. Troyan, and L. A. Sherman. 1993. The highly abundant chlorophyll-protein complex of iron-deficient *Synechococcus* sp. PCC7942 (CP43') is encoded by the *isiA* gene. *Plant Physiology* 103: 893-902.
- Bustos, S. A., and S. S. Golden. 1992. Light-regulated expression of the *psbD* gene family in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: evidence for the role of duplicated *psbD* genes in cyanobacteria. *Molecular & General Genetics* 232: 221-230.
- Bustos, S. A., M. R. Schaefer, and S. S. Golden. 1990. Different and rapid responses of four cyanobacterial *psbA* transcripts to changes in light intensity. *Journal of Bacteriology* 172: 1998-2004.
- Buttner, M., D. L. Xie, and H. Nelson. 1992a. Photosynthetic reaction center genes in green sulfur bacteria and in photosystem I are related. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 8135-8139.
- Buttner, M., D. L. Xie, H. Nelson, W. Pinter, G. Hauska, and N. Nelson. 1992b. The photosystem I-like P840-reaction center of green S-bacteria is a homodimer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1101: 154-156.
- Cailliau, C., H. Claustre, F. Vidussi, D. Marie, and D. Vaultot. 1996. Carbon biomass, and gross growth rates as estimated from C-14 pigment labelling, during photoacclimation in *Prochlorococcus* CCMP 1378. *Marine Ecology - Progress Series* 145: 209-221.
- Callebaut, I., G. Labesse, P. Durand, A. Poupon, L. Canard, J. Chomilier, B. Henrissat, and J. P. Mornon. 1997. Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences* 53: 621-645.
- Camm, E. L., and B. R. Green. 1989. The chlorophyll *a/b* complex, CP29, is associated with the photosystem-II reaction center core. *Biochimica et Biophysica Acta* 974: 180-184.
- Campbell, D., M. J. Eriksson, G. Oquist, P. Gustafsson, and A. K. Clarke. 1998. The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 364-369.
- Campbell, L., H. A. Nolla, and D. Vaultot. 1994. The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central North Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography* 39: 954-961.
- Campbell, L., and D. Vaultot. 1993. Photosynthetic picoplankton community structure in the subtropical North Pacific Ocean near Hawaii (station ALOHA). *Deep-Sea Research* 40: 2043-2060.
- Caron, L., R. Remy, and C. Berkaloff. 1988. Polypeptide composition of light harvesting complexes from brown algae and diatoms. *FEBS Letters* 229: 11-15.
- Chen, T. H., T. L. Chen, L. M. Hung, and T. C. Huang. 1991. Circadian rhythm in amino acid uptake by *Synechococcus* sp RF-1. *Plant Physiology* 97: 55-59.
- Chisholm, S. W. 1992. Phytoplankton size. Pages 213-237 in P. G Falkowski and A. D. Woodhead, eds. *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea*. Plenum Press, New York.
- Chisholm, S. W., S. L. Frankel, R. Goericke, R. J. Olson, B. Palenik, J. B. Waterbury, L. West-Johnsrud, and E. R. Zettler. 1992. *Prochlorococcus marinus* nov. gen. nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll *a* and *b*. *Archives of Microbiology* 157: 297-300.
- Chisholm, S. W., R. J. Olson, E. R. Zettler, J. Waterbury, R. Goericke, and N. Welschmeyer. 1988. A novel free-living prochlorophyte occurs at high cell concentrations in the oceanic euphotic zone. *Nature, London* 334: 340-343.
- Chitnis, P. R. 1996. Update on photosynthetic electron transport. Photosystem I. *Plant Physiology* 111: 661-669.
- Chitnis, P. R., and N. Nelson. 1992. Assembly of two subunits of the cyanobacterial Photosystem I on the n-side

- of thylakoid membranes. *Plant Physiology* 99: 239-246.
- Chitnis, P. R., Q. Xu, V. P. Chitnis, and R. Nechushtai. 1995. Function and organization of photosystem I polypeptides. *Photosynthesis Research* 44: 23-40.
- Chitnis, V. P., and P. R. Chitnis. 1993. PsaL subunit is required for the formation of photosystem I trimers in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Letters* 336: 330-334.
- Chow, W. S. 1994. Photoprotection and photoinhibitory damage. Pages 151-196 in J. Barber, ed. *Advances in molecular and cell biology, molecular processes of photosynthesis*. Jai Press, Connecticut.
- Chow, W. S. e. a. 1998. Two different genes encode ferrochelatase in *Arabidopsis*: mapping, expression and subcellular targetting of the precursor proteins. *Plant Journal* 15: 531-541.
- Christopher, D. A., M. Kim, and J. E. Mullet. 1992. A novel light-regulated promoter is conserved in cereal and dicot chloroplasts. *Plant Cell* 4: 785-798.
- Christopher, D. A., and J. E. Mullet. 1994. Separated photosensory pathways co-regulate blue-light/ultraviolet-a-activated *psbD-psbC* transcription and light-induced D2 and CP43 degradation in Barley (*Hordeum vulgare*) chloroplasts. *Plant Physiology* 104: 1119-1129.
- Church, G. M., and W. Gilbert. 1984. Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 1991-1995.
- Clarke, A. K., V. M. Hurry, P. Gustafsson, and G. Oquist. 1993. Two functionally distinct forms of the photosystem II reaction center D1 protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 11985-11989.
- Coleman, W. J., and D. C. Youvan. 1993. Atavistic reaction centre. *Nature* 366: 517-518.
- ColonLopez, M. S., and L. A. Sherman. 1998. Transcriptional and translational regulation of photosystem I and II genes in light-dark- and continuous-light-grown cultures of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142. *Journal of Bacteriology* 180: 519-526.
- Cui, L., S. E. Bingham, M. Kuhn, H. Käss, W. Lubitz, and A. N. Webber. 1995. Site-directed mutagenesis of conserved histidines in the helix VIII domain of PsaB impairs assembly of the photosystem I reaction center without altering spectroscopic characteristics of P700. *Biochemistry* 34: 1549-1558.
- Dainesse, P., and R. Bassi. 1991. Subunit stoichiometry of the chloroplast photosystem-II antenna system and aggregation state of the component chlorophyll-a/b binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 8136-8142.
- Dayhoff, M. O., R. M. Schwartz, and B. C. Orcutt. 1978. A model of evolutionary change in proteins. Pages 345-352 in D. MO, ed. *Atlas of protein sequence and structure*. Natural Biomedical Research Foundation, Washington, DC.
- Debus, R. J. 1992. The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochimica et Biophysica Acta* 1102: 269-352.
- Delphin, E., J. C. Duval, A. L. Etienne, and D. Kirilovsky. 1996. State transitions or DpH-dependent quenching of photosystem II fluorescence in red algae. *Biochemistry* 35: 9435-9445.
- Demmig-Adams, B. 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica and Biophysica Acta* 1020: 1-24.
- Demmig-Adams, B., and W. W. Adams. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 7: 1-116.

- Deisenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber, and H. Michel. 1985. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature* 318: 19-26.
- Deisenhofer, J., and H. Michel. 1989. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *EMBO Journal* 8: 2149-2170.
- Diner, B. A., and G. T. Babcock. 1996. Structure, dynamics, and energy conversion efficiency in photosystem II. Pages 213-247 in D. R. Ort and C. F. Yocum, eds. *Advances in photosynthesis: The light reactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Durnford, D. G., J. A. Deane, S. Tan, G. I. McFadden, E. Gantt, and B. R. Green. 1999. A phylogenetic assessment of the eukaryotic light-harvesting antenna proteins, with implications for plastid evolution. *Journal of Molecular Evolution* 48: 59-68.
- Durnford, D. G., and B. R. Green. 1994. Characterization of the light harvesting proteins of the chromophytic alga, *Olisodiscus luteus* (*Heterosigma carterae*). *Biochimica et Biophysica Acta* 1184: 118-123.
- Enami, I., A. Tohri, M. Kamo, H. Ohta, and J. R. Shen. 1997. Identification of domains on the 43 kDa chlorophyll-carrying protein (CP43) that are shielded from tryptic attack by binding of the extrinsic 33 kDa protein with Photosystem II complex. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1320: 17-26.
- Falk, S., G. Samson, D. Bruce, N. P. A. Huner, and D. E. Laudenbach. 1995. Functional analysis of the iron-stress induced CP 43' polypeptide of PS II in the cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC 7942. *Photosynthesis Research* 45: 51-60.
- Falkowski, P. G., and J. LaRoche. 1991. Acclimation to spectral irradiance in algae. *Journal of Phycology* 7: 8-14.
- Falkowski, P. G., and T. G. Owens. 1980. Light-shade adaptation - Two strategies in marine phytoplankton. *Plant Physiology* 66: 592-595.
- Fawley, M. W., K. D. Stewart, and K. R. Mattox. 1986. The novel light-harvesting pigment-protein complex of *Mantoniella squamata* (Chlorophyta) : Phylogenetic implications. *Journal of Molecular Biology* 23: 168-176.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). University of Washington, Seattle.
- Ferris, M. J., and B. Palenik. 1998. Niche adaptation in ocean cyanobacteria. *Nature* 396: 226-228.
- Fish, L. E., U. Kuck, and L. Bogorad. 1985. Two partial homologous adjacent light-inductible maize chloroplast genes encoding polypeptides of the P700 chlorophyll *a* protein complex of photosystem I. *Journal of Biological Chemistry* 260: 1413-1421.
- Fitch, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic and Zoologie* 20: 406-416.
- Fling, S. P., and D. S. Gregerson. 1986. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity Tris buffer system without urea. *Analytical Biochemistry* 155: 83-88.
- Franche, C., and T. Damerval. 1988. Test on nif probes and DNA hybridization. *Methods in Enzymology* 167: 803-808.
- Frank, H. A., and R. J. Cogdell. 1996. Carotenoids in photosynthesis. *Photochemistry and Photobiology* 63: 257-264.
- Frankel, L. K., and T. M. Bricker. 1995. Interaction of the 33-kDa extrinsic protein with the photosystem II: Identification of the domain on the 33-kDa protein that are shielded from the NHS-biotinylation by

- photosystem II. *Biochemistry* 34: 7492-7497.
- Fuhrman, J. A., K. McCallum, and A. A. Davis. 1993. Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1294-1302.
- Funk, C., I. Adamska, B. R. Green, B. Andersson, and G. Renger. 1995a. The nuclear encoded chlorophyll-binding PSII-S protein is stable in absence of pigments. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 30141-30147.
- Funk, C., V. Lindstrom, and W. Vermaas. 1999. Small Cab-like proteins: Relatives to the chlorophyll a/b binding proteins in cyanobacteria. Pages 103-106 in J. H. ArgyroudiAkoyunoglou and H. Senger, eds. *Chloroplast: From Molecular B*. Kluwer Academic Publ, PO Box 17, 3300 AA Dordrecht, Netherlands.
- Funk, C., W. P. Schroöder, A. Napiwotzki, S. E. Tjus, G. Renger, and B. Andersson. 1995b. The PS II-S protein of higher plants : a new type of pigment binding protein. *Biochemistry* 34: 11133-11141.
- Funk, C., and W. Vermaas. 1999. A cyanobacterial gene family coding for single-helix proteins resembling part of the light-harvesting proteins from higher plants. *Biochemistry USA* 38: 9397-9404.
- Galtier, N., M. Gouy, and C. Gautier. 1996. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 543-548.
- Gantt, E. 1994. Supramolecular membrane organization. Pages 119-138 in D. A. Bryant, ed. *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, London.
- Gantt, E. 1996. Pigment protein complexes and the concept of the photosynthetic unit: Chlorophyll complexes and phycobilisomes. *Photosynthesis Research* 48: 47-53.
- Gantt, E., J. D. Clement-Metral, and B. M. Chereskin. 1986. Photosystem II-phycobilisome complex preparations. Pages 286-290. *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York.
- Gantt, E., and S. F. Conti. 1966. Granules associated with the chloroplast lamellae of *porphyridium cruentum*. *Journal of Cell Biology* 29: 423-434.
- Garcia-Fernandez, J. M., W. R. Hess, J. Houmard, and F. Partensky. 1998. Expression of the *psbA* gene in the marine oxyphotobacteria *Prochlorococcus* spp. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 359: 17-23.
- Garczarek, L., W. R. Hess, J. Holtzendorff, G. W. M. van der Staay, and F. Partensky. 2000. Multiplication of antenna genes as a major adaptation to low light in a marine prokaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 4098-4101.
- Ghanotakis, D. E., C. M. Waggoner, N. R. Bowlby, G. T. Demetriou, and Y. Babcock, C. F. 1987. Comparative structural and catalytic properties of oxygen-evolving photosystem II preparations. *Photosynthesis Research* 14: 191-199.
- Ghanotakis, D. F., and C. F. Yocum. 1990. Photosystem II and the oxygen-evolving complex. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41.
- Gieskes, W. W. C., and G. W. Kraay. 1983. Unknown chlorophyll a derivatives in the North Sea and the tropical Atlantic Ocean revealed by HPLC analysis. *Limnology and Oceanography* 28: 757-766.
- Gillham, N. W., J. E. Boynton, and C. R. Hauser. 1994. Translational regulation of gene expression in chloroplasts and mitochondria. *Annual Review of Genetics* 28: 71-93.
- Gilmore, A. M., and H. Y. Yamamoto. 1993. Linear models relating xanthophylls and lumen activity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that anteraxanthin explains zeaxanthin independent quenching. *Photosynthesis Research* 35: 67-78.

- Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer, and K. G. Field. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345: 60-3.
- Glazer, A. N., and S. Fang. 1973. Chromophore content of blue-green algal phycobiliproteins. *Journal of Biological Chemistry* 248: 659-662.
- Goericke, R., and D. J. Repeta. 1992. The pigments of *Prochlorococcus marinus*: the presence of divinyl chlorophyll *a* and *b* in a marine prochlorophyte. *Limnology and Oceanography* 37: 425-433.
- Goericke, R., and D. J. Repeta. 1993. Chlorophylls *a* and *b* and divinyl chlorophylls *a* and *b* in the open subtropical North Atlantic Ocean. *Marine Ecology-Progress Series* 101: 307-313.
- Goericke, R., and N. A. Welschmeyer. 1993. The marine prochlorophyte *Prochlorococcus* contributes significantly to phytoplankton biomass and primary production in the Sargasso Sea. *Deep-Sea Research* 40: 2283-2294.
- Golbeck, J. H. 1987. Structure, function and organization of the photosystem I reaction center complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 895: 167-204.
- Golbeck, J. H. 1992. Structure and function of photosystem I. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 293-324.
- Golbeck, J. H. 1993. Shared thematic element in photochemical reaction center. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 1642-1646.
- Golbeck, J. H. 1994. Photosystem I in cyanobacteria. Pages 319-360 in D. A. Bryant, ed. *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Golden, S. S. 1994. Light-responsive gene expression and the biochemistry of the photosystem II reaction center. Pages 693-714 in D. A. Bryant, ed. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Golden, S. S. 1995. Light-responsive gene expression in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* 177: 1651-1654.
- Golden, S. S., J. Brusslan, and R. Haselkorn. 1986. Expression of a family of *psbA* genes encoding a photosystem II polypeptide in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *EMBO Journal* 5: 2789-2798.
- Golden, S. S., and G. W. Stearns. 1988. Nucleotide sequence and transcript analysis of three photosystem II genes from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Gene* 67: 85-96.
- Goodwin, T. W., and G. Britton. 1988. Distribution and analysis of carotenoids. Pages 61-132 in T. W. Goodwin, ed. *Plant pigment*. Academic Press, London.
- Gounaris, K., D. J. Chapman, and J. Barber. 1989. Isolation and characterization of a D1/D2 cytochrome *b-559* complex from *Synechocystis* 6803. *Biochimica et Biophysica Acta* 973: 296-301.
- Green, B. R. 1988. The chlorophyll-protein complexes of higher plant photosynthetic membranes, or just what green band is that? *Photosynthesis Research* 15: 3-32.
- Green, B. R., and D. G. Durnford. 1996. The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 685-714.
- Green, B. R., and W. Kühlbrandt. 1995. Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHCII. *Photosynthesis Research* 44: 139-148.
- Green, B. R., and E. Pichersky. 1994. Hypothesis for the evolution of three-helix Chl *a/b* and Chl *a/c* light-harvesting antenna proteins from two-helix and four-helix ancestors. *Photosynthesis Research* 39: 149-162.
- Green, B. R., E. Pichersky, and K. Kloppstech. 1991. Chlorophyll *a/b*-binding proteins: an extended family.

- Trends in Biochemical Sciences* 16: 181-186.
- Green, B. R., and A. H. Salter. 1996. Light regulation of nuclear-encoded thylakoid proteins in B. J., H. Salter, and B. Anderson, eds. *Molecular genetics of photosynthesis*. Oxford University Press, Oxford.
- Grimm, B., and K. Kloppstech. 1987. The early light-inducible proteins of Barley: characterization of two families of 2-h-specific nuclear-coded chloroplast proteins. *European Journal of Biochemistry* 167: 493-499.
- Grimm, B., E. Kruse, and K. Kloppstech. 1989. Transiently expressed early light-inducible thylakoid proteins share transmembrane domains with light-harvesting chlorophyll binding proteins. *Plant Molecular Biology* 13: 583-593.
- Grossman, A., A. Manadori, and D. Snyder. 1990. Light-harvesting proteins of diatoms: their relationship to the chlorophyll *a/b* binding proteins of higher plants and their mode of transport into plastids. *Molecular & General Genetics* 224: 91-100.
- Grossman, A. R., D. Bhaya, K. E. Apt, and D. M. Kehoe. 1995. Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: diversity, control and evolution. *Annual Reviews of Genetics* 29: 231-288.
- Haehnel, W., R. Ratajczak, and H. Robenek. 1989. Lateral distribution and diffusion of plastocyanin in chloroplast thylakoids. *Journal of Cell Biology* 108: 1397-1405.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hansche, P. E. 1974. Gene duplication as a mechanism of genetic adaptation in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 79: 661-674.
- Harrer, R., R. Bassi, M. G. Testi, and C. Schäfer. 1998. Nearest-neighbour analysis of a PSII complex from *Marchantia polymorpha* (liverwort) which contains reaction center and antenna proteins. *Journal of Biochemistry* 255: 196-205.
- Havaux, M. 1998. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Sciences* 3: 147-151.
- Hearst, J. E., and K. Sauer. 1984. Protein sequence homologies between portions of the L and M subunits of reaction center of *Rhodospseudomonas capsulata* and the QB-protein of chloroplast thylacoid membranes. *Zeitschrift Fur Naturforschung C - A Journal of Biosciences* 39c: 421-424.
- Helfrich, M., A. Ross, G. C. King, A. G. Turner, and A. W. Larkum. 1999. Identification of [8-vinyl]-protochlorophyllide a in phototrophic prokaryotes and algae: chemical and spectroscopic properties. *Biochimica and Biophysica Acta* 1410: 262-72.
- Henrysson, T., W. P. Schröder, M. Spangfort, and H. E. Akerlund. 1989. Isolation and characterization of the chlorophyll *a/b* protein complex CP29 from spinach. *Biochimica et Biophysica Acta* 977: 301-308.
- Herdman, M., M. Janvier, R. Rippka, and R. Y. Stanier. 1979. Genome size of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111: 73-85.
- Herrmann, R. G., P. Westhoff, and G. Link. 1992. Biogenesis in plastids in higher plants in R. G. Herrmann, ed. *Plant gene research, vol 6 : Cell organelles*. Springer, Wien.
- Hess, W. R., C. Fingerhut, and A. Schon. 1998. RNase P RNA from *Prochlorococcus marinus*: contribution of substrate domains to recognition by a cyanobacterial ribozyme. *FEBS Letters* 431: 138-42.
- Hess, W. R., and F. Partensky. 1998. Identification of a putative gamma linker polypeptide gene in the marine oxyphotobacterium *Prochlorococcus marinus* - Implications for the phylogeny of *Prochlorococcus* phycoerythrins. Pages 751-761 in G. A. Peschek, W. Löffelhardt, and G. Schmetterer, eds. *The Phototrophic*

- Procarvates*. Plenum Press, New York.
- Hess, W. R., F. Partensky, G. W. van der Staay, J. M. Garcia-Fernandez, T. Borner, and D. Vault. 1996. Coexistence of phycoerythrin and a chlorophyll *a/b* antenna in a marine prokaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 93: 11126-30.
- Hess, W. R., C. Steglich, C. Lichtle, and F. Partensky. 1999. Phycoerythrins of the oxyphotobacterium *Prochlorococcus marinus* are associated to the thylakoid membrane and are encoded by a single large gene cluster. *Plant Molecular Biology* 40: 507-521.
- Hess, W. R., A. Weihe, S. Loiseaux-de Goër, F. Partensky, and D. Vault. 1995. Characterization of the single *psbA* gene of *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375 (Prochlorophyta). *Plant Molecular Biology* 27: 1189-1196.
- Hill, R., and F. Bendall. 1960. Function of two cytochrome components in chloroplasts. A working hypothesis. *Nature* 186: 136-137.
- Hiller, R. G., J. M. Anderson, and A. W. D. Larkum. 1991. The chlorophyll-protein complexes of algae. Pages 529-547 in H. Scheers, ed. *Chlorophylls*. CRC Press, Baton Rouge, LA.
- Hiller, R. G., and A. W. D. Larkum. 1985. The chlorophyll-protein complexes of *Prochloron* sp. (Prochlorophyta). *Biochimica et Biophysica Acta* 806: 107-115.
- Hiller, R. G., A. W. D. Larkum, and P. M. Wrench. 1988. Chlorophyll proteins of the prymnesiophyte *Pavlova lutherii* (Droop) comb. nov.: identification of the major light harvesting complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 932: 223-231.
- Hiller, R. G., C. D. Scaramuzzi, and J. Breton. 1992. The organization of photosynthetic pigments in a cryptophyte algae. A linear dichroism study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1102: 360-364.
- Hiller, R. G., P. M. Wrench, A. P. Gooley, G. Shoebridge, and J. Breton. 1993. The major intrinsic light harvesting protein of *Amphidinium*: characterization and relation to the other light harvesting proteins. *Photochemistry and Photobiology* 57: 125-131.
- Hiller, R. G., P. M. Wrench, and F. P. Sharples. 1995. The light harvesting chlorophyll *a/c*-binding protein of dinoflagellates: a putative polyprotein. *FEBS Letters* 363: 175-178.
- Hirschberg, J., and D. Chamovitz. 1994. Carotenoids in cyanobacteria. Pages 559-579 in D. A. Bryant, ed. *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Hiyama, T., and B. Ke. 1972. Difference spectra and extinction coefficient of P700. *Biochimica et Biophysica Acta* 267: 160-171.
- Hoffer, P. H., and D. A. Christopher. 1997. Structure and blue-light-responsive transcription of a chloroplast *psbD* promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 115: 213-222.
- Holschuh, K., W. Bottomley, and P. R. Whitfeld. 1984. Structure of the spinach chloroplast genes for the D2 and the 44 kDa reaction centre proteins of photosystem II and for tRNA^{SER}(UGA). *Nucleic Acids Research* 12: 8819-8834.
- Horton, P., and A. V. Ruban. 1992. Regulation of photosystem II. *Photosynthesis Research* 34: 375-385.
- Horton, P., A. V. Ruban, D. Rees, A. A. Pascal, G. Noctor, and A. J. Young. 1991. Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHCII chlorophyll-protein complex. *FEBS Letters* 292: 1-4.
- Houlné, G., and R. Schantz. 1988. Characterization of cDAN sequences for LHC I apoproteins in *Euglena*

- gracilis*; the mRNA encode a large precursor containing several consecutive divergent polypeptides. *Molecular & General Genetics* 213: 479-486.
- Huang, T.-C., T.-J. Chow, and T. H. Chen. 1990. Circadian rhythm of the prokaryote *Synechococcus* sp. RF-1. *Plant Physiology* 92: 531-533.
- Hwang, S., and D. L. Herrin. 1994. Control of *Lhc* gene transcription by the circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Molecular Biology* 26: 557-569.
- Iglesiasprieto, R., N. S. Govind, and R. K. Trench. 1993. Isolation and characterization of 3 membrane-bound chlorophyll protein-complexes from 4 dinoflagellates species. *Phylosophical Transactions of the Royal Society London B* 340: 381-392.
- Ingram, K., and R. G. Hiller. 1983. Isolation and characterization of a major chlorophyll *a/c2* light-harvesting protein from *Chroomonas* species (Cryptophyceae). *Biochimica et Biophysica Acta* 722: 310-319.
- Irrgang, K. D., L. X. Shi, C. Funk, and W. P. Schroder. 1995. A nuclear-encoded subunit of the photosystem II reaction center. *Journal of Biological Chemistry* 270: 17588-17593.
- Ish-Horowicz, D., and J. F. Burke. 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Research* 9: 2989.
- Jansen, M. A. K., B. Depka, A. Trebst, and M. Edelman. 1993. Engagement of specific sites in the plastoquinone niche regulates degradation of the D1 reaction centre protein of the photosystem II. *Journal of Biological Chemistry* 268: 21246-21252.
- Jansson, C., R. J. Debus, H. D. Osiewacz, M. Gurevitz, and L. McIntosh. 1987. Construction of an obligate photoheterotrophic mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Physiology* 85: 1021-1025.
- Jansson, S. 1994. The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1184: 1-19.
- Jansson, S. 1999. A guide to the *Lhc* genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Sciences* 4: 236-240.
- Jeffrey, S. W., and R. F. C. Mantoura. 1996. Development of pigment methods for oceanography: SCOR-supported working group and objectives. Pages 17-178 in S. W. Jeffrey, R. F. C. Mantoura, and S. W. Wright, eds. *Phytoplankton pigments in oceanography*. United Nations Educational, Paris.
- Johnson, C. H., and S. S. Golden. 1999. Circadian programs in cyanobacteria: Adaptiveness and mechanism. *Annual Revue of Microbiology* 53: 389-409.
- Johnson, P. W., and J. M. Sieburth. 1979. Chroococcoid cyanobacteria in the sea: a ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnology and Oceanography* 24: 928-935.
- Jukes, T. H., and V. Bushan. 1986. Silent nucleotide substitutions and G+C content of some mitochondrial and bacterial genes. *Journal of Molecular Evolution* 24: 39-44.
- Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirosawa, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda, and S. Tabata. 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Research* 3: 109-136.
- Kaneko, T., and S. Tabata. 1997. Complete genome structure of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant and Cell Physiology* 38: 1171-1176.

- Kay, S. A. 1993. Shedding light on clock controlled *cab* gene transcription in higher plants. *Seminars Cell Biology* 4: 81-86.
- Kay, S. A., and A. J. Millar. 1993. Circadian-regulated *cab* gene expression in higher plants. Pages 73-89 in M. W. Young, ed. *The molecular genetics of biological rhythms*. Dekker, New York.
- Kim, S., E. Pichersky, and C. F. Yocum. 1994. Topological studies of spinach 22-kDa protein in photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1188: 339-348.
- Kim, S., P. Sandusky, N. R. Bowlby, R. Aebersold, B. R. Green, S. Vlahakis, C. F. Yocum, and E. Pichersky. 1992. Characterization of a spinach *psbS* cDNA encoding the 22 kDa protein of photosystem II. *FEBS Letters* 314: 67-71.
- Klotz, A., V., A. N. Glazer, J. E. Bishop, J. O. Nagy, and H. Ropoport. 1986. Phycobilin linkage diversity. II. Structural studies on A- and D-ring linked phycoerythrobilins. *Journal of Biological Chemistry* 261: 15891-15894.
- Knoetzel, J., I. Svendsen, and D. J. Simpson. 1992. Identification of the photosystem I antenna polypeptides in Barley: isolation of 3 pigment-binding antenna complexes. *European Journal of Biochemistry* 206: 209-215.
- Knötzel, J., and L. Rensing. 1990. Characterization of the photosynthetic apparatus from the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyhedra*. I. Pigment polypeptide composition of the pigment-protein complexes. *Journal of Plant Physiology* 136: 271-279.
- Kondo, T., and M. Ishiura. 1999. The circadian clocks of plants and cyanobacteria. *Trends in Plant Sciences* 4: 171-176.
- Kondo, T., C. A. Strayer, R. D. Kulkarni, W. Taylor, M. Ishiura, S. S. Golden, and C. A. Johnson. 1993. Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter circadian gene expression in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 5672-5676.
- Kotani, H., and S. Tabata. 1998. Lessons from sequencing of the genome of a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC6803. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 151-171.
- Kowallik, K. V., B. Stoebe, I. Schaffran, P. Kroth-Pancic, and U. Freier. 1995. The chloroplast genome of a chlorophyll *a+c*-containing alga, *Odontella sinensis*. *Plant Molecular Biology* 13: 336-342.
- Kraay, G. W., M. Zapata, and M. J. W. Veldhuis. 1992. Separation of chlorophylls *c*₁, *c*₂, *c*₃ of marine phytoplankton by reversed-phase C18 high performance liquid chromatography. *Journal of Phycology* 28: 708-712.
- Krause, G. H., and E. Weis. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349.
- Krauss, N., W. Hinrichs, I. Witt, P. Fromme, and W. Protzkow. 1993. 3-Dimensional structure of the system-I of the photosynthesis at 6 angstrom resolution. *Nature* 361: 326-331.
- Krauss, N., W. D. Schubert, O. Klukas, P. Fromme, H. T. Witt, and W. Saenger. 1996. Photosystem I at 4 Å resolution represents the first structural model of a joint photosynthetic reaction centre and core antenna. *Nature Structural Biology* 3: 965-973.
- Kruip, J., P. R. Chitnis, B. Lagoutte, M. Rogner, and E. J. Boekema. 1997. Structural organization of the major subunits in cyanobacterial photosystem I - Localization of subunits PsaC, -D, -E, -F, and -J. *Journal of Biological Chemistry* 272: 17061-17069.
- Kühlbrandt, W., and D. N. Wang. 1991. Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex

- determined by electron crystallography. *Nature* 350: 130-134.
- Kühlbrandt, W., D. N. Wang, and Y. Fujiyoshi. 1994. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367: 614-621.
- Kulkarni, R. D., and S. S. Golden. 1995. Form II of D1 is important during transition from standard to high light intensity in *Synechococcus* sp strain PCC 7942. *Photosynthesis Research* 46: 435-443.
- Kulkarni, R. D., M. R. Schaefer, and S. S. Golden. 1992. Transcriptional and posttranscriptional components of *psbA* response to high light intensity in *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *Journal of Bacteriology* 174: 3775-3781.
- Larkum, A. W. D., C. Scaramuzzi, G. C. Cox, R. G. Hiller, and A. G. Turner. 1994. Light-harvesting chlorophyll *c*-like pigment in *Prochloron*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 679-683.
- LaRoche, J., D. Henry, K. Wyman, A. Sukenik, and P. Falkowsky. 1994. Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding a major fucoxanthine-, chlorophyll *a/c*-containing protein from the crysophyte *Isochrysis galbana*: implications for evolution of the *cab* gene family. *Plant Molecular Biology* 25: 355-368.
- LaRoche, J., G. W. van der Staay, F. Partensky, A. Ducret, R. Aebersold, R. Li, S. S. Golden, R. G. Hiller, P. M. Wrench, A. W. Larkum, and B. R. Green. 1996. Independent evolution of the prochlorophyte and green plant chlorophyll *a/b* light-harvesting proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 15244-8.
- Laudenbach, D. E., and N. A. Straus. 1988. Characterization of a cyanobacterial iron stress-induced gene similar to *psbC*. *Journal of Bacteriology* 170: 5018-26.
- Lee, A. I., and J. P. Thornber. 1995. An analysis of the pigment stoichiometry of pigment-protein complexes from Barley: the xanthophyll cycle intermediates occur mainly in the light harvesting complexes of PS I and PSII. *Plant Physiology* 107: 565-574.
- Lemesle-Varloot, L., B. Henrissat, C. Gaboriaud, V. Bissery, A. Morgat, and J. P. Mornon. 1990. Hydrophobic cluster analysis: procedure to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences. *Biochimie* 72: 555-574.
- Leonhardt, K., and N. A. Straus. 1992. An iron stress operon involved in photosynthetic electron transport in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Journal of General Microbiology* 138: 1613-21.
- Leonhardt, K., and N. A. Straus. 1994. Photosystem II genes *isiA*, *psbDI* and *psbC* in *Anabaena* sp. PCC 7120: cloning, sequencing and the transcriptional regulation in iron-stressed and iron-repleted cells. *Plant Molecular Biology* 24: 63-73.
- Lers, A., H. Levy, and A. Zamir. 1991. Coregulation of a gene homologous to early light-inducible genes in higher plants and beta-carotene biosynthesis in the alga *Dunaliella bardawil*. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 13698-13705.
- Levy, H., I. Gokhman, and A. Zamir. 1992. Regulation and light-harvesting complex II association of a *Dunaliella* protein homologous to early light-inducible proteins in higher plants. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 18831-18836.
- Levy, H., T. Tal, A. Shaish, and A. Zamir. 1993. Cbr, an algal homolog of plant early light-induced proteins, is a putative zeaxanthine binding protein. *Journal of Biological Chemistry* 268: 20892-20896.
- Lewin, R. A. 1976. Prochlorophyta as a proposed new division of algae. *Nature* 261: 697-8.

- Lewin, R. A., and N. W. Withers. 1975. Extraordinary pigment composition of a prokaryotic alga. *Nature, London* 256: 735-737.
- Li, N., J. Zhao, J. T. Warren, J. T. Warden, D. A. Bryant, and J. H. Golbeck. 1991. PsaD is required for the stable binding of PsaC to photosystem I core protein of *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Biochemistry* 30: 7863-7872.
- Li, W. K. W., and A. M. Wood. 1988. Vertical distribution of North Atlantic ultraphytoplankton: analysis by flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Deep-Sea Research* 35: 1615-1638.
- Li, X. P., O. Björkman, C. Shih, A. R. Grossman, M. Rosenquist, S. Jansson, and K. K. Niyogi. 2000. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403: 391-395.
- Lichtlé, C., J. C. Duval, and Y. Lemoine. 1987. Comparative biochemical, functional and ultrastructure studies of photosystem particles from a cryptophyceae: *Cryptomonas rufescens*, isolation of an active phycoerythrin particle. *Biochimica et Biophysica Acta* 894: 76-90.
- Lichtlé, C., J. C. Thomas, A. Spilar, and F. Partensky. 1995. Immunological and ultrastructural characterization of the photosynthetic complexes of the prochlorophyte *Prochlorococcus* (Oxychlorobacteria). *Journal of Phycology* 31: 934-941.
- Liebl, U., M. Mockensturm-Wilson, J. T. Trost, D. C. Brune, R. E. Balnkenship, and W. Vermaas. 1993. Single core polypeptide in the reaction center of the photosynthetic bacterium *Heliobacillus mobilis*: Structural implications and relations to the others photosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 7124-7128.
- Lindahl, M., C. Funk, J. Webster, S. Bingsmark, and I. Adamska. 1997. Expression of ELIPs and photosystem II-S protein in spinach during acclimatation reduction of photosystem II antenna in response to increased light intensities. *Photosynthesis Research* 54: 227-236.
- Lindell, D., and A. F. Post. 1995. Ultraphytoplankton succession is triggered by deep winter mixing in the Gulf of Aqaba (Eilat), Red Sea. *Limnology and Oceanography* 40: 1130-1141.
- Liu, Y., N. F. Tsinoremas, C. H. Johnson, N. V. Lebedeva, S. S. Golden, M. Ishiura, and T. Kondo. 1995. Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genes & Development* 9: 1469-1478.
- Lockau, W., and W. Nitschke. 1993. Photosystem I and its bacterial counterparts. *Physiologia Plantarum* 88: 372-381.
- Logemann, J., J. Schell, and L. Willmitzer. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry* 163: 16-20.
- Loiseaux-de Goër, S. 1994. Plastid lineages. Pages 137-177 in F. E. Round and D. J. Chapman, eds. *Progress in Phycological Research*. Biopress Ltd.
- Lönneborg, A., S. R. Kalla, G. Samuelsson, P. Gustafsson, and G. Öquist. 1988. Light regulated expression of the *psbA* transcripts in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *FEBS letter* 240: 110-114.
- Lorenz, M., T. Börner, and W. R. Hess. 1995. Molecular cloning and characterization of a dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) gene from the photoautotrophic prokaryote *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375 (Prochlorophyta). *Endocytobiosis and Cell Research* 11: 59-68.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. I. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lüning, K. 1990. *Seaweeds, their environmental biogeography and ecophysiology*. Wiley interscience

- publication, New York.
- MacColl, R. 1998. Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology* 124: 311-334.
- Machold, O. 1991. The structure of light-harvesting complex II as deduced from its polypeptide composition and stoichiometry I: Studies with *Vicia faba*. *Journal of Plant Physiology* 138: 678-684.
- Malkin, R. 1996. Photosystem I electron transfer reactions: components and kinetics. Pages 313-332 in D. R. Ort and C. F. Yocum, eds. *Advances in photosynthesis: the light reactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Margulis, L. 1996. Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: Phylogenetic classification of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 1071-1076.
- Marie, D., C. Brussaard, F. Partensky, and D. Vaultot. 1999. Flow cytometric analysis of phytoplankton, bacteria and viruses. Pages 11.11.1-11.11.15. in J. W. Sons, ed. *Current Protocols in Cytometry*. International Society for Analytical Cytology.
- Marie, D., F. Partensky, N. Simon, L. Guillou, and D. Vaultot. in press. Flow cytometry analysis of marine picoplankton in R. A. Diamond and S. DeMaggio, eds. *In living colors: protocols in flow cytometry and cell sorting*. RG Landes Company.
- Marie, D., N. Simon, L. Guillou, F. Partensky, and D. Vaultot. 2000. DNA, RNA analysis of phytoplankton by flow cytometry. Pages 11.12.1-11.12.14. in J. W. Sons, ed. *Current Protocols in Cytometry*.
- Marquardt, J., H. Senger, H. Miyashita, S. Miyachi, and E. Morschel. 1997. Isolation and characterization of biliprotein aggregates from *Acaryochloris marina*, a *Prochloron*-like prokaryote containing mainly chlorophyll *d*. *FEBS Letters* 410: 428-32.
- Marrs, K. A., and L. S. Kaufman. 1989. Blue-light regulation of transcription for nuclear genes in pea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 4492-4495.
- Mathis, J. N., and K. O. Burkey. 1987. Regulation of light harvesting chlorophyll protein biosynthesis in greening seedlings. *Plant Physiology* 85: 971-977.
- Matthijs, H. C. P., G. W. M. van der Staay, and L. R. Mur. 1994. Prochlorophytes: the "other" cyanobacteria? Pages 49-64 in D. A. Bryant, ed. *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Matto, A. K., H. Hoffman-Falk, J. B. Marder, and M. Edelman. 1984. Regulation of protein metabolism: coupling of photosynthetic electron transport to *in vivo* degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 1380-1384.
- Mayfield, S. P., and W. C. Taylor. 1984. Carotenoid-deficient maize seedlings fail to accumulate light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein (LHCP) mRNA. *European Journal of Biochemistry* 144: 79-84.
- Mayfield, S. P., C. B. Yohn, A. Cohen, and A. Danon. 1995. Regulation of chloroplast gene expression. *Annual Review of Plant Physiology* 46: 147-166.
- McDermott, A. E., V. K. Yachandra, R. D. Guiles, K. Sauer, K. G. Parrett, and J. H. Golbeck. 1989. An EXAFS structural study of the Fx, the low-potential Fe-S center in photosystem I. *Biochemistry* 28: 8056-8059.
- McManus, G. B., and R. Dawson. 1994. Phytoplankton pigments in the deep chlorophyll maximum of the Caribbean Sea and the western tropical Atlantic Ocean. *Marine Ecology-Progress Series* 113: 199-206.
- Melis, A. 1991. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochimica et Biophysica*

- Acta* 1058: 87-106.
- Melis, A. 1999. Photosystem-II damage and repair cycle in Chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*? *Trends in Plant Science* 4: 130-135.
- Meyer, T. E. 1994. Evolution of photosynthetic reaction centers and light harvesting chlorophyll proteins. *Biosystems* 33: 167-175.
- Michel, H., and J. Deseinoffer. 1988. Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of the photosystem II. *Biochemistry* 27: 1.7.
- Michel, H., K. A. Weyer, H. Gruenberg, I. Dunger, D. Oesterheld, and F. and Lottspeich. 1986. The "light" and "medium" subunits of the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*: isolation of the genes, nucleotide and amino acid sequences. *The EMBO Journal* 5: 1149-1158.
- Millar, A. J., and S. A. Kay. 1991. Circadian control of *cab* genetranscription and mRNA accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3: 541-550.
- Miroshnichenko Dolganov, N. A., D. Bhaya, and A. R. Grossman. 1995. Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll *a/b* binding proteins of higher plants: evolution and regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 636-640.
- Mitsui, A., S. Kumazawa, S. Takahashi, H. Ikemoto, S. Cao, and T. Arai. 1986. Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature, London* 323: 720-722.
- Miyashita, H., K. Adachi, N. Kurano, H. Ikemoto, M. Chihara, and S. Miyachi. 1997. Pigment composition of a novel oxygenic photosynthetic prokaryote containing chlorophyll *d* as the major chlorophyll. *Plant and Cell Physiology* 38: 274-281.
- Miyashita, H., H. Ikemoto, N. Kurano, K. Adachi, M. Chihara, and S. Miyachi. 1996. Chlorophyll *d* as a major pigment. *Nature, London* 383: 402.
- Mohamed, A., J. Eriksson, H. D. Osiewacz, and C. Jansson. 1993. Differential expression of the *psbA* genes in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Molecular & General Genetics* 238: 161-168.
- Moore, L. R., and S. W. Chisholm. 1999. Photophysiology of the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*: Ecotypic differences among cultured isolates. *Limnology and Oceanography* 44: 628-638.
- Moore, L. R., R. Goericke, and S. W. Chisholm. 1995. Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Marine Ecology-Progress Series* 116: 259-275.
- Moore, L. R., G. Rocap, and S. W. Chisholm. 1998. Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* 393: 464-467.
- Morden, C. W., and S. S. Golden. 1989. *psbA* genes indicate common ancestry of prochlorophytes and chloroplasts: corrigendum. *Nature, London* 339: 400.
- Morel, A. 1978. Available, usable, and stored radiant energy in relation to marine photosynthesis. *Deep - Sea Research* 25: 673-688.
- Morel, A., Y.-W. Ahn, F. Partensky, D. Vaultot, and H. Claustre. 1993. *Prochlorococcus* and *Synechococcus* : a comparative study of their size, pigmentation and related optical properties. *Journal of Marine Research* 51: 617-649.
- Mösinger, E., A. Batschauer, E. Schäfer, and K. Apel. 1985. Phytochrome control of *in vitro* transcription of specific genes in isolated nuclei from Barley (*Hordeum vulgare*). *European Journal of Biochemistry* 147: 137-

- 142.
- Muchhal, U. S., and S. D. Scharwzbach. 1992. Characterization of a *Euglena* gene encoding a polyprotein precursor of the light harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein of photosystem II. *Plant Molecular Biology* 18: 287-299.
- Mühlhoff, U., W. Haehnel, H. Witt, and R. G. Herrmann. 1993. Genes encoding 11 subunits of photosystem I from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Gene* 127: 71-78.
- Mullet, J. E. 1983. The amino acid sequence of the polypeptide segment which regulates membrane adhesion (grana stacking) in chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* 258: 9941.
- Mullineaux, C. W. 1992. Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in a cyanobacterium. *Biochimica et Biophysica Acta* 1100: 285-292.
- Mullineaux, C. W. 1999. The thylakoid membranes of cyanobacteria: structure, dynamics and function. *Australian Journal of Plant Physiology* 26: 671-677.
- Myers, J. 1963. Enhancement. Pages 301-317 in B. Kok and A. T. Jagendorf, eds. *Photosynthetic mechanism in green plants*. National Academic Sciences National Research Council, Washington, D. C.
- Neale, P. J. 1987. Algal photoinhibition and photosynthesis in the aquatic environment. Pages 39-65 in D. J. Kyle, C. B. Osmond, and C. J. Arntzen, eds. *Photosynthesis*. Elsevier, Amsterdam.
- Neveux, J., D. Vaultot, C. Courties, and E. Fukai. 1989. Green photosynthetic bacteria associated with the deep chlorophyll maximum of the Sargasso Sea. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris (III)* 308: 9-14.
- Newman, P. J., and L. A. Sherman. 1978. Isolation and characterization of photosystem I and II membranes particles from the blue alga, *Synechococcus cedrorum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 5023: 343-361.
- Nikolaitchik, O. A., and G. S. Bullerjahn. 1998. Transcript analysis of the *pcbABC* genes encoding the antenna apoproteins in the photosynthetic prokaryote, *Prochlorothrix hollandica*. *FEMS Microbiological Letters* 168: 187-94.
- Nilsson, F., B. Andersson, and C. Jansson. 1990. Photosystem II characteristics of a constructed *Synechocystis* 6803 mutant lacking synthesis of the D1 polypeptide. *Plant Molecular Biology* 14: 1051-1054.
- Nitschke, W., U. Feiler, W. Lockau, and G. Hauska. 1987. The photosystem of the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola* contains two early electron acceptors similar to photosystem I. *FEBS Letters* 218: 283-286.
- Nitschke, W., and W. Rutherford. 1991. Photosynthetic reaction centers-variations on a theme. *Trends in Biochemical Sciences* 16: 241-245.
- Norris, B. J., and D. J. Miller. 1994. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the precursor of the peridinin-chlorophyll *a*-binding protein from the dinoflagellate *Symbiodinium* sp. *Plant Molecular Biology* 24: 673-677.
- Nugent, J. H. A. 1996. Oxygenic photosynthesis - Electron transfer in photosystem I and photosystem II. *European Journal of Biochemistry* 237: 519-531.
- Oelmüller, R., and H. Mohr. 1986. Photooxydative destruction of chloroplasts and its consequences on expression of nuclear genes. *Planta* 167: 89-96.
- Oelmüller, R., A. Schneiderbauer, and R. G. Herrmann. 1995. The steady-state mRNA levels for thylakoid proteins exhibit coordinate diurnal regulation. *Molecular & General Genetics* 246: 478-484.

- Ohad, I., D. J. Kyle, and C. J. Arntzen. 1984. Membran protein damage and repair, removal and replacement of inactivated 32 kDa polypeptide in chloroplast membranes. *Journal of Cell Biology* 99: 481-485.
- Olson, R. J., E. R. Zettler, M. A. Altabet, J. A. Dusenberry, and S. W. Chisholm. 1990. Spatial and temporal distributions of prochlorophyte picoplankton in the North Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research* 37: 1033-1051.
- Olson, R. J., E. R. Zettler, S. W. Chisholm, and J. A. Dusenberry. 1991. Advances in Oceanography through flow cytometry. Pages 351-399 in S. Demers, ed. *Particle Analysis in Oceanography*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Ong, L. J., and J. B. Waterbury. 1984. An unusual phycoerythrin from a marine cyanobacterium. *Science* 24: 80-83.
- Oquist, G., D. Campbell, A. K. Clarke, and P. Gustafsson. 1995. The cyanobacterium *Synechococcus* modulates photosystem II function in response to excitation stress through D1 exchange. *Photosynthesis Research* 46: 151-158.
- Ort, D. R., and C. F. Yocum. 1996. Electron transfert and energy transduction in photosynthesis: an overview. Pages 1-9 in D. R. Ort and C. F. Yocum, eds. *Oxygenic photosynthesis; the light reactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Owens, T. G. 1996. Processing of excitation energy by antenna pigments. Pages 1-23 in N. R. Baker, ed. *Photosynthesis and environment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Owens, T. G., and E. R. Wold. 1986. Light harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*: Isolation and characterization of pigment protein-complexes. *Plant Physiology* 80: 732-738.
- Pakrasi, H. B. 1995. Genetic analysis of the form and function of the photosystem I and photosystem II. *Annual Review of Genetics* 29: 755-776.
- Pakrasi, H. B., A. Goldenberg, and L. A. Sherman. 1985. Membrane development in the cyanobacterium, *Anacystis nidulans* during recovery from iron starvation. *Plant Physiology* 79: 290-295.
- Pakrasi, H. B., and W. F. J. Vermaas. 1992. Protein engineering of photosystem II. Pages 231-56 in J. Barber, ed. *Current topics in photosynthesis*. Elsevier, Amsterdam.
- Palenik, B. 1994. Cyanobacterial community structure as seen from RNA polymerase gene sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3212-9.
- Palenik, B., and R. Haselkorn. 1992. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll *b*-containing prokaryotes. *Nature* 355: 265-7.
- Palsson, L. O., S. E. Tjus, B. Andersson, and T. Gillbro. 1995. Ultrafast energy transfert dynamics resolved in isolated spinach light-harvesting complex I and the LHC I-730 subpopulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1230: 1-9.
- Park, Y. I., W. S. Chow, and J. M. Anderson. 1997. Antenna size dependency of photoinactivation of photosystem II in light-acclimated pea leaves. *Plant Physiology* 115: 151-157.
- Park, Y. I., S. Sandstrom, P. Gustafsson, and G. Oquist. 1999. Expression of the *isiA* gene is essential for the survival of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 by protecting photosystem II from excess light under iron limitation. *Molecular Microbiology* 32: 123-129.
- Partensky, F., J. Blanchot, F. Lantoine, J. Neveux, and D. Marie. 1996. Vertical structure of picophytoplankton at different trophic sites of the tropical northeastern Atlantic Ocean. *Deep - Sea Research I* 43: 1191-1213.

- Partensky, F., J. Blanchot, and D. Vaultot. 1999a. Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. Pages 457-475 in L. Charpy and A. W. D. Larkum, eds. *Marine Cyanobacteria*. Bull. Inst. Océanogr., Monaco.
- Partensky, F., W. R. Hess, and D. Vaultot. 1999b. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 106-127.
- Partensky, F., N. Hoepffner, W. K. W. Li, O. Ulloa, and D. Vaultot. 1993. Photoacclimation of *Prochlorococcus* sp (Prochlorophyta) strains isolated from the North Atlantic and the Mediterranean Sea. *Plant Physiology* 101: 295-296.
- Partensky, F., J. LaRoche, K. Wyman, and P. G. Falkowski. 1997. The divinyl-chlorophyll *a/b*-protein complexes of two strains of the oxyphototrophic marine prokaryote *Prochlorococcus* - Characterization and response to changes in growth irradiance. *Photosynthesis Research* 51: 209-222.
- Passaquet, C., J. C. Thomas, L. Caron, N. Hauswirth, F. Puel, and C. Berkaloff. 1991. Light-harvesting complexes of brown algae. Biochemical characterization and immunological relationship. *FEBS Letters* 280: 21-26.
- Paulsen, H. 1995. Chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Photochemistry and Photobiology* 62: 367-382.
- Penno, S., L. Campbell, and W. R. Hess. 2000a. Presence of phycoerythrin in two strains of *Prochlorococcus* isolated from the sub-tropical North Pacific Ocean. *Journal of Phycology* in press.
- Penno, S., J. E. Lamerdin, F. W. Larimer, and W. R. Hess. 2000b. Comparative Genomics in Marine Cyanobacteria: Evolution of the Phycoerythrin Gene Cluster in *Prochlorococcus*. *Genomes 2000*, Paris.
- Peter, G. F., and J. P. Thornber. 1991. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem-II light-harvesting pigment-protein. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 16745-16754.
- Petrouleas, V., J. J. Brand, K. P. Parrett, and J. H. Golbeck. 1989. A Mössbauer analysis of the low-potential iron-sulfur center in photosystem I. Spectroscopic evidence that Fx is a [4Fe-4S] cluster. *Biochemistry* 28: 8980-8983.
- Pickersky, E., R. Subramaniam, M. J. White, J. Reid, R. Aebersold, and B. R. Green. 1991. Chlorophyll *a/b* binding CAB polypeptides of CP29, the internal chlorophyll *a/b* complex of photosystem II: characterization of the tomato gene encoding the 26 kDa (type I) polypeptides and evidence for a second CP29 polypeptide. *Molecular & General Genetics* 227: 277-284.
- Piechulla, B. 1993. "Circadian clock" directs the expression of plant genes. *Plant Molecular Biology* 22: 533-542.
- Piechulla, B. 1999. Circadian expression of the light-harvesting complex protein genes in plants. *Chronobiology International* 16: 115-128.
- Piechulla, B., N. Merforth, and B. Rudolph. 1998. Identification of tomato *Lhc* promoter necessary for circadian expression. *Plant Molecular Biology* 38: 655-662.
- Pinevich, A. V. 1997. Intracytoplasmic membrane structures in bacteria. *Endocytobiosis and Cell Research* 12: 9-40.
- Pinevich, A. V., S. G. Averina, and N. V. Velichko. 1997. Another view on the role of photosynthetic pigments in taxonomy of oxygenic-phototrophic bacteria: proposed rejection of the order Prochlorales Florenzano, Balloni, and Materassi 1986 (Emend. Burger-Wiersma, Stal, and Mur 1989), the family Prochloraceae Florenzano, Balloni, and Materassi 1986, and the family Prochlorotrichaceae Burger-Wiersma, Stal, and Mur

1989. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 1264-1267.
- Pinevich, A. V., O. M. Skulberg, H. C. P. Matthijs, H. Schubert, E. Willen, O. V. Gavriloova, and N. Velichko. 1999. Characterization of a novel chlorophyll b-containing *Prochlorothrix* species (Prochlorophyta) and its photosynthetic apparatus. *Microbios* 100: 159-174.
- Plumley, F. G., and G. W. Schmidt. 1987. Reconstitution of the chlorophyll *a/b* light-harvesting complexes: xanthophyll-dependent assembly and energy transfert. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 146-150.
- Porter, G., C. J. Tredwell, G. F. W. Searle, and J. Barber. 1978. Picosecond time-resolved energy transfer in *Porphyridium cruentum*. Part I. In the intact alga. *Biochimica et Biophysica Acta* 501: 232-245.
- Post, A. F., and G. S. Bullerjahn. 1994. The photosynthetic machinery in Prochlorophytes: structural properties and ecological significance. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 393-414.
- Preiss, S., G. F. Peter, S. Anandan, and J. P. Thornber. 1993. The multiple pigment-proteins of the photosystem-I antenna. *Photochemistry and Photobiology* 57: 152-157.
- Prince, R. C., T. Gest, and R. E. Blankenship. 1985. Thermodynamic properties of the photochemical reaction center of *Heliobacterium chlorum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 810: 377-384.
- Ragan, M. A. 1981. Chemical constituents of seaweeds. Pages 589-626 in C. S. Lobban and M. J. Wynne, eds. *The biology of seaweeds*. Blackwell, Oxford.
- Raines, C. A., and J. C. Lloyd. 1996. Molecular biological approaches to environmental effects on photosynthesis. Pages 305-319 in N. R. Baker, ed. *Photosynthesis and the environment*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, London.
- Reith, M. 1996. The evolution of plastids and the photosynthetic apparatus. Pages 643-657 in D. R. Ort and C. F. Yocum, eds. *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Rhee, K. H., E. P. Morris, J. Barber, and W. Kühlbrandt. 1998. Three-dimensional structure of photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature* 396: 283-286.
- Rhiel, E., J. Kunz, and W. Wehrmeyer. 1989. Immunocytochemical localization of phycoerythrin-545 and of a chlorophyll *a/c* light harvesting complex in *Cryptomonas maculata* (Cryptophyceae). *Botanica Acta* 102: 46-53.
- Rhiel, E., J. Marquardt, M. Eppard, E. Morschel, and W. E. Krumbein. 1997. The light harvesting system of the diatom *Cyclotella cryptica*. Isolation and characterization of the main light harvesting complex and evidence for the existence of minor pigment proteins. *Botanica Acta* 110: 109-117.
- Rhiel, E., and E. Mörschel. 1993. The atypical Chlorophyll *a/b/c* light-harvesting complex of *Mantoniella squamata*: Molecular cloning and sequence analysis. *Molecular & General Genetics* 240: 403-413.
- Riesselmann, S., and B. Piechulla. 1992. Diurnal and circadian light-harvesting complex and quinone B-binding protein synthesis in leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiology* 100: 1840-1845.
- Riethman, H. C., and L. A. Sherman. 1988a. Immunological characterization of iron-regulated membrane proteins in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Plant Physiology* 88: 497-505.
- Riethman, H. C., and L. A. Sherman. 1988b. Purification and characterization of an iron-stress induced chlorophyll-protein from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Biochimica et Biophysica Acta* 935: 141-151.
- Rippka, R. 1988. Isolation and purification of Cyanobacteria. Pages 3-27 in L. Packer and A. N. Glazer, eds.

- Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego.
- Rippka, R., T. Coursin, W. R. Hess, C. Lichtlé, D. J. Scanlan, K. A. Palinska, I. Itean, F. Partensky, N. Tandeau de Marsac, J. Houmard, and M. Herdman. 2000. *Prochlorococcus marinus* Chisholm et al. 1992, subsp. nov. *pastoris*, strain PCC 9511, the first axenic chlorophyll *a2/b2*-containing cyanobacterium (Oxyphotobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* Sous presse.
- Rocap, G., L. Moore, and S. W. Chisholm. 1999. Molecular phylogeny of *Prochlorococcus* ecotypes. Pages 457-475 in L. Charpy and A. W. D. Larkum, eds. *Marine Cyanobacteria*. Bull. Inst. Océanogr., Monaco.
- Rochaix, J. D. 1992. Post-transcriptional steps in the expression of chloroplast genes. *Annual Review of Cell Biology* 8: 1-28.
- Rögner, M., P. J. Nixon, and A. D. Diner. 1989. Purification and characterization of photosystem I and II core complexes from wild-type and phycocyanin-deficient strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry* 265(11): 6189-6196.
- Rutherford, A. W., and W. Nischke. 1996. Photosystem II and the quinone-iron containing reaction centres: comparison and evolutionary perspectives. Pages 143-174 in H. Baltscheffsky, ed. *Origin and evolution of biological energy conversion*. VCH Publishers, New York.
- Rutherford, A. W., J. L. Zimmermann, and A. Boussac. 1992. Oxygen evolution. Pages 179-229 in J. Barber, ed. *The photosystems: structure, function and molecular biology*. Elsevier science publishers, Amsterdam.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sambrook, E., F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Sanger, F., S. Niklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.
- Sato, M., J. Shibato, T. Aida, M. Asayama, and M. Shirai. 1996. Light-responsive and rhythmic gene expression of *psbA2* in cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* K-81. *Journal of General and Applied Microbiology* 42: 381-391.
- Satoh, K. 1982. Fractionation of thylakoid-bound chlorophyll-protein complexes by isoelectric focussing. Pages 845-856 in M. Edelman, R. P. Hallick, and N. H. Chua, eds. *Method in chloroplast molecular biology*. Elsevier Biomedical, Amsterdam.
- Satoh, K. 1993. *Isolation and properties of the photosystem II reaction center*. Academic, San Diego.
- Satoh, K. 1996. Introduction to the photosystem II reaction center. Isolation and biochemical and biophysical characterization. Pages 193-211 in D. R. Ort and C. F. Yocum, eds. *Advances in photosynthesis: The light reactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Sayre, R. T., and E. A. von Wrobelboerner. 1994. Molecular topology of the photosystem II chlorophyll alpha binding protein, CP43: topology of a thylakoid membrane protein. *Photosynthesis Research* 40: 11-19.
- Scanlan, D. J., W. R. Hess, F. Partensky, J. Scanlan, and D. Vaultot. 1996. High degree of genetic variation in *Prochlorococcus* (Prochlorophyta) revealed by RFLP analysis. *European Journal of Phycology* 31: 1-9.
- Schaefer, M. R., and S. S. Golden. 1989a. Differential expression of members of a cyanobacterial *psbA* gene family in response to light. *Journal of Bacteriology* 171: 3973-3981.
- Schaefer, M. R., and S. S. Golden. 1989b. Light availability influences the ratio of the two forms of D1 in cyanobacterial thylakoids. *Journal of Biological Chemistry* 264: 7412-7417.

- Scheller, H. V., H. Naver, and B. L. Moller. 1997. Molecular aspects of photosystem I. *Physiologia Plantarum* 100: 842-851.
- Schmidt, T. M., E. F. DeLong, and N. R. Pace. 1991. Analysis of marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of Bacteriology* 173: 4371-4378.
- Schmitt, A., G. Frank, P. James, W. Staudenmann, H. Zuber, and C. Wilhelm. 1994. Polypeptide sequence of the Chlorophyll *a/b/c*-binding protein of the *Prasinophycean* *Mantoniella squamata*. *Photosynthesis Research* 40: 269-277.
- Schubert, W. D., O. Klukas, N. Krauss, W. Saenger, P. Fromme, and H. T. Witt. 1997. Photosystem I of *Synechococcus elongatus* at 4 angstrom resolution: comprehensive structure analysis. *Journal of Molecular Biology* 272: 741-769.
- Schubert, W. D., O. Klukas, W. Saenger, H. T. Witt, P. Fromme, and N. Krauss. 1998. A common ancestor for oxygenic and anoxygenic photosynthetic systems. A comparison based on the structural model of photosystem I. *Journal of Molecular Biology* 280: 297-314.
- Schuster, G., R. Nechushtai, B. L. Nelson, and I. Ohad. 1985. Purification and composition of photosystem I reaction center of *Prochloron* sp., an oxygen-evolving prokaryote containing chlorophyll *b*. *FEBS Letters* 191: 29-33.
- Schuster, G., G. C. Owens, Y. Cohen, and I. Ohad. 1984. Thylakoid polypeptide composition and light-independent phosphorylation of the chlorophyll *a/b*-protein in *Prochloron*, a prokaryote exhibiting oxygenic photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 767: 596-605.
- Schwartz, E., D. Shen, R. Aebersold, J. M. McGrath, E. Pichersky, and B. R. and Green. 1991. Nucleotide sequence and chromosomal location of Cab11 and Cab12, the genes for the fourth polypeptide of the photosystem I light-harvesting antenna (LHCI). *FEBS* 280: 229-234.
- Searle, G. F. W., J. Barber, G. Porter, and C. J. Tredwell. 1978. Picosecond time-resolved energy transfer in *Porphyridium cruentum*. Part II. In the isolated light harvesting complex (phycobilisomes). *Biochimica et Biophysica Acta* 501: 246-256.
- Seibert, M. 1993. Biochemical, Biophysical and structural characterization of the isolated photosystem II reaction center complex. Pages 319-56 in J. Deisenhofer and J. R. Norris, eds. *The photosynthetic reaction center*. Academic, San Diego.
- Selosse, M. A., and S. Loiseaux-de-Goër. 1997. La saga de l'endosymbiose - Les mitochondries et les plastes, témoins et acteurs de l'évolution. *La Recherche* 296: 36-41.
- Setif, P. 1992. Energy transfer and trapping in photosystem I. Pages 471-499 in J. Barber, ed. *The photosystems: structure, function and molecular biology, topics in photosynthesis II*. Elsevier, Amsterdam.
- Sexton, T. B., D. A. Christopher, and J. E. Mullet. 1990. Light-induced switch in barley *psbD-psbC* promoter utilization: a novel mechanism regulating chloroplast gene expression. *EMBO Journal* 9: 4485-4494.
- Shalapyonok, A., R. J. Olson, and L. S. Shalapyonok. 1998. Ultradian growth in *Prochlorococcus* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1066-1069.
- Shapiro, L. P., and E. M. Haugen. 1988. Seasonal distribution and temperature tolerance of *Synechococcus* in Boothbay Harbor, Maine. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 26: 517-525.
- Sharp, P. M., and G. Matassi. 1994. Codon usage and genome evolution. *Current Opinion in Genetics and Development* 4: 851-860.

- Shen, G., J. J. Eaton-Rye, and W. F. Vermaas. 1993. Mutation of histidine residues in CP47 leads to destabilization of the photosystem II complex and to impairment of light energy transfer. *Biochemistry* 32: 5109-5115.
- Shen, J. R., and Y. Inoue. 1993. Binding and functional properties of two new extrinsic components, cytochrome *c*-550 and a 12-kDa protein, in cyanobacterial photosystem II. *Biochemistry* 32: 1825-1832.
- Shimada, A., S. Kanai, and T. Maruyama. 1995a. Partial sequence of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the phylogeny of Prochloron and Prochlorococcus (Prochlorales). *Journal of Molecular Evolution* 40: 671-7.
- Shimada, A., T. Maruyama, and S. Miyachi. 1996. Vertical distributions and photosynthetic action spectra of two oceanic picophytoplankters, *Prochlorococcus marinus* and *Synechococcus* sp. *Marine Biology* 127: 15-23.
- Shimada, A., M. Nishijima, and T. Maruyama. 1995b. Seasonal abundance of *Prochlorococcus* in Suruga Bay, Japan in 1992-1993. *Journal of Oceanography* 51: 289-300.
- Sidler, W. A. 1994. Phycobilisome and phycobiliprotein structure. Pages 139-216 in D. A. Bryant, ed. *The molecular Biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publisher, Netherlands.
- Siefermann-Harms, D. 1985. Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochimica et Biophysica Acta* 811: 325-355.
- Silverstone, J., and E. M. Tobin. 1987. Phytochrome regulation of nuclear gene expression. *Bioassays* 7: 18-22.
- Smart, L. B., and L. McIntosh. 1991. Expression of photosynthesis genes in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803: *psaA-psaB* and *psbA* transcripts accumulates in dark-grown cells. *Plant Molecular Biology* 17.
- Smart, L. B., and L. McIntosh. 1993. Genetic inactivation of the *psaB* gene in *Synechocystis* sp. PCC6803 disrupts assembly of photosystem I. *Plant Molecular Biology* 21: 177-180.
- Smith, S. W., R. Overbeek, C. R. Woese, and W. Gilbert. 1994. The genetic data environment : an expendable GUI for multiple sequence analyses. *CABIOS* 10: 671-675.
- Smith, S. W., C. Wang, P. M. Gillevet , and W. Gilbert. 1992. Genetic Data Environment and the Harvard Genome Database. Genome Mapping and Sequencing,, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Staelin, L. A., and G. W. M. van der Staay. 1996. Structure, composition, functional organization and dynamic properties of thylakoid membranes. Pages 11-30 in D. R. Ort and F. Yocum, eds. *Oxygenic photosynthesis: The light reactions*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Stewart, D. H., and G. W. Brudvig. 1998. Cytochrome b559 of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1367: 63-87.
- Stiller, J. W., and B. D. Hall. 1997. The origin of red algae: Implications for plasmid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 4520-4525.
- Strauss, N. A. 1994. Iron deprivation: Physiology and gene regulation. Pages 731-750 in D. A. Bryant, ed. *Advances in photosynthesis: the molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Strehl, B., J. Holtendorff, F. Partensky, and W. R. Hess. 1999. A small and compact genome in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375: lack of an intron in the gene for tRNA(Leu)(UAA) and a single copy of the rRNA operon. *FEMS Microbiological Letters* 181: 261-266.
- Sueoka, N. 1992. Directional mutation pressure, selective constraints, and genetic equilibria. *Journal of*

- Molecular Evolution* 34: 95-114.
- Sulli, C., and S. D. Schwartzbach. 1995. The polyprotein precursor to the Euglena light-harvesting Chl a/b-binding protein is transported to the Golgi apparatus prior to chloroplast import and polyprotein processing. *Journal of Biological Chemistry* 270: 13084-13090.
- Svensson, B., I. Vass, and S. Styring. 1991. Sequence analysis of the D1 and D2 reaction center proteins of Photosystem II. *Zeitschrift Fur Naturforschung C - A Journal of Biosciences* 46C: 765-776.
- Sylversthorpe, J., and E. M. Tobin. 1984. Demonstration of transcriptional regulation of specific genes by phytochrome action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 1112-1116.
- Tan, S., G. R. Wolfe, F. X. Cunningham, and E. Gantt. 1995. Decrease of polypeptides in the PS I antenna complex with increasing growth irradiance in the red alga *Porphyridium cruentum*. *Photosynthesis Research* 45: 1-10.
- Tanaka, A., H. Ito, R. Tanaka, N. K. Tanaka, K. Yoshida, and K. Okada. 1998. Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 12719-23.
- Tandeau de Marsac, N., and G. Cohen-Bazire. 1977. Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 1635-1639.
- Tandeau de Marsac, N., D. Mazel, V. Capuano, G. Damerval, and J. Houmard. 1990. Genetic analysis of the cyanobacterial light-harvesting antenna complex. Pages 143-153 in G. Drews and E. A. Dawes, eds. *The molecular biology of membrane-bound complexes in phototrophic bacteria*. Plenum Press, New York.
- Tandeau de Marsac, N., D. Mazel, G. Damerval, G. Guglielmi, V. Capuano, and J. Houmard. 1988. Photoregulation of gene expression in the filamentous cyanobacterium *Calothrix sp.* 7601: light harvesting complexes and cell differentiation. *Photosynthesis Research* 18: 99-132.
- Tang, D., R. Jankowiak, M. Seibert, C. F. Yocum, and G. I. Samml. 1990. Excited-state structure and energy-transfer dynamics of two different preparations of the reaction center of photosystem II: a hole burning study. *Journal of Physiology and Chemistry* 94: 6519-6522.
- Taylor, W. C. 1989. Transcriptional regulation by circadian rhythm. *Plant Cell* 1: 259-264.
- Terashima, I., and Y. Inoue. 1985. Vertical gradient in photosynthetic properties of spinach chloroplasts dependant on intra-leaf light environment. *Plant Cell Physiology* 26: 781-785.
- Thompson, W. F., and M. J. White. 1991. Physiological and molecular studies of light regulated nuclear genes in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 42: 423-466.
- Ting, C., G. Rocap, J. King, and S. W. Chisholm. 1998. Characterization of phycoerythrin genes in the chlorophyll A2/B2-containing procaryote, *Prochlorococcus sp.* MIT9303. Pages 225-228 in G. Garab, ed. *Photosynthesis: mechanisms and effects*. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands.
- Tjus, S. E., M. Roobol-Boza, L. O. Palson, and B. Andersson. 1995. Rapid isolation of photosystem I chlorophyll binding protein by anion exchange perfusion chromatography. *Photosynthesis Research* 45: 41-49.
- Tobin, E. M., and J. Silverstone. 1985. Light regulation of gene expression in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 36: 569-594.
- Tomitani, A., K. Okada, H. Miyashita, H. C. P. Matthijs, T. Ohno, and A. Tanaka. 1999. Chlorophyll b and

- phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts. *Nature* 400: 159-162.
- Towbin, S. E., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76: 4350-4354.
- Trebst, A. 1986. The topology of the plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystem II in the thylakoid membrane. *Zeitschrift Fur Naturforschung C - A Journal of Biosciences* 41c: 240-245.
- Trost, J. T., and R. E. Blankenship. 1989. Isolation of a photoactive photosynthetic reaction center-core antenna complex from *Heliobacillus mobilis*. *Biochemistry* 28: 9898-9904.
- Trost, J. T., D. C. Brune, and R. E. Blankenship. 1992. Protein sequences and redox titrations indicate that the electron acceptors in reaction centers from Heliobacteria are similar to photosystem I. *Photosynthesis Research* 32: 11-22.
- Turner, S., K. M. Pryer, V. P. W. Miao, and J. D. Palmer. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: 327-338.
- Urbach, E., and S. W. Chisholm. 1998. Genetic diversity in *Prochlorococcus* populations flow cytometrically sorted from the Sargasso Sea and Gulf Stream. *Limnology and Oceanography* 43: 1615-1630.
- Urbach, E., D. L. Robertson, and S. W. Chisholm. 1992. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature* 355: 267-70.
- Urbach, E., D. J. Scanlan, D. L. Distel, J. B. Waterbury, and S. W. Chisholm. 1998. Rapid diversification of marine picophytoplankton with dissimilar light-harvesting structures inferred from sequences of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Cyanobacteria). *Journal of Molecular Evolution* 46: 188-201.
- Vallon, O., L. Bulte, P. Dainese, O. J., R. Bassi, and F. A. Wollman. 1991. Lateral redistribution of cytochrome b6/f complexes along thylakoid membranes upon state transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 8262-8266.
- Van Amerongen, H., B. M. Van Bolhuis, S. Betts, R. Mei, R. Van Grondelle, and e. al. 1994. Spectroscopic characterization of CP26, a chlorophyll *a/b* binding protein of higher plant photosystem II complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 1188: 227-234.
- van den Hoek, G., D. G. Mann, and H. M. Janhs. 1995. *Algae, an introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- van der Bolt, F. V., and W. Vermaas. 1992. Photoinactivation of photosystem II as studied with site-directed D2 mutants of the cyanobacterium *Synechocystis sp.* 6803. *Biochimica et Biophysica Acta* 1098: 247-254.
- van der Staay, G. W., and L. A. Staehelin. 1994. Biochemical characterization of protein composition and protein phosphorylation patterns in stacked and unstacked thylakoid membranes of the prochlorophyte *Prochlorothrix hollandica*. *Journal of Biological Chemistry* 269: 24834-44.
- van der Staay, G. W. M., A. Brouwer, R. L. Baard, F. van Mourik, and H. C. P. Matthijs. 1992. Separation of photosystems I and II from the oxychlorobacterium (prochlorophyte) *Prochlorothrix hollandica* and association of chlorophyll *b* binding antennae with photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1102: 220-228.
- van der Staay, G. W. M., S. Y. Moon-van der Staay, L. Garczarek, and F. Partensky. 1998a. Characterization of the Photosystem I subunits PsaI and PsaL from two strains of the marine oxyphototrophic prokaryote

- Prochlorococcus*. *Photosynthesis Research* 57: 183-191.
- van der Staay, G. W. M., N. Yurkova, and B. R. Green. 1998b. The 38 kDa chlorophyll *a/b* protein of the prokaryote *Prochlorothrix hollandica* is encoded by a divergent *pcb* gene. *Plant Molecular Biology* 36: 709-716.
- Vaulot, D., and D. Marie. 1999. Diel variability of photosynthetic picoplankton in the equatorial Pacific. *Journal of Geophysical Research* 104: 3297-3310.
- Vaulot, D., D. Marie, R. J. Olson, and S. W. Chisholm. 1995. Growth of *Prochlorococcus*, a photosynthetic prokaryote, in the equatorial Pacific Ocean. *Science* 268: 1480-1482.
- Vaulot, D., and F. Partensky. 1992. Cell cycle distributions of prochlorophytes in the North Western Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research* 39: 727-742.
- Vermaas, W. 1993. Molecular biological approaches to analyse photosystem II structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 457-481.
- Vermaas, W. F. J. 1994. Evolution of heliobacteria: Implications for photosynthetic reaction center complexes. *Photosynthesis Research* 41: 285-294.
- Vermaas, W. F. J., and M. Ikeuchi. 1991. *Photosystem II*. Academic Press, San Diego.
- Vermaas, W. F. J., J. G. K. Williams, and C. J. Arntzen. 1987. Sequencing and modification of *psbB*, the gene encoding the CP-47 protein of the photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Molecular Biology* 8: 317-326.
- Virgin, I., S. Styring, and B. Andersson. 1988. Photosystem II disorganization and manganese release after photoinhibition of isolated spinach thylakoid membranes. *FEBS Letter* 133: 408-412.
- Vishnevetsky, M., M. Ovadis, and A. Vainstein. 1999. Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. .
- von Wettstein, D., S. Gough, and C. G. Kannagara. 1995. Chlorophyll biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 1039-1057.
- Warpeha, K. M. F., and L. S. Kaufman. 1990. Two distinct blue-light systems regulate the level of specific nuclear encoded transcripts in pea. *Planta* 182: 553-558.
- Warpeha, K. M. F., K. A. Marrs, and L. S. Kaufman. 1989. Blue-light regulation of specific transcript levels in *Pisum sativum*. *Plant Physiology* 91: 1030-1035.
- Waterbury, J., and R. Rippka. 1989. Order Chroococcales Wettstein 1924, Emend. Rippka et al., 1979. Pages 1728-1746 in N. Krieg and J. Holt, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Waterbury, J. B., S. W. Watson, R. R. L. Guillard, and L. E. Brand. 1979. Widespread occurrence of a unicellular, marine planktonic, cyanobacterium. *Nature, London* 277: 293-294.
- Waterbury, J. B., S. W. Watson, F. W. Valois, and D. G. Franks. 1986. Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. Pages 71-120 in T. Platt and W. K. W. Li, eds. *Photosynthetic Picoplankton*.
- Wedel, N., R. Klein, U. Ljungberg, B. Andersson, and R. G. Herrmann. 1992. The single copy-gene *psbS* codes for a phylogenetically intriguing 22 kDa polypeptide of photosystem II. *FEBS Letters* 314: 61-66.
- Wei, H., Q. Ca, R. Rahn, X. Zhang, Y. Wang, and M. Leibold. 1998. DNA structural integrity and base composition affect ultraviolet light-induced oxidative DNA damage. *Biochemistry* 37: 6485-6490.
- Weier, T. E., C. R. Stocking, and L. K. Shumway. 1966. The photosynthetic apparatus in chloroplasts of higher

- plants. Pages 353-374. *Brookhaven symposia in biology*, Springfield.
- West, N. J., and D. J. Scanlan. 1999. Niche-partitioning of *Prochlorococcus* populations in a stratified water column in the eastern north Atlantic ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2585-2591.
- White, M. J., B. W. Fristensky, D. Falconet, L. C. Childs, J. C. Watson, L. Alexander, B. A. Roe, and W. S. Thompson. 1992. Expression of the chlorophyll-a/b multigene family in pea (*Pisum sativum* L.): evidence for distinct developmental responses. *Planta* 188: 190-198.
- Williams, J. C., L. A. Steiner, and G. Feher. 1986. Primary structure of the reaction center from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Proteins - Structure Function and Genetics* 1: 312-325.
- Williams, J. C., L. A. Steiner, G. Feher, and M. I. Simon. 1984. Primary structure of the L subunit of the reaction center from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 7303-7307.
- Williams, W. P., and Allen, J. F. 1987. State1-state2 changes in higher plants and Algae. *Photosynthesis Research* 13: 19-45.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51: 221-271.
- Woese, C. R., O. Kandler, and M. L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 4576-4579.
- Wolfe, G. R., F. X. Cunningham, D. Durnford, B. R. Green, and E. Gantt. 1994a. Evidence for a common origin of chloroplasts with light-harvesting complexes of different pigmentation. *Nature* 367: 566-568.
- Wolfe, G. R., F. X. Cunningham, B. Grabowski, and E. Gantt. 1994b. Isolation and characterization of photosystem I and II from the red algae *Porphyridium cruentum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1188: 357-366.
- Wolfe, G. R., and J. K. Hooper. 1996. Evolution of thylakoid structure. Pages 31-40 in R. Donald, F. Charles, and F. Yocum, eds. *Oxygenic photosynthesis: The light reactions*. Kluwer Academic Publishers, Netherland.
- Wu, Y. P., and D. W. Krogmann. 1997. The orange carotenoid protein of *Synechocystis* PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1322: 1-7.
- Xu, Q., T. S. Armbrust, J. A. Guikema, and P. R. Chitnis. 1994. Organization of Photosystem I polypeptides: A structural interactions between PsaD and PsaL subunits. *Plant Physiology* 106: 1057-1063.
- Yamamoto, H., and R. Bassi. 1996. *Carotenoids: localization and function*. Kluwer, Dordrecht.
- Yanamaka, K., L. Fang, and M. Inouye. 1998. The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Molecular Microbiology* 27: 247-255.
- Zuber, H., R. Brunisholz, and W. Silder. 1987. Structure and fonction of light harvesting pigment protein complexes. Elsevier Press, Amsterdam.

* * * * *

RESUME

Les complexes pigments-protéines de l'appareil photosynthétique jouent un rôle primordial dans la capacité d'adaptation à la lumière des organismes oxyphototrophes.

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les processus de photoacclimatation (au sens physiologique du terme) et/ou de photoadaptation (au sens évolutif du terme), le modèle utilisé lors de cette étude a été le procaryote marin *Prochlorococcus* qui, dans la nature, peut croître et photosynthétiser dans une gamme de lumière couvrant environ 4 ordres de magnitude.

La caractérisation biochimique du photosystème I de *Prochlorococcus* a permis de montrer que les protéines du centre réactionnel (PsaA et PsaB) fixaient de la chlorophylle *b* et que deux protéines mineures, PsaF et PsaL, présentaient des divergences importantes par rapport à celles des cyanobactéries typiques possédant des phycobilisomes. Ce photosystème étant particulièrement bien conservé parmi les organismes oxyphototrophes, ces modifications ont probablement des implications sur les propriétés biophysiques et biochimiques de ce complexe.

La spécificité la plus remarquable de l'appareil photosynthétique de *Prochlorococcus* est sans doute la multiplication du nombre de copies du gène codant l'antenne collectrice (*pcb*) chez les souches adaptées à faible lumière (5-7 copies), alors qu'une seule copie de ce gène est présente chez les souches adaptées à forte lumière. Ce phénomène, qui semble résulter d'une adaptation à long terme aux différentes niches lumineuses présentes dans les océans, est probablement l'un des facteurs principaux responsables des différences pigmentaires et physiologiques observées entre ces deux écotypes de *Prochlorococcus*.

Le contrôle au niveau transcriptionnel de l'expression de certains gènes codant pour des protéines photosynthétiques (*pcb*, *psbA*, *psbC*, *psbD*) est également atypique et suggère l'existence de processus de régulation de la lumière absorbée spécifiques à *Prochlorococcus*.

Enfin, la comparaison structurale de l'antenne de *Prochlorococcus* avec d'autres protéines photosynthétiques liant la chlorophylle et l'analyse du génome de la souche MED4 nous a amené à réexaminer les relations entre les différentes protéines pigmentaires. Un schéma évolutif de ces protéines est proposé, mettant en évidence les éventuels liens entre les antennes collectrices des eucaryotes et celles des procaryotes à chlorophylle *b* sont ainsi qu'avec les sous-unités majeures du centre réactionnel I.

Mots clés : Chl-protéines, Prochlorophyte, *Prochlorococcus*, antenne, *pcb*, adaptation lumineuse

ABSTRACT

The pigment-protein complexes of the photosynthetic apparatus play a major role in the capacity of adaptation to light environment of oxyphototrophic organisms.

In order to better understand the mechanisms involved in both photoacclimation (in the physiological sense) and photoadaptation (in the evolutive sense) processes, this study used as a model organism the marine prokaryote *Prochlorococcus*, which in the field is able to sustain growth and photosynthesis over almost four orders of magnitude of light.

The biochemical characterization of the photosystem I has shown that the reaction center I can bind some Chl *b* and that some minor proteins highly diverge from those of typical cyanobacteria containing phycobilisomes. Since this photosystem is particularly conserved within oxyphototrophic organisms, these modifications likely have implications on the biophysical and biochemical properties of this photosystem.

The most remarkable peculiarity of the photosynthetic apparatus of *Prochlorococcus* is certainly the multiplication of genes encoding the major light harvesting antenna (*pcb*) in low-light adapted strains (5-7 copies), whereas only a single *pcb* copy is present in high-light adapted strains. This phenomenon, which probably results from a long term adaptation to different light niches in the ocean, is certainly one of the main factors responsible for the differences observed between the *Prochlorococcus* ecotypes at both the pigment and physiological levels.

The expression pattern at the transcriptional level of several genes encoding photosynthetic proteins (*pcb*, *psbA*, *psbC*, *psbD*) is also atypical and suggest the occurrence of a regulation process of light absorption specific from *Prochlorococcus*.

In the last part of this PhD, the structural comparison of *Prochlorococcus* antenna with other Chl-binding proteins of the photosynthetic apparatus and the analysis of the MED4 genome led us to re-examine the relationships between the different chlorophyll-binding proteins. An evolutionary scheme of these proteins is proposed, relating the antenna complexes of eukaryotes and Chl *b*-containing prokaryotes as well as the major subunits of the reaction center I.