



HAL
open science

Mécanismes moléculaires de la réponse aux stress environnementaux chez la cyanobactérie marine **Prochlorococcus**

Isabelle Mary

► **To cite this version:**

Isabelle Mary. Mécanismes moléculaires de la réponse aux stress environnementaux chez la cyanobactérie marine *Prochlorococcus*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Rennes 1, 2003. Français. NNT : . tel-01117616

HAL Id: tel-01117616

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01117616>

Submitted on 17 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)

N° Ordre : 2853
De la thèse

THÈSE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

pour obtenir

le grade de : **DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

Mention : BIOLOGIE

PAR

Isabelle MARY

Équipe d'accueil : UMR 7127, CNRS, ROSCOFF

École Doctorale : Vie et Santé

Composante universitaire : Observatoire Océanologique de Roscoff

TITRE DE LA THÈSE :

**MECANISMES MOLECULAIRES DE LA REPONSE AUX STRESS
ENVIRONNEMENTAUX CHEZ LA CYANOBACTERIE MARINE
*PROCHLOROCOCCUS***

SOUTENUE LE 9 juillet 2003 devant la commission d'Examen

COMPOSITION DU JURY :

Alain RINCE, Maître de Conférence de l'Université de Caen

Rapporteur

Cheng-Cai ZHANG, Professeur de l'Université d'Aix-Marseille

Rapporteur

Nicole TANDEAU DE MARSAC, Directeur de Recherche, CNRS, Pasteur

Examineur

Carlos BLANCO, Professeur de l'Université de Rennes 1

Examineur

Michel GAUTIER, Professeur de l'ENSAR, Rennes

Président

Daniel VAULOT, Directeur de Recherche, CNRS, SBR, Roscoff

Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

A l'issue de ces trois ans et demi de Thèse, le moment est venu, pour moi, de remercier toutes les personnes qui m'ont entourée, pour mener à bien ce projet. La liste est longue et je vais essayer de n'oublier personne.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du Jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie André Toulmond, Directeur de la Station Biologique, qui m'a permis d'effectuer cette Thèse à Roscoff.

Je remercie également Daniel Vaultot, mon Directeur de Thèse, pour avoir dirigé ce travail et pour tous les moyens mis à ma disposition pendant ces quatre années.

Je tiens aussi à remercier Frédéric Partensky, pour son enthousiasme, ses compétences et son aide précieuse.

Un grand merci à Arthur Grossman, pour m'avoir accueillie durant mes séjours à Carnegie, pour son aide et ses nombreux conseils qui m'ont beaucoup apportés durant cette collaboration.

Je remercie tout le personnel de la Station pour leur gentillesse et leur disponibilité, et particulièrement Nicole, Maryse, Franck, Marie-Noëlle, Martine, Joël, Alain, Fabrice et Jack.

Merci évidemment à toute l'équipe des Green's : Lôh, Alex et Tof (le noyau « cyanos », j'ai été très heureuse de faire un bout de chemin avec vous et merci encore pour tout); p'tite Flo (ma p'tite maman), Domi (p'tit cousin); Francisco, Fab, Nath, Laure, Agnès, Antoine et Fei-Zhu (la « great team » des picoeuks); Jean, IsaB et Khadidja (je ne vous oublie pas). J'ai beaucoup appris à vos côtés.

Je remercie très sincèrement tous mes amis, il m'est impossible de les citer tous ici, mais merci tout particulièrement à Marie et Mumu (les meilleures colloc'...), Vince, Finou, Carole et Marc, Cécile et Hervé, Marie et Stéphane, Pascalou, Clauclau, Tom, Manue, Xavier et Gaele, Marie-Cécile, Anna, Franck, Ronan, Julia et Pascal, Julia et Jens, Erwan, Jérôme, Sabine, Sylvie, Julie, Mag, Gaëtan... merci pour votre soutien et votre amitié.

Je remercie également tous ceux que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces quelques années à Roscoff.

Je n'aurais pas pu mener cette Thèse jusqu'au bout sans le soutien de ceux qui me sont les plus proches. J'adresse donc mes derniers (et forcément les meilleurs) remerciements à ma famille.

A toutes et à tous, un grand merci !

SOMMAIRE

CHAPITRE I : INTRODUCTION	9
I. Introduction générale	9
II. Modèles d'étude	11
II.1 Les cyanobactéries	11
II.1.1 Introduction aux cyanobactéries	11
II.1.2 Diversité écologique	14
II.2 La réponse des cyanobactéries à leur environnement	16
II.2.1 L'excès de lumière	16
II.2.2 Acclimatation aux quantités de nutriments	16
II.3 <i>Prochlorococcus</i>	17
II.3.1 Distribution océanique	17
II.3.2 Caractères généraux et Physiologie	18
II.3.3 Photoacclimatation et photoadaptation	19
II.3.4 Appareil photosynthétique	20
II.3.5 Assimilation des nutriments	21
III. Les systèmes de transduction de signal à deux composants	22
III.1 Perception de l'environnement	22
III.2 Les systèmes à deux composants	22
III.3 Les composants de base	23
III.3.1 Les senseurs: HSKs	24
III.3.2 Les régulateurs de réponse: RRs	25
III.4 Un exemple simple	26
III.5 Des systèmes à plus de deux composants	27
III.6 Diversité chez les procaryotes	28
III.7 Systèmes à deux composants eucaryotes	29
III.8 Mécanismes de régulation	30
III.8.1 Régulation des activités Histidine Kinase	30
III.8.2 Régulation de la déphosphorylation du régulateur	30
III.9 Systèmes à deux composants cyanobactériens	31
IV. Les protéines de stress ou protéines "heat shock"	35
IV.1 Introduction	35
IV.2 Régulation	36
IV.3 Les différentes familles de Hsps	37
IV.3.1 Le système DnaK (DnaK-DnaJ-GrpE)	37
IV.3.2 Le système GroESL (GroEL-GroES)	40
IV.3.3 La famille Clp	41
IV.3.4 HtpG	43
IV.4 Protéines Hsp chez les cyanobactéries	44
V. Appareil photosynthétique et réponse aux facteurs environnementaux chez les cyanobactéries	46
V.1 Lumière	46
V.1.1 Appareil photosynthétique et lumière	46
V.1.2 Cas particulier des oxyphotobactéries à chlorophylle <i>b</i>	47
V.2 Carence en nutriments	48
V.2.1 Appareil photosynthétique et carence en nutriments	48
V.2.2 Cas particulier de la carence en fer	49

VI. Objectifs et Déroulement de la Thèse.....	52
CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES	54
I. Analyse génomique	54
II. Conditions de culture.....	54
III. Extraction des ARNs	55
IV. RT-PCR.....	56
V. PCR Quantitative en temps réel	56
V.1 Protocole.....	56
V.2 Méthode de calcul $\Delta\Delta C_T$	59
V.3 Chimie SYBR Green.....	61
CHAPITRE III: LES SYSTEMES A DEUX COMPOSANTS	62
I. Résumé.....	62
II. Article	63
CHAPITRE IV: LA REPOSE HEAT-SHOCK	74
I. Résumé.....	74
II. Article	76
CHAPITRE V: LES GENES PHOTOSYNTHETIQUES	106
I. Résumé.....	106
II. Article	110
CHAPITRE VI: CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	135
I. Les techniques de mesure de l'expression des gènes.....	135
II. La réponse de l'adaptation des cyanobactéries au stress.....	136
III. Perspectives écologiques.....	140
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	142
ANNEXES.....	173
Annexe 1 (Article 4): "Expression différentielle des gènes de l'antenne et du noyau chez <i>Prochlorococcus</i> PCC 9511 (Oxyphotobactérie) cultivée en cycle jour-nuit"	173
I. Résumé.....	173
II. Article	173
Annexe 2 (Article 5): "Expression des gènes associés au cycle cellulaire dans des cultures synchronisées de <i>Prochlorococcus</i> sp. strain PCC 9511"	182
I. Résumé.....	182
II. Article	182

Liste des illustrations

Figure 1 : Exemples de la diversité morphologique des cyanobactéries.....	12
Figure 2 : Représentation schématique de l'appareil photosynthétique d'une cyanobactérie « typique ».....	13
Figure 3 : Exemples de blooms de cyanobactéries	15
Figure 4 : Distribution mondiale de <i>Prochlorococcus</i> sur la base de 8400 mesures effectuées en milieu naturel par cytométrie en flux.	17
Figure 5 : Photographie de microscopie électronique d'une coupe de <i>Prochlorococcus</i> provenant d'échantillons profonds de l'Océan Atlantique Nord.....	18
Figure 6: Distribution verticale des populations de <i>Prochlorococcus</i> dans le Pacifique subtropical près d'Hawaii.....	20
Figure 7: Représentation schématique du système de régulation à deux composants.....	23
Figure 8: Diagramme illustrant l'organisation des différents domaines des histidine kinases et des régulateurs de réponse typiques.....	24
Figure 9: Exemple de système à deux composants de base.....	26
Figure 10: Exemples montrant la diversité des systèmes à deux composants	28
Figure 11: Représentation schématique d'un système de signalisation à deux composants et d'un système de signalisation de phospho-relais à étapes multiples	34
Figure 12: Exemples de différents mécanismes de régulation des gènes heat-shock chez <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	38
Figure 13: Modèle d'action du système DnaK dans le repliement protéique	39
Figure 14: Organisation des domaines des protéines DnaK, DnaJ et GrpE.....	40
Figure 15: Modèle d'action du système GroESL dans le repliement protéique.....	41
Figure 16: Modèle d'action du complexe Clp Protéase	43
Figure 17: Mécanisme d'action de la protéine la protéine ClpB en coopération avec le système DnaK.....	44
Figure 18: Supercomplexe Pcb-PS I de <i>Prochlorococcus</i> SS120	49
Figure 19: Représentation schématique de la dégradation du phycobilisome en condition de carence en soufre	50
Figure 20: Photographies de microscopie électronique, vues de dessus, du trimère de PSI et du supercomplexe CP43-PSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	51

Figure 21: Système « 5700 Sequence Detection» (Applied Biosystems).....	57
Figure 22: Système Light Cycler (Roche).....	58
Figure 23: Exemple de RT-PCR quantitative en temps réel	58
Figure 24: Réaction d'incorporation du SYBR Green durant la réaction de PCR	61
Figure 25: Arbre phylogénétique basé sur les séquences protéiques des Pcb des oxyphotobactéries et des IsiA de cyanobactéries	107
Figure 26: Schéma de l'appareil photosynthétique des différentes souches de <i>Prochlorococcus</i>	109
Figure 27: Modèle décrivant le rôle de NblS dans le contrôle des réponse au stress de forte lumière (HL) et aux carences nutritives et dans le contrôle de certains processus liés à l'absorption directe de lumière bleue/UVA	137
Figure 28: Scénario hypothétique de l'évolution de <i>Prochlorococcus</i>	139

Les figures des articles sont numérotées de manière indépendante.

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques des différents génomes de <i>Prochlorococcus</i> et de <i>Synechococcus</i> WH8102.....	19
Tableau 2: Répartition des systèmes à deux composants dans différents génomes représentatifs.....	29
Tableau 3: Exemples de réponses adaptatives cyanobactériennes impliquant des histidine kinases ou des régulateurs de réponse	32
Tableau 4: Classification des Hsp en fonction de leur masse moléculaire	36

Les tableaux des articles sont numérotées de manière indépendante.

Table des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP	Allophycocyanine
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATP	Adénosine tri-phosphate
ATPase	Adénosine tri-phosphatase
Chl	Chlorophylle
Chla₂	Divinyle chlorophylle <i>a</i>
Chlb₂	Divinyle chlorophylle <i>b</i>
CR	Centre réactionnel
C_T	Cycle seuil
Da	Dalton
DNAse	Acide désoxyribonucléase
dNTP	déoxynucléotide tri-phosphate
DO	Densité optique
EDTA	Acide tétra-acétique diamino-éthylène
Fd	Ferredoxine
HL	Forte lumière
HSK	Senseur Histidine Kinase
Hsp	Protéine « Heat Shock »
Kb	Kilobases
KD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LL	Faible lumière
Mb	Mégabases
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ORF	Cadre ouvert de lecture
PBS	Phycobilisome
PC	Phycocyanine

Pcb	Protéine liant la chlorophylle <i>b</i> des oxyphotobactéries
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PE	Phycoérythrine
PQ	Plastoquinone
PS I	Photosystème I
PS II	Photosystème II
RR	Régulateur de réponse
RT	Transcription inverse
RT-PCR	Transcription inverse – réaction de polymérisation en chaîne

CHAPITRE I

Introduction

CHAPITRE I : INTRODUCTION

I. Introduction générale

Les fluctuations des différents facteurs environnementaux, tels que la concentration en nutriments, l'intensité de la lumière ou la température, peuvent altérer la vitesse de croissance des organismes photosynthétiques. En conditions extrêmes, lorsque la croissance s'arrête, des changements importants peuvent être observés au niveau de la pigmentation, des divers processus métaboliques et de la morphologie de la cellule. Le style de vie photoautotrophe des cyanobactéries impliquent une dépendance vis à vis des facteurs physico-chimiques de l'environnement tels que l'intensité et la qualité de la lumière et la concentration de nutriments dans l'eau. Les variations de ces facteurs constituent les stimuli primaires auxquels ces organismes doivent s'adapter. Les signaux intracellulaires et les mécanismes impliqués dans la transduction de ces signaux permettent à la cellule de s'adapter à ces changements d'environnement. Chez les bactéries, de nombreux circuits de "détection-réponse" fonctionnent en utilisant des mécanismes de contrôle de la phosphorylation appelés "systèmes à deux composants" (Nixon *et al.*, 1986 ; Parkinson & Kofoid, 1992). Ces systèmes sont impliqués dans un très grand nombre de réponses adaptatives (Stock *et al.*, 1989 ; Parkinson & Kofoid, 1992).

Des conditions suboptimales de lumière et de nutriments aboutissent à un certain nombre de réponses générales et spécifiques qui influencent fortement la physiologie de la cellule. Les réponses générales, qui sont principalement contrôlées par un seul ou quelques régulateurs principaux, fournissent une protection contre une grande variété de signaux environnementaux, quel que soit le stimulus initial. Les bactéries ont par exemple développé un programme complexe d'expression différentielle de gènes menant à l'induction transitoire d'un ensemble de protéines qui protègent la cellule des dommages causés par l'accumulation de protéines dénaturées (Gottesman, 1998). La plupart de ces protéines, aussi appelées protéines "heat-shock" (Hsps), sont des chaperones ou des protéases qui jouent un rôle crucial dans le repliement, l'assemblage et la dégradation des protéines durant les conditions normales de croissance et, en particulier en conditions de stress (Parsell & Lindquist, 1993). Cette réponse est efficace et permet à la cellule de survivre mais elle n'est pas suffisante pour lui permettre de se développer en conditions de stress.

Face à des conditions prolongées de stress, la cellule utilise des mécanismes de réponse spécifiques qui font intervenir des réseaux de gènes et divers mécanismes

d'adaptation physiologique. Par exemple, beaucoup de réponses à un changement de l'environnement lumineux modifient les caractéristiques structurelles et fonctionnelles de l'appareil photosynthétique. Certaines cyanobactéries peuvent, par exemple, modifier la composition pigmentaire de leurs complexes collecteurs de lumière en réponse à une variation de qualité spectrale de la lumière si bien qu'elles prennent une couleur différente en fonction de la longueur de la lumière à laquelle elles poussent: c'est l'adaptation chromatique complémentaire (Tandeau de Marsac & Houmard, 1993). La concentration en nutriments de l'environnement est aussi critique dans l'altération de l'activité et de la biogenèse de l'appareil photosynthétique. La limitation par le fer, par exemple, entraîne chez les cyanobactéries "typiques", la dégradation rapide des phycobilisomes, et la formation d'une antenne autour du photosystème I, constitué par des protéines IsiA ("iron-stress induced"), qui pourraient jouer un rôle d'"antenne de secours" transitoire pour compenser la disparition de l'antenne principale.

Le but majeur de cette étude a consisté à examiner les mécanismes utilisés par les cyanobactéries leur permettant de détecter (systèmes à deux composants) et de répondre, de façon générale (réponse "heat-shock") ou plus spécifique (modification de l'appareil photosynthétique), aux variations de leur environnement. Cette étude a été réalisée principalement sur la cyanobactérie marine, *Prochlorococcus*, le plus petit et le plus abondant procaryote oxyphototrophe connu à l'heure actuelle dans l'océan. Cet organisme présente de nombreuses caractéristiques remarquables. En particulier, sa composition pigmentaire comporte des dérivés divinyl de chlorophylle *a* et *b* uniques à ce genre. Il prolifère dans les zones centrales des océans, qui sont des environnements particulièrement pauvres en nutriments et sa distribution verticale est très étendue (de 0 à 200 m de profondeur). Cette dernière particularité est due à l'existence de plusieurs écotypes possédant des caractéristiques écophysologiques distinctes et occupant des niches lumineuses différentes. Les génomes complets de souches représentatives des différents écotypes sont disponibles, permettant des analyses génomiques comparatives.

II. Modèles d'étude

II.1. Les cyanobactéries

II.1.1. Introduction

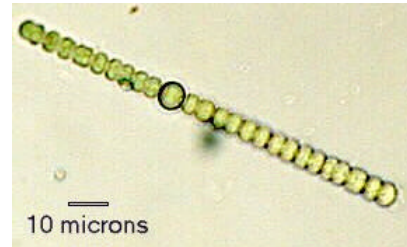
Les cyanobactéries forment un des groupes bactériens les plus larges et les plus importants écologiquement, présent dans pratiquement tous les environnements et constituant un des acteurs majeurs de la biomasse et la production végétale sur Terre. Ce sont également les seuls procaryotes à réaliser la photosynthèse oxygénique, similairement aux algues et aux plantes supérieures. Elles sont généralement considérées comme les ancêtres des plastes selon la théorie endosymbiotique (Loiseaux-de Goër, 1994, Selosse & Loiseaux-de-Goer, 1997 ; Stiller & Hall, 1997). Les cyanobactéries se séparent clairement des autres bactéries photosynthétiques, telles que les bactéries pourpres ou vertes, parce qu'elles utilisent l'eau comme donneur d'électrons.

Les cyanobactéries typiques sont caractérisées par la présence d'un certain nombre de pigments incluant la chlorophylle *a*, des caroténoïdes, la phycoérythrine, la phycocyanine et l'allophycocyanine. Elles sont caractérisées de manière classique, par leur capacité à produire une phycobiline (pigment coloré), la phycocyanobiline. C'est la forte concentration de ce pigment sous certaines conditions qui donne la couleur bleu-vert à beaucoup de ces organismes, propriété à l'origine des deux noms communément utilisés de cyanobactéries et algues bleu-vertes. Cependant, on sait maintenant que quelques procaryotes photosynthétiques, comme *Prochlorothrix*, qui ne possède pas de phycobiliprotéine mais produit de la chlorophylle *b* en plus de la chlorophylle *a* (Tomitani *et al.*, 1999), sont phylogénétiquement très proches des organismes possédant de la phycocyanine.

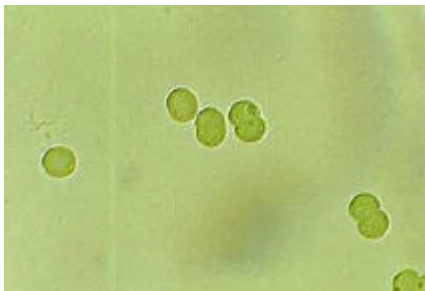
Les cyanobactéries présentent une très grande diversité morphologique (Figure 1). Elles peuvent être unicellulaires (*Chroococcus*) ou filamenteuses (*Anabaena*) et on les trouve soit sous forme isolée (*Synechococcus*) soit regroupées en colonies (*Schizothrix*). La présence ou l'absence d'une structure appelée hétérocyste, qui permet la fixation de l'azote atmosphérique, est aussi une des caractéristiques importantes qui sépare les genres.



Spirulina sp.



Anabaena sp.



Synechocystis
buzasii



Aphanizomenon
flos-aquae.

Figure 1. Exemples de la diversité morphologique des cyanobactéries. Photos provenant du site Cyanosite (<http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/images/images.html>).

Les cyanobactéries “typiques” possèdent une antenne collectrice de lumière, le phycobilisome (Figure 2), qui est un très bon modèle pour étudier le transport de électrons, la régulation lumineuse et la biogenèse des complexes solubles multiprotéiques. En tant que bactéries, les cyanobactéries présentent aussi des avantages expérimentaux comparés aux plantes supérieures. Elles sont faciles à faire pousser sur milieu soit solide soit liquide, les acides nucléiques et les protéines sont facilement isolables, et il est relativement facile de réaliser des études génétiques. Les cyanobactéries ont donc tout naturellement servi d’organismes modèles pour l’étude d’un certain nombre de processus cellulaires communs aux organismes photosynthétiques.

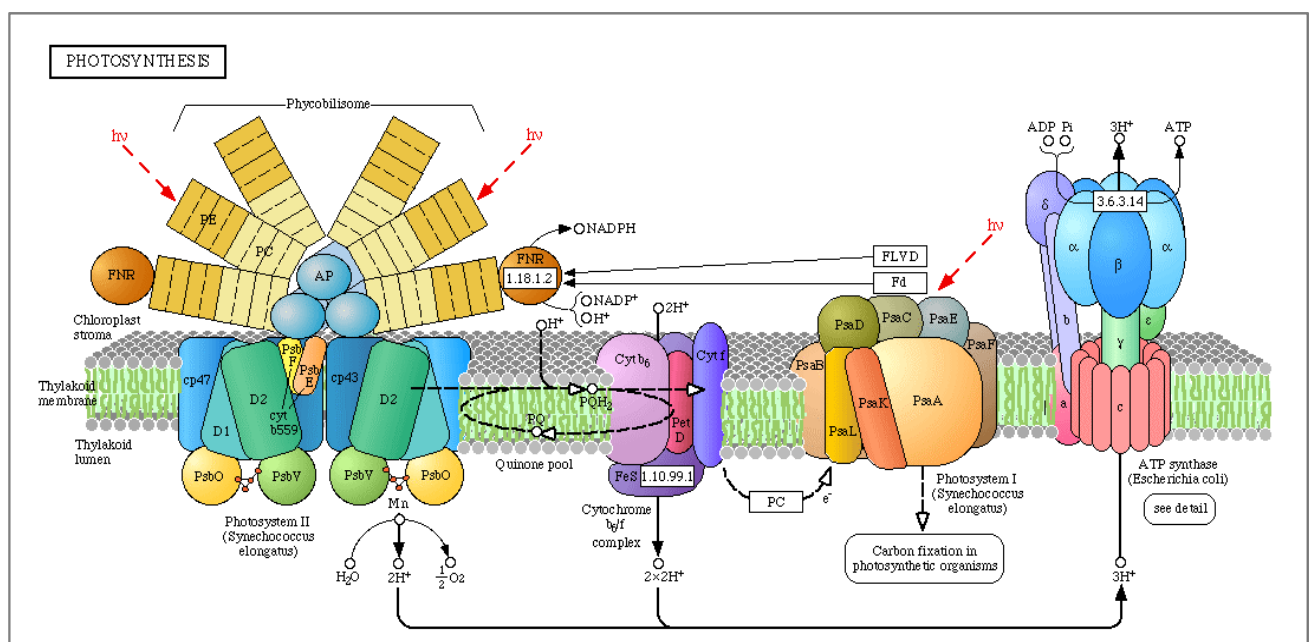


Figure 2. Représentation schématique de l’appareil photosynthétique d’une cyanobactérie typique, d’après le site du KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map00195.html>).

Bien que les cyanobactéries constituent un des groupes les plus larges des bactéries Gram-négatives, seul un nombre limité de souches ont été utilisées pour des études physiologiques et génétiques. Parmi celles-ci, *Synechocystis* sp. PCC 6803, une cyanobactérie unicellulaire photoautotrophe, présente l’avantage d’être naturellement transformable. De plus, la séquence nucléotidique complète du génome de *Synechocystis* sp. PCC 6803 a été la première d’une cyanobactérie à être déterminée (Kaneko *et al.*, 1996). La longueur totale du génome est de 3 573 470 bp avec un GC% de 47%. Un total de 3168 gènes codant

potentiellement des protéines a pu être mis en évidence, dont 145 (4.6%) ont été trouvés identiques à des gènes connus ; et 1259 (39.6%) et 342 (10.8%), respectivement ont montré des similarités à des gènes connus ou hypothétiques. Les 1422 (45.0%) restant n'ont montré de similarité apparente avec aucun des gènes répertoriés dans les bases de données. La classification de ces gènes par leur fonction biologique et par comparaison avec les homologues d'autres organismes a permis de déterminer les gènes caractéristiques d'un organisme photoautotrophe.

II.1.2. Diversité écologique

Les cyanobactéries possèdent une longue histoire évolutive (Woese, 1987). Une des raisons de l'abondance des cyanobactéries dans de nombreux habitats (Figure 3) peut être liée à cette caractéristique. La composition changeante en métaux dans l'environnement terrestre initial pourrait avoir influencé l'évolution de facteurs de résistance à ces nouveaux métaux et de protéines permettant leur utilisation. La tolérance aux faibles concentrations d'O₂ est encore très répandue chez les cyanobactéries et le sulfure libre est toléré par certaines souches à des niveaux très supérieurs à ceux tolérés par les algues eucaryotes (Padan & Cohen, 1982). Une autre caractéristique de certaines souches est leur forte tolérance aux radiations des UV-B et UV-C (Holm-Hansen *et al.*, 1993), caractéristique qui a été très importante pour l'évolution des cyanobactéries. L'adaptation aux faibles lumières et aux faibles concentrations ambiantes en nutriments sont des facteurs importants qui ont mené à la dominance des picocyanobactéries aujourd'hui, aussi bien en terme de biomasse que de production, dans les eaux limitées en nutriments qui caractérisent les vastes zones centrales des océans (Waterbury *et al.*, 1986) et quelques grands lacs (Hawes, 1990). Les cyanobactéries sont aussi importantes dans certains environnements terrestres pour lesquels leur tolérance à la dessiccation et à la sécheresse est un élément essentiel (Potts, 1994). Une autre caractéristique importante de certaines cyanobactéries est leur capacité à fixer l'azote atmosphérique. Dans la plupart des environnements oxygénés, ce phénomène est réalisé dans les hétérocystes (Wolk, 1996), cellules à paroi épaisse possédant souvent un nodule de cyanophycine. On ne connaît aucune algue eucaryote capable de fixer l'azote moléculaire, ainsi les cyanobactéries fixatrices d'azote possèdent un avantage certain lorsque les sources d'azote inorganique sont limitantes dans l'eau (Howarth *et al.*, 1988).



Bloom de *Microcystis aeruginosa* et *Anabaena circinalis* dans la rivière St. Johns River, FL
Victoria, Australia.



Bloom de *Anabaenopsis* sp. dans le lac Bedetti Lake, Santo Tome, Santa Fe, Argentina



Bloom de *Microcystis aeruginosa*, Lake Mokoan, Victoria, Australia.

Figure 3. Exemples de blooms de cyanobactéries. Photos provenant du site Cyanosite (<http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/images/images.html>).

II. 2. La réponse des cyanobactéries à leur environnement

La plupart des cyanobactéries possèdent une remarquable capacité à prospérer dans des environnements possédant des paramètres physico-chimiques très fluctuants, tels que la disponibilité en nutriments, la qualité et l'intensité de la lumière, la température et les conditions osmotiques. Des conditions suboptimales de lumière et de nutriments engendrent un nombre de réponses qui influencent fortement la physiologie des cellules. Les réponses peuvent être évidentes ou plus subtiles et les changements induits peuvent s'opérer rapidement ou très lentement.

II.2.1. L'excès de lumière

Les cyanobactéries sont généralement des photoautotrophes stricts. Il est donc essentiel qu'elles puissent détecter et répondre à la fois à la qualité et à l'intensité de la lumière (van Liere & Walsby, 1982). Comme la lumière affecte dans un premier temps l'activité photosynthétique, beaucoup de réponses aux changements de lumière modifient les caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'appareil photosynthétique. Certaines adaptations à la lumière sont évidentes et immédiates. Par exemple, certaines cyanobactéries peuvent modifier la composition pigmentaire des complexes de capture de lumière si bien que les cellules prennent une couleur différente en fonction de la longueur d'onde de la lumière à laquelle elles poussent. D'autres changements sont plus subtils et peuvent impliquer des interactions entre les différents types de signaux environnementaux. Par exemple, la répartition relative de l'énergie d'excitation absorbée par le PS I et le PS II dépend du spectre de distribution de la lumière dans l'environnement et cette capacité à redistribuer l'énergie d'excitation est importante pour l'équilibre du flux d'électrons entre les deux photosystèmes.

II.2.2. Acclimatation aux quantités de nutriments

La composition en nutriments de l'environnement est un facteur essentiel dans la modulation de l'activité et de la biogenèse de l'appareil photosynthétique. Dans les environnements terrestres et aquatiques, les cyanobactéries connaissent des périodes prolongées pendant lesquelles elles sont limitées par un ou plusieurs éléments nutritifs. En conditions de carence, la plupart des cyanobactéries augmentent l'efficacité avec laquelle elles assimilent les nutriments, initient la mobilisation de leurs réserves internes de nutriments, et limitent les activités métaboliques qui ne sont pas essentielles pour leur survie. Certaines de ces réponses sont spécifiques d'une carence vis-à-vis d'un élément nutritif particulier et impliquent une synthèse importante des systèmes de transport et des enzymes

qui peuvent augmenter l'assimilation de l'élément limitant dans la cellule. Cependant, il existe également des réponses générales qui se produisent durant des carences vis-à-vis d'un ou plusieurs différents éléments nutritifs (Grossman *et al.*, 1994). Ces réponses impliquent des adaptations morphologiques, des changements dans les réserves internes et des altérations du métabolisme cellulaire, particulièrement de l'appareil photosynthétique.

II.3. *Prochlorococcus*

II.3.1. Distribution océanique

Prochlorococcus est l'organisme photosynthétique le plus abondant des océans et probablement sur Terre (Figure 4). Il est, en effet, ubiquiste dans la bande latitudinale 40°N-40°S des océans et en zone intertropicale oligotrophe et il est présent à de fortes densités de la surface jusqu'à des profondeurs de 200 m. Bien que *Prochlorococcus* soit l'organisme photosynthétique le plus abondant dans les eaux oligotrophes, il n'est absolument pas limité aux eaux dépourvues en nutriments et on peut le trouver dans des eaux côtières telles que celles de la Méditerranée (Vaulot *et al.*, 1990) ou les eaux japonaises de Suruga Bay (Shimada *et al.*, 1995).

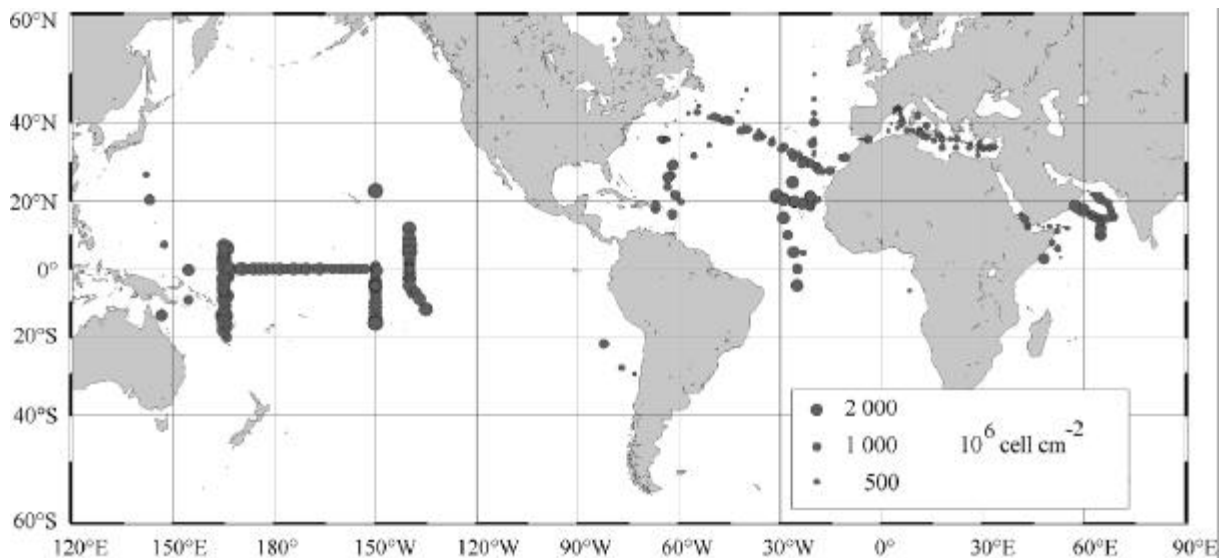


Figure 4. Distribution mondiale de *Prochlorococcus* sur la base de 8 400 mesures effectuées en milieu naturel par cytométrie en flux. Les cercles représentent les concentrations intégrées sur la colonne d'eau (Partensky *et al.*, 1999)

II.3.2. Caractères généraux et Physiologie

La microscopie électronique à transmission a révélé que *Prochlorococcus* possède une architecture typique des cyanobactéries (Figure 5), qui est très comparable à celle d'un autre procaryote photosynthétique océanique, *Synechococcus*.

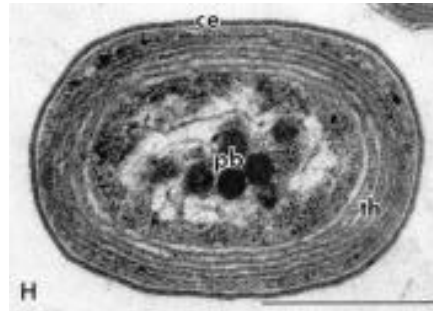


Figure 5. Photographie de microscopie électronique d'une coupe de *Prochlorococcus* provenant d'échantillons profonds de l'Océan Atlantique Nord (Johnson et Sieburth, 1979). ce, enveloppe cellulaire; pb, corps polyédraux; th, thylakoïdes. Echelle, 0,5 μm .

Avec une taille de 0,5 à 0,7 μm (Morel *et al.*, 1993), *Prochlorococcus* est le plus petit organisme photosynthétique connu à l'heure actuelle. Il se divise généralement une fois par jour dans la couche supérieure de surface en zone oligotrophe (Vaulot *et al.*, 1995) où il domine la biomasse photosynthétique (Campbell *et al.*, 1994).

Le génome de *Prochlorococcus* est très compact. Trois génomes de *Prochlorococcus* ont été séquencés jusqu'à maintenant : celui de la souche de surface *Prochlorococcus* MED4 (1,66 Mbp), et ceux de deux souches de profondeur, *Prochlorococcus* SS120 (1,75 Mbp) et *Prochlorococcus* MIT9313 (2,41 Mbp). Cette dernière souche possède des caractéristiques qui semblent plus proches de celles du *Synechococcus* marin que de celles des autres *Prochlorococcus* (Tableau 1). La taille des autres génomes cyanobactériens est comprise entre 2,55 et 13,2 Mbp, *Synechocystis* sp. PCC 6803 possédant par exemple un génome environ deux fois plus grand que *Prochlorococcus* (3,6 Mbp, Kaneko *et al.*, 1996). *Prochlorococcus* possède donc le plus petit génome connu à l'heure actuelle pour un organisme photosynthétique. Il possède également en général un très faible pourcentage en GC (30,9% pour MED4 et 36,4% pour SS120) beaucoup plus faible que celui de *Synechococcus* (47,4 à 69,5 %, Watson & Tabita, 1996) ou *Synechocystis* sp. PCC 6803 (47,7 %, Kaneko & Tabata, 1997).

Tableau 1. Caractéristiques des différents génomes de *Prochlorococcus* et de *Synechococcus* WH8102.

Genre	Souche	séquencé par	taille du génome (Mb)	GC %	Nombre de gènes
<i>Prochlorococcus</i>	MED4 (HL)	JGI	1,66	30,9	1713
<i>Prochlorococcus</i>	SS120 (LL)	Genoscope	1,75	36,4	1884
<i>Prochlorococcus</i>	MIT9313 (LL)	JGI	2,41	50,7	2265
<i>Synechococcus</i>	WH8102	JGI	2,43	59,4	2522

II.3.3. Photoacclimatation et photoadaptation

Une caractéristique importante de *Prochlorococcus* est sa distribution sur une très grande couche de la colonne d'eau, de la surface jusqu'à 150-200 m de profondeur. Le long de ce gradient naturel de lumière pouvant aller de 1500 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ près de la surface à moins de 1 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ à 150 m de profondeur, les cellules montrent de grandes différences, dont la plus évidente est une augmentation de la taille cellulaire et du contenu en pigments (Figure 6).

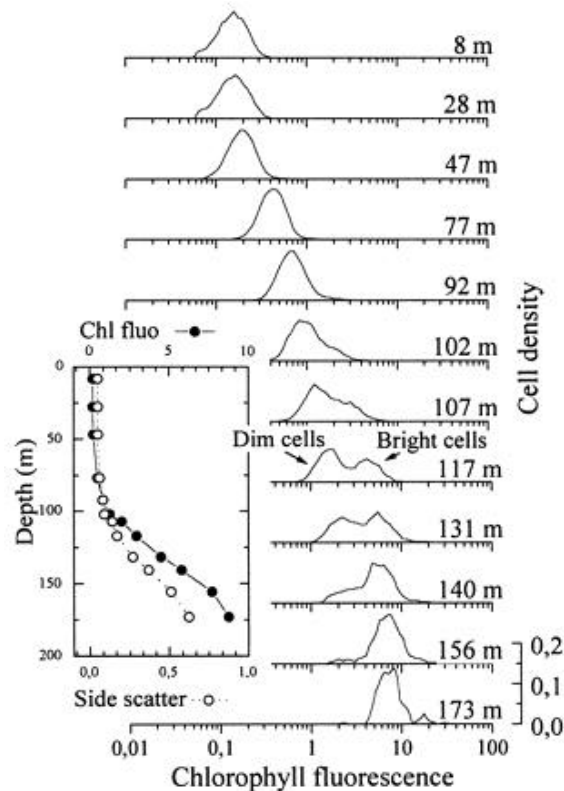


Figure 6. Distribution verticale des populations de *Prochlorococcus* dans le Pacifique subtropical près d'Hawaii. On distingue deux populations à forte (« bright ») et faible (« dim ») fluorescence chlorophyllienne. L'insert représente le profil vertical de diffusion à angle droit (indicatif de la taille cellulaire) et de fluorescence rouge de la population totale de *Prochlorococcus* mesurée par cytométrie en flux (d'après Campbell et Vault, 1993).

II.3.4. Appareil photosynthétique

Prochlorococcus se distingue de la grande majorité des cyanobactéries par sa pigmentation et par la nature très particulière de ses antennes collectrices. L'antenne des cyanobactéries "typiques" est formée par un complexe multiprotéique très volumineux, le phycobilisome (PBS), fixant de nombreux pigments solubles colorés (les phycobilines). L'antenne de *Prochlorococcus* est beaucoup plus simple et rappelle beaucoup, par sa structure et les pigments qu'elle fixe (des dérivés de chlorophylle *a* et *b*) (Goericke & Repeta, 1992), celle des plantes supérieures et des algues vertes, même si la nature et l'origine des protéines impliquées sont différentes (LaRoche *et al.*, 1996).

Les protéines de l'antenne de *Prochlorococcus* (Pcb), comme celles des deux autres oxyphotobactéries à chlorophylle *b* (*Prochlorothrix* et *Prochloron*), sont proches des protéines IsiA trouvées chez les cyanobactéries d'eau douce telles que *Synechococcus* sp. PCC 7942 et en dérivent probablement (LaRoche *et al.*, 1996), voir aussi chapitre V.2.2.). Toutes ces protéines appartiennent à la même famille de protéines liant la chlorophylle telles

que CP43 et CP47, qui sont les constituants majeurs de l'antenne interne du Photosystème II (PS II) de tous les organismes oxyphototrophes (LaRoche *et al.*, 1996). Le séquençage des gènes *pcb* a confirmé les différences existant entre les différentes souches de *Prochlorococcus* (Garczarek *et al.*, 2000, 2001).

II.3.5. Assimilation des nutriments

Une autre caractéristique importante de *Prochlorococcus* est son aptitude à coloniser des zones extrêmement oligotrophes qui sont limitées soit par l'azote, soit par le phosphore (Cottner *et al.*, 1997 ; Veldhuis & Kraav, 1993). Par exemple, *Prochlorococcus* représente jusqu'à 73 % du carbone photosynthétique dans la couche mélangée de surface au large de Hawaii (Campbell *et al.*, 1994). Dans ces conditions, sa petite taille, et par conséquent son rapport volume sur surface élevé, est un avantage adaptatif pour l'assimilation des nutriments (Chisholm, 1992). Dans les zones tropicales, *Prochlorococcus* est présent à la fois en surface, où seules les formes azotées réduites et organiques sont présentes, et en profondeur où les nitrates sont présents. En Mer Méditerranée en hiver, le NO_3^- supplémentaire est capable de stimuler le cycle cellulaire de *Prochlorococcus* (Vaulot *et al.*, 1990), suggérant que certaines populations doivent être capables d'assimiler ces formes oxydées de l'azote. Bien que l'azote soit le premier élément limitant dans beaucoup de zones océaniques, le phosphate peut être également limitant, soit de façon permanente comme dans la Mer Méditerranée, soit de façon transitoire comme dans la Mer des Sargasses (Cottner *et al.*, 1997 ; Thingstad & Rassoulzadegan, 1995). *Prochlorococcus* est bien représenté dans ces différentes zones, suggérant qu'il peut croître en présence de très faibles concentrations en phosphate. Le fer est le troisième élément nutritif majeur impliqué dans la limitation de la productivité primaire dans des zones océaniques non sujettes aux apports éoliens tels que le Pacifique équatorial (Martin *et al.*, 1994) ou dans certaines zones côtières (LaRoche *et al.*, 1996). Les faibles besoins en fer de *Prochlorococcus* pourraient être un facteur essentiel de sa dominance dans les océans. Ceci est suggéré en particulier par le fait que les protéines de l'antenne du PS II de *Prochlorococcus* sont similaires à IsiA, une protéine induite en condition de carence en fer chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 (LaRoche *et al.*, 1996) (voir chapitre suivant).

III. Les systèmes de transduction de signal à deux composants

III.1. Perception de l'environnement

Tous les organismes sont capables de détecter des changements dans leur environnement et de mettre en place des mécanismes de réponse qui leur permettent de s'adapter à ces changements. Le style de vie photoautotrophe des cyanobactéries leur impose une dépendance vis à vis des facteurs physico-chimiques de l'environnement, tels que la disponibilité de la lumière et des éléments nutritifs inorganiques. Les variations de ces paramètres à court terme, soit régulières (ex : rythme jour-nuit) soit aléatoires (ex : passage de nuages) constituent des stimuli auxquels ces organismes doivent répondre. De ce fait, les cyanobactéries possèdent une très large gamme de mécanismes de transduction des signaux et de réponses adaptatives (Tandeau de Marsac & Houmard, 1993). Les systèmes de transduction de signaux fonctionnent comme des circuits de traitement de l'information intracellulaire qui relient les stimuli externes aux réponses spécifiques d'adaptation. Beaucoup de cascades de signalisation eucaryotes font intervenir des protéines kinases qui à la fois s'autophosphorylent et phosphorylent d'autres protéines sur leurs résidus Ser, Thr ou Tyr, régulant ainsi leur activité. Cependant, dans les systèmes de signalisation procaryotes, un schéma de phosphorylation différent prédomine. Ces circuits de signalisation sont structurés autour de deux protéines conservées : une protéine histidine kinase (HSK) et un régulateur de réponse (RR) qui sont phosphorylés sur des résidus His et Asp, respectivement. Le transfert de phosphate de l'HSK vers le RR permet l'activation du RR, aboutissant ainsi à la réponse cellulaire.

III.2. Les systèmes à deux composants

L'étude des systèmes de signalisation a permis de définir les bases selon lesquelles les organismes détectent et répondent avec une très grande sensibilité aux changements chimiques ou physiques de leur environnement. Dans un grand nombre de cas, ces circuits de signalisation impliquent la phosphorylation de protéines effectrices clés par des protéines kinases. Chez les bactéries, de nombreux circuits de signalisation fonctionnent en utilisant un mécanisme de contrôle de la phosphorylation appelé "système à deux composants" (Nixon *et al.*, 1986 ; Parkinson & Kofoid, 1992).

Les événements biochimiques de base des systèmes de transduction de signal à deux composants ont été établis pour la première fois par Ninfa et Magasanik (1986) pour le

système NR (Nitrogen Regulator), système de régulation qui contrôle, chez *Escherichia coli*, l'expression de gènes en réponse à la disponibilité des sources azotées. A peu près à la même époque, Nixon *et al.* (1986) ont trouvé des similarités entre les séquences protéiques des composants du système NR et les séquences des composants de nombreux autres systèmes de détection bactériens, soulevant ainsi la possibilité que ces autres systèmes pourraient fonctionner via un mécanisme de signalisation analogue à celui utilisé par le système NR. Les travaux qui ont suivi sont partis de cette idée, et la liste des systèmes à deux composants s'est étendue à des centaines de systèmes distincts (Stock *et al.*, 1990 ; Bourret *et al.*, 1991 ; Parkinson & Kofoid, 1992). Récemment, la disponibilité de génomes complets a contribué à augmenter le nombre identifié de ces systèmes (Mizuno *et al.*, 1996 ; Mizuno *et al.*, 1997).

III.3. Les composants de base

Le système sensoriel à deux composants de base est composé de deux protéines (Figure 7).

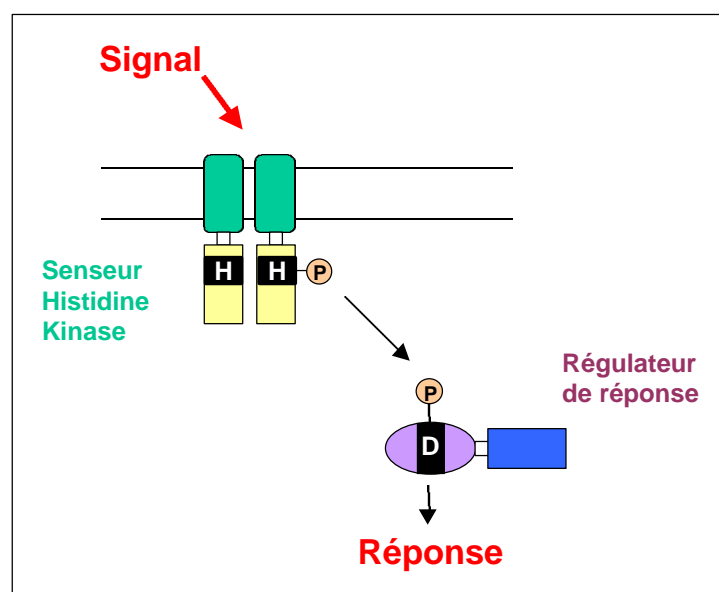


Figure 7. Représentation schématique du système de régulation à deux composants. H : résidu histidine, D : résidu aspartate, P : groupement phosphoryl. Vert : domaine senseur de l'histidine kinase, jaune : domaine transmetteur de l'histidine kinase, violet : domaine récepteur du régulateur, bleu : domaine effecteur du régulateur

La protéine HSK est composée d'un domaine senseur qui peut interagir avec les stimuli environnementaux et d'un domaine transmetteur, capable de s'autophosphoryler sur un résidu spécifique histidine et de transférer par la suite le phosphate sur le RR. Le RR possède également deux domaines, un domaine récepteur qui contient le résidu aspartate

phosphorylable et un domaine effecteur, qui est impliqué dans l'initiation de la réponse adaptative spécifique. La nature du signal dans cette voie de transduction sensorielle est le transfert du phosphate, en général provenant de l'ATP, vers la protéine HSK et ensuite vers le RR activant la réponse cellulaire. Ces deux classes de protéines, HSKs et RRs, constituent deux superfamilles qui possèdent des motifs d'acides aminés conservés (Figure 8).

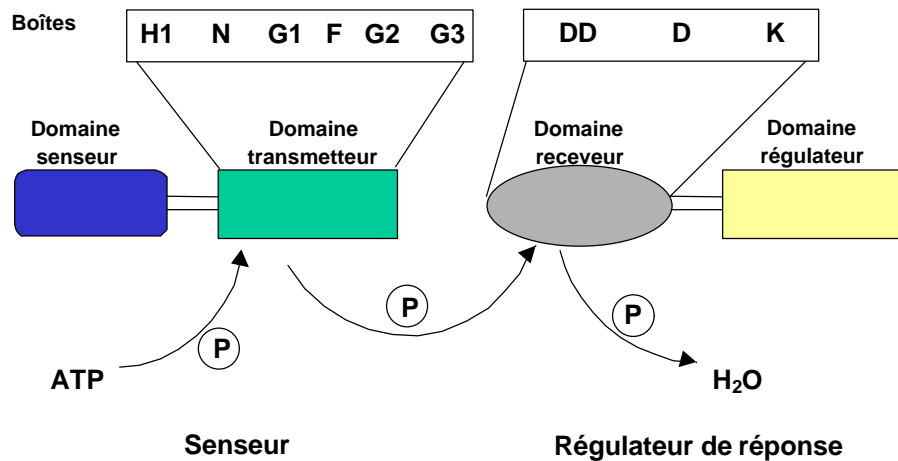


Figure 8. Diagramme illustrant l'organisation des différents domaines des histidine kinases et des régulateurs de réponse typiques. Les boîtes H, N, D, F et G sont indiquées ainsi que les acides aminés conservés (D aspartate, F phénylalanine, G glycine, H histidine, K lysine, x n'importe quel acide aminé) pour les histidine kinases et les régulateurs de réponse (d'après Whitton et Potts, 1998).

III.3.1. Les senseurs HSKs

Plus de 350 protéines de la superfamille de HSKs ont été déterminées à l'heure actuelle (Grebe & Stock, 1999). La grande majorité de ces HSKs sont des protéines homodimériques, possédant un domaine périplasmique N-terminal senseur qui est couplé à un domaine kinase cytoplasmique C-terminal. Les séquences des domaines senseurs sont variables de manière à pouvoir répondre aux différents signaux environnementaux, alors que le domaine kinase, de 250 acides aminés environ, est beaucoup plus conservé et peut être identifié par un ensemble de motifs d'acides aminés conservés appelés boîtes H, N, G1, F et G2 (Stock, et al., 1989 ; Parkinson & Kofoed, 1992), la boîte H contenant le résidu phosphorylable histidine. Par plusieurs aspects, les HSKs sont similaires aux familles de récepteur Tyr kinase bien connues (Stock *et al.*, 1991). Les HSKs fonctionnent en dimères et s'autophosphorylent. Elles sont associées à la membrane cytoplasmique, la plupart du temps via une ou deux séquences transmembranaires. Elles contiennent en général des modules

sensoriels extracellulaires fusionnés au module catalytique protéine kinase (Bourret *et al.*, 1991). Cet arrangement facilite la détection des stimuli environnementaux qui agissent sur les HSKs en régulant leur activité kinase. Cependant, dans certains cas, les ligands interagissent directement avec les HSKs alors que dans d'autres cas, une protéine distincte sert de récepteur primaire pour le stimulus. Malgré ces similarités au niveau du mécanisme général, des caractéristiques fonctionnelles permettent de distinguer les HSKs des autres protéines kinase. Tout d'abord, les HSKs ne catalysent pas de transfert direct de phosphate de l'ATP vers leur "substrat" RR ; chaque HSK doit d'abord s'autophosphoryler, et seulement ensuite le groupement phosphoryl est transféré de HSK-P vers le RR. De plus, le site d'autophosphorylation de HSK est un résidu His et le site de phosphorylation du RR, un résidu Asp (Bourret *et al.*, 1991). Les stabilités énergétiques et chimiques des phospho-His et des phospho-Asp diffèrent significativement de celles des acides phospho-aminés plus traditionnels (phospho-Tyr, phospho-Ser et phospho-Thr) (Stock *et al.*, 1990).

III.3.2. Les régulateurs de réponse (RRs)

Plus de 400 exemples différents de RRs ont été identifiés jusqu'à maintenant. Les RRs sont en général trouvés à la fin des chaînes de phosphotransfert où ils agissent, lorsqu'ils sont activés par phosphorylation, en régulant la réponse de la cellule. Ces protéines possèdent en général deux domaines dont un domaine receveur N-terminal conservé, d'environ 125 acides aminés, et un domaine effecteur C-terminal variable. Les résidus Asp-13, Asp-57 et Lys-109 (boîte DD, D et K) mis en évidence dans le RR CheY de *E. coli* semblent être particulièrement conservés chez les RRs (Stock *et al.*, 1989), l'Asp-57 étant le site de phosphorylation de la protéine. Les domaines régulateurs des RRs ont trois fonctions : premièrement, ils interagissent avec les HSKs phosphorylées et catalysent le transfert du groupement phosphoryl sur un des leurs propres résidus Asp ; deuxièmement, ils catalysent ensuite leur autodéphosphorylation ; et troisièmement, ils régulent les activités de leurs domaines effecteurs associés de façon phosphorylation-dépendante. Le domaine receveur est en général connecté par une région variable au domaine effecteur (Fig. 8). Dans la plupart des cas, le domaine effecteur est un domaine de liaison à l'ADN permettant au RR de fonctionner comme un facteur de transcription, et la phosphorylation du résidu Asp permet de contrôler sa capacité soit à lier une séquence ADN cible soit à interagir avec d'autres composants de la machinerie de transcription (Hakenbeck & Stock, 1996). Les RRs possédant un domaine effecteur capable de lier l'ADN sont divisés en trois sous-famille appelées OmpR-PhoB, NtrC

et FixJ (Stock *et al.*, 1990). Il existe aussi certains RRs qui ne sont pas liés à la transcription comme par exemple, CheB, qui est impliqué dans la déméthylation des protéines “ récepteur ” du chémotaxisme chez *E. coli* (Lupas & Stock, 1989). En revanche, la famille de RRs CheY possède, elle, uniquement le domaine receveur.

III.4. Un exemple simple

Le système EnvZ-OmpR de *E. coli* est un exemple simple de système de signalisation à deux composants (Figure 9). Ce système régule l'expression des gènes des porines *ompF* et *ompC* en réponse aux changements d'osmolarité extracellulaire (Pratt & Silhavy, 1995). EnvZ est une HSK qui agit comme un osmosenseur.

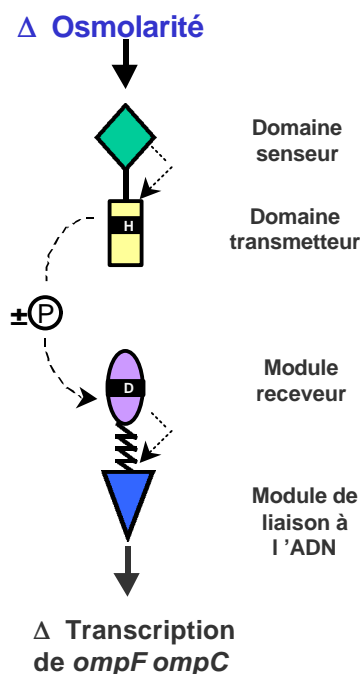


Figure 9. Exemple de système à deux composants de base. Le système de réponse à un changement d'osmolarité de *E. coli* est composé d'une histidine kinase « osmosenseur » EnvZ, et d'un régulateur de réponse « facteur de transcription » OmpR (Pratt et Silhavy, 1995) (d'après Chang et Stewart, 1998).

Le signal qui est détecté par EnvZ n'a pas été déterminé, mais en conditions de forte osmolarité, EnvZ s'autophosphoryle et peut alors facilement transférer le groupement de phosphoryl sur résidu Asp du module receveur du RR, OmpR. OmpR phosphorylé peut alors se fixer sur les séquences en amont des gènes *ompF* et *ompC*, régulant ainsi leur expression. Ce système contrôle les niveaux relatifs des protéines OmpF et OmpC, qui forment des pores homotrimeriques dans la membrane externe de la bactérie, régulant ainsi la diffusion de

substances à travers la membrane en conditions de forte osmolarité. En plus de son rôle de HSK, EnvZ catalyse également la déphosphorylation de OmpR phosphorylé. La réponse de ce système aux conditions osmotiques résulte du contrôle des deux réactions enzymatiques kinase / phosphatase de EnvZ (Pratt & Silhavy, 1995).

III.5. Des systèmes à plus de deux composants

A l'exception de quelques systèmes simples comme celui décrit ci-dessus, la plupart des systèmes sont plus complexes et impliquent soit des modules additionnels soit un certain nombre de protéines accessoires (Figure 10). Certains systèmes à deux composants, par exemple, nécessitent une phosphatase additionnelle pour contrôler le niveau de phosphorylation du RR. Il existe aussi de nombreux exemples de systèmes qui utilisent plus d'une HSK ou plus d'un RR. Ces exemples incluent : (a) de multiples HSKs agissant sur un RR, (b) de multiples RRs régulés par une seule HSK, (c) un système de relais en plusieurs étapes de phosphotransfert, et (d) des senseurs HSKs hybrides, dans lesquels un module receveur est fusionné à l'HSK de telle sorte qu'une seule protéine possède tous les éléments de ces systèmes à deux composants (Parkinson & Kofoed, 1992). La plupart de ces kinases hybrides semblent phosphoryler un module receveur sur une seconde protéine distincte, d'où la possibilité d'avoir différents circuits par lesquels une phosphatase peut être transférée d'un site de phosphorylation His à un module receveur (Appleby *et al.*, 1996). La protéine FreZ, chez *Myxococcus xanthus* est une exception à cette généralité dans laquelle la kinase hybride semble être capable d'exécuter les fonctions effectrices sans l'aide d'autres RRs (Ward & Zusman, 1997). Il a été estimé que près de 20% des HSKs sont en fait des kinases hybrides (Grebe & Stock, 1999).

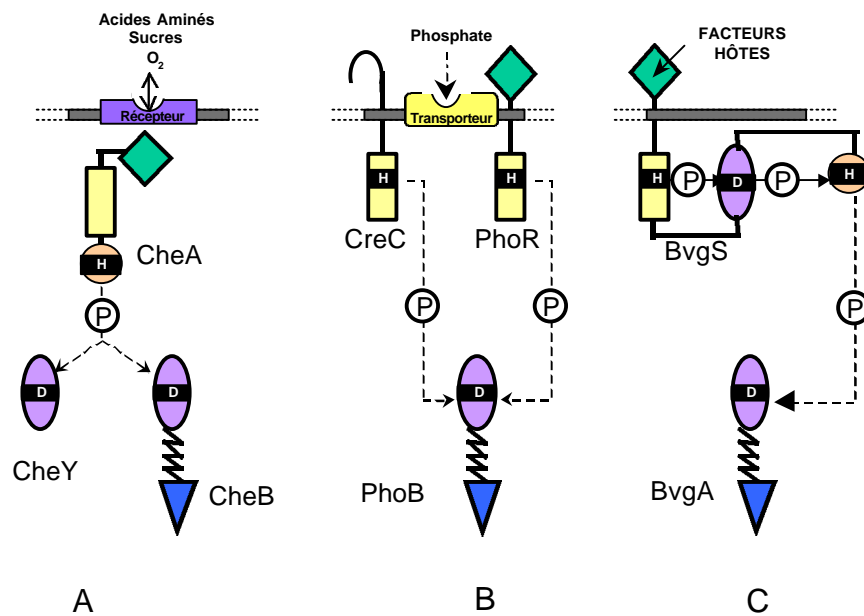


Figure 10. Exemples montrant la diversité des systèmes à deux composants. Dans les figures A et B, un récepteur à la surface de la cellule ou une protéine de transport est responsable de la liaison directe ou de la détection du stimulus, et cette information est alors dirigée vers l'histidine kinase appropriée via des interactions protéine-protéine. A, circuit de signalisation impliqué dans le chemotaxisme chez *E. coli* (Bourret et al., 1991 ; Stock et al., 1991). B, Système impliqué dans le contrôle de l'expression de gène en réponse à la disponibilité du phosphate (Wanner, 1994). C, Système impliquant une histidine kinase hybride BvgS qui régule l'expression de facteurs de virulence du pathogène humain *Bordetella pertussis* en réponse à des facteurs hôtes non déterminés (d'après Chang et Stewart, 1998).

III.6. Diversité chez les procaryotes

La disponibilité des séquences complètes de génomes bactériens a permis d'estimer la diversité des protéines constituant les systèmes à deux composants (Tableau 2). Chez *E. coli*, on trouve environ 30 HSKs (5 d'entre elles étant des kinases hybrides) et 32 RRs (Mizuno, 1997). Cependant, le nombre de systèmes à deux composants diffère de façon importante chez les différentes bactéries, pouvant aller de 0 chez *Mycoplasma genitalium* à 80 chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, pour laquelle ces protéines représentent jusqu'à 2,5 % du génome (Mizuno *et al.*, 1996 ; Mizuno, 1998). Des analyses sur d'autres génomes bactériens ont permis d'estimer le nombre de systèmes à deux composants à 70 chez *B. subtilis* (Fabret *et al.*, 1999) ; 9 chez *Haemophilus influenzae* (Mizuno, 1998) ; 11 chez *Helicobacter pylori* (Mizuno, 1998) ; et 19 chez *Thermotoga maritima* (Nelson *et al.*, 1999). De la même façon, chez deux archaebactéries, on a pu estimer le nombre de ces systèmes à 24 chez

Methanobacterium thermoautotrophicum (Smith *et al.*, 1997) et 0 chez *Methanococcus jannaschii* (Mizuno, 1998).

Tableau 2. Répartition des systèmes à deux composants dans différents génomes représentatifs (d'après West et Stock, 2001).

organisme	HKs		RRs	HPt Protéines ^b	Refs
	Orthodoxe	Hybride			
<i>Escherichia coli</i>	24	5	32	1	Mizuno <i>et al.</i> , 1997
<i>Synechocystis</i> sp.	25	16	38	1	Mizuno <i>et al.</i> , 1996
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	13	0	14	ND	Throup <i>et al.</i> , 2000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	1	2	1	Thomason <i>et al.</i> , 1999
<i>Dictyostelium discoideum</i> ^c	0	11	1	1	Thomason <i>et al.</i> , 1999
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	9 ^d	16	5	Makino <i>et al.</i> , 2000

^a Abbreviations: HK, protéine histidine kinase; HPt, protéine de phosphotransfert contenant une His; ND, non déterminé; RR, régulateur de réponse.

^b Domaines indépendants, ne font pas partie des HKs.

^c La séquence du génome n'est pas complète.

^d Six sur neuf de cette catégorie sont annotées comme étant des kinases hybrides; les autres sont à confirmer.

III.7. Systèmes à deux composants eucaryotes

Bien qu'il soit maintenant établi que les systèmes à deux composants constituent le mécanisme de signalisation le plus fréquent chez les bactéries (Parkinson & Kofoed, 1992 ; Stock *et al.*, 1989), ces systèmes ont également été trouvés chez des eucaryotes (Tableau 2), mais jusqu'à ce jour, seulement chez un nombre limité d'organismes (Loomis *et al.*, 1997 ; Wurgler-Murphy & Saito, 1997). Un certain nombre de gènes codant des HSKs, des HSKs hybrides et des RRs ont notamment été rapportés chez les levures (*S. cerevisiae*, *Schizosaccharomycetes pombe* et *Candida albicans*), chez *Dictyostelium discoideum*, chez *Neurospora crassa*, et dans des plantes supérieures (Brown *et al.*, 1993 ; Chang *et al.*, 1993 ; Wang *et al.*, 1996). La plupart des kinases senseurs identifiées dans des systèmes eucaryotes sont des HSKs hybrides. Dans certains cas, la désignation d'une HSK ou d'un RR a été basée exclusivement sur des similarités de séquences avec des HSKs et RRs bactériens connus. Par contre, on connaît très peu de choses sur les stimuli, les activités effectrices, les propriétés biochimiques et les activités de signalisation de la plupart des HSKs et RRs eucaryotes.

III.8. Mécanismes de régulation

Certains systèmes à deux composants engendrent une réponse progressive, comme le système EnvZ-OmpR qui régule l'expression différentielle des gènes des porines *ompF* et *ompC* (Pratt & Silhavy, 1995) alors que d'autres, comme le système Spo de *B. subtilis* qui contrôle la sporulation, engendrent une réponse de type "tout ou rien" (Hoch & Silhavy, 1995). En fonction de la réponse, ces deux types de systèmes peuvent donc nécessiter une régulation importante et souvent l'intervention de protéines auxiliaires. Les premières cibles de cette régulation sont les activités des HSKs et la déphosphorylation du RR.

III.8.1. Régulation des activités Histidine kinase

Les HSKs possèdent deux activités qui vont réguler le niveau de phosphorylation du RR : l'autophosphorylation et la déphosphorylation du RR. Toutes les HSKs ne possèdent pas une activité phosphatase ; pour certaines d'entre elles, la régulation se produit exclusivement au niveau de l'autophosphorylation (Borkovich *et al.*, 1989). Dans d'autres systèmes, c'est l'activité phosphatase sur le RR plutôt que l'autophosphorylation qui est régulée (Dahl *et al.*, 1992 ; Jung *et al.*, 1997). L'une ou l'autre de ces activités peut être régulée directement ou indirectement par les stimuli.

Dans les HSKs trans-membranaires typiques, les domaines senseurs lient directement les ligands ou détectent d'autres stimuli physiques. Des schémas plus complexes impliquent la détection indirecte des signaux via l'interaction avec une autre protéine. Par exemple, l'activité d'autophosphorylation de CheA, HSK impliquée dans le chemotactisme qui forme un complexe avec les chémorécepteurs et une protéine "adaptateur", CheW (Gegner *et al.*, 1992 ; Liu *et al.*, 1997), est soit inhibée soit stimulée par des signaux transmis par ces chemorecepteurs (Ninfa *et al.*, 1991 ; Borkovich *et al.*, 1989). La capacité de l'HSK PhoR à réprimer le régulon Pho quand le phosphate est en excès, nécessite, elle, l'intervention d'un complexe de transport de phosphate (PstA-C et PstS), ainsi qu'une protéine accessoire, phoU (Steed & Wanner, 1993). Ces protéines formeraient un complexe de répression associé à la membrane qui régulerait l'activité de PhoR (Wanner, 1993).

III.8.2. Régulation de la déphosphorylation du régulateur

Certains régulateurs ont également une activité autophosphatase, et le taux de déphosphorylation peut alors être régulé en fonction des nécessités de chaque système

spécifiquement. La déphosphorylation du RR est aussi influencée par les activités phosphatases des HSKs qui sont régulées par différents mécanismes comme discuté précédemment. Dans la plupart des cas, le mécanisme “phosphatase” paraît être distinct d’une simple réaction reverse de phosphotransfert (Kamberov *et al.*, 1994 ; Skarphol *et al.*, 1997). Le déphosphorylation du RR peut aussi être effectuée par des protéines auxiliaires. Le système de sporulation de *B. subtilis* implique par exemple un ensemble de phosphatases hautement régulées (RapA, RapB et RapE) qui déphosphorylent la protéine Spo0F (Perego *et al.*, 1994), et une phosphatase distincte (Spo0E) qui déphosphoryle une autre protéine Spo0A (Ohlsen *et al.*, 1994). Dans le chemotaxisme bactérien, une protéine auxiliaire, CheZ, forme un oligomère avec le régulateur CheY phosphorylé et accélère ainsi sa déphosphorylation (Hess *et al.*, 1988).

III.9. Systèmes à deux composants cyanobactériens

Des études récentes ont montré que parmi les diverses espèces bactériennes dont les génomes ont été totalement séquencés, les cyanobactéries possèdent le plus grand nombre de systèmes à deux composants (Mizuno *et al.*, 1996; West & Stock, 2001). L’analyse du génome de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996) indique la présence d’au moins 44 HSKs et 52 RRs chez cet organisme. Dans le génome de la cyanobactérie filamenteuse fixatrice d’azote, *Anabaena* sp. PCC 7120, 195 gènes codant pour des composants de ces systèmes de transduction de signal à deux composants ont été identifiés (Kaneko *et al.*, 2001). Ces systèmes peuvent être impliqués dans des réponses à des conditions environnementales diverses telles que des carences générales en nutriments ou des stress de forte lumière (Schwarz & Grossman, 1998), des carences en phosphate (Hirani *et al.*, 2001), et des variations de température (Suzuki *et al.*, 2000 ; Suzuki *et al.*, 2001) (Tableau 3).

Un des premiers systèmes à deux composants identifiés chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 a été le système Cph1/Rcp1 qui est impliqué dans la régulation de certains gènes en réponse à des stress lumineux (Yeh *et al.*, 1997 ; Garcia-Dominguez *et al.*, 2000). La protéine Cph1 a été identifiée à l’origine comme un homologue du phytochrome (Kaneko *et al.*, 1996). Un autre système à deux composants a également été identifié plus récemment chez ce même organisme et semble être impliqué dans la régulation de la stoechiométrie entre les complexes du photosystème I et du photosystème II via la détection des changements de l’état d’oxydo-réduction des réserves de plastoquinone dans les membranes (Li & Sherman, 2000).

Tableau 3. Exemples de réponses adaptatives cyanobactériennes impliquant des histidine kinases ou des régulateurs de réponse (d'après Whitton et Potts, 1998)

Fonction physiologique	Gènes ou ORFs	Organisme	Références
Dégradation des phycobilisomes et survie en conditions de carence en nutriments et forte lumière	<i>nblR</i>	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	Schwarz et Grossman, 1998
Adaptation chromatique complémentaire	<i>rcaC</i>	<i>Fremyella diplosiphon</i>	Chiang <i>et al.</i> , 1992
	<i>rcaE</i>	<i>Fremyella diplosiphon</i>	Kehoe et Grossman, 1996
	<i>rcaF</i>	<i>Fremyella diplosiphon</i>	Kehoe et Grossman, 1997
Formation du profil hétérocyste	<i>patA</i>	<i>Anabaena</i> PCC 7120	Liang <i>et al.</i> , 1992
Fixation d'azote	<i>devR</i>	<i>Nostoc</i> ATCC 29133	Campbell <i>et al.</i> , 1996
Disponibilité en CO ₂	<i>hatR</i>	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	Bédu <i>et al.</i> , 1995
Signalisation dans la réponse de type phytochrome et éthylène	<i>slr1393, slr1124, slr1969, slr0473</i>	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	Kaneko <i>et al.</i> , 1996
	<i>phy</i>	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	Hughes <i>et al.</i> , 1997
	<i>plpA</i>	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	Wilde <i>et al.</i> , 1997
Résistance aux herbicides / signalisation chimique	<i>dspA</i>	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	Bartsevich et Shestakov, 1995
Disponibilité en phosphate	<i>sphR/sphS</i>	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	Aiba <i>et al.</i> , 1993
	<i>phoB/phoR</i>	<i>Synechococcus</i> WH 7803	Watson <i>et al.</i> , 1996

Le RR NblR, identifié chez *Synechococcus* sp. PCC 7942, est impliqué dans la régulation de la dégradation des phycobilisomes en réponse à une carence en nutriments, mais régule aussi des fonctions supplémentaires essentielles pour la survie de la cellule durant des conditions de carence en nutriments et de forte lumière (Schwarz & Grossman, 1998). Le gène, *patA*, est impliqué dans le contrôle de la formation de l'hétérocyste et code pour une protéine de 379 acides aminés qui est constituée de 3 domaines et dont le domaine C-terminal possède des caractéristiques de RR (Liang *et al.*, 1992). Des expériences de mutagenèse chez la souche fixatrice d'azote *Nostoc* ont permis l'identification d'un gène, *devR*, codant une protéine possédant les caractéristiques d'un RR, similaire à CheY de *E. coli* et SpoOF de *Bacillus subtilis*, qui est nécessaire pour la fixation de l'azote en condition anaérobie (Campbell *et al.*, 1996). De la même façon, le gène *rcaC* qui complémente une mutation provoquant la perte de la sensibilité à la lumière rouge dans l'adaptation chromatique complémentaire chez *Fremyella diplosiphon*, code une protéine de 632 acides aminés qui contient deux domaines receveurs RR (Chiang *et al.*, 1992). Plus récemment, Kehoe et Grossman (1996, 1997) ont montré que les gènes *racE* et *rcaF* de *F. diplosiphon*, qui pourraient être impliqués dans la détection de la qualité de la lumière, codent pour des protéines ayant les caractéristiques d'une HSK et d'un RR, respectivement. Chez

Synechocystis sp. PCC 6803, le gène *dspA*, qui provoque une résistance croisée à certains herbicides aussi bien qu'aux antagonistes de la calmoduline, code une HSK possédant deux segments trans-membranaires typiques (Bartsevich & Shestakov, 1995). Aiba *et al.* (1993) ont caractérisé deux gènes contigus *sphS* et *sphR* dans *Synechococcus* sp. PCC 7942 qui codent une HSK et un RR respectivement. Des mutations de ces gènes empêchent l'induction de la phosphatase alcaline et d'autres polypeptides impliqués dans l'assimilation du phosphate. Nagaya *et al.*, (1994) ont aussi montré que SphR est phosphorylé par phosphotransfert de SphS et lie deux sites distincts en amont sur le promoteur du gène de la phosphatase alcaline (*phoA*). Dans le cas de la souche océanique *Synechococcus* WH 7803, deux gènes contigus, désignés *phoB* et *phoR*, codent un RR et une HSK respectivement et la transcription de ces gènes est induite par une carence en phosphate (Watson *et al.*, 1996). Plusieurs autres gènes de HSK et RR d'une importance physiologique non définie ont été identifiés chez les cyanobactéries (Mann & Scanlan, 1994) tels que ceux clonés par Nagaya *et al.* (1993) chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 sur la base de leur aptitude à compléter les mutants HSK de *E. coli*, et un ORF incomplet trouvé en aval du gène *petH* (NADP⁺-ferredoxin oxidoreductase) de *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Schluchter & Bryant, 1992).

En plus des HSKs et RRs typiques, un nombre significatif de protéines possédant des caractéristiques des deux familles ont été caractérisées. Parmi les protéines cyanobactériennes, il faut noter RcaC, qui est impliquée dans l'adaptation chromatique et possède deux domaines conservés receveurs, chacun ayant un site de phosphorylation potentiel Asp (Chiang *et al.*, 1992) et un site d'autophosphorylation His (Appleby *et al.*, 1996). Ces protéines de signalisation plus complexes pourraient jouer un rôle dans les systèmes de phospho-relais à 4 étapes dans lesquels on observe un phosphotransfert His-Asp-His-Asp (Appleby *et al.*, 1996). De tels systèmes sont typiques dans les circuits contrôlant l'initiation de la sporulation chez *B. subtilis* et sont présents également dans le système de régulation des facteurs de virulence chez *Bordetella pertussis* (Appleby *et al.*, 1996). De plus, avec la découverte de RcaE (Kehoe & Grossman, 1996), une kinase senseur qui pourrait agir en amont de RcaC, un tel phospho-relais multiple pourrait être impliqué dans l'adaptation chromatique. Cette observation s'est étendue avec la découverte de RcaF, qui pourrait impliquer cinq domaines phospho-accepteurs dans le système de signalisation (Kehoe & Grossman, 1997). L'intérêt premier de ces phospho-relais multiples est qu'ils offrent de plusieurs points de contrôle dans le circuit de signalisation (Figure 11).

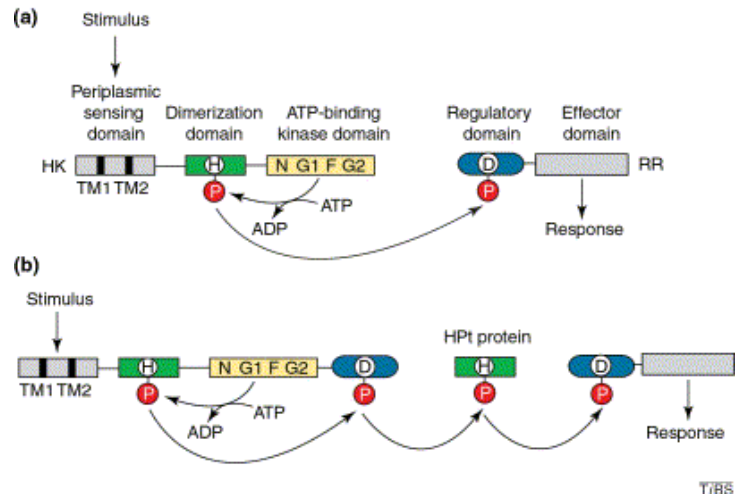


Figure 11. Représentation schématique d'un système de signalisation à deux composants (a) et d'un système de signalisation de phospho-relais à étapes multiples (b) (d'après West et Stock, 2001).

IV. Les protéines de stress ou protéines « heat shock »

IV.1. Introduction

Une cellule confrontée à un changement brusque de son environnement souffre de stress. La cause, ou l'élément stressant peut être de plusieurs types, par exemple, physique (élévation de température) ou chimique (augmentation ou diminution du pH, salinité ou concentration en oxygène) (Hall *et al.*, 1995 ; Sanders, 1993 ; Watson, 1990). Un des composants clés du stress est la dénaturation des protéines (Parsell & Lindquist, 1993 ; Gottesman, 1998) ; certaines protéines perdent en effet leur configuration native, fonctionnelle, et ont tendance à s'agréger. Ce processus est réversible jusqu'à un certain point au delà duquel il devient irréversible et généralisé dans la cellule, qui finalement meurt. Un composant essentiel de la réponse au stress est l'activation d'un certain nombre de " gènes de stress " (Georgopoulos *et al.*, 1994 ; Hecker *et al.*, 1996 ; Morimoto, 1998), dont la concentration des produits va augmenter, protégeant ainsi la cellule des effets destructeurs engendrés. Ces produits vont favoriser la remise en état de la cellule en permettant la renaturation des protéines partiellement dénaturées (Glover & Lindquist, 1998 ; Parsell & Lindquist, 1993). La plupart de ces protéines dites " de stress " agissent également en absence de stress, c'est à dire en conditions physiologiques normales, et jouent un rôle critique dans la biogénèse des protéines. Elles assistent notamment le repliement, la translocation et l'assemblage des autres protéines (Martin & Hartl, 1997 ; Ruddon & Bedows, 1997). C'est la raison pour laquelle la plupart de ces protéines sont appelées protéines " chaperones ". Elles aident les autres protéines cellulaires (i) à se replier correctement pendant et après la traduction ; (ii) à migrer vers leur localisation finale où elles vont fonctionner ; et (iii) à s'organiser lorsque ces protéines fonctionnent en polymères. De plus, certaines protéines participent également à la dégradation des autres polypeptides, par exemple, lorsque ces polypeptides sont dénaturés au delà d'un certain point et pourraient devenir une menace pour la cellule s'ils venaient à s'agréger (Gottesman *et al.*, 1998 ; Herman & D'Ari, 1998).

Ces gènes et protéines de stress sont souvent appelés " heat-shock " (hsp et Hsp) dans la littérature pour des raisons historiques. Les Hsp ont été observés pour la première fois chez la *Drosophile* exposée à une température supérieure à son optimum de croissance (Ritossa, 1962). Les protéines Hsp (et leur gène) sont regroupées en différentes familles en fonction de leur masse moléculaire (Tableau 4). Les protéines de 55 à 64 kDa, ou famille Hsp60, sont aussi appelées " chaperonines " et font partie des " chaperones moléculaires " dans le langage courant. Plus spécifiquement, ce terme de " chaperones " s'applique à la famille Hsp70.

Certaines de ces protéines ont été très conservées au cours de l'évolution, spécialement les protéines codées par les gènes *hsp60* (encore appelés *groEL* ou *cpn60*) et *hsp70* (*dnaK*). Elles ont été identifiées dans de nombreux organismes (eucaryotes et procaryotes) aussi bien que dans différents compartiments cellulaires majeurs dont le cytoplasme, le noyau, le réticulum endoplasmique, les mitochondries et les chloroplastes (Gething & Sambrook, 1992 ; Lindquist & Craig, 1988).

Tableau 4. Classification des Hsp en fonction de leur masse moléculaire (d'après Macario *et al.*, 1999).

Name	Masse (kDa)
Hsp100 (Clp)	100 ou plus
Hsp90 (HtpG)	81-99
Hsp70 (chaperones DnaK)	65-80
Hsp60 (chaperonines GroE)	55-64
Hsp40 (DnaJ)	35-54
Petites HSP (sHsp)	<35
Autres (protéases, etc...)	variée

IV.2. Régulation

Les deux systèmes chaperones majeurs des cellules bactériennes sont les systèmes GroES/L et DnaK. Les deux signaux essentiels induisant une réponse de type “ heat shock ” sont une température élevée et la présence de protéines dénaturées dans la cellule, mais ces signaux sont détectés et transmis différemment en fonction des bactéries. L'exemple le mieux caractérisé est celui du facteur alternatif σ^{32} (RpoH) de l'ARN polymérase de *E. coli* qui est à la fois traduit de façon plus efficace et aussi stabilisée transitoirement après un choc thermique. Ce système est régulé par la protéine chaperon DnaK. *E. coli* semble être une exception en ce qui concerne la régulation des gènes heat-shock dans le sens où tous les gènes heat-shock majeurs font partie du régulon σ^{32} . A faibles températures, RpoH est rapidement dégradé par une métalloprotéase associée à la membrane, FtsH. La protéolyse de RpoH est un processus complexe parce que les contacts protéines-protéines déterminent le devenir du facteur de transcription. Ce n'est pas le cas pour la plupart des bactéries où les gènes heat-shock appartiennent à différents regulons. Par exemple, chez *Bacillus subtilis*, quatre classes de gènes heat-shock ont été identifiées jusqu'à maintenant. La classe I comprend les opérons *dnaK* et *groESL* qui sont sous le contrôle négatif de la protéine répresseur HrcA qui peut lier

une séquence CIRCE (pour “Controlling Inverted Repeat of Chaperonin Expression”) du promoteur. L’activité du répresseur HrcA est modulé par le système GroES/L (Mogk *et al.*, 1997). Ce système de régulation est très courant chez les bactéries et a été décrit dans plus de 40 espèces différentes (Hecker *et al.*, 1996). Les gènes de la classe II constituent le régulon σ^B , qui compte environ 100 protéines, et représentent le plus large groupe connu à l’heure actuelle (Hecker & Volker, 1998). L’activité du facteur σ^B est modulé par un anti facteur σ^B . Un second acteur est un anti-anti facteur σ^B qui est présent sous une forme phosphorylée en absence de stress. Les stress et carences augmentent le niveau de la forme non phosphorylée de l’anti-anti facteur σ^B qui est alors capable de lier l’anti-facteur σ^B relargant ainsi le facteur σ^B . Les gènes heat-shock de la classe III, sont contrôlés par un autre répresseur, la protéine CtsR, qui interagit avec une séquence “CtsR box”. Seuls les trois opérons *clpP*, *clpE* et *clpC* sont contrôlés par ce répresseur (Derre *et al.*, 1999). La façon dont l’activité de ce répresseur est modulée après une soudaine augmentation de température est inconnue. Il existe d’autres gènes qui ne sont contrôlés par aucun de ces mécanismes dont *ftsH*, *lon*, *htrA* et *htpG* (Homuth *et al.*, 1999). Certaines études ont montré que le gène *htpG* était contrôlé par un activateur transcriptionnel (Versteeg *et al.*, 2003) (Figure 12). Chez *Bradyrhizobium japonicum*, en plus des mécanismes impliquant le répresseur HrcA ou le facteur alternatif sigma (RpoH), il existe un mécanisme de régulation qui implique une séquence appelée ROSE. En effet, la région 5’ non codante de plusieurs opérons heat shock est caractérisée par la présence d’une séquence ROSE (Repression Of heat Shock gene Expression). Ces ARNm ROSE se replient en une structure qui empêche la traduction à faible température. A forte température, cette structure disparaît permettant l’accès au ribosome et la traduction des messagers.

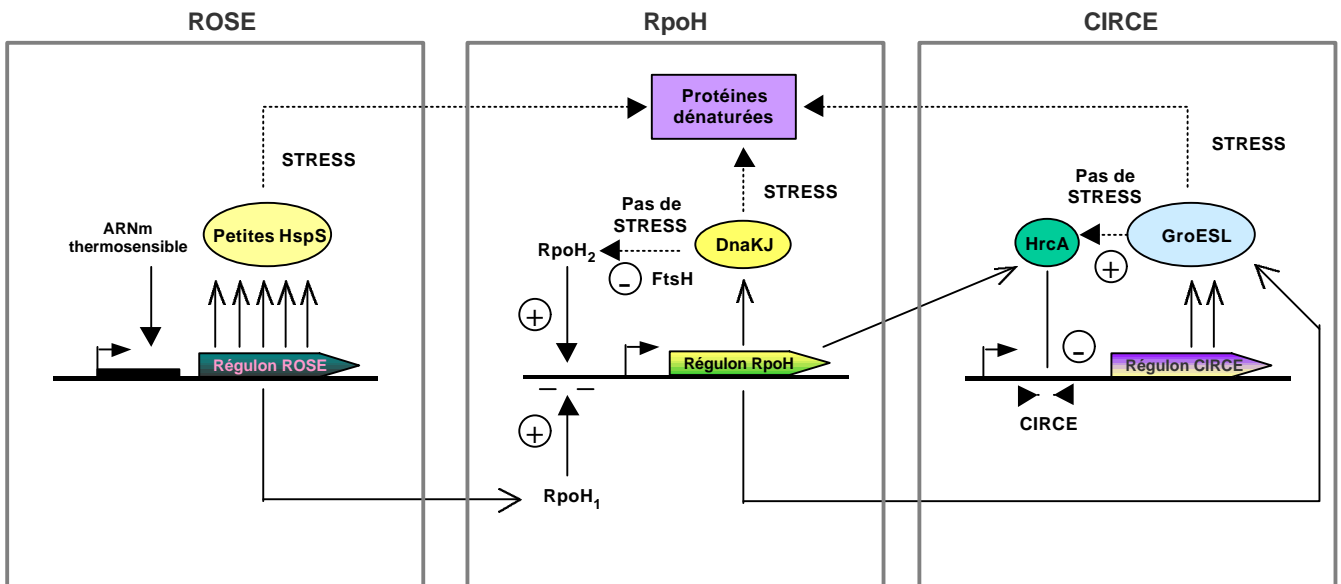


Figure 12. Exemples de différents mécanismes de régulation des gènes heat-shock chez *Bradyrhizobium japonicum*.

IV.3. Les différentes familles de Hsp

IV.3.1. Le système DnaK (DnaK-DnaJ-GrpE)

Le système DnaK est composé de trois protéines DnaK (Hsp70), DnaJ (Hsp40) et GrpE. Ces protéines sont impliquées non seulement dans le repliement protéique, mais aussi dans le transport des protéines à travers la membrane et la réactivation des protéines endommagées suite à un choc thermique ou autre stress. La protéine chaperone DnaK agit en collaboration avec la co-protéine DnaJ (impliquée dans la liaison du substrat et sa présentation) et GrpE (un facteur d'échange de nucléotides). DnaK est une ATPase, et peut donc lier à la fois des molécules d'ATP et des polypeptides dénaturés (substrat). DnaK-ATP a une plus faible affinité pour le substrat que DnaK-ADP. L'hydrolyse de l'ATP, qui est favorisée par la protéine DnaJ via l'interaction de son domaine J avec molécule DnaK, permet la liaison du substrat, et le polypeptide est maintenu sous une forme étirée évitant ainsi son agrégation. L'interaction avec la protéine GrpE, facteur d'échange de nucléotides, régénère le complexe DnaK-ATP, diminue l'affinité pour le substrat, et le libère. Le polypeptide peut alors être pris en charge par le système chaperonine GroESL pour son repliement final (Figure 13). La famille de protéines DnaK est fortement conservée et ubiquiste.

Les membres de la famille DnaJ, de la même façon que les protéines DnaK, appartiennent à la famille des protéines chaperones (Caplan *et al.*, 1993 ; Langer *et al.*, 1992). DnaJ est composée d'un domaine N-terminal conservé (appelé domaine J) d'environ 70

acides aminés, d'une région riche en glycine (domaine G) d'environ 30 résidus, d'un domaine central contenant 4 répétitions d'un motif CXXCXGXG (domaine CRR) et d'une région C-terminale de 120 à 170 résidus. Le domaine J est le domaine qui interagit avec la protéine DnaK.

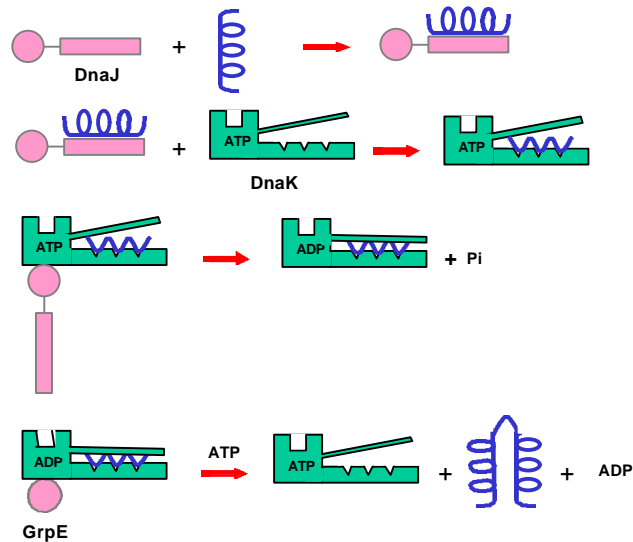


Figure 13. Modèle d'action du système DnaK dans le repliement protéique.

L'activité de DnaK est également régulée par GrpE, petite protéine de 23 kDa environ, qui accélère l'activité de DnaK en induisant la libération de nucléotide (Liberek *et al.*, 1991 ; Miao *et al.*, 1997) et du substrat (Harrison *et al.*, 1997 ; Mally & Witt, 2001). Sa séquence en acides aminés n'est pas très conservée comme celle de Hsp70 ou même de Hsp40. Cependant, GrpE possède des régions appelées régions I et II dont la fonction n'a pas encore été déterminée mais qui pourraient être des parties importantes de la molécule, impliquées dans l'interaction de GrpE avec les autres membres du complexe chaperone, DnaK et DnaJ (Conway de Macario *et al.*, 1994 ; Wetzstein *et al.*, 1992) (Figure 14).

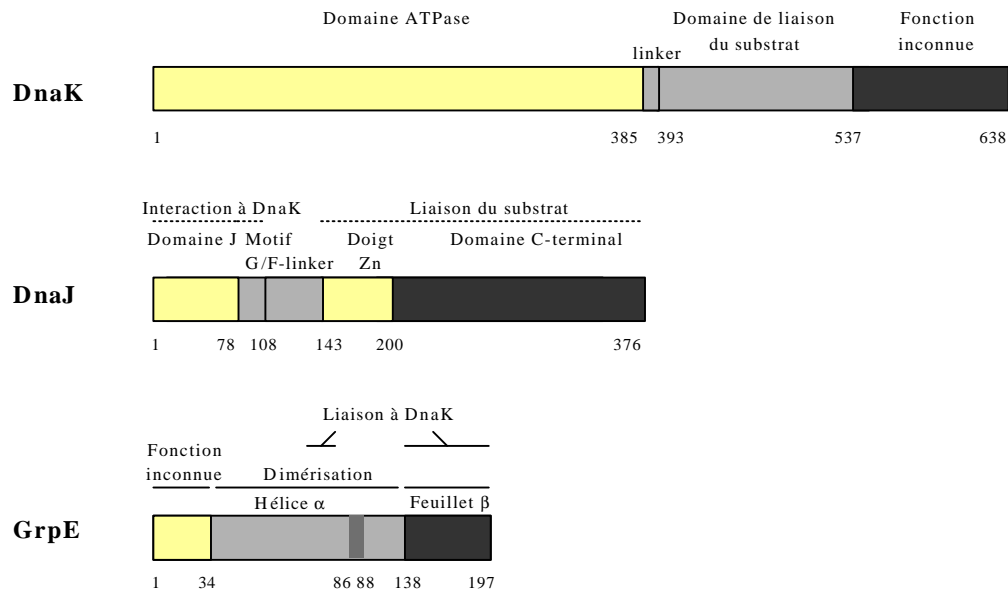


Figure 14. Organisation des domaines des protéines DnaK, DnaJ et GrpE.

Chez *E. coli*, le système DnaK permet, grâce à des cycles répétés de liaison et relargage des substrats, d'assurer le repliement, l'assemblage, la translocation et la protéolyse des protéines (Bukau & Horwich, 1998 ; Ellis & Hartl, 1999). Le système DnaK joue un rôle dans l'acclimatation à de nombreux stress tels que les chocs thermiques (Chow & Tung, 1998 ; Prasad *et al.*, 2003), les stress osmotiques (Prasad *et al.*, 2003) ou encore les stress chimiques (Salotra *et al.*, 1995).

IV.3.2. Le système GroESL (GroEL-GroES)

Comme les protéines DnaK, les protéines GroEL sont ubiquistes et ont des séquences très conservées. Celles que l'on trouve chez les bactéries et les organelles, telles que les mitochondries, sont essentielles à toutes les températures et particulièrement après un choc thermique. Leur perte ou leur diminution mènent à la formation d'agrégats de protéines et éventuellement à la mort de la cellule. Les protéines GroEL et leurs partenaires, les protéines GroES, sont appelées "chaperonines".

Chez les bactéries, les systèmes DnaK et GroEL/S co-existent et ont apparemment évolué ensemble pour interagir l'un avec l'autre. Le système DnaK agit au début de la biogénèse des protéines pour éviter l'agrégation des polypeptides naissants durant la

traduction ou immédiatement après. En conséquence, le polypeptide utilise le système GroEL/S pour son repliement final (Martin & Hartl, 1997 ; Ranson *et al.*, 1998 ; Ruddon & Bedows, 1997). On sait maintenant que seulement une minorité de polypeptides ont besoin du système GroES/L pour être correctement repliés (Netzer & Hartl, 1998), mais il ne fait aucun doute que l'action coordonnée entre les systèmes Hsp70 (DnaK) et GroEL/S est une caractéristique physiologique importante de la cellule bactérienne.

Le système bactérien chaperonine ou “GroES/L” est composé de deux protéines, GroEL et GroES, d'environ 60 et 10 kDa, respectivement (Ranson *et al.*, 1998 ; Ruddon & Bedows, 1997). Ces deux protéines s'assemblent en couronnes homoheptamériques. GroEL forme un complexe en forme de “tonneau” constitué de deux couronnes empilées (14 sous-unités pour chaque couronne). Chaque sous-unité possède trois domaines : équatorial, intermédiaire et apical. Le domaine intermédiaire laisse des espaces ouverts ou fenêtres qui permettent la connexion entre l'extérieur et l'intérieur de la cavité du tonneau. GroES, au contraire, forme un anneau unique (7 sous-unités) et vient compléter le système en servant de couvercle pour fermer une des deux extrémités du tonneau formé par les anneaux de GroEL. Dans ce système, le tonneau est alternativement ouvert (stade accepteur, quand le polypeptide dénaturé entre dans le système) ou fermé (stade de repliement). Dans ce dernier stade, le polypeptide se retrouve dans un environnement hydrophile à l'intérieur du tonneau. Le stade fermé se produit lorsque l'anneau GroES se fixe à l'une des extrémités du tonneau (Figure 15). Les protéines GroEL et GroES de *Escherichia coli* ont été les premières chaperons à être étudiées en détail et sont devenues un modèle pour l'étude du repliement des protéines en général. GroEL et GroES sont impliquées dans le repliement ATP-dépendant d'une grande variété de protéines (Ewalt *et al.*, 1997) et sont essentielles pour la viabilité de la cellule à toutes les températures (Fayet *et al.*, 1989 ; Cheng *et al.*, 1989).

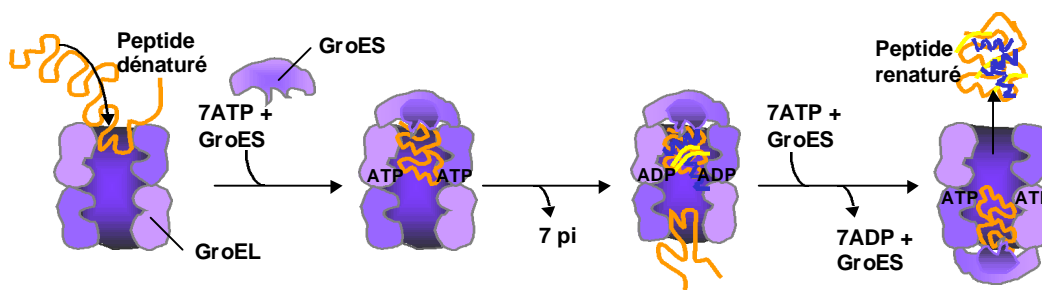


Figure 15. Modèle d'action du système GroES/L dans le repliement protéique.

IV.3.3. La famille Clp

- Les protéases ATP-dépendantes

Les protéines HSP100/Clp appartiennent à une famille découverte plus récemment qui possède une grande diversité de fonctions, dont, l'augmentation de la tolérance aux températures élevées, la protéolyse de substrats cellulaires spécifiques et la régulation de la transcription. Elles peuvent fonctionner soit comme protéases soit comme chaperons moléculaires (Gottesman & Maurizi, 1992 ; Squires & Squires, 1992). Le complexe Clp classique, décrit pour la première fois chez *E. coli* (Hwang *et al.*, 1987), consiste en un gros complexe hétéro-oligomérique (environ 750 kDa), qui comprend une sous-unité ATPase/chaperone régulatrice (ClpA, ClpX, ClpY) et une sous-unité protéolytique (ClpP). Les protéases Clp possèdent une architecture globale conservée qui ressemble au protéasome cytosolique 26S des eucaryotes. Deux anneaux de la sous-unité protéolytique, couronnes heptamériques pour ClpP et hexamériques pour ClpQ, forment une cavité centrale qui héberge les sites actifs protéolytiques (Rohrwild *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1997). Des pores axiaux étroits, que seuls les polypeptides non repliés peuvent traverser, restreignent l'accès à la cavité interne. Des couronnes hexamériques de sous-unités ATPase/chaperones sont situées à chaque extrémité du complexe protéolytique, ClpA et/ou ClpX avec ClpP (Grimaud *et al.*, 1998), et ClpY avec ClpQ (Rohrwild *et al.*, 1997) chez *E. coli*. La reconnaissance du substrat est assurée par la sous-unité chaperone, qui, après liaison, va déplier le substrat protéique pour permettre son transfert dans la chambre protéolytique (Singh *et al.*, 2000). Une fois à l'intérieur, le substrat protéique est dégradé en petits fragments polypeptidiques qui seront ensuite relargués à l'extérieur du complexe (Figure 16).

Les protéines Clp sont largement distribuées ; on les trouve chez toutes les eubactéries, les plantes et les mammifères. Bien que ClpP soit commune à tous ces organismes, le type et le nombre de sous-unités ATPase/chaperones varient. La famille Clp/HSP100 est divisée en deux groupes ; les membres du premier (ClpA-E) possèdent deux domaines de liaison à l'ADN distincts, alors que les membres du second (ClpX, ClpY) n'en possèdent qu'un. Bien que ClpX soit ubiquiste, ClpA semble être restreint aux eubactéries Gram-négatives comme *E. coli*. A la place de ClpA, les bactéries Gram-positives, les cyanobactéries et les plastes des plantes possèdent généralement la protéine ClpC. D'autres types supplémentaires existent également chez la plupart des bactéries Gram-positives (ClpE) et des plantes supérieures (ClpD) (Porankiewicz *et al.*, 1999).

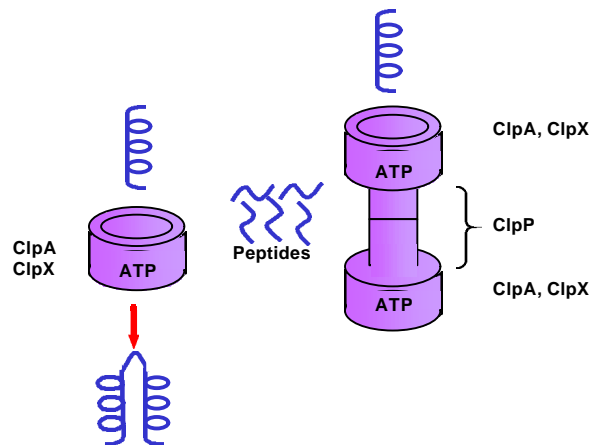


Figure 16. Modèle d'action du complexe Clp Protéase.

Chez *B. subtilis* par exemple, des protéines comme ClpC , ClpX et ClpP sont vitales aussi bien pour la résistance à beaucoup de stress que pour de nombreux processus cellulaires et développementaux tels que la division cellulaire, la motilité, la sporulation et la compétence (Porankiewicz *et al.*, 1999). Les fonctions de ClpC et ClpP sont également essentielles chez les cyanobactéries et les plantes, comme cela a pu être montré par diverses études génétiques (Shanklin *et al.*, 1995 ; Clarke & Eriksson, 1996 ; Clarke *et al.*, 1998).

- Protéine ClpB

La principale Hsp de la famille des chaperones Hsp100/Clp est la protéine ClpB, et la plupart des organismes produisent au moins deux différents types de ClpB. Chez les bactéries et les eucaryotes, ClpB coopère avec les protéines DanK-DnaJ-GrpE dans un circuit de type “ bi-chaperone ” (Figure 17) pour prévenir et solubiliser les agrégats protéiques durant le choc thermique (Glover & Lindquist, 1998 ; Mogk *et al.*, 1999 ; Motohashi *et al.*, 1999). ClpB est capable de désagréger de grosses protéines inactivées par la chaleur en se liant directement aux agrégats et en exposant les surfaces hydrophobes des polypeptides (Diamant *et al.*, 2000 ; Goloubinoff *et al.*, 1999). ClpB peut alors preconditionner les agrégats protéiques pour permettre leur solubilisation et leur repliement par le système DnaK. ClpB est la seule protéine connue de la famille Hsp100 qui est capable de coopérer avec d'autres protéines heat-shock. La plupart des protéines ClpB sont fortement induites par des températures élevées, et beaucoup sont vitales pour la tolérance à la chaleur (Eriksson & Clarke, 1996).

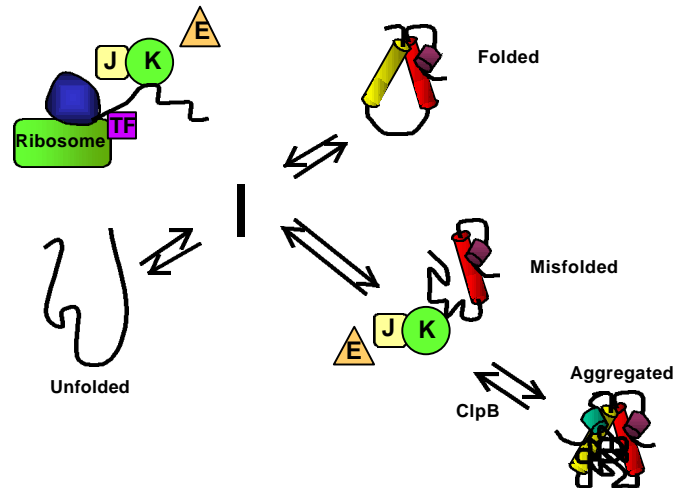


Figure 17. Mécanisme d'action de la protéine la protéine ClpB en coopération avec le système DnaK. K= DnaK ; J= DnaJ ; E= GrpE.

IV.3.4. HtpG

Les protéines Hsp90 constituent l'une des familles de protéines heat shock les plus conservées (Buchner, 1999 ; Buchner, 1999 ; Parsell & Linnik, 1994). HtpG (Hsp90) est présent dans le cytoplasme des eubactéries, des levures et des organismes supérieurs. Des homologues existent également dans le réticulum endoplasmique (Buchner, 1999) et les plastides des plantes supérieures (Schmitz *et al.*, 1996). *In vivo*, la protéine Hsp90 eucaryote peut s'associer avec des récepteurs des hormones stéroïdiennes, des protéines kinase, et des facteurs de transcription, jouant un rôle important dans diverses voies de transduction de signaux (Buchner, 1999). *In vitro*, la protéine cytosolique Hsp90 peut maintenir un substrat non natif dans une configuration soluble qui, en présence de Hsp70 et Hdj1 (homologue de DnaJ), aboutit au repliement de ce substrat (Freeman & Morimoto, 1996) indiquant que Hsp90, Hsp70, et Hdj1 ont chacun des rôles distincts dans le processus de repliement.

IV.4. Protéines Hsp chez les cyanobactéries

Trois gènes *dnaK* (*dnaK1*, *dnaK2* et *dnaK3*) ont été identifiés chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Nimura *et al.*, 1994) et chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 (sll0058, sll0170 et sll1932 ; Kaneko *et al.*, 1996). A l'exception des cyanobactéries, l'existence de gènes *dnaK* multiples est rare parmi les procaryotes. Chez la plupart des eucaryotes, les *hsp70s* constituent

des familles multigéniques dont les membres s'expriment différemment en fonction des conditions physiologiques (Lindquist & Craig, 1988 ; Werner-Washburne & Craig, 1989). Certains sont exprimés constitutivement et ne sont pas induits par le stress, et d'autres sont à la fois constitutifs et inductibles par le stress. Il a été montré chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 que les différentes DnaK ont une fonction spécifique dans la cellule. En effet, contrairement à DnaK1, DnaK2 et DnaK3 apparaissent essentielles pour la croissance cellulaire. De plus, la synthèse de DnaK1 et DnaK3 ne répond pas à un choc thermique alors que celle de DnaK2 montre une réponse de type heat shock classique (Nimura *et al.*, 2001).

De la même façon, la plupart des procaryotes possèdent une seule copie de DnaJ (Caplan, *et al.*, 1993). Cependant, chez les cyanobactéries dont le génome a été totalement séquencé, quatre gènes différents codant DnaJ ont été identifiés (Kaneko *et al.* 1996). Chez *Synechococcus* sp. PCC7942, un des gènes *dnaJ7942* est localisé dans la région qui se situe juste en aval d'un gène *dnaK* et semble être essentiel pour la croissance cellulaire (Oguchi *et al.*, 1997).

Deux gènes *groEL* ont également été identifiés chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, (Chitnis & Nelson, 1991 ; Lehel *et al.*, 1993). L'un de ces gènes, le gène *cpn60* (*groEL-2*), semble avoir une régulation σ -dépendante alors que le second, appartenant à l'opéron *groESL*, serait régulé via l'interaction d'un represser de type HrcA sur un élément CIRCE en amont de cet opéron (Rajaram *et al.*, 2001). Kovacs *et al.* (2001) ont montré que les deux protéines chaperones, GroEL and GroEL-2, diffèrent dans leur induction par la chaleur et leur activité chaperone chez *Synechocystis* sp. PCC 6803. L'induction de *groEL* et *groES* en réponse à différentes conditions de stress, comme une forte lumière ou un stress thermique, a particulièrement été étudiée chez les cyanobactéries (Clarke & Eriksson, 1996 ; Apte *et al.*, 1998 ; Huang *et al.*, 2002).

Chez les cyanobactéries, des familles multigéniques codent également au moins trois isoenzymes ClpP distincts (Kaneko *et al.*, 1996 ; Clarke *et al.*, 1998 ; Schelin *et al.*, 2002). A l'origine, un quatrième gène *clpP* avait également été identifié mais, contrairement aux trois autres *clpP*, trois acides aminés du site actif sont absents de la protéine codée par ce gène. Il semble donc improbable que cette protéine fonctionne comme une vraie protéase ClpP et celle-ci a été appelée ClpR (Schelin *et al.*, 2002). Parmi les trois gènes *clpP*, l'un est monocistronique (*clpP1*), alors que les deux autres (*clpP2* et *clpP3*) sont en opéron avec *clpX* (Kaneko *et al.*, 1996 ; Clarke *et al.*, 1998) et *clpR* (Schelin, *et al.*, 2002), respectivement. ClpP1 est synthétisé constitutivement chez *Synechococcus* à un niveau relativement bas, mais n'est pas inductible par la chaleur comme les ClpP de toutes les autres bactéries, et n'est donc

pas impliqué dans la thermotolérance (Clarke *et al.*, 1998). En revanche, ClpP1 semble jouer un rôle important pendant la croissance et l'acclimatation à long terme à d'autres types de conditions environnementales (Clarke *et al.*, 1998 ; Porankiewicz *et al.*, 1998). Chez *Synechococcus* sp. PCC 7942, ClpP2, ClpP3, ClpR et ClpX ne semblent pas fortement induites par de fortes températures ou par d'autres stress tels que le froid, de fortes lumières ou un stress oxydatif (Schelin *et al.*, 2002).

Chez *Synechococcus* sp. PCC 7942, Porankiewicz et Clarke (1997) ont également montré que la protéine ClpB1 est essentielle pour l'acclimatation au froid. En conditions physiologiques normales cependant, ClpB1 semble être une protéine non essentielle (Eriksson & Clarke, 1996 ; Eriksson & Clarke, 2000 ; Sanchez & Lindquist, 1990). Un second gène a été identifié chez ce même organisme et code pour une protéine appelée ClpB2, relativement proche en terme de séquence primaire de ClpB1 et des autres protéines ClpB connues. Contrairement à ClpB1, ClpB2 n'est pas induite par la chaleur ou par d'autres stress et est incapable de compléter la fonction de ClpB1 dans la thermotolérance. Cependant, ClpB2 semble être essentielle pour la viabilité cellulaire (Eriksson *et al.*, 2001).

Enfin, il a été montré que l'inactivation du gène *htpG* de *Synechococcus* sp. PCC 7942 pouvait inhiber la croissance même à température modérément élevée et provoquait une perte de la thermotolérance, indiquant un rôle indispensable de la protéine HtpG pour la survie en conditions de stress thermique (Tanaka & Nakamoto, 1999). De plus, la protéine HtpG semble contribuer significativement à l'acclimatation *Synechococcus* sp. PCC 7942 à de faibles températures (Hossain & Nakamoto, 2002) et en condition de stress oxydatif (Hossain & Nakamoto, 2003).

V. Appareil photosynthétique et réponse aux facteurs environnementaux chez les cyanobactéries

En réponse aux changements de la qualité spectrale de la lumière (Bryant, 1981 ; Grossman & Kehoe, 1997 ; Tandeau de Marsac & Cohen-Bazire, 1977), de l'intensité de la lumière (Horton *et al.*, 1996), et de la disponibilité en nutriments (Collier & Grossman, 1992), les organismes photosynthétiques sont capables d'altérer la synthèse et la dégradation des complexes collecteurs de lumière de leur photosystème. De telles altérations aident les organismes à équilibrer de façon efficace l'absorption de l'énergie d'excitation et la production de NADPH et d'ATP avec leur utilisation, afin d'assurer le maintien et la

croissance de la cellule. Cet équilibre est essentiel car un excès d'excitation des centres réactionnels photosynthétiques peut mener à la production d'espèces oxygénées toxiques qui peuvent provoquer de sévères dommages cellulaires (Asada, 1994).

V.1. Lumière

V.1.1. Appareil photosynthétique et lumière

Dans la nature, les cyanobactéries doivent faire face à des conditions de lumière qui changent rapidement ou ne sont pas optimales pour la photosynthèse. A la fois la qualité spectrale et la quantité de lumière peuvent varier de façon dramatique durant la journée ou d'un habitat à l'autre. Les variations de lumière environnementale auxquelles ont dû faire face les cyanobactéries au cours de l'évolution, ont mené à l'apparition d'un certain nombre de mécanismes nécessaires à la détection la lumière et à la modification de l'appareil photosynthétique de façon à optimiser le métabolisme des cellules. Pour s'accommoder rapidement aux fluctuations de l'intensité et de la qualité de la lumière, l'appareil photosynthétique peut être modifié en quelques minutes. Ces modifications à court terme sont nommées "transitions d'états" et ne nécessitent pas de synthèse protéique. Cependant, les cyanobactéries sont aussi capables d'altérer (i) le nombre total de photosystèmes (PS), (ii) le rapport PS I / PS II et (iii) la structure du PBS en réponse à des changements prolongés de l'environnement lumineux. Ces réponses d'acclimatation à long terme nécessitent l'induction de gènes et la synthèse *de novo* de protéines. De plus, quand l'intensité de la lumière est très forte, elle peut provoquer une photoinhibition ou des dommages au niveau des centres réactionnels du PS II. Les cyanobactéries peuvent modifier la composition protéique du centre réactionnel du PS II en conditions de forte lumière, ce qui rend le centre réactionnel du PS II moins sensible à la photoinhibition. Une réponse bien connue à la fois chez les plantes et les cyanobactéries à une forte lumière est le renouvellement et l'échange des sous-unités D1 du photosystème II, premier site de dommage durant la photoinhibition (Chow, 1994). Chez les cyanobactéries, les antennes de l'appareil photosynthétique que sont les phycobilosomes collectent les photons via des phycobilines. L'énergie d'excitation capturée est alors transférée vers les centres réactionnels du PS II où se produit la séparation de charge et où est initié le transfert des électrons. Le PS II comprend un certain nombre de protéines qui doivent être finement régulées. Une de ces protéines, la protéine D1 qui forme un hétérodimère avec la protéine D2 au sein du centre réactionnel, est continuellement endommagée, éliminée et rapidement remplacée par des protéines D1 nouvellement synthétisées. Ceci peut changer de

façon rapide lorsque le centre réactionnel est exposé à des stress sévères tels que la photoinhibition (Clarke *et al.*, 1993). Chez *Synechococcus* sp. PCC 7942, trois gènes codent pour deux formes légèrement différentes de D1: *psbAI* codant pour D1:1 et *psbAII* et *psbAIII* codant pour D1:2 (Golden *et al.*, 1986). Le PS II contenant la forme D1:2 possède une efficacité photochimique supérieure de 20% à celui contenant la forme D1:1. D1:1 est la protéine favorisée chez la cyanobactérie durant les conditions de croissance normales alors que D1:2 est induite de façon transitoire sous différentes conditions de stress (Bustos *et al.*, 1990).

V.1.2. Cas particulier des Oxyphotobactéries à chlorophylle *b*

Contrairement aux cyanobactéries typiques qui capturent la lumière grâce à leurs phycobilisomes, *Prochlorococcus*, *Prochloron* et *Prochlorothrix* utilisent tous des complexes collecteurs de la lumière intrinsèques et liant les chlorophylles *a* et *b* (ou, dans le cas de *Prochlorococcus*, des dérivés divinyl de ces chlorophylles). Les protéines formant ces complexes sont codés par les gènes *pcb* qui présentent une forte similarité avec les protéines IsiA (ou CP43') qui sont spécifiquement synthétisées en carence de fer chez les cyanobactéries à PBS (LaRoche *et al.*, 1996). Bien qu'il y ait généralement un seul gène *isiA* chez celles-ci, le nombre de gènes *pcb* est très variable (entre 1 et 8) entre *Prochloron*, *Prochlorothrix* et *Prochlorococcus*, ainsi qu'entre les différentes souches de *Prochlorococcus* (LaRoche *et al.*, 1996 ; Garczarek *et al.*, 2000). Des études ont montré que les protéines Pcb, liant la chlorophylle *a/b*, interagissent structurellement avec le centre réactionnel du PS I chez la souche de profondeur *Prochlorococcus marinus* SS120. Les protéines d'antenne forment une "couronne" composée de 18 protéines Pcb autour du photosystème I qui, chez *Prochlorococcus* comme chez les autres cyanobactéries, est organisé en trimère (Figure 18). Cette structure est remarquablement similaire à celle du complexe PS I de la cyanobactérie *Synechocystis* PCC6803 isolé en condition de carence en fer (Bibby *et al.*, 2001) (voir partie V.2.2) " Cas particulier de la carence en fer ").

La couronne de protéines Pcb permet de fixer 270 molécules de chlorophylle supplémentaires s'ajoutant aux 300 prédites pour être associées au trimère de PS I. Ainsi la présence de cette antenne double la capacité de capture des photons du PS I. Cette organisation structurale correspond sans doute à une adaptation aux conditions de vie à très faible lumière.

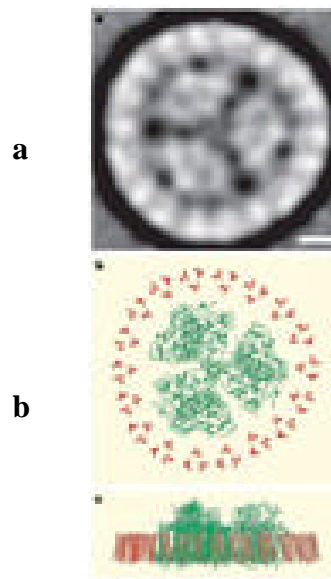


Figure 18. Supercomplexe Pcb-PS I de *Prochlorococcus* SS120. a, Projection d'une image de microscopie électronique, vue de dessus, du supercomplexe isolé de la souche *Prochlorococcus* SS120 montrant le trimère de PS I entouré de 18 Pcb (échelle, 5 nm). b, structure 3D du supercomplexe Pcb-PS I modélisée en utilisant les structures de PS I et CP43 de *Synechococcus elongatus* (d'après Bibby *et al.* 2001).

V.2. Carences en nutriments

V.2.1. Appareil photosynthétique et carence en nutriments

Les stratégies d'acclimatation aux carences en nutriments peuvent être spécifiques de l'élément nutritif limitant ou plus générales. Les réponses spécifiques comprennent un certain nombre de changements métaboliques qui aident l'organisme à utiliser de façon plus efficace les éléments limitants de l'environnement, en augmentant par exemple les systèmes de transport à haute affinité (Green & Grossman, 1988 ; Omata *et al.*, 1993) et la production d'enzymes qui permettent l'utilisation de formes alternatives du nutriment (de Hostos *et al.*, 1988 ; Ray *et al.*, 1991). Les réponses générales qui se produisent pendant une carence en nutriments peuvent être un arrêt de la division cellulaire ou des altérations importantes de la structure cellulaire et du métabolisme (Collier & Grossman, 1992 ; Yamanaka *et al.*, 1980). Une des réponses générales qui a été étudiée chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 implique la dégradation des PBS (Collier & Grossman, 1992 ; Grossman *et al.*, 1995) (Figure 19). Une carence en azote ou en soufre entraîne donc la dégradation rapide et complète des PBS, ce qui provoque une coloration jaune des cellules de *Synechococcus* sp. PCC 7942.

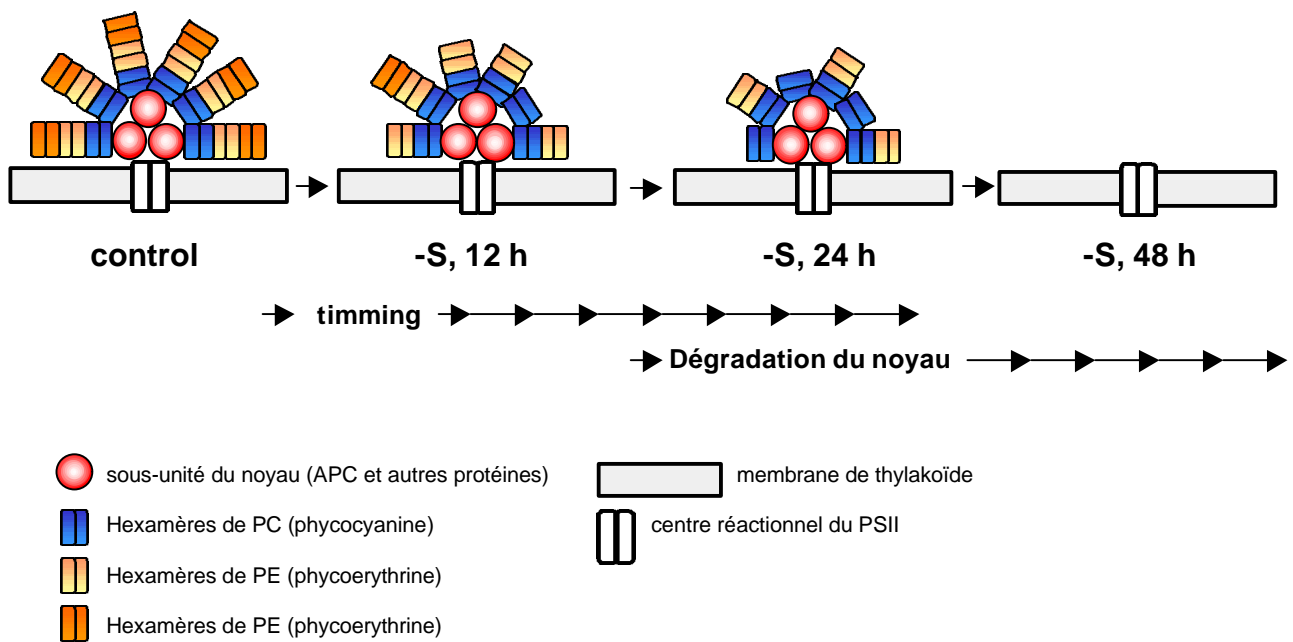


Figure 19. Représentation schématique de la dégradation du phycobilisome (PBS) en condition de carence en soufre (ou en azote). Le PBS reste attaché à la membrane du thylakoïde jusqu'à dégradation du noyau (d'après Collier & Grossman, 1993).

V.2.2. Cas particulier de la carence en fer

Bien que le fer soit le quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre, sa concentration dans les écosystèmes aquatiques, particulièrement dans les océans, est suffisamment faible pour limiter l'activité photosynthétique et la croissance du phytoplancton (Martin *et al.*, 1994 ; Behrenfeld *et al.*, 1996). Le fer est en effet un élément absolument nécessaire pour les organismes photosynthétiques parce qu'il est requis pour la plupart des fonctions des complexes photosynthétiques. En conséquence, les cyanobactéries et autres microorganismes ont développé un certain nombre de processus pour faire face à ces fréquentes déficiences en fer (Straus, 1994). Un de ces processus consiste à exprimer deux gènes induits par un stress en fer, appelés *isiA* et *isiB* (*isi* pour "iron stress-induced") (Pakrasi *et al.*, 1985 ; Laudenbach & Straus, 1988), qui sont localisés sur le même opéron. Le gène *isiB* code pour la flavodoxine, qui peut remplacer fonctionnellement la ferredoxine, contenant un centre fer-soufre. Chaque électron qui entre dans le photosystème I est amené à un niveau d'énergie très élevé qui lui permet d'être transmis au centre fer-soufre de la ferredoxine puis au NADP⁺ pour fabriquer du NADPH. L'expression de *isiB* indique que les cellules sont adaptées aux conditions de carence en fer. Le gène *isiA* code pour une protéine souvent appelée CP43' parce qu'elle possède une séquence en acides aminés homologue à celle d'une protéine PS II liant la chlorophylle *a*, CP43 (Burnap *et al.*, 1993 ; Falk *et al.*, 1995). Comme

CP43, CP43' possède six hélices transmembranaires, ainsi que des résidus His conservés, et lie probablement le même nombre de molécules de chlorophylle *a*. Plusieurs hypothèses ont été suggérées quant à la fonction de cette protéine de type CP43 : (i) CP43' pourrait favoriser la récupération des cellules en agissant comme stock de chlorophylle de sorte que les complexes PS II et PS I puissent être rapidement synthétisés quand le fer redevient disponible dans l'environnement (Riethman & Sherman, 1988) ; (ii) CP43' pourrait protéger le PS II des dommages induits par la lumière en dissipant l'énergie d'excitation (Park *et al.*, 1999) ; (iii) CP43' serait un remplaçant fonctionnel de CP43 au sein du PS II lors d'une carence en fer (Burnap *et al.*, 1993); (iv) CP43' agirait comme un complexe collecteur de lumière lors d'une carence en fer, principalement pour le PS II (Pakrasi *et al.*, 1985) mais peut-être aussi pour le PS I (Tetenkin *et al.*, 1998).

Récemment, un supercomplexe trimère de CP43'-PS I a pu être isolé de la cyanobactérie *Synechocystis* PCC 6803 cultivée en conditions de carence en fer (Bibby *et al.*, 2001) (Figure 20). Il a été montré que CP43' s'associe avec le photosystème I (PS I) pour former un complexe qui consiste en une couronne de 18 molécules de CP43' autour d'un trimère de PS I. Cette configuration augmente la taille du système de capture de la lumière du PS I.

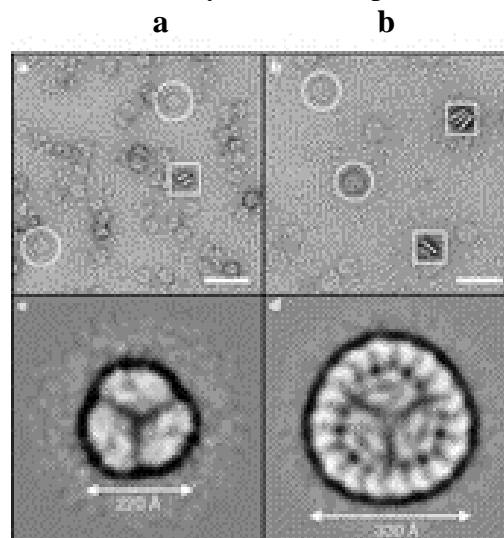


Figure 20. Photographies de microscopie électronique, vues de dessus, du trimère de PSI (a) et du supercomplexe CP43-PSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (b). Echelle, 50 nm (d'après Bibby *et al.* 2001).

L'utilisation d'une protéine de type PS II comme antenne externe pour le PS I souligne la flexibilité des systèmes de capture de la lumière des cyanobactéries, et semble être une stratégie qui compense la perte des phycobilisomes et la diminution du rapport PS I /PS II en réponse à une déficience en fer. Cette stratégie de réponse au stress permet aux cyanobactéries de produire de l'oxygène même en présence de faible quantité de fer.

VI. Objectifs et déroulement de la Thèse

Les cyanobactéries constituent un groupe bactérien ancien, diversifié et écologiquement très important. Les réponses de ces organismes à la lumière et aux nutriments sont très contrôlées et permettent à ces organismes de survivre face à des conditions défavorables de croissance. La cyanobactérie atypique *Prochlorococcus* est l'un des producteurs primaires dominants des eaux océaniques oligotrophes. C'est le plus petit et le plus abondant procaryote photosynthétique des océans connu à ce jour. Il est présent de la surface jusqu'à des profondeurs 100 – 200 m, et les cellules semblent être capables de se développer et de réaliser la photosynthèse tout au long de ce gradient naturel de lumière et de nutriments. La capacité de *Prochlorococcus* à tolérer une telle gamme de conditions résulte de sa capacité d'adaptation, mais également de la présence de différents écotypes de *Prochlorococcus* qui diffèrent notamment par leur composition pigmentaire et les différents systèmes antennaires spécifiquement adaptés à leur environnement lumineux. Malgré ces remarquables caractéristiques écologiques et physiologiques, on connaît encore peu de choses sur les mécanismes d'adaptation et de régulation de l'expression des gènes chez cet organisme principalement du au fait qu'il est difficilement cultivable et toujours résistant aux manipulations génétiques. Ce travail de Thèse s'est donc intéressé à trois niveaux différents de la réponse au stress chez *Prochlorococcus*.

1. Dans un premier temps (Chapitre IV), je me suis intéressée aux systèmes de transduction à deux composants qui sont des éléments importants permettant aux bactéries de percevoir et de s'acclimater rapidement aux changements de leur environnement. Le génome de la souche de surface, *Prochlorococcus* MED4 (<http://bahama.jgi-psf.org/prod/bin/microbes/pmarmed/home.pmarmed.cgi>) a été analysé afin d'identifier les gènes codant les HSK et les RR, d'évaluer les relations phylogénétiques de ces gènes avec leurs orthologues chez les autres bactéries et cyanobactéries et d'étudier leur expression en condition de stress.

2. Dans un deuxième temps (Chapitre V), je me suis focalisée sur la façon dont les cyanobactéries s'acclimatent à une forte lumière en comparant les cinétiques d'accumulation des transcrits des protéines de stress telles que les protéines chaperones et les protéases

associées au stress chez la cyanobactérie d'eau douce *Synechocystis* sp. strain PCC6803, la souche marine de surface *Prochlorococcus* MED4, et la souche marine de profondeur *Prochlorococcus* MIT9313. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Arthur Grossman, à l'Institut Carnegie, Université de Stanford, en Californie, faisant l'objet de deux séjours, de deux et trois mois, en 2001 et 2002.

3. Chez *Prochlorococcus*, les processus d'adaptation aux différentes niches lumineuses se sont accompagnés d'une évolution rapide des gènes *pcb* codant les complexes collecteurs de lumière. Afin de mieux comprendre l'origine et la fonction des protéines Pcb-Chl des complexes antennaires, je me suis intéressée, dans un troisième temps (Chapitre VI), à l'expression des gènes codant ces protéines et à la structure de ces complexes antennaires chez *Prochlorococcus* en condition de carence en fer. Cette partie a été réalisée en collaboration avec Frédéric Partensky (Equipe Phytoplancton, Station Biologique de Roscoff) et James Barber (Département des Sciences Biologiques, Collège impérial de Londres).

Lors de ma thèse, j'ai également participé à un atelier de travail sur *Prochlorococcus*, qui a eu lieu à Roscoff en mai 1999 ce qui m'a permis d'être associée à deux papiers qui figurent en annexe. Lors de cet atelier, la souche axénique de surface *Prochlorococcus* PCC 9511 a été cultivée en grand volume, sous un régime de lumière dynamique simulant les conditions trouvées dans les eaux de surface des océans. Un des principaux buts a été d'étudier les effets du cycle jour/nuit sur l'expression d'un certain nombre de gènes, et principalement les gènes photosynthétiques (article 4), et les gènes *ftsZ* et *dnaA*, impliqués dans le cycle cellulaire (article 5).

CHAPITRE II

Matériels et Méthodes

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Seules les méthodes les plus importantes sont présentées ici, telles que la PCR quantitative en temps réel que j'ai développée durant ma thèse. Le détail des méthodes utilisées pour une étude plus spécifique se trouve dans la partie Matériels et Méthodes de chaque article.

I. Analyse génomique

Les séquences des gènes de *Synechocystis* sp. PCC 6803 ont été obtenues à partir du site Cyanobase <http://www.kazusa.or.jp/cyano/index.html>, celles de *Prochlorococcus* MED4 à partir du site http://spider.jgi-psf.org/JGI_microbial/html/prochlorococcus_homepage.html et celles de *Prochlorococcus* MIT9313 à partir du site http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/prochlorococcus_mit9313/prochlo_mit9313_homepage.html ou par BLAST sur le site <http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/ProSS120> (*Prochlorococcus* SS120).

Les alignements multiples des séquences protéiques ont été réalisées selon la méthode de “neighbor joining” en utilisant le programme ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) avec les paramètres par défaut et une inspection visuelle. Les structures secondaires des protéines ont été prédites avec les programme BCM Search Launcher (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/pssprediction/pssp.html>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).et DC-Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Les segments transmembranaires ont été prédits avec l'algorithme TMPredict (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html). L'analyse du voisinage des gènes a été réalisée à l'aide du logiciel Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>).

II. Conditions de culture

Synechocystis sp. Strain PCC6803 a été cultivée dans le milieu BG-11 (annexe 1, référence) tamponné avec 10 mM Tris, pH 8.2, à 30°C. Les cultures ont été bullées avec 3% v/v de CO₂ dans l'air et illuminées par 30 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ avec des lampes

incandescentes. Pour les traitements à forte lumière, les cultures ont été diluées en milieu de phase exponentielle de croissance ($DO_{730} \sim 0.8$) avec du milieu frais jusqu'à une $DO_{730} \sim 0.2$. Les cultures (50 ml) ont ensuite été placées dans une chambre avec une température maintenue à 30°C et exposées à une lumière blanche de $600 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pendant différentes périodes, avant extraction des ARNs. *Prochlorococcus* MED4 et MIT9313 ont été cultivées dans le milieu PCR-S11 (Partensky et al., 1999) à 20°C sous une lumière de 6 ou 20 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Pour les traitements à forte lumière, les cellules en milieu de phase exponentielle de croissance ($10^8 \text{ cell ml}^{-1}$, mesurée par cytométrie en flux, Moore *et al.*, 1995) ont été exposées à une lumière de 40 ou 200 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pendant différentes périodes, avant extraction des ARNs.

Pour les expériences de choc thermique (chaleur ou froid), les cellules, cultivées à 20 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ à 20 °C, ont été transférées soit à 35 °C soit à 13°C ou 4 °C.

II. Extraction des ARNs

Les ARNs ont été isolés à partir de culots de cellules congelés à - 80°C en utilisant une version modifiée de la méthode de de Saizieu *et al.* (1998), comme décrit par Bhaya *et al.* (2000). 500 μl de phénol acide et 500 μl de NAES (50 mM sodium acetate [pH 5.1], 10 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate) ont été ajoutés aux culots de cellules obtenus à partir de 150 ml de culture; 100 mg de billes de verres (0.1- μm de diamètre, BioRad Hercules CA) ont été ajoutées à la suspension qui a ensuite été vortexée trois fois 20 s. Cette étape a été suivie d'une extraction avec deux phénol-chloroforme (1:1) et un chloroforme. Les acides nucléiques ont alors été précipités avec 2 volumes d'éthanol, resuspendus dans de l'eau distillée stérile et traités 1 h à température ambiante à la DNase I, selon le protocole recommandé par le fabricant (20 U FPLC purifiée, Amersham, Piscataway NJ). Les échantillons traités à la DNase ont alors été extraits avec deux phénol-chloroforme (1:1) et un chloroforme. Les ARNs ont ensuite précipités à partir de la phase aqueuse après addition de 2 volumes d'éthanol. Le culot final d'ARN a été dissout dans 50 μl de 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA et stocké à - 80°C.

III. RT-PCR

Les amorces spécifiques ont été dessinées à l'aide des logiciels Primer Express (Applied Biosystems) et Primer3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3.cgi/>). Ces amorces ont été utilisées pour amplifier des fragments de 400-500 pb pour les plus longues séquences et 150-200 pb pour les plus courtes avec une température d'hybridation de 55-60 °C. La spécificité et l'efficacité des amorces ont été vérifiées par amplification PCR sur ADN génomique. Pour la réaction de transcription inverse (RT), 200 ng d'ARN ont été incubés avec un mélange contenant les amorces reverses de PCR (4 pmol/20 µl volume final) 10 min à 70°C avant addition de 100 U de Superscript II RT (GIBCO BRL, Grand Island, NY). La réaction de RT a été réalisée à 42°C pendant 1 h et stoppée en plaçant la réaction à 72°C pendant 10 min. 0,1 µl de la réaction de RT a été utilisée pour l'amplification par PCR avec 5 pmol d'amorce, 2 mM MgCl₂ et 1 U of Taq DNA polymerase (Promega Biosciences) dans un volume de 25 µl (35 cycles, T_m 55 °C). Les échantillons ont été maintenus à 4 °C et analysés sur gel d'agarose à 1% dans du tampon TAE (40 mM Tris-acetate [pH 8.0, 1 mM EDTA]); les produits amplifiés ont ensuite été visualisés par coloration au bromure d'éthidium. Le gène *rnpB* (codant la RnaseP) a été utilisé comme gène de référence car le niveau de ce transcrit n'est pas altéré par les conditions de forte lumière. Le gène *psbA* (codant la sous-unité D1 du centre réactionnel du PS II) a été utilisé comme contrôle positif parce qu'il est connu pour être induit par une exposition à forte lumière (Garcia-Fernandez *et al.*, 1998). Des échantillons, pour lesquels l'étape de RT a été omise, ont été utilisés comme contrôles négatifs afin de vérifier que l'ARN extrait n'était pas contaminé par de l'ADN génomique.

IV. PCR quantitative en temps réel

IV.1. Protocole

Les mélanges SYBR Green PCR Master mix (AppliedBiosystems) ou LightCycler DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science, Indianapolis) ont été utilisés selon les recommandations des fabricants; chaque réaction de 25 µl contenant 1 µl d'ADNc spécifique dilué (dilué au 1/10 par rapport à la solution initiale d'ADNc, voir partie précédente) et 0,4 µmol/L des amorces appropriées.

Les niveaux des transcrits des gènes des souches de *Prochlorococcus* ont été analysés par PCR quantitative en utilisant le système ABI Prism™ 5700 (PE Applied Biosystems) (Figure 21). Le programme d'amplification a consisté en 1 cycle à 95°C de 60 s, suivi par 40 cycles à 95°C 15 s et 60°C 1 min. Les niveaux des transcrits des gènes de *Synechocystis* sp. PCC 6803 ont été analysés en utilisant le système Light Cycler (Roche Applied Science, Indianapolis) (Figure 22). Le programme d'amplification a consisté en 1 cycle à 95°C de 60 s suivi par 40 cycles à 95°C 15 s, 55°C 20 s, 72°C 40 s. Les transcrits *rnpB* et *rps* (*slr1984*) ont été utilisés comme standards externes (Figure 23). La quantification du changement relatif des niveaux d'ARNs a été calculé en utilisant la méthode $\Delta\Delta C_t$ après normalisation avec le niveau de transcrit de *rnpB* ou *rps* comme décrit dans le bulletin #2 d'utilisation Applied Biosystems (http://dna-9.int-med.uiowa.edu/RealtimePCRdocs/Compar_Anal_Bulletin2.pdf) (voir partie suivante).



Figure 21. Système « 5700 Sequence Detection» (Applied Biosystems).



Figure 22. Système Light Cycler (Roche).

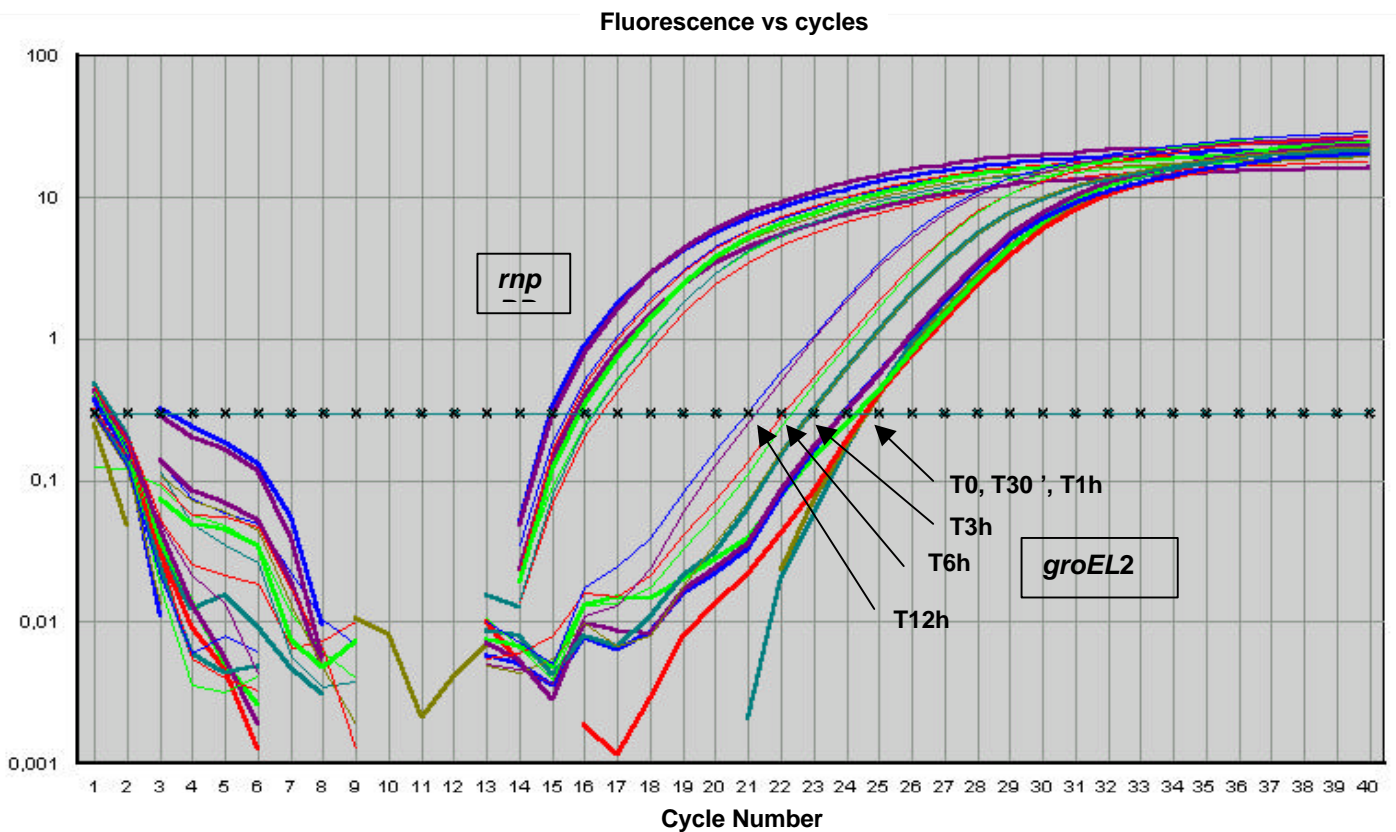


Figure 23. Exemple de RT-PCR quantitative en temps réel. Analyse de l'expression des gènes *rnpB* et *groEL2* après 30 min, 1 h, 3 h, 6 h et 12 h de stress de forte lumière.

IV.2. Méthode de calcul $\Delta\Delta C_T$

La quantité de gène cible, normalisée avec un gène référence et relative à un calibre est donnée par la formule suivante :

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

L'équation qui décrit la réaction exponentielle de PCR est :

$$X_n = X_o \times (1 + E_x)^n$$

Où :

- X_n = nombre de molécules de cibles au cycle n
- X_o = nombre initial de molécules cibles
- E_x = efficacité de l'amplification de la cible
- n = nombre de cycles

Le cycle seuil (C_T) indique le nombre de cycles pour lequel la quantité de cible amplifiée atteint un seuil fixé. Alors,

$$X_T = X_o \times (1 + E_x)^{C_{T,x}}$$

Où :

- X_T = nombre de molécules de cibles au seuil
- $C_{T,x}$ = cycle seuil pour l'amplification de la cible

Une équation similaire pour le gène référence est obtenue :

$$R_T = R_o \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}$$

Où :

- R_T = nombre de molécules de références au seuil
- R_o = nombre initial de molécules de références
- E_R = efficacité de l'amplification de la référence
- $C_{T,R}$ = cycle seuil pour l'amplification de la référence

La division de X_T par R_T donne l'expression suivante :

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_o \times (1 + E_x)^{C_{T,x}}}{R_o \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = K$$

En s'assurant que les efficacités de la cible et de la référence soient relativement les mêmes (calcul de l'efficacité grâce à une courbe standard): $E_X = E_R = E$,

$$\frac{X_o}{R_o} \times (1 + E_X)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K$$

Où

$$X_N \times (1 + E_X)^{\Delta C_T} = K$$

Où :

X_N = X_o/R_o , quantité normalisée de cible

ΔC_T = $C_{T,X} - C_{T,R}$, différence de cycles au seuil pour le gène cible et le gène référence

En réarrangeant on obtient la formule suivante :

$$X_N = K \times (1 + E_X)^{-\Delta C_T}$$

L'étape finale est de diviser le X_N de chaque échantillon (q) par le X_N du calibre (cb) :

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E_X)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E_X)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E_X)^{-\Delta \Delta C_T}$$

Où :

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}$$

Pour les produits d'amplification dessinés et optimisés selon les recommandations de PE Applied Biosystems (taille < 150 bp), l'efficacité est proche de 1. La quantité de gène cible, normalisée avec le gène de référence et relative au calibre, est alors donnée par la formule suivante:

$$2^{-\Delta \Delta C_T}$$

IV.3. Chimie SYBR Green

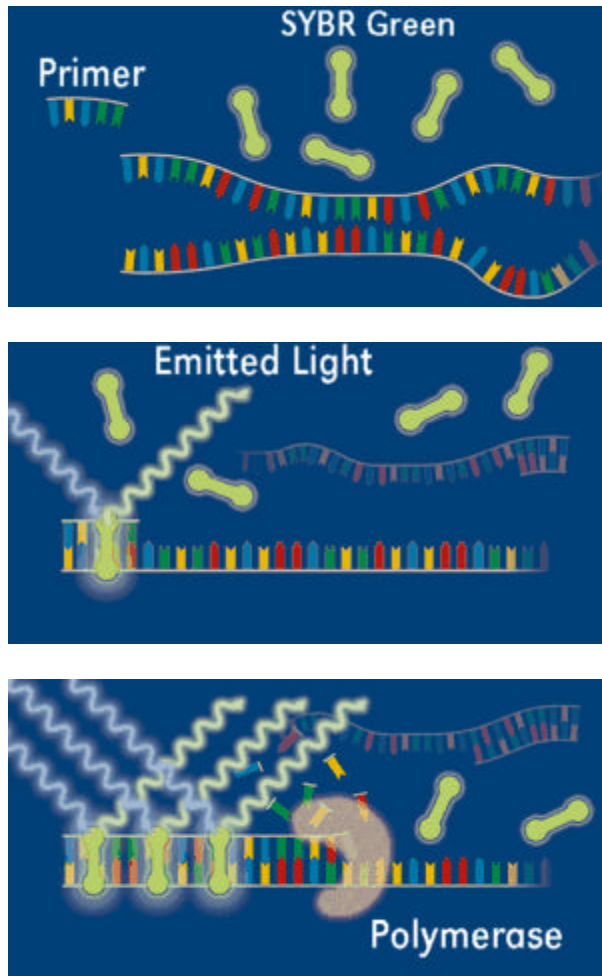


Figure 24. Réaction d'incorporation du SYBR Green durant la réaction de PCR. D'après le site : <http://www.ich.ucl.ac.uk/cmgs/part2/mutttest.htm>

L'incorporation du colorant SYBR Green I dans la réaction de PCR permet de détecter l'ADN double brin généré durant la PCR (Figure 24).

Le colorant SYBR Green I s'intercale dans l'ADN double brin et produit un signal fluorescent. L'intensité de ce signal est proportionnel à la quantité d'ADN double brin présent dans la réaction. Ainsi, à chaque étape de la réaction de PCR, l'intensité du signal augmente en même temps que la quantité de produit augmente. Ceci fournit une méthode très simple et fiable pour mesurer les réactions de PCR en temps réel. Un autre avantage de cette technique est qu'elle utilise des amorces non modifiées ce qui facilite le dessin et la synthèse des amorces et diminue leur coût. Cependant, une optimisation des conditions de réaction pour chaque amorce est nécessaire. Ces paramètres incluent la concentration des amorces, la température d'hybridation et la concentration en chlorure de magnésium.

CHAPITRE III

Les systèmes à deux composants

CHAPITRE III : LES SYSTEMES A DEUX COMPOSANTS

Ce chapitre est présenté sous forme d'une publication dans FEMS Microbiology Letters.

I. Résumé

Article 1 : Les systèmes à deux composants de *Prochlorococcus* MED4 : analyse génomique et expression différentielle en conditions de stress

Les systèmes à deux composants font partie des principaux mécanismes de signalisation utilisés par les bactéries afin de détecter et de s'acclimater aux variations de leur environnement (Stock *et al.*, 1989 ; Parkinson & Kofoid, 1992). La petite taille du génome de *Prochlorococcus* et son petit nombre de gènes en font un modèle très intéressant pour l'étude et la caractérisation de la fonction de ces systèmes.

Nous nous sommes principalement focalisés sur la souche *Prochlorococcus* MED4 (ou son équivalent axénique PCC9511), une souche adaptée aux conditions océaniques de surface.

L'analyse de ce génome a permis l'identification de 11 gènes codant potentiellement des protéines des systèmes à deux composants, 5 HSK et 6 RR. Ce nombre est comparable à celui des autres picocyanobactéries marines mais très faible par rapport aux 80 gènes identifiés chez la cyanobactérie d'eau douce *Synechocystis* sp. PCC 6803 ou aux 195 identifiés chez *Anabaena* sp. PCC 7120 (Mizuno *et al.*, 1997). De plus, la diversité de ces gènes est très faible chez *Prochlorococcus*. En effet, la plupart des histidine kinases appartiennent à un seul groupe (type I) et la plupart des régulateurs de réponse appartiennent à une seule famille (OmpR). Ceci pourrait résulter de la compaction du génome de *Prochlorococcus* (le plus petit génome connu à ce jour pour un organisme photosynthétique), qui a probablement gardé uniquement les gènes nécessaires à son adaptation dans la niche écologique où il vit. De plus, étant exposé dans les eaux océaniques à un environnement beaucoup moins variable que les cyanobactéries d'eau douce, *Prochlorococcus* nécessite probablement un nombre plus réduit et une moindre diversité de ces systèmes à deux composants. Un exemple de ce phénomène est la disparition du système PhoR/PhoB, impliqué dans l'assimilation du phosphate, chez les souches de *Prochlorococcus* vivant en profondeur

où le phosphate est abondant. D'autre part, des analyses par RT-PCR quantitative ont révélé une augmentation de l'expression de certains gènes de régulateur (*rer01*, *rer04*, *rer05*, et *rer06*) en réponse à une forte lumière. Les régulateurs Rer01 et Rer04 sont similaires aux régulateurs de la famille OmpR, et particulièrement à RpaA et RpaB de *Tolypothrix* PCC 7601 (Ashby *et al.*, 2002), et Slr0115 et Slr0947 de *Synechocystis* PCC 6803, respectivement connus pour influencer la distribution de l'énergie d'excitation absorbée par les phycobilisomes (Ashby *et al.*, 1999). Ces gènes pourraient donc jouer un rôle dans l'adaptation au stress lumineux. Par contre, aucun changement des niveaux d'ARNm des histidine kinases n'a pu être détecté en réponse au même stress. En revanche, l'expression de la plupart des gènes *hik* et *rer* semble être réprimée en réponse au choc thermique.

II. Article

CHAPITRE IV
La réponse heat-shock

CHAPITRE IV : LA REPONSE HEAT-SHOCK

Ce chapitre est présenté sous forme d'une publication en préparation pour Microbiology.

I. Résumé

Article 2 : Effet du stress lumineux sur les niveaux des transcrits des gènes de stress chez la cyanobactérie d'eau douce *Synechocystis* sp. PCC 6803 et les cyanobactéries marines *Prochlorococcus* MED4 et *Prochlorococcus* MIT9313 »

Les cyanobactéries, comme tous les organismes vivants, répondent aux stress imposés par leur environnement en synthétisant un ensemble de protéines de stress appelées aussi protéines "heat-shock" (Hsp) (Parsell & Lindquist, 1993). La plupart de ces protéines jouent un rôle essentiel dans le repliement, l'assemblage et la dégradation d'autres protéines cellulaires, en conditions normales de croissance et en particulier en conditions de stress. Dans cette étude, nous avons comparé le profil d'accumulation des transcrits de ces gènes chez trois souches cyanobactériennes localisées dans différentes niches écologiques, la souche d'eau douce *Synechocystis* sp. PCC 6803, la souche marine de surface *Prochlorococcus* MED4 et la souche marine de profondeur *Prochlorococcus* MIT9313.

Nous avons utilisé la RT-PCR quantitative afin de mesurer les changements des niveaux de transcrits des protéines chaperones (GroEL, GroES, DnaK...) et des protéases associées au stress (ClpP) provoqué par une forte lumière. Les résultats de cette étude suggèrent une accumulation différentielle des transcrits et donc une régulation dynamique des gènes *hsp*. Cependant, les cinétiques d'accumulation diffèrent chez les trois organismes étudiés, reflétant probablement les différents environnements dans lesquels ces organismes ont évolué. De façon intéressante, la comparaison entre les écotypes de haute et de basse lumière de *Prochlorococcus* a révélé des différences au niveau de la réponse à une forte lumière. Ceci reflète donc une aptitude accrue des écotypes de surface à activer un plus grand nombre de gènes et à provoquer une réponse plus importante des gènes *hsp*.

Ces résultats confirment le rôle important des Hsp pour la survie dans un environnement hostile. En effet, *Prochlorococcus* MED4 est présent dans les eaux de surface où les intensités lumineuses peuvent atteindre jusqu'à $1500 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ à midi, et où

les niveaux de nutriments peuvent être extrêmement bas (Partensky *et al.*, 1999). Une réponse significativement élevée à forte lumière des gènes *hsp* chez *Prochlorococcus* MED4 par rapport à MIT9313 reflète probablement une stratégie de survie liée à la croissance dans les eaux de surface des océans.

II. Article

Effects of high light on transcripts of stress-associated genes for the cyanobacteria

***Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Prochlorococcus* MED4 and MIT9313**

Isabelle MARY¹, Chao-Jung TU², Arthur GROSSMAN² and Daniel VAULOT¹

¹ Station Biologique, UMR 7127, CNRS et Université Pierre et Marie Curie, BP 74, F-29682 Roscoff cedex, France

² Carnegie Institution of Washington, Department of Plant Biology, 260 Panama Street, Stanford, California 94305.

In prep. for Microbiology.

Abstract

Cyanobacteria constitute an ancient, diverse and ecologically important bacterial group. The responses of these organisms to light and nutrient conditions are finely controlled, enabling the cells to survive a range of environmental conditions. We are interested in understanding how cyanobacteria acclimate to the absorption of excess excitation energy and the kinetics of accumulation of stress-associated transcripts following transfer of cells from low to high light. In this study, we have used quantitative RT-PCR to monitor changes in levels of transcripts encoding chaperones and stress-associated proteases in three cyanobacterial strains that inhabit different ecological niches; we examined the freshwater strain *Synechocystis* sp. PCC 6803, the marine high light-adapted strain *Prochlorococcus* MED4, and the marine low light-adapted strain *Prochlorococcus* MIT9313. Levels of transcripts encoding stress-associated proteins were very sensitive to changes in light intensity in all of these organisms, although there were significant differences in the degree and kinetics of transcript accumulation which probably reflects the different environments in which these cyanobacteria evolved.

Introduction

All living organisms must acclimate to environmental stresses that can potentially damage cellular processes (Asada, 1994). Under extreme environmental conditions many polypeptides will denature (Glover & Lindquist, 1998; Gottesman *et al.*, 1998); they lose their native, functional configuration and tend to aggregate. This process can be reversed to some extent, but when conditions become severe, aggregation can lead to irreversible damage of cellular functions and result in cell death (Herman & D'Ari, 1998). Bacteria respond to adverse environmental conditions by synthesizing a set of 'stress-associated' proteins that limit cellular damage by preventing the intracellular accumulation of unfolded and misfolded polypeptides (Lindquist & Craig, 1988). Most stress-associated polypeptides, also called heat shock proteins (Hsp) because they were first observed in cells exposed to elevated temperatures, are molecular chaperones or energy-dependent proteases. The chaperones play crucial roles in promoting folding, stabilization, solubilization, renaturation and degradation of polypeptides, and also facilitate the transport polypeptides into specific cellular compartments, and the assembly of multiprotein complexes (Bukau & Horwich, 1998; Gottesman *et al.*, 1997). The energy-dependent proteases perform targeted polypeptide degradation, modulating the availability of regulatory elements and removing non-functional but potentially harmful polypeptides that arise when polypeptides misfold, denature and/or aggregate (Gottesman, 1996). Many of these proteases function in conjunction with chaperones since substrates targeted for degradation may need to be unfolded prior to proteolysis.

Some stress-associated proteins, such as GroES/GroEL and DnaK, are highly conserved among a diverse group of organisms (Lindquist & Craig, 1988; Craig *et al.*, 1993). These proteins represent two major chaperone systems that function in the cytoplasm, nucleus, endoplasmic reticulum, mitochondria, and chloroplasts (Bukau & Horwich, 1998).

The GroES/GroEL and DnaK systems coexist and appear to have evolved together to improve protein aggregation (Martin & Hartl, 1997; Netzer & Hartl, 1998). GroES/GroEL provides a protected environment that facilitates polypeptide folding while DnaK polypeptides bind exposed regions on unfolded or partially folded polypeptides, protecting them from aggregation processes and facilitating proper folding and assembly.

The GroEL/GroES system is composed of the GroEL and GroES polypeptides, which are approximately 60 and 10 kDa, respectively. GroEL assembles into heptameric rings that stack to form a barrel-like complex with an open or closed configuration. The open configuration accommodates nascent or unfolded polypeptides while the closed configuration is associated protein folding events. GroES forms a single heptameric ring that functionally and structurally completes the chaperone complex by serving as a lid that occludes one of the two barrel ends (Macario *et al.*, 1999). GroEL/GroES complexes function as ATP-dependent folding/refolding machines that operate on a wide variety of structurally unrelated proteins (Ewalt *et al.*, 1997). They become more abundant under a variety of stress conditions (Bahl *et al.*, 1995; Llorca *et al.*, 1998; Lemos *et al.*, 2001) and are essential for cell viability at all temperatures (Fayet *et al.*, 1989; Cheng *et al.*, 1989).

Generally, DnaK or Hsp70 polypeptides are encoded by a multigene family with members that are differentially expressed under a variety of physiological conditions (Lindquist & Craig, 1988; Werner-Washburne & Craig, 1989). DnaK (~70 kDa) has an ATPase activity and functions in concert with DnaJ (~40 kDa) and GrpE (~23 kDa) to promote early stages in protein biogenesis, minimizing aggregation of nascent polypeptides during or immediately after translation. DnaJ interacts with DnaK, and along with GrpE, stimulates the ATPase activity of DnaK, which facilitates dissociation of protein aggregates.

Clp proteins have been highly conserved during evolution, often serving as molecular chaperones that facilitate the elimination of abnormally folded polypeptides (Maurizi *et al.*,

1990; Gottesman & Maurizi, 1992; Wawrzynow *et al.*, 1996). Clp function is mediated by interactions of ClpP serine proteases, which are present in all bacteria, plants and mammals, with regulatory ATPase components, ClpA, ClpC or ClpX. ClpX is an ATP-dependent specificity component of the ClpP protease that regulates proteolysis, but also functions independently of ClpP as a molecular chaperone. ClpC, ClpX and ClpP of *B. subtilis* have been shown to be vital for acclimation to stress and developmental processes (Porankiewicz *et al.*, 1999). Moreover, ClpP and ClpC functions are essential in cyanobacteria and plants (Clarke *et al.*, 1998; Shanklin *et al.*, 1995). ClpB of *E. coli* (Squires *et al.*, 1991) and Hsp104 of *S. cerevisiae* (Sanchez & Lindquist, 1990) are required for thermotolerance, while ClpC (MecB) of *B. subtilis* is involved in stress tolerance, development of transformation competence and cell division (Kruger *et al.*, 1994; Msadek *et al.*, 1994; Turgay *et al.*, 1997). While ClpB does not interact directly with ClpP (Squires & Squires, 1992), it cooperates with the DnaK system as a bichaperone network that dissolves inactive protein aggregates (Glover & Lindquist, 1998; Parsell *et al.*, 1994; Motohashi *et al.*, 1999).

HtpG or Hsp90, present in the cytoplasm of eubacteria, yeast and some morphologically complex organisms, constitutes one of the most conserved heat shock protein families (Scheibel *et al.*, 1997; Buchner, 1999). Similar to other molecular chaperones, Hsp90 recognizes non-native proteins preventing irreversible aggregation during refolding (Wiech *et al.*, 1992) and thermally-induced unfolding (Jakob *et al.*, 1995). HtpG can maintain a non-native substrate in a soluble, folding-competent state, and upon addition of DnaK, DnaJ and ATP/ADP or GroEL, GroES and ATP, the polypeptide substrate can refold (Freeman & Morimoto, 1996).

Small heat shock proteins (sHSPs) with molecular masses of 15-42 kDa (Roy *et al.*, 1999) are a ubiquitous class of molecular chaperones proposed to act as molecular chaperones to prevent irreversible protein denaturation. Typically, the synthesis of sHSPs is induced by

various stresses and by a wide variety of additional signals (Shearstone & Baneyx, 1999). Moreover, the small *hsp17* gene was found to have a protein-protective activity and to stabilize lipid membranes (Torok *et al.*, 2001).

Cyanobacteria are an ancient (over 3 billion years old), diverse and ecologically important group of eubacteria that evolved to inhabit a wide range of habitats. As the only prokaryotes that perform oxygenic photosynthesis, they are major contributors to biomass accumulation on Earth. Since their apparatus for photosynthesis resembles that of plants, they have been used as model organisms by many scientists to investigate the structure and function of plant-type photosynthesis. *Synechocystis* sp. PCC 6803 is a freshwater, unicellular, non-nitrogen-fixing cyanobacterium for which there is a complete nucleotide sequence of the genome (Partensky *et al.*, 1999). This naturally transformable strain has been one of the most popular organisms for genetic and physiological studies of photosynthesis and environmental gene regulation because of its ability to grow both photo-autotrophically and photo-heterotrophically. The cyanobacterium *Prochlorococcus*, the smallest known photosynthetic prokaryote, is a dominant primary producer throughout the oligotrophic oceans (Partensky *et al.*, 1999). It is ubiquitous within the 40°S to 40°N latitudinal band and is found both in surface waters, experiencing light intensities of as high as 1,500 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, and 200 m below the water surface where light intensities could fall below 1 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The wide distribution of *Prochlorococcus* in the marine environment probably reflects the fact that several ecotypes of this organism exist and that these ecotypes may have considerable photoacclimation capabilities (Moore *et al.*, 1998; Goericke & Welschmeyer, 1993). Two ecotypes for which full genome information is available are *Prochlorococcus* MED4, which populates high light (HL), nutrient-poor surface waters of the open oceans, and

Prochlorococcus MIT9313, which inhabits low light (LL), higher nutrient environments, deeper down in the water column (Partensky *et al.*, 1999).

Cyanobacteria possess stress-associated genes, encoding chaperones (such as DnaK, DnaJ, GroEL or ClpB) and proteases (ClpP) (Glatz *et al.*, 1999). A number of these genes may be induced when cells are shifted to high temperatures (Eriksson *et al.*, 2001) or shifted from LL to HL. In *Synechocystis* sp. PCC 6803, *clpB*, *htpG*, *dnaK*, *groES*, *groEL*, *groEL2*, and *hsp17* transcripts all appeared to accumulate when cells were transferred from 20 to 300 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ (Hihara *et al.*, 2001). These results are consistent with experiments performed under similar conditions by Huang *et al.* (2002) (Huang *et al.*, 2002), although such studies would not necessarily distinguish expression levels of closely related *hsp* genes. In fact, stress-associated multigene family members appear to be differentially expressed under a variety of physiological conditions (Lindquist & Craig, 1988). As an example, cyanobacteria possess four *clpP* genes (Porankiewicz *et al.*, 1999; Schelin *et al.*, 2002). *clpP1* is monocistronic, while *clpP2* and *clpP3*, similar to the situation in *E. coli*, appear to be arranged in an operon with *clpX* (Schelin *et al.*, 2002; Clarke *et al.*, 1998) and *clpP4* (Schelin *et al.*, 2002), respectively. Thus, unlike for most bacterial Clp proteins, and especially ClpP1 [26], the ClpP2, ClpP3, ClpP4 and ClpX polypeptides did not accumulate to high levels upon cold shock, oxidative stress or HL exposure in *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Schelin *et al.*, 2002). Similarly, while the DnaK2 protein of *Synechococcus* sp. PCC 7942 exhibited a typical heat shock response (increased accumulation following heat shock), the levels of DnaK1 and DnaK3 did not change following heat treatment (Nimura *et al.*, 2001). Moreover, HtpG is known to play a role in the acclimation of *Synechococcus* sp. PCC 7942 to heat and cold shock as well as to oxidative stress (Hossain & Nakamoto, 2002; Hossain & Nakamoto, 2003). In addition, the small chaperone, Hsp17, was shown to be associated with thylakoid membranes (Lee *et al.*, 2000 ; Horváth *et al.*, 1998) and to be involved in the development of

induced thermotolerance in *Synechocystis* sp. PCC6803 membranes (Lee *et al.*, 1998 ; Lee, *et al.*, 2000) and *Synechococcus* PCC7942 (Nakamoto *et al.*, 2000).

In this study we examined the responses of the *groES*, *groEL*, *dnaK* and *clp* transcripts in the freshwater cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, the marine HL-adapted strain *Prochlorococcus* MED4 and the marine LL-adapted strain *Prochlorococcus* MIT9313 following a shift from LL to HL. Using real-time, quantitative RT-PCR, the levels of transcripts were quantified over both the short term (30 min, 1 h) and relatively longer term (3 h, 6 h and 12 h) following the light shift.

Materials and methods

Culture Conditions: *Synechocystis* sp. PCC 6803 was cultivated in BG-11 medium (Rippka *et al.*, 1979) buffered with 10 mM Tris, pH 8.2, at 30°C. Cultures were bubbled with 3% CO₂ in air and illuminated with 30 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ from incandescent bulbs. For HL treatments, cells in mid-logarithmic growth phase (OD₇₃₀ ~0.8) were diluted with fresh medium to an OD₇₃₀ of ~0.2. The cells (50-ml cultures) were then placed in a temperature-controlled chamber maintained at 30°C and exposed to 600 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ white light for various lengths of time, as indicated in the text, prior to RNA isolation. *Prochlorococcus* MED4 and MIT9313 were cultivated in PCR-S11 medium (Partensky *et al.*, 1999) at 20°C with 6 or 20 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$. For HL treatments, cells in mid-logarithmic growth phase ($10^8 \text{ cell ml}^{-1}$, as measured by flow cytometry) were exposed to 40 or 200 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for various lengths of time, as indicated in the text, prior to RNA isolation.

RNA isolation: RNA was isolated from pelleted cells that had been frozen at -80°C, using a modification of the method of de Saizieu *et al.* (De Saizieu *et al.*, 1998), as described by Bhaya *et al.* (Bhaya *et al.*, 2000). Briefly, 500 μl of acidified phenol and 500 μl of NAES (50 mM sodium acetate [pH 5.1], 10 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate) were added to pelleted cells from 150 ml cultures; 100 mg of glass beads (0.1- μm , average diameter, BioRad Hercules CA) was placed in the suspension, which was then vortexed three times for 20 s each. This was followed by two phenol-chloroform (1:1) and one chloroform extraction. Nucleic acid was precipitated with 2 vol ethanol, resuspended in sterile, double distilled H₂O and then treated for 1 h at room temperature with DNase I, according to the protocol recommended by the manufacturer (20 U FPLC purified, Amersham, Piscataway NJ). DNase treated samples were extracted with phenol-chloroform (1:1), chloroform, and the RNA was precipitated from the aqueous phase upon addition of 2 vol of ethanol. The final RNA pellet was dissolved in 50 μl of 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA and stored at -80°C.

Real time quantitative RT-PCR analysis of gene expression: For the reverse transcriptase (RT) reaction, 200 ng of RNA was incubated with a mixture of PCR reverse primers (4 pmol/20 µl final vol) (Table 2) for 10 min at 70°C prior to adding 100 U of Superscript II RT (GIBCO BRL, Grand Island, NY). The RT reaction was performed at 42°C for 1 h and stopped by placing the reaction at 72°C for 10 min. SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems) or LightCycler DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science, Indianapolis) were used as recommended by the manufacturers; each reaction of 25 µl contained 1 µl of a specific, diluted cDNA (diluted 1/10 relative to the cDNA reaction mixture) and 0.4 µmol/L of the appropriate primers.

Synechocystis sp. PCC 6803 *hsp* gene sequences were obtained from Cyanobase at <http://www.kazusa.or.jp/cyano/index.html>, *Prochlorococcus* MED4 sequences from http://spider.jgi-psf.org/JGI_microbial/html/prochlorococcus_homepage.html and *Prochlorococcus* MIT9313 sequences from http://www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/prochlorococcus_mit9313/prochlo_mit9313_homepage.html. The *hsp* genes in the *Prochlorococcus* strains (Table 1) were identified by similarity searches of the complete genome sequences with *hsp* sequences from other cyanobacteria using the (gapped) local tBLASTN program (Altschul *et al.*, 1997).

Transcripts levels of the *Synechocystis* sp. PCC 6803 *hsp* genes were analyzed by real time PCR using the LightCycler System (Roche Applied Science, Indianapolis). The amplification program consisted of 1 cycle of 95°C for 60 s followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 55°C for 20 s, 72°C for 40 s. The relative levels of transcripts of *hsp* genes of the *Prochlorococcus* strains were analyzed by real time RT-PCR using the ABI Prism™ 5700 sequence detection system (PE Applied Biosystems). The amplification program consisted of 1 cycle of 95°C with a 60 s hold followed by 40 cycles of 95°C with a 15 s hold and 60°C with a 1 min hold. The *rps* (*slr1984*) and *rnpB* transcripts were used as external standards since

levels of these transcripts were not altered by HL conditions (Mary & Vulot, submitted; Chao-Jung Tu, unpublished) (Figure 1).

Each quantitative RT-PCR experiment was performed on two distinct biological samples (using separate cultures grown under identical conditions) with three replicates for the first and two replicates for the second experiment. Quantification of the relative fold change in mRNA levels was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method normalized against the level of *rpnB* transcript as described in Applied Biosystems user bulletin #2 (http://dna-9.int-med.uiowa.edu/RealtimePCRdocs/Compar_Anal_Bulletin2.pdf), using the equation $2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-[(C_{T \text{ hsp, HL}} - C_{T \text{ rpnB, HL}}) - (C_{T \text{ hsp, LL}} - C_{T \text{ rpnB, LL}})]}$ where C_T is the threshold cycle for amplification of *hsp* or *rpnB* from LL or HL-stressed cultures.

Results

Synechocystis sp. PCC 6803

To analyze changes in the level of each *hsp* mRNA after shifting *Synechocystis* sp. PCC 6803 from LL to HL, we used real-time quantitative RT-PCR. To determine the reliability of these data, we used two biological replicates for each experiment and either two or three replicates per biological sample. Overall, quantitative RT-PCR data was reproducible, although in some cases, standard deviations were relatively high. The accumulation of each *hsp* transcript was monitored in response to a shift from 30 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ to 600 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over a period of 12 h. The levels of many *hsp* mRNAs increased in response to HL (Table 3); of the 20 genes examined, transcripts for 15 increased following HL exposure, with 9 increasing by more than 3-fold and 5 by more than 5-fold.

The GroEL/GroES polypeptides showed significant and sustained changes during HL exposure. Two genes encoding GroEL have been identified in the *Synechocystis* sp. PCC 6803 genome (Table 1). The *groEL2* gene is monocistronic and the *groEL1* gene is part of a bicistronic operon with *groES* (Lehel *et al.*, 1993). The *groEL1* and *groES* mRNA levels exhibited similar patterns of accumulation in response to HL. Both transcripts accumulated after 30 min in HL, reaching maximum levels after 1 h, with the levels remaining high for at least 12 h following HL exposure. Similarly, the level of *groEL2* mRNA also remained high over the entire period of HL treatment, although the maximum transcript level was attained after 3 h of HL exposure.

The second major chaperone system, the DnaK system, is encoded by multiple *dnaK*, *dnaJ* and *grpE* genes (Table 1). There are four *dnaK* genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996), *dnaK1*, *dnaK2*, *dnaK3* and *dnaK4* (sll0086, sll0170, sll1932, and sll0058). The polypeptides encoded by these genes are very similar to the analogous genes identified in *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Nimura *et al.*, 2001). The levels of the four *dnaK*

transcripts were sensitive to the HL shift, with *dnaK2* mRNA showing a marked increase (>5-fold) after 1 h of HL exposure and a subsequent decline to the LL level (by 12 h). The level of *dnaK1* and *dnaK4* mRNA also increased transiently, but the increase was less marked (>3-fold after 3 h), whereas the level of *dnaK3* mRNA declined to slightly below the LL value. *Synechocystis* sp. PCC 6803 also has 4 genes that have been classified as *dnaJ* homologs (sll1666, sll1933, sll0093 and slr0897). The level of the *dnaJ3* transcript increased within 3 h of exposure to HL by at least 3.5-fold (with a subsequent decline to the LL level by 12 h), whereas that of *dnaJ1* did not increase significantly. The levels of both *dnaJ2* and *dnaJ4* seemed to decline slightly following HL exposure. The *grpE* mRNA level, the other component of this chaperone system, did not change significantly over the 12 h HL exposure.

The other *hsp* genes examined were *hspG* and those encoding components of the Clp protease complex. The *hspG* transcript level increased after 1 h in HL, reached a maximum of ~3-fold after 3 h, and then declined to the LL control level after 12 h. The *hsp17* transcript level highly increased by ~5-fold after 30 min of HL exposure and then declined below the LL value. The *clp* family of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 consists of single *clpC* and *clpX* genes and multiple *clpB* and *clpP* genes. Of the two *clpB* genes, only *clpB1* mRNA levels rose following HL exposure; a maximum transcript level was attained after 1 h in HL. The ClpP ATP-dependent protease is encoded by 4 distinct genes. The *clpP1* gene appears to be monocistronic while *clpP2* and *clpP3* are each part of bicistronic operons with *clpX* and *clpP4*, respectively. The *clpP1* transcript increased within 1 h of HL exposure and reached relatively high levels, although the standard error in the data was quite large. The level of the *clpP2* mRNA did not change significantly, while those of *clpP3* and *clpP4* showed a moderate increase after 1 h in HL. Finally, *clpC* and *clpX* mRNA levels decreased slightly after the cells were shifted to HL.

Prochlorococcus MED4 and MIT9313

The effects of light on *hsp* transcript levels were examined in both LL- and HL-ecotypes of *Prochlorococcus*. The HL-adapted *Prochlorococcus* MED4, was shifted from LL (20 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to HL (200 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) conditions and of the 20 *Prochlorococcus* MED4 genes examined, all, except *clpB2* and *clpX*, showed some increase in transcript level following HL exposure; for some (*dnaJ1* and *grpE*) the increase was small (Table 4). A change in *hsp* transcript levels in the LL-adapted *Prochlorococcus* MIT9313 was monitored after shifting cells from 20 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ to 200 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ or from 6 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ to 40 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$; the latter conditions are supposed to be closer to those experienced by this organism in its natural habitat (Table 5). In all cases, the increase in transcript levels upon shifting *Prochlorococcus* MIT9313 from 6 to 40 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were lower than when the organism was shifted from 20 to 200 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Overall, the increase in transcript levels in the *Prochlorococcus* strains was higher and more sustained over the period examined than that of *Synechocystis* sp. PCC 6803, although the light conditions used in the experiments were significantly different. Moreover, most mRNA accumulated in *Prochlorococcus* MED4 after 6 h of HL exposure, whereas in *Prochlorococcus* MIT9313 and *Synechocystis* sp. PCC 6803 they accumulated mostly after 1 h in HL. As with *Synechocystis* PCC 6803, most *Prochlorococcus* MED4 *hsp* transcripts accumulated transiently (>3-fold), but some exhibited sustained high levels over the entire time course. For example, the *groEL2* and *groES* transcripts increased to high levels after a 3-6 h HL exposure, and by 12 h they were >15 fold higher than at LL. On the other hand, neither *groEL2* nor *groES* showed as dramatic or as sustained an increase in *Prochlorococcus* MIT9313 as in *Prochlorococcus* MED4.

In many instances there are differences in the number of genes in a particular *hsp* category as well as the transcript profiles observed for the three cyanobacteria examined.

Among the *dnaK* family, the *dnaK2* transcript increased strongly in both *Prochlorococcus* strains, whereas *dnaK1* and *dnaK3* significantly increased only in *Prochlorococcus* MED4. Some transcripts remained high even after 12 h of HL exposure, including *dnaK2* in *Prochlorococcus* MED4 and *dnaJ3* in *Prochlorococcus* MIT9313. In contrast with *Synechocystis* sp. PCC 6803 which has four *dnaK* genes, the *Prochlorococcus* strains have only three. Moreover *grpE* is in an operon with a *dnaK* gene (sll0058) in *Synechocystis* sp. PCC 6803, whereas it is in operon with *dnaJ3* in the *Prochlorococcus* strains. *Prochlorococcus* MED4 possesses only two *dnaJ* homologs, most similar to *dnaJ1* and *dnaJ3* of *Synechocystis* sp. PCC 6803). In contrast, *Prochlorococcus* MIT9313 possesses three *dnaJ* homologs, and these genes (*dnaJ1*, *dnaJ2* and *dnaJ3*) are not well conserved among the three strains (Table 1). Overall, the *dnaJ3* transcript level increased dramatically in both *Synechocystis* sp. PCC 6803 and the *Prochlorococcus* strains, whereas *dnaJ2* mRNA accumulated to a lesser extent only in *Prochlorococcus* MIT9313. The *clp* mRNA levels also showed differential accumulation in the three cyanobacterial strains. The *clpP1* transcript level markedly increased both in *Prochlorococcus* MED4 (>10-fold) and *Synechocystis* sp. PCC 6803, although *clpP2*, *clpP3* and *clpC* mRNA only accumulated to high levels in *Prochlorococcus* MED4. In contrast, many transcripts encoding Clp protease components, with the exception of *clpB1* and *clpB2*, did not increase following HL exposure of *Prochlorococcus* MIT9313. Furthermore, *grpE* mRNA accumulated only in *Prochlorococcus* MIT9313 and *htpG* transcripts showed a greater increase in *Prochlorococcus* MIT9313 than in *Prochlorococcus* MED4 and *Synechocystis* sp. PCC6803.

Discussion

Using Real-time quantitative RT-PCR, we examined the influence of HL on transcript accumulation from genes encoding stress proteins in three cyanobacteria that have evolved in very different environmental niches. The freshwater *Synechocystis* sp. PCC 6803 has several *hsp*-like genes (Table 1) that encode chaperones (two *clpB*, *hspG*, three *dnaKs*, *groES*, two *groEL*, four *dnaJs*, *grpE*, *hsp17*) and specific proteases (four *clpP*, *clpX* and *clpC*) (Schelin *et al.*, 2002; Glatz *et al.*, 1999). While the number of genes in the compact genomes of *Prochlorococcus* MED4 and MIT9313 are reduced for some gene categories (e.g. there are only 12 genes encoding two-component systems, which is much less relative to the ~80 in this category in *Synechocystis* sp. PCC 6803; Mary & Vaultot, submitted), these strains complement of *hsp* genes that have been identified in *Synechocystis* sp. PCC6803. The exceptions are *dnaK4*, *dnaJ4* and the small *hsp17* genes (Table 1), which have no equivalent in *Prochlorococcus* strains, and *dnaJ2* which is absent in *Prochlorococcus* MED4 (but present in *Prochlorococcus* MIT9313). The transcripts for *dnaJ2* and *dnaJ4* do not increase strongly in *Synechocystis* sp. PCC6803 during HL treatment, suggesting that they may not play a crucial role in this acclimation process. However, the *dnaK4* transcript does go up to some extent, and the *hsp17* gene was shown to be strongly induced in response to HL stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Eriksson *et al.*, 2001). In addition to having a protein-protective activity, it may help stabilize cell membranes (Torok *et al.*, 2001). Hence, the complement of Hsps that function in HL acclimation are probably tailored to the lifestyles of the different cyanobacteria. Furthermore, in contrast to *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Prochlorococcus* MIT9313, the CIRCE (Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression) binding repressor, HrcA, which is thought to regulate expression of some chaperone genes (Glatz *et al.*, 1997), is absent from the *Prochlorococcus* MED4 genome, which suggests that there must be another mechanism involved in regulation in this HL adapted strain.

There are a number of different *hsp* features with respect to gene organization and the effect of HL on transcript accumulation that have been generally observed in the different cyanobacteria. In many cases, the *hsp* transcripts increase in abundance soon after exposure to HL and then decline during the later stages of acclimation. This probably reflects the cells capacity to reach a homeostatic condition in which the physiology of the cell has been modified with respect to the capture and utilization of excitation energy under HL conditions. However, some of the *hsp* mRNAs, such as those of *groEL* and *groES*, accumulate to high levels that are sustained over the 12 h HL period; this is especially apparent from the results obtained with *Prochlorococcus* MED4. The polypeptides encoded by these transcripts may be very important (either singly or in combinations) for maintenance of cellular function under specific stress conditions, such as HL. Among the three strains examined, *groEL1* and *groES* are arranged in an operon and are the encoded polypeptides are among the most conserved Hsps in the three strains. In contrast, the GroEL2 polypeptide is much less conserved. Moreover, while not all *dnaK* and *dnaJ* family members are present in the three cyanobacterial strains examined, the common DnaK2 and DnaJ3 polypeptides appear to be highly conserved. Furthermore, HL triggers a pronounced increase in the *dnaK2* and *dnaJ3* transcripts in all three of the cyanobacteria following HL exposure (see Tables 3-5 and the discussion below), suggesting an important role in HL acclimation. In contrast, while the ClpPs and ClpC proteases also appear conserved in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and the *Prochlorococcus* strains (Table 1), the responses of these genes to HL is much more variable.

The GroEL/GroES system is a major chaperone system in all bacteria and the ways in which this system responds to stress conditions have been extensively studied in cyanobacteria (Hihara *et al.*, 2001; Clarke & Eriksson, 1996; Apte *et al.*, 1998). In all three strains, transcripts from these genes displayed higher relative levels than transcripts from

other *hsp* genes, and these levels were sustained for a longer time after the light shift. In all three strains *groES* and *groEL1* showed somewhat similar levels and kinetics of mRNA accumulation, while the level of the *groEL2* transcript increased later with respect to the HL exposure. The levels of *groEL1* and *groEL2* transcripts have also been shown to accumulate in response to elevated temperatures (Kovacs *et al.*, 2001). Generally, the results suggest that the two *groEL* genes may be regulated differently, as hypothesized previously for *Synechocystis* sp. PCC 6803; *groEL2* appears to be under the control of RpoH while *groEL1/groES* is possibly regulated by the CIRCE element found upstream of this operon (Rajaram *et al.*, 2001).

The temporal pattern of mRNA accumulation after HL exposure was also significantly different for the *dnaK* genes; the *dnaK2* transcripts accumulated more than those of the other *dnaK* genes. This agrees with previous results showing that, upon shifting *Synechococcus* sp. PCC 7942 cells to elevated temperatures, the level of DnaK1 and DnaK3 remained relatively constant while that of DnaK2 increased (Nimura *et al.*, 2001). Hihara *et al.* (Hihara *et al.*, 2001) also demonstrated that HL caused increased accumulation of *dnaK2* (*sll0170*) transcripts in *Synechocystis* sp. PCC 6803. This parallels the observation that in most eukaryotes, Hsp70s (the DnaK homologs) are represented by a multigene family in which the different family members are differentially expressed (Lindquist & Craig, 1988; Queitsch *et al.*, 2000) .

Levels of the different *dnaJ* transcripts, like those of *dnaK*, exhibited characteristic responses to HL, with *dnaJ3* mRNA accumulating more than the other *dnaJ* transcripts following HL exposure. Of the four *dnaJ* genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803, only the level of transcript from *dnaJ3* increased. The *dnaJ3* transcript also exhibited the strongest and most sustained increase in our analyses of *Prochlorococcus* MED4 and MIT9313, suggesting universal involvement of DnaJ3 in HL stress responses.

Another common feature to the three strains examined in this study, is the contiguous genomic locations of *dnaJ1* and *dnaK3*, with the former immediately downstream of the latter. Interestingly, while these transcripts show some increase in HL in all of the cyanobacterial strains (with the least change in *Synechocystis* sp. PCC 6803), these increases are neither marked nor as sustained as observed for *dnaK2* and *dnaJ3*. The *Synechococcus* sp. PCC 7942 *dnaJ1* homolog was shown to be essential for growth and was detected in thylakoid membranes (Nimura *et al.*, 2001), suggesting that DnaK3 and DnaJ1 might function cooperatively in relation to photosynthesis.

One of the best-studied family of stress proteins in *E. coli* is represented by the Clp proteases. These proteases are comprised of regulatory, ATPase/chaperone polypeptides associated with protease subunits. The three cyanobacteria studied here, have two different *clpB* genes (Table 1), like in *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Eriksson *et al.*, 2001). In the present study, *clpB1* transcripts transiently increased while *clpB2* mRNA levels did not change following the transfer of cyanobacterial cells to HL. ClpB1 was shown to be essential for resistance to high and low temperature stress in several organisms (Sanchez & Lindquist, 1990; Queitsch *et al.*, 2000; Eriksson & Clarke, 1996; Porankiewicz & Clarke, 1997). While ClpB2 is likely to be an essential constitutive protein with general chaperone activity (Eriksson *et al.*, 2001), our data suggests that ClpB1 might have a stress-related function. The *clpP* transcripts also accumulated in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Prochlorococcus* MED4 after HL exposure, with a more pronounced increase in the level of the *clpP1* transcript. In contrast to these results, all of the *clp* transcripts declined in *Prochlorococcus* MIT 9313, except that of *clpP1*. ClpP1 was previously shown to be induced strongly during acclimation of *Synechococcus* sp. PCC 7942 to either cold temperature or UV-B, but was not induced by heat shock (Clarke *et al.*, 1998; Porankiewicz *et al.*, 1998). Similarly, neither ClpP2, ClpP3 nor ClpR were shown to increase upon heat or cold shock (Schelin *et al.*, 2002; Porankiewicz

et al., 1998), whereas all four Clp proteins were induced by HL intensities to different degrees, but again the most pronounced increase was for ClpP1 (Clarke *et al.*, 1998). The ClpX, ClpP3 and ClpR were found to be primarily constitutive proteins critical for cell viability (Schelin *et al.*, 2002). A synthesis of all of the data presented above suggests a complexity in the control and importance of the multiple *clp* genes in cyanobacteria in response to stress conditions. The arrangement of *clp* genes is also conserved in the genomes of several cyanobacteria including *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Nostoc punctiforme*, and *Prochlorococcus marinus* (Schelin *et al.*, 2002). For example, the *clpP2* gene is part of an operon with *clpX* and, therefore, ClpP2 may preferentially associate with ClpX and not with other Clp/Hsp100 proteins, such as ClpC (Porankiewicz *et al.*, 1999). In the present study, *clpX* mRNA did not accumulate in any of the three strains following HL exposure, raising the possibility that ClpX in cyanobacteria may function as an independent chaperone that is not functionally linked to ClpP (Levchenko *et al.*, 1995).

In this study we also showed that the *htpG* transcript accumulated in both the *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Prochlorococcus* strains following exposure of cells to HL. These results are consistent with previous microarray studies (Hihara *et al.*, 2001) (Huang *et al.*, 2002). Moreover, it has been shown that HtpG is essential for survival during heat (Tanaka & Nakamoto, 1999) and cold stress (Hossain & Nakamoto, 2002), and is also involved in acclimation of *Synechococcus* sp. PCC 7942 to oxidative stress (Hossain & Nakamoto, 2003).

Overall, increases in *hsp* transcript levels were higher for *Prochlorococcus* MED4 than for either *Prochlorococcus* MIT9313 or *Synechocystis* sp. PCC 6803; the genes were induced to higher levels and remained high for longer times after the light shift. For example, unlike in *Synechocystis* sp. PCC 6803 for which only the *clpP1* transcript level rose substantially following exposure to HL, transcripts for all four of the *clpPs* strongly increased

in *Prochlorococcus* MED4. None of the *clpP* transcripts accumulated in *Prochlorococcus* MIT9313 following HL exposure. Furthermore, transcripts encoding Hsp100 or ClpC (Kaneko *et al.*, 1996; Clarke & Eriksson, 1996) did not accumulate following exposure of *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Eriksson *et al.*, 2001) or *Prochlorococcus* MIT9313 to HL; indeed these transcript levels declined. On the other hand, in *Prochlorococcus* MED4, *clpC* mRNA accumulated following HL exposure, which is similar to what was observed for *Synechococcus* sp. PCC 7942 following exposure to high temperature (Clarke & Eriksson, 1996), although the increased transcript level was not reflected in an increase in protein abundance. However, an increase in ClpC protein was observed as the rate of cell growth increased (Clarke & Eriksson, 1996). Exposure of *Prochlorococcus* MED4 does result in a higher growth rate (relative to LL growth), which could elicit increased synthesis of ClpC.

The results discussed above for *Prochlorococcus* MED4 are consistent with a shaping of *hsp* regulatory features to survival in an environment in which cells might experience considerable protein misfolding and aggregation. Indeed, *Prochlorococcus* MED4 is found in the surface waters where light intensities can reach up to $1,500 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at midday, nutrient levels could be extremely low, and the cells would have more of a tendency to experience oxidative stress; a significantly elevated HL responsiveness of *hsp* genes in *Prochlorococcus* MED4 relative to LL adapted strains may represent a strong survival strategy linked to growth at the ocean surfaces (Partensky *et al.*, 1999). Another example of adaptation of *Prochlorococcus* MED4 to a HL environment was demonstrated with the finding that this strain contains at least 22 *hli* genes (Bhaya *et al.*, 2002), a family important for cyanobacterial survival during HL exposure (He *et al.*, 2001). This number is significantly greater than that found in the genomes of the LL *Prochlorococcus* strains or the freshwater cyanobacteria (Bhaya *et al.*, 2002).

In summary, we have performed a quantitative analysis of HL-elicited changes in *hsp* gene expression in the cyanobacteria *Prochlorococcus* MED4, *Prochlorococcus* MIT9313 and *Synechocystis* sp. PCC 6803. Our data suggest a dynamic regulation of the *hsp* genes with differential accumulation of their transcripts that is generally consistent with expression studies previously performed with *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Hihara *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002). Furthermore, the HL ecotype of *Prochlorococcus* activates a larger range of *hsp* genes and elicits more sustained HL responses than either *Prochlorococcus* MIT9313 or *Synechocystis* sp. PCC 6803, consistent with the different ecological niches occupied by these two ecotypes. However, it will be critical in future work to measure the absolute levels of both *hsp* transcripts and their protein products in order to better understand the physiological role that the different chaperones play in adaptation and acclimation processes.

References

Voir la partie “Références Bibliographiques” de la Thèse.

Figure legend

Figure 1. Analysis of *groES* and control genes by real-time quantitative RT-PCR. Fluorescence vs. amplification cycle during HL stress experiment using 1/10 cDNA dilution. (A) *groES* and *rps* (control) for *Synechocystis* sp. PCC 6803. (B) *groES* and *rnpB* (control) for *Prochlorococcus* MED4.

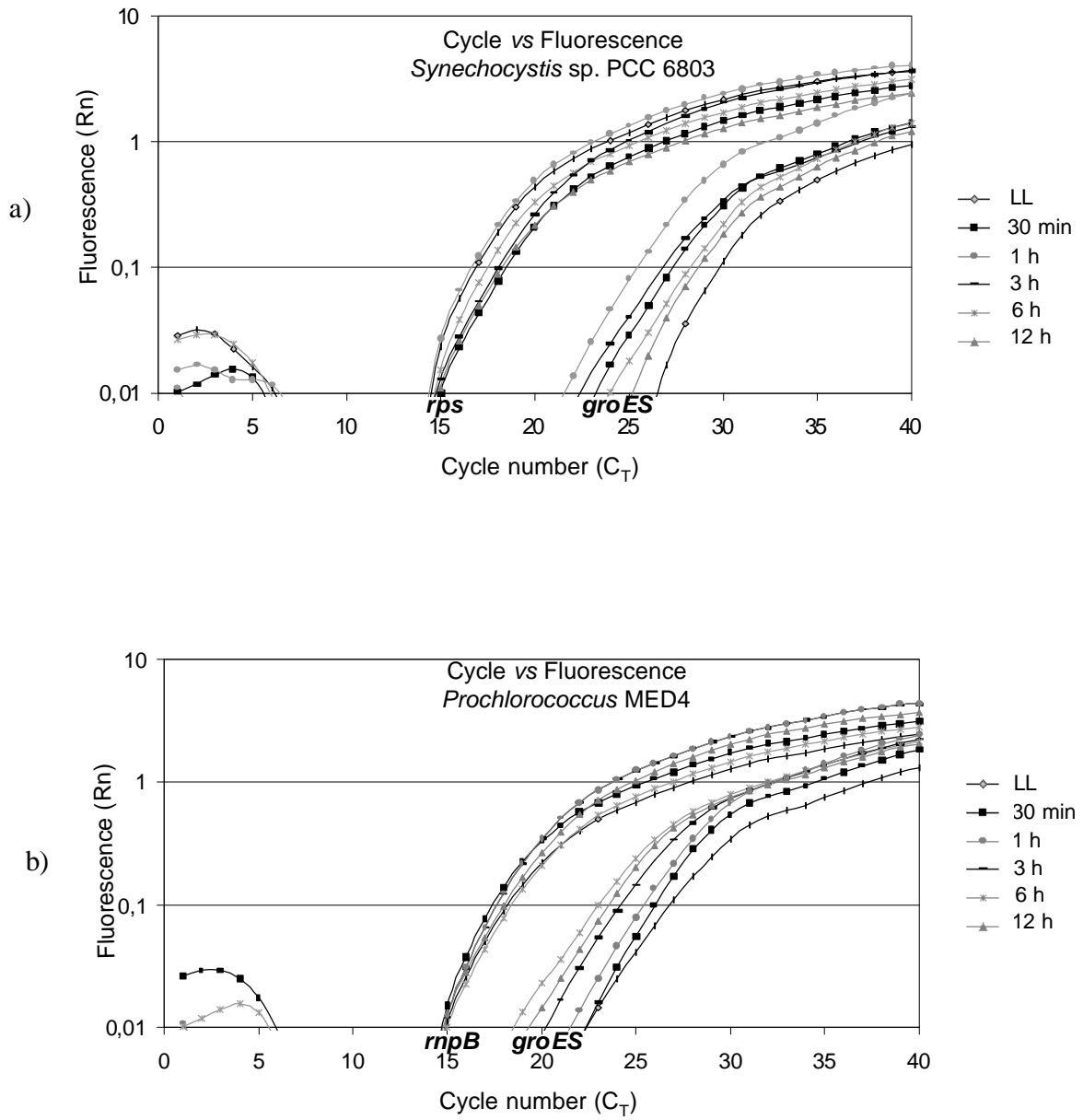


Figure 1

Table 1. Similarity of Hsp proteins of *Prochlorococcus* MED4 and *Prochlorococcus* MIT9313 in relation to *Synechocystis* sp. PCC 6803. Values in gray are >75%.

Gene name	Syn6803 ID (Cyanobase)	ProMED4		ProMIT9313	
		GB accession number	% similarity	GB accession number	% similarity
<i>clpB1</i>	slr1641	ZP_00104570	54	ZP_00112910	69
<i>clpB2</i>	slr0156	ZP_00104216	42	ZP_00114295	50
<i>clpC</i>	sll0020	ZP_00105058	82	ZP_00113393	81
<i>clpX</i>	sll0535	ZP_00105592	64	ZP_00112574	67
<i>clpP1</i>	slr0542	ZP_00104729	69	ZP_00113104	72
<i>clpP2</i>	sll0534	ZP_00105591	80	ZP_00112575	78
<i>clpP3</i>	slr0165	ZP_00105272	76	ZP_00112785	76
<i>clpP4</i>	slr0164	ZP_00105271	74	ZP_00112786	74
<i>dnaJ1</i>	sll1933	ZP_00104878	32	ZP_00113129	34
<i>dnaJ2</i>	slr0093	-	-	ZP_00113822	51
<i>dnaJ3</i>	sll0897	ZP_00104034	60	ZP_00112541	63
<i>dnaJ4</i>	sll1666	-	-	-	-
<i>dnaK1</i>	sll0086	ZP_00105383	31	ZP_00113734	33
<i>dnaK2</i>	sll0170	ZP_00105635	76	ZP_00114455	75
<i>dnaK3</i>	sll1932	ZP_00104879	54	ZP_00113128	57
<i>dnaK4</i>	sll0058	-	-	-	-
<i>groEL1</i>	slr2076	ZP_00105387	81	ZP_00113738	80
<i>groEL2</i>	sll0416	ZP_00104450	56	ZP_00113642	62
<i>groES</i>	slr2075	ZP_00105388	79	ZP_00113739	82
<i>grpE</i>	sll0057	ZP_00104033	47	ZP_00112540	44
<i>htpG</i>	sll0430	ZP_00104883	46	ZP_00113122	48

Table 2. Primers (5' to 3') specific of the chaperone and protease genes of *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Prochlorococcus* MED4 and *Prochlorococcus* MIT9313 used for quantitative RT-PCR reactions.

gene	<i>Synechocystis</i> sp. Strain PCC 6803		<i>Prochlorococcus</i> MED4		<i>Prochlorococcus</i> MIT9313	
	forward primer sequence	reverse primer sequence	forward primer sequence	reverse primer sequence	forward primer sequence	reverse primer sequence
<i>clpB1</i>	AAACGTCCTGGTTTAGGAGC	GGGATTGTAATACCTGTTTCT	TTAGGGCCAACAGGAGTAGG	TTGCCCATCGTAATAATCC	TGGCTCGAGGTGATGAGTTGT	GGAACGGTCGGCTTCTTCA
<i>clpB2</i>	AACTGATTTACAGCGGCAAG	CCAACGGGTAGCCAAAGAC	CCAATCCTCATTGGTCATCC	AGGCGTTGTTGTTCTATGC	TCGGTAAAACGGAGCTATCCA	GCCGCTCGCTGTCAA
<i>clpC</i>	CGGCTCGGACATAACTTCG	CATCCTCGAAGAAAAACGGG	ACTGCTGAGGTTGGTTCAGG	ATTTTGTTCCTGCGACAAGG	TCATGCTGGCCAGGAA	CGGTGCCACGAAATTATG
<i>clpX</i>	ATGCCCAAATACGACTCCCA	CTAAGCAGATCCCGTTTAG	CGCCAGAAAGAGTGAAAACC	TTTGCTTTCATCAGGGTTGG	CCTGCTCATCGGTCCAACA	GGCCAGGGTCTGGGCTAATA
<i>clpP1</i>	ATGGAATAACTGCTTTTCA	CTAAATCACTGCCATTGGT	AGCTGGTATACCGGAGATGC	CCTCTTCTGCCCTTATTTGG	CAGGAACCAAAGCCACAGA	GTTGGTGACGACGATTGAG
<i>clpP2</i>	ATGCCTATAGGTGTTCCAG	TTAGTTATTGCCATGGTGG	ATGATGGAATTGCCAACAGC	AGCCTGACGTTGTGAAGTCC	CGATGGGCGCCTTCT	GGGCAGGGCAGCTTTTT
<i>clpP3</i>	ATGATTCCAACCGTCATT	TTAAATAGGGTCACAGGCGG	GGAGGTTGCGTTTATGATGG	TCACTGGCTTGACCTCTTGC	CAAGTAGCAGATGCCCTCGTT	TCGGATCTTCGGCTTCA
<i>clpP4</i>	AACTCCCGTTCTCCCTACCG	GGTGACGGGGTAGTGGGGT	CGGTGGCTCTGTTACTGCTG	ATTTCAACTGCTTGGCCTTG	TGCGTGAACGGATGACATCT	TCGATTTGCCGAATCACTTG
<i>dnaJ1</i>	ATGGAACAAGTGGGAA	TTAAAAATCAAAGAACTT	GAGTTTCTGGAGAGGGAAACG	ACCTGATGATTGCCCTTTCG	AGTTGCGCGTTCAAACAGAA	CGGGATAAAGCACAGAAATG
<i>dnaJ2</i>	ATGGCATCAACAGATTTT	CTATGCCAACAAATTGG			GCGAAGTTCAAGGAGGTGAG	CGGCCAAACTGCTCATATTT
<i>dnaJ3</i>	GTGTCTTCTAATCCCCATTC	TTAGTTGATGAACCATGGTA	AAAGCTTTTCGAAGGGAAGC	ACAGGTGGTGGTCTTCTGG	CCGCATAAAGACGCATGGT	CGAACGCCACGCTGATG
<i>dnaJ4</i>	GGGCGATTTTGCCGACATTT	TCATTTATGGAATAATCCCC				
<i>dnaK1</i>	AACGGCAATTTTTTGAACGATT	TTGGGCCGTTTGTCTGAAC	AACTTCGGTACAGAGAAAGAAGG	TTCTTCTCGTTCCAAGTCTCC	TCCTCGATCTCCCACCAATC	GCCGGCCAGATCAAAT
<i>dnaK2</i>	ACAGTCAGTTAGAGGGTTCC	CTAATCGATCGTTCATAGT	TGGTGGCTCAACTAGAATGC	CCTGCAAACATGAATCTCG	TGTTGGCATTGACCTTGAA	GCTTGCCACCCTCCATTACA
<i>dnaK3</i>	AGGTCACCGGAGCTGTGATTA	TTGCCGTTGGGAATCGTT	GGGATTGATTTGGTACTGC	AATCCCTTCCITCATTGC	TGCCGGCAGGCTCTTG	CAGCAGTGGGCTCGTTGAG
<i>dnaK4</i>	GCAAAGATCCCAACCAAGGA	CTATTTCTCGGCTCAGAGA				
<i>groEL1</i>	ATGGCTAAATCCATCATTTA	GGTTTCTTCGATCTGGCGAC	CGCTGAGGGTAATGAAAAGG	AAAGCTTTATCAGCCATTCC	TCGCAACCTTGGTGGTCAA	CTTCACGGCAGCCACATTC
<i>groEL2</i>	GGAAGAATATGCTGCTTCT	TTACATCATGCCATGCCTCC	GACTGCTGGTGATGGAACAA	GCTCCCGCAGCTATATTTTT	GCCCTGCTGTTGCTCACA	TGGGCACAAGATCGGAAAC
<i>groES</i>	ATGACTTCTATGGCCGCTAT	TAGGCAACGGAGGCCAAAA	TCACTTACAGTCTCTACAGTCAAACC	TCTGAAAGTAAGACGTAATCTCC	CCAGGCCCCCGAAGTG	CCATACCTGCGTACTTGCTGTAA
<i>grpE</i>	GGGAACCCACCCTGAA	CCCGCACCAACTCCTCAA	CAACTAAAACCCGAAAGTGAGG	GGCTCTTGGAATTTTGTGG	GCTTGTGATCGGTGCTCAA	GCCCAACACCCGCATT
<i>hspG</i>	GCATTGCTGATTACATTGCC	TTACTGTTTGGTCAAACGGG	AAGAAGAATGGCCTCAATGG	AGGTGAGCCATCACATGACC	AACCGAATCCTTGCACAAG	CCGAGGCGAGCCATGTC
<i>rps/mpB</i>	ATGCCTTCTCCTCAA	AACTTTTTTCCAGTTGCTC	CCCATATGGTCAGGCTTGC	GGCAATCATCTATAGGACTGG	TGCAAGCAAATCCCAACTG	GCATGCCGTGGAGTTGTG

Table 3. Change in transcript accumulation of *Synechocystis* sp. PCC 6803 *hsp* gene following a shift of the cells from LL (30 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to HL (600 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$), as monitored by using real-time quantitative RT-PCR. Values in clear gray are >5 .

Gene ID		HL incubation (induction ratio with regard to LL)				
		<i>Synechocystis</i> PCC 6803 (30-600 $\mu\text{mol photon m}^{-1} \text{s}^{-2}$)				
		30mn	1h	3h	6h	12h
<i>clpB1</i>	<i>slr1641</i>	1.31 \pm 0.40	5.53 \pm 1.12	4.02 \pm 1.50	0.60 \pm 0.32	0.74 \pm 0.20
<i>clpB2</i>	<i>slr0156</i>	0.90 \pm 0.41	0.65 \pm 0.24	0.91 \pm 0.12	0.70 \pm 0.23	0.61 \pm 0.12
<i>clpC</i>	<i>sll0020</i>	1.02 \pm 0.23	0.84 \pm 0.19	0.53 \pm 0.40	0.41 \pm 0.12	0.49 \pm 0.29
<i>clpX</i>	<i>sll0535</i>	0.59 \pm 0.32	0.86 \pm 0.23	0.68 \pm 0.29	0.75 \pm 0.43	0.31 \pm 0.12
<i>clpP1</i>	<i>slr0542</i>	4.02 \pm 1.00	6.12 \pm 3.02	7.31 \pm 4.03	5.41 \pm 2.51	2.02 \pm 0.48
<i>clpP2</i>	<i>sll0534</i>	1.10 \pm 0.32	1.27 \pm 0.61	0.70 \pm 0.21	0.85 \pm 0.50	0.95 \pm 0.29
<i>clpP3</i>	<i>slr0165</i>	1.10 \pm 0.38	2.00 \pm 0.35	1.81 \pm 1.05	1.50 \pm 0.62	2.05 \pm 1.25
<i>clpP4</i>	<i>slr0164</i>	1.03 \pm 0.24	3.01 \pm 0.90	1.89 \pm 0.48	1.75 \pm 0.25	1.19 \pm 1.02
<i>dnaJ1</i>	<i>sll1933</i>	0.62 \pm 0.23	1.46 \pm 0.36	1.01 \pm 0.46	1.52 \pm 1.03	1.12 \pm 0.20
<i>dnaJ2</i>	<i>slr0093</i>	1.02 \pm 0.34	0.59 \pm 0.23	0.42 \pm 0.25	0.37 \pm 0.19	0.56 \pm 0.22
<i>dnaJ3</i>	<i>sll1666</i>	0.98 \pm 0.15	2.12 \pm 0.24	4.20 \pm 1.86	2.12 \pm 1.02	1.53 \pm 0.54
<i>dnaJ4</i>	<i>sll0897</i>	1.53 \pm 0.61	1.42 \pm 0.22	0.71 \pm 0.54	0.50 \pm 0.23	0.71 \pm 0.33
<i>dnaK1</i>	<i>sll0086</i>	0.98 \pm 0.31	1.61 \pm 0.22	3.51 \pm 0.52	1.12 \pm 1.01	0.86 \pm 0.40
<i>dnaK2</i>	<i>sll0170</i>	1.12 \pm 0.27	5.41 \pm 1.02	1.66 \pm 0.55	0.82 \pm 0.32	0.83 \pm 0.40
<i>dnaK3</i>	<i>sll1932</i>	1.01 \pm 0.30	1.40 \pm 0.57	1.57 \pm 0.61	0.54 \pm 0.17	0.51 \pm 0.32
<i>dnaK4</i>	<i>sll0058</i>	1.38 \pm 0.11	1.13 \pm 0.15	2.43 \pm 0.67	3.19 \pm 0.69	0.96 \pm 0.42
<i>groEL1</i>	<i>slr2076</i>	4.03 \pm 0.42	6.52 \pm 2.68	5.99 \pm 1.20	4.01 \pm 2.23	2.52 \pm 1.03
<i>groEL2</i>	<i>sll0416</i>	1.23 \pm 0.51	2.20 \pm 0.91	4.07 \pm 2.09	3.22 \pm 1.90	4.12 \pm 1.36
<i>groES</i>	<i>slr2075</i>	6.52 \pm 2.31	7.80 \pm 1.97	7.53 \pm 2.90	5.23 \pm 2.64	3.99 \pm 1.23
<i>grpE</i>	<i>sll0057</i>	1.26 \pm 0.96	1.75 \pm 0.54	1.52 \pm 0.50	1.14 \pm 0.63	0.62 \pm 0.21
<i>htpG</i>	<i>sll0430</i>	1.41 \pm 0.61	1.89 \pm 0.95	2.94 \pm 0.83	2.25 \pm 1.14	1.17 \pm 1.01

Table 4. Change in transcript accumulation of *Prochlorococcus* MED4 *hsp* gene following a shift of the cells from LL (20 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to HL (200 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$), as monitored by real-time quantitative RT-PCR. . Values in clear gray are >5 and values in dark gray are >10 .

Gene ID		HL incubation (induction ratio with regard to LL)				
		<i>Prochlorococcus</i> MED4 (20-200 $\mu\text{mol photon m}^{-1} \text{s}^{-2}$)				
		30mn	1h	3h	6h	12h
<i>clpB1</i>	<i>slr1641</i>	2.15 \pm 1.09	2.01 \pm 0.60	3.25 \pm 1.24	7.34 \pm 3.05	2.09 \pm 1.14
<i>clpB2</i>	<i>slr0156</i>	0.97 \pm 0.10	1.09 \pm 0.19	1.22 \pm 0.43	0.74 \pm 0.15	0.66 \pm 0.22
<i>clpC</i>	<i>slI0020</i>	4.12 \pm 2.10	5.03 \pm 1.87	12.54 \pm 4.15	13.08 \pm 5.44	2.67 \pm 1.36
<i>clpX</i>	<i>slI0535</i>	0.54 \pm 0.21	0.56 \pm 0.22	0.39 \pm 0.20	0.64 \pm 0.36	0.55 \pm 0.12
<i>clpP1</i>	<i>slr0542</i>	3.50 \pm 1.54	6.50 \pm 2.19	5.14 \pm 2.32	12.15 \pm 3.28	3.04 \pm 1.12
<i>clpP2</i>	<i>slI0534</i>	3.17 \pm 1.76	3.23 \pm 0.59	4.32 \pm 1.64	6.24 \pm 2.56	1.76 \pm 0.50
<i>clpP3</i>	<i>slr0165</i>	1.09 \pm 0.44	2.13 \pm 0.44	1.77 \pm 0.81	11.34 \pm 2.13	3.45 \pm 1.17
<i>clpP4</i>	<i>slr0164</i>	1.03 \pm 0.72	2.11 \pm 0.45	2.36 \pm 0.90	3.65 \pm 2.01	1.75 \pm 1.01
<i>dnaJ1</i>	<i>slI1933</i>	0.98 \pm 0.22	0.77 \pm 0.19	0.75 \pm 0.39	2.13 \pm 1.08	1.45 \pm 1.01
<i>dnaJ3</i>	<i>slI1666</i>	11.45 \pm 3.56	10.99 \pm 4.12	13.67 \pm 4.99	2.87 \pm 1.31	2.56 \pm 1.03
<i>dnaK1</i>	<i>slI0058</i>	5.05 \pm 2.31	8.54 \pm 3.12	1.74 \pm 0.39	1.17 \pm 0.24	1.68 \pm 0.52
<i>dnaK2</i>	<i>slI0170</i>	0.85 \pm 0.38	3.96 \pm 1.23	22.80 \pm 4.23	25.03 \pm 5.43	12.82 \pm 5.02
<i>dnaK3</i>	<i>slI1932</i>	1.10 \pm 0.66	1.22 \pm 0.50	1.50 \pm 0.78	8.56 \pm 5.76	1.58 \pm 1.00
<i>groEL1</i>	<i>slr2076</i>	2.16 \pm 0.56	2.81 \pm 1.05	3.10 \pm 1.19	10.11 \pm 5.01	4.96 \pm 1.12
<i>groEL2</i>	<i>slI0416</i>	1.35 \pm 0.51	2.54 \pm 1.13	3.41 \pm 1.20	6.76 \pm 3.04	15.01 \pm 5.02
<i>groES</i>	<i>slr2075</i>	1.28 \pm 0.95	7.72 \pm 2.86	11.22 \pm 3.54	17.05 \pm 4.15	16.08 \pm 5.53
<i>grpE</i>	<i>slI0057</i>	1.23 \pm 0.44	1.91 \pm 0.34	1.86 \pm 0.45	0.68 \pm 0.23	0.75 \pm 0.19
<i>htpG</i>	<i>slI0430</i>	4.55 \pm 2.13	4.98 \pm 2.21	2.57 \pm 1.12	2.11 \pm 0.65	2.09 \pm 1.09

Table 5. Change in transcript accumulation of *Prochlorococcus* MIT9313 *hsp* gene following a shift of the cells from LL to HL (4 or 20 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to HL (40 or 200 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$), as monitored by real-time quantitative RT-PCR. . Values in clear gray are >5 and values in dark gray are >10.

Gene	ID	HL incubation (induction ratio with regard to LL)								
		<i>Prochlorococcus</i> MIT9313 (20-200 $\mu\text{mol photon m}^{-1} \text{s}^{-2}$)				<i>Prochlorococcus</i> MIT9313 (6-40 $\mu\text{mol photon m}^{-1} \text{s}^{-2}$)				
		1h	3h	6h	12h	30mn	1h	3h	6h	12h
<i>clpB1</i>	<i>slr1641</i>	6.54 \pm 2.34	8.66 \pm 3.09	6.86 \pm 2.55	4.56 \pm 1.77	2.09 \pm 1.07	1.49 \pm 0.59	2.86 \pm 0.56	1.38 \pm 0.42	1.09 \pm 0.23
<i>clpB2</i>	<i>slr0156</i>	2.97 \pm 1.09	2.13 \pm 1.02	1.45 \pm 1.11	0.54 \pm 0.13	0.78 \pm 0.33	0.76 \pm 0.17	0.80 \pm 0.09	0.67 \pm 0.27	0.55 \pm 0.20
<i>clpC</i>	<i>slI0020</i>	0.46 \pm 0.23	0.45 \pm 0.09	0.39 \pm 0.08	0.49 \pm 0.18	0.79 \pm 0.15	0.84 \pm 0.16	1.01 \pm 0.52	0.99 \pm 0.29	1.65 \pm 0.78
<i>clpX</i>	<i>slI0535</i>	0.67 \pm 0.22	0.33 \pm 0.15	1.54 \pm 0.12	1.63 \pm 1.02	0.39 \pm 0.13	0.54 \pm 0.14	0.72 \pm 0.17	0.45 \pm 0.24	0.80 \pm 0.21
<i>clpP1</i>	<i>slr0542</i>	1.06 \pm 0.57	2.13 \pm 0.61	1.95 \pm 0.35	1.38 \pm 0.11	0.78 \pm 0.39	0.91 \pm 0.26	0.59 \pm 0.37	3.43 \pm 1.19	2.34 \pm 0.90
<i>clpP2</i>	<i>slI0534</i>	0.64 \pm 0.23	0.52 \pm 0.11	0.56 \pm 0.20	0.35 \pm 0.04	0.81 \pm 0.51	0.74 \pm 0.28	0.55 \pm 0.17	0.49 \pm 0.08	0.34 \pm 0.19
<i>clpP3</i>	<i>slr0165</i>	0.34 \pm 0.14	0.36 \pm 0.15	0.45 \pm 0.13	0.25 \pm 0.07	0.60 \pm 0.23	0.85 \pm 0.13	1.02 \pm 0.14	1.56 \pm 1.10	0.98 \pm 0.27
<i>clpP4</i>	<i>slr0164</i>	0.64 \pm 0.32	0.60 \pm 0.24	0.57 \pm 0.19	0.39 \pm 0.15	0.60 \pm 0.29	0.51 \pm 0.26	0.47 \pm 0.21	0.56 \pm 0.10	0.39 \pm 0.17
<i>dnaJ1</i>	<i>slI1933</i>	1.39 \pm 1.03	2.16 \pm 1.12	2.34 \pm 0.72	3.42 \pm 1.23	0.46 \pm 0.14	0.49 \pm 0.23	0.37 \pm 0.21	0.49 \pm 0.22	0.58 \pm 0.18
<i>dnaJ2</i>	<i>slr0093</i>	5.47 \pm 2.25	5.52 \pm 1.14	3.52 \pm 1.73	2.24 \pm 1.03	0.72 \pm 0.32	0.52 \pm 0.21	0.68 \pm 0.33	0.54 \pm 0.15	1.57 \pm 0.18
<i>dnaJ3</i>	<i>slI1666</i>	2.90 \pm 1.17	7.54 \pm 1.98	17.23 \pm 2.99	24.33 \pm 7.43	8.18 \pm 1.65	9.25 \pm 3.12	8.44 \pm 3.05	5.25 \pm 2.03	3.22 \pm 1.49
<i>dnaK1</i>	<i>slI0058</i>	0.56 \pm 0.08	0.43 \pm 0.28	0.69 \pm 0.41	0.39 \pm 0.20	1.21 \pm 0.32	1.72 \pm 1.02	1.83 \pm 0.72	5.01 \pm 1.79	1.13 \pm 0.25
<i>dnaK2</i>	<i>slI0170</i>	12.13 \pm 2.43	9.07 \pm 4.10	2.35 \pm 0.36	1.06 \pm 0.53	6.24 \pm 2.85	4.39 \pm 2.02	5.52 \pm 3.05	7.21 \pm 2.23	3.89 \pm 1.76
<i>dnaK3</i>	<i>slI1932</i>	2.32 \pm 1.09	3.45 \pm 1.14	3.04 \pm 0.78	2.12 \pm 1.07	1.42 \pm 0.98	3.69 \pm 2.04	2.56 \pm 1.43	1.45 \pm 0.79	1.34 \pm 1.02
<i>groEL1</i>	<i>slr2076</i>	11.12 \pm 5.45	5.46 \pm 1.04	8.43 \pm 3.25	4.67 \pm 1.07	3.33 \pm 1.17	1.98 \pm 0.49	2.24 \pm 1.01	3.67 \pm 1.50	0.99 \pm 0.25
<i>groEL2</i>	<i>slI0416</i>	4.78 \pm 1.52	3.52 \pm 1.03	3.24 \pm 1.23	2.56 \pm 0.58	1.53 \pm 1.03	0.95 \pm 0.56	1.24 \pm 0.20	1.52 \pm 0.58	2.17 \pm 1.04
<i>groES</i>	<i>slr2075</i>	6.21 \pm 2.15	5.03 \pm 2.12	2.01 \pm 1.06	1.99 \pm 0.44	3.05 \pm 0.76	3.84 \pm 1.41	1.88 \pm 0.42	1.93 \pm 1.01	1.29 \pm 0.43
<i>grpE</i>	<i>slI0057</i>	6.74 \pm 2.02	6.10 \pm 1.22	3.88 \pm 1.54	2.17 \pm 1.02	0.78 \pm 0.21	0.99 \pm 0.31	1.29 \pm 0.18	1.54 \pm 0.43	0.69 \pm 0.31
<i>htpG</i>	<i>slI0430</i>	10.12 \pm 3.54	11.34 \pm 5.22	7.09 \pm 3.16	5.32 \pm 2.56	1.55 \pm 1.02	1.46 \pm 0.49	1.79 \pm 0.56	2.37 \pm 0.67	1.76 \pm 0.55

Table 6. Comparative table of *hsp* gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Prochlorococcus* MED4 and *Prochlorococcus* MIT9313 following a shift of the cells from

		HL incubation (induction ratio with respect to LL)																		
		<i>Synechocystis</i> PCC 6803 (30-600 $\mu\text{mol photon m}^{-1} \text{s}^{-2}$)					<i>Prochlorococcus</i> MED4 (20-200 $\mu\text{mol photon m}^{-1} \text{s}^{-2}$)					<i>Prochlorococcus</i> MIT9313 (20-200 $\mu\text{mol photon m}^{-1} \text{s}^{-2}$)				<i>Prochlorococcus</i> MIT9313 (6-40 $\mu\text{mol photon m}^{-1} \text{s}^{-2}$)				
Gene	ID	30mn	1h	3h	6h	12h	30mn	1h	3h	6h	12h	1h	3h	6h	12h	30mn	1h	3h	6h	12h
<i>clpB1</i>	slr1641		+							+		+	+	+	+					
<i>clpB2</i>	slr0156																			
<i>clpC</i>	slI0020							+	++	++										
<i>clpX</i>	slI0535																			
<i>clpP1</i>	slr0542		+	+	+			+	+	++										
<i>clpP2</i>	slI0534									+										
<i>clpP3</i>	slr0165									++										
<i>clpP4</i>	slr0164																			
<i>dnaJ1</i>	slI1933																			
<i>dnaJ2</i>	slr0093											+	+							
<i>dnaJ3</i>	slI1666						++	++	++				+	++	++	+	+	+	+	
<i>dnaJ4</i>	slI0897																			
<i>dnaK1</i>	slI0058						+	+												+
<i>dnaK2</i>	slI0170		+						++	++	++	++	+			+		+	+	
<i>dnaK3</i>	slI1932									+										
<i>groEL1</i>	slr2076		+	+						++		++	+	+						
<i>groEL2</i>	slI0416			+						+	++									
<i>groES</i>	slr2075	+	+	+	+			+	++	++	++	+	+							
<i>grpE</i>	slI0057											+	+							
<i>hspG</i>	slI0430											++	++	+	+					

CHAPITRE V

Les gènes photosynthétiques

CHAPITRE V : LES GENES PHOTOSYNTHETIQUES

Ce chapitre est présenté sous forme d'une publication dans Nature.

I. Résumé

Article 3 : Caractérisation et expression différentielle des gènes *pcb* en conditions de carence en fer chez la cyanobactérie marine *Prochlorococcus* MIT9313

Prochlorococcus est une cyanobactérie atypique qui contient des dérivés divinyl de chlorophylle (Chl) *a* et *b*. Ces molécules de Chl agissent comme pigments collecteurs de lumière et se lient aux protéines codées par les gènes *pcb*. Une des plus intéressantes caractéristiques de *Prochlorococcus* est l'existence de génotypes distincts adaptés aux niches de forte et de faible lumière. Les processus d'adaptation à de telles niches se sont accompagnés d'une évolution rapide des gènes *pcb* (Garczarek *et al.*, 2000). Ces gènes sont homologues aux gènes *isiA* des cyanobactéries qui codent des protéines liant la Chl *a* et sont exprimés uniquement en condition de carence en fer (Figure 25). En effet, lors d'une carence en fer, l'induction des gènes *isiA* et *isiB* mène à la synthèse de CP43' (IsiA) et de la flavodoxine, respectivement (la flavodoxine fonctionne comme un accepteur d'électrons à la place de la ferredoxine). L'analyse phylogénétique des séquences protéiques des Pcb a montré que les souches de surface de *Prochlorococcus* possède un Pcb unique alors que les souches de profondeur telles que SS120 et MIT9313 en possèdent plusieurs. De plus, les Pcb des souches de surface sont regroupés au sein d'un clade unique alors que ceux de SS120 sont divisés en deux clades distincts (Figure 25). Afin de mieux comprendre l'origine, la fonction et la localisation des complexes antennaires Pcb-Chl de *Prochlorococcus* et la façon dont ils sont liés aux différentes niches écologiques, des études d'expression de gènes et de structure ont été réalisées sur les différentes souches de *Prochlorococcus*. La souche de profondeur MIT 9313 possède deux gènes *pcb* (*pcbA* et *pcbB*), contrairement à l'autre souche de profondeur SS120 qui en possède huit (*pcbA* to H) et à la souche de surface MED4 qui n'en possède qu'un (*pcbA*).

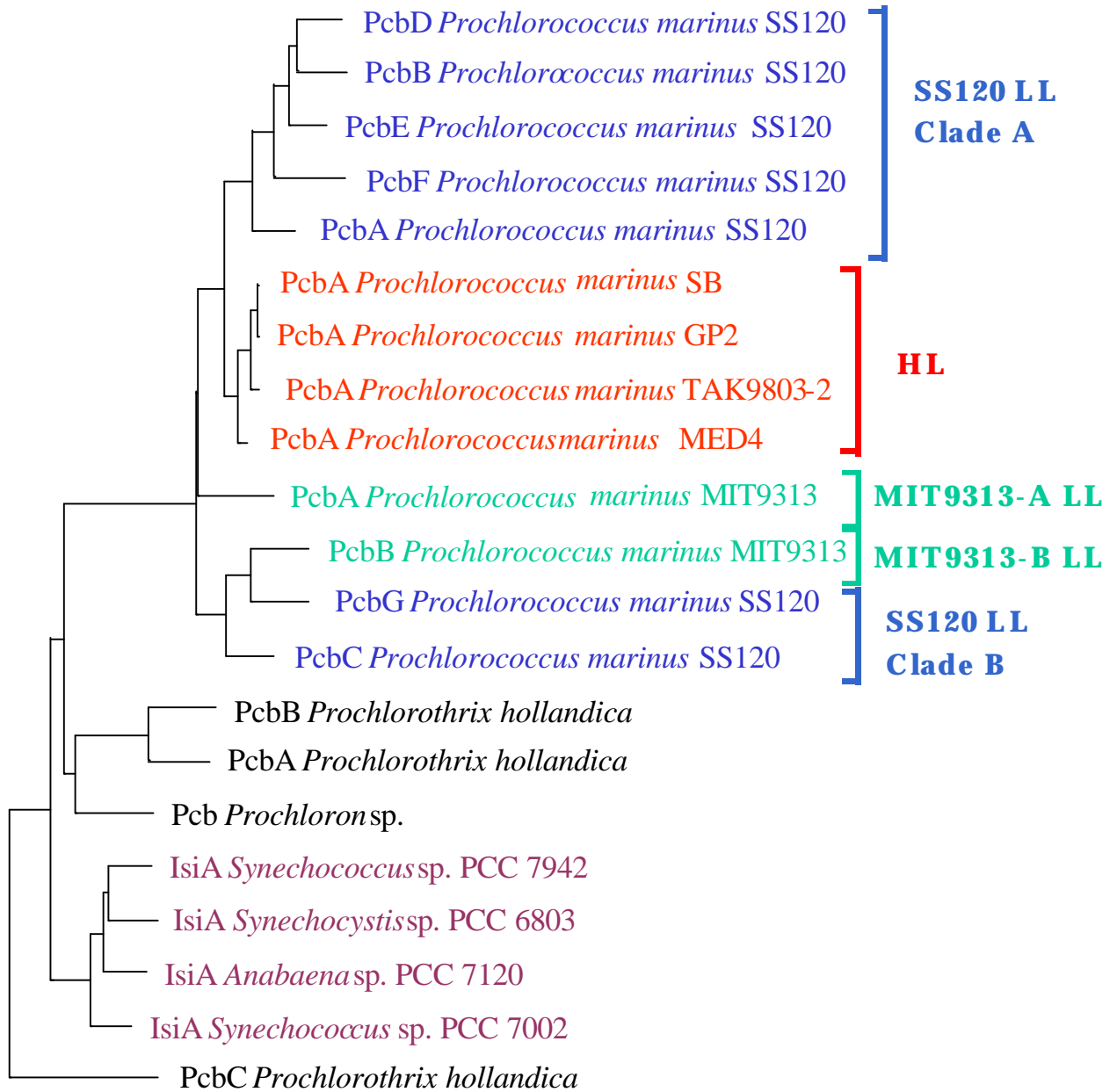
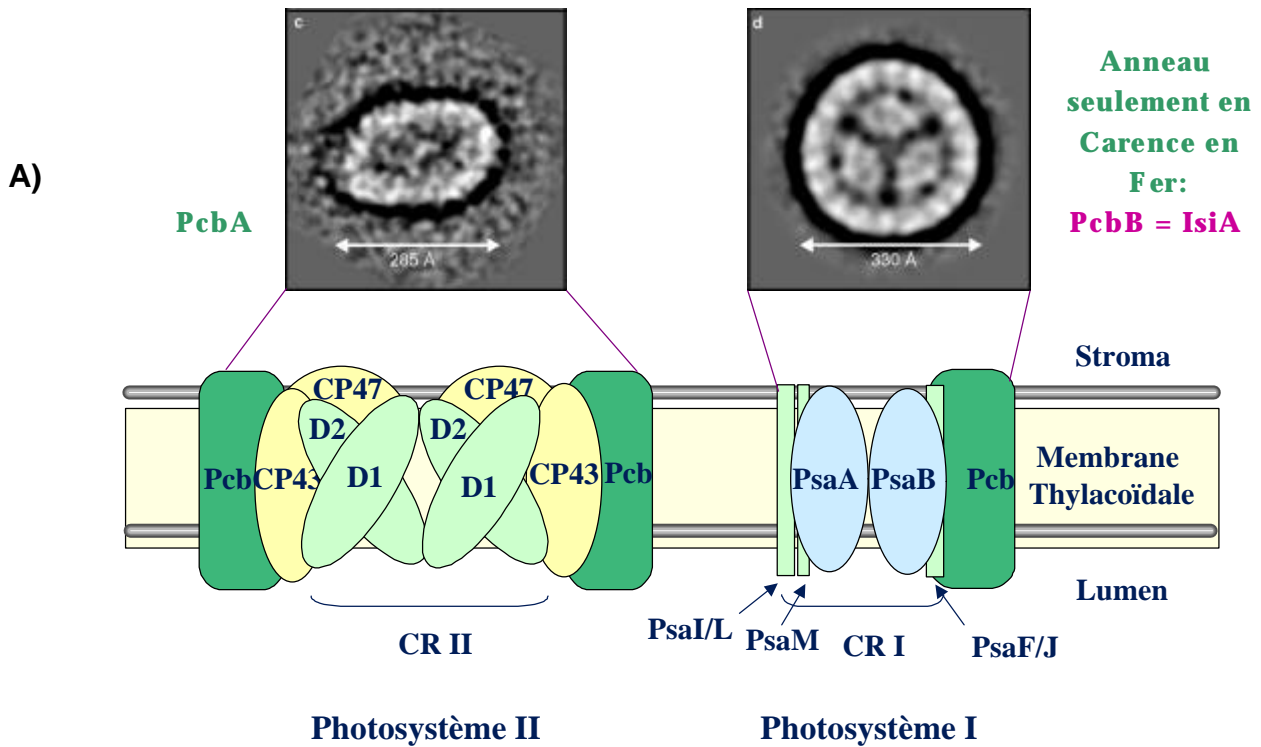


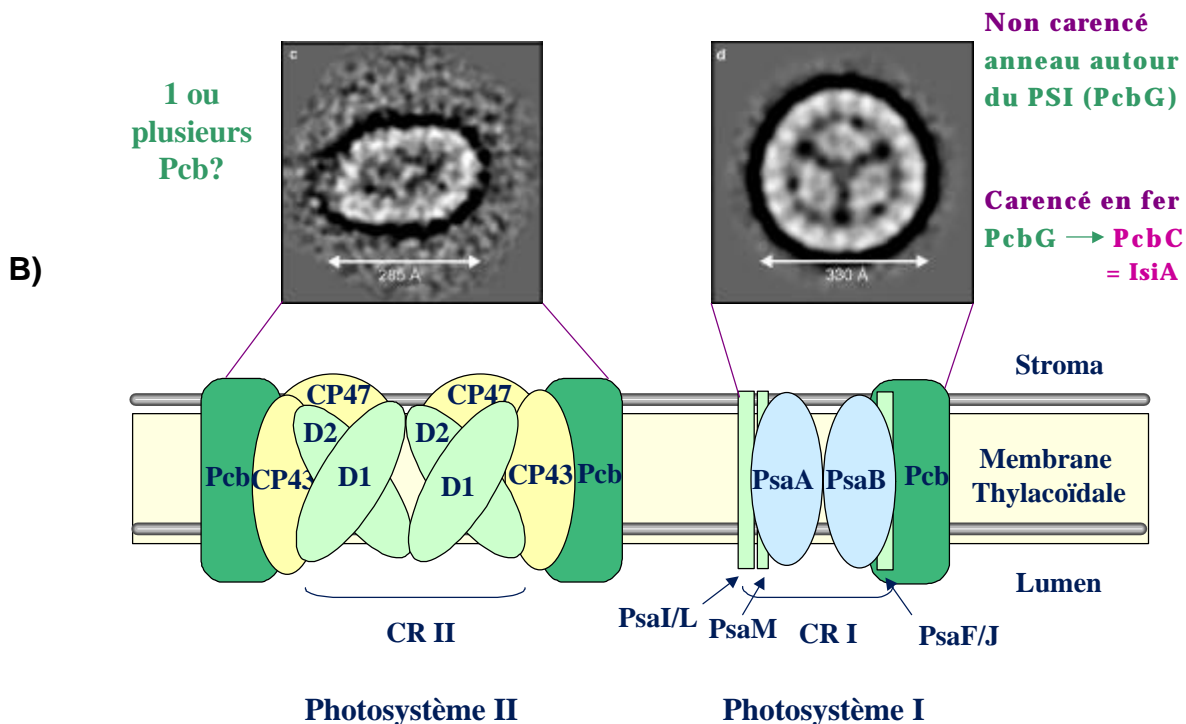
Figure 25. Arbre phylogénétique basé sur les séquences protéiques des Pcb des oxyphotobactéries et des IsiA de cyanobactéries d'eau douce.

Des études préliminaires réalisées en milieu supplémenté en fer ont montré que SS120 possède un supercomplexe PcbG-PS I similaire à celui induit chez les cyanobactéries d'eau douce en réponse à une carence en fer. Cependant, dans les mêmes conditions de culture, MIT9313 ne présente pas de supercomplexe et seule PcbA est retrouvée dans les fractions associées au PS II (Bibby *et al.*, 2001). De plus, quand les cellules sont cultivées en milieu supplémenté en fer, nous avons montré que seul le gène *pcbA* est exprimé. Cependant, quand les cellules sont transférées dans de l'eau de mer carencée en fer, l'expression de *pcbB* est activée, similairement à celle d'*isiB*. En revanche, l'expression de *pcbA*, comme celle de *psaA* et *psbA*, codant les protéines des centres réactionnels du PS I et PS II, est réprimée. La souche *Prochlorococcus* sp. MIT9313 possède donc à la fois un gène *pcb* (*pcbB*) induit par le fer codant une protéine associée au photosystème I, et un gène *pcb* (*pcbA*), réprimé lors d'une carence en fer, codant une protéine associée au photosystème II. De façon surprenante, en condition de carence en fer, l'expression du gène *pcbC* de SS120 augmente fortement alors que l'expression de *pcbG* est réprimée. Il semblerait alors que dans ces conditions, la protéine PcbC puisse remplacer PcbG dans les supercomplexes Pcb-PS I. Enfin, chez MED4, l'expression de l'unique *pcb* (*pcbA*) n'est pas modifiée significativement par la carence en fer et le produit de ce gène est associé au PS II (Figure 26). L'évolution des gènes *pcb* et leur différenciation fonctionnelle chez *Prochlorococcus* semblent alors être directement liées aux contraintes environnementales.

Appareil Photosynthétique de *Prochlorococcus marinus* MIT9313 (LL)



Appareil Photosynthétique de *Prochlorococcus marinus* SS120



Appareil Photosynthétique de *Prochlorococcus marinus* MED4 (HL)

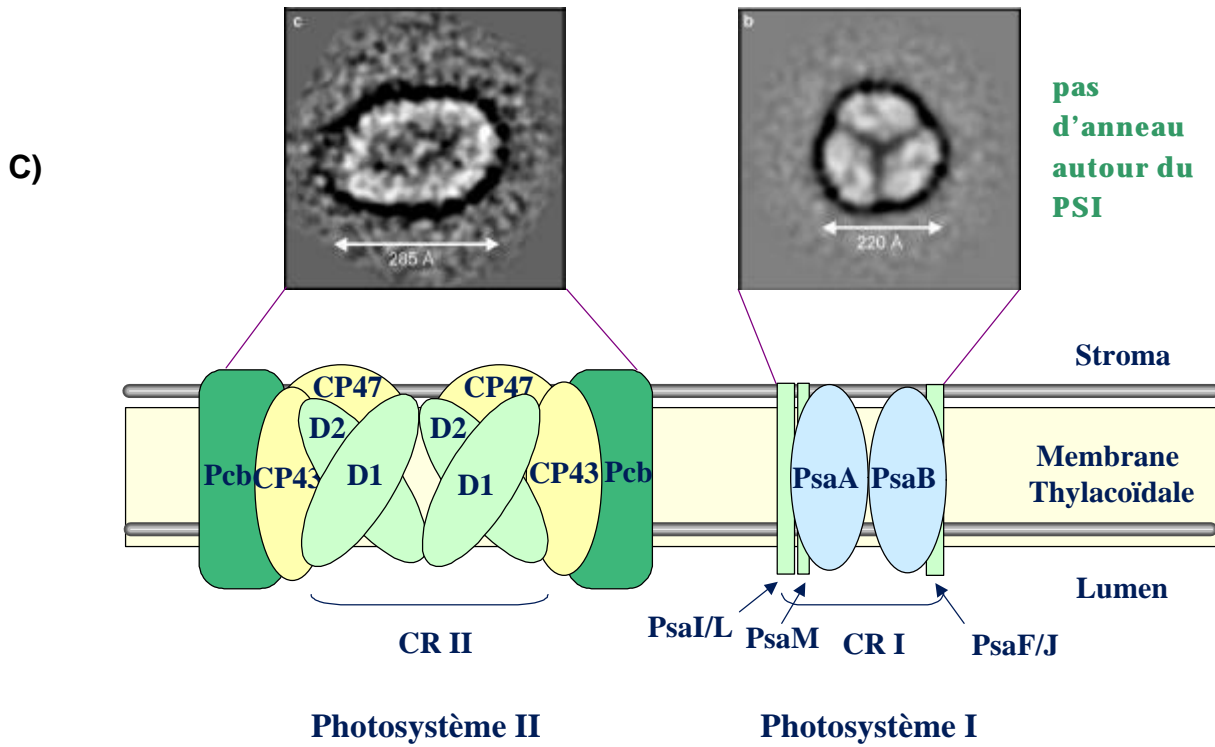


Figure 26. Schéma de l'appareil photosynthétiques de différentes souches de *Prochlorococcus*. A) *Prochlorococcus* MIT9313 ; B) *Prochlorococcus* SS120 ; C) *Prochlorococcus* MED4.

II. Article

CHAPITRE VI

Conclusions et Perspectives

CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I. Les techniques de mesure de l'expression des gènes

Ces dix dernières années, les études d'expression de gènes ont été significativement facilitées par le développement d'un certain nombre de méthodes telles que le « differential display », les micropuces à ADN ou la RT-PCR quantitative. Le differential display est une technique basée sur la RT-PCR qui utilise des amorces aléatoires afin d'amplifier le maximum de gènes exprimés dans la cellule (Liang & Pardee, 1992). En comparant deux conditions, cette méthode permet d'isoler les gènes qui sont exprimés différemment. Cette technique est particulièrement bien développée chez les eucaryotes (Liang *et al.*, 1993) mais encore peu répandue chez les cyanobactéries (Bhaya *et al.*, 2000) et les procaryotes en général pour lesquels elle est plus difficile à mettre en œuvre (faible reproductibilité, impossibilité d'isoler facilement les ARNs messagers ..., Fislage *et al.*, 1997). Les puces à ADN permettent de mesurer et de visualiser très rapidement les différences d'expression entre les gènes et ceci à l'échelle d'un génome complet. Elles permettent également l'analyse simultanée de nombreux gènes et la comparaison d'échantillons obtenus dans des conditions physiologiques diverses ouvrant ainsi un vaste champ d'applications. Etant donné que trois génomes de *Prochlorococcus* sont déjà disponibles, cette technique sera donc dans un avenir proche très utile pour les études globales d'expression de gènes chez cet organisme.

La principale technique utilisée dans cette étude a été la RT-PCR quantitative en temps réel. Cette technique présente un certain nombre d'avantages dont sa sensibilité, sa précision, la très faible quantité d'ARN nécessaire et l'absence de manipulation post-PCR. Enfin, le temps d'analyse est relativement rapide (2 à 3 heures) et les réplicats sont faciles à réaliser contrairement à la PCR compétitive, au Northern blot ou à la RPA (Ribonuclease Protection Assay), qui sont des techniques laborieuses et relativement longues. De plus, le grand avantage de la PCR quantitative en temps réel est qu'elle permet une quantification absolue ou relative du nombre de copies de gènes ou de messagers. La quantification absolue détermine le nombre exact de copies de gène dans un échantillon, généralement par comparaison avec une courbe standard (Li & Wang, 2000). La quantification relative détermine le niveau d'expression d'un gène d'un échantillon par rapport à un autre (contrôle non traité par exemple). La disponibilité de génomes complets permet de facilement mettre au point des amorces ciblant certaines catégories de gènes, comme cela a été fait au cours de cette thèse. Cette méthode constitue un excellent compromis pour quantifier l'expression d'un

nombre limité de gènes, de façon précise, sur un grand nombre d'échantillons, ce qui rend son application au milieu naturel particulièrement attractive (voir ci-dessous).

II. La réponse de l'adaptation des cyanobactéries au stress

Les cyanobactéries sont capables de s'acclimater à une gamme très large de conditions environnementales. Comme chez les autres organismes, un stress soudain va provoquer dans un premier temps l'arrêt de plusieurs fonctions cellulaires et stopper la croissance. Durant la période d'acclimatation qui suit, soit les processus cellulaires constitutifs sont réajustés, soit de nouvelles protéines sont induites afin de faire face à ces nouvelles conditions, menant à un nouvel état d'équilibre. Un certain nombre de ces processus d'acclimatation et, beaucoup de senseurs et autres membres de la chaîne de transduction du signal (histidine kinase et régulateur de réponse, facteur alternatif sigma, protéines phosphatases...) ont été identifiés et caractérisés chez les cyanobactéries. Ce travail de thèse qui s'est intéressé à trois niveaux de réponses différentes (système à deux composants, protéine heat shock, gènes de l'antenne photosynthétique) permet de suggérer un certain nombre de directions de recherche qui pourraient être développées dans le futur.

La présence des gènes Hik03/Rer06, homologues de PhoR/PhoB chez *Prochlorococcus* MED4, et leur absence ou la présence d'un codon stop dans la séquence de Hik03 chez les souches *Prochlorococcus* SS120 et MIT9313, est intéressante car MED4 est caractéristique des populations de surface des océans où il a été montré que le phosphate est limitant (Moore *et al.*, 1998) alors que les deux autres souches correspondent à des populations localisées en bas de la zone euphotique où le phosphate est en général abondant. Néanmoins, les études d'expression réalisées chez MED4 ont montré que ce gène semble s'exprimer également en réponse à une exposition à forte lumière et pourrait donc être impliqué dans des mécanismes de réponse au stress plus généraux. Des expériences complémentaires, comme l'étude de l'expression de ces deux gènes lors de carences nutritives (carence en phosphate en particulier), seraient donc nécessaires afin de pouvoir déterminer la spécificité de ce système.

La protéine senseur Hik04, seule histidine kinase transmembranaire de MED4, serait également intéressante pour une étude plus approfondie. En effet, elle montre une forte

similarité avec la protéine NblS de *Synechococcus* sp. PCC7942 (homologue de DspA de *Synechocystis* sp. PCC 6803; van Waasbergen *et al.*, 2001) qui interviendrait dans la détection des diminutions de températures et le contrôle de l'expression des gènes impliqués dans la photosynthèse lors de stress de forte lumière ou lors de carences en nutriments (Figure 25). Cette protéine pourrait donc jouer un rôle important dans la transduction de signal chez MED4. Le gène *hik04* est également intéressant puisque qu'il est localisé à proximité des gènes *kaiB* et *kaiC* impliqués dans la mise en place du rythme circadien chez les cyanobactéries. Cette organisation est très conservée dans les différentes souches de *Prochlorococcus* et la souche marine de *Synechococcus* WH8102. Contrairement à *Synechocystis*, MED4 et MIT9313 ne possèdent pas le gène *kaiA* codant une protéine capable d'activer *kaiB* and *kaiC*. D'autre part, il a été montré récemment que l'opéron *kaiABC* peut aussi être contrôlé par une histidine kinase chez *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 (Iwasaki *et al.*, 2000). Etant donné la difficulté d'obtenir des colonies sur milieu solide, les études génétiques ne sont pas encore réalisables chez *Prochlorococcus*. Une solution pour étudier la fonction de cette protéine serait de réaliser des expériences de complémentation hétérologue des mutants *dspA* (*Synechocystis*) ou *nblS* (*Synechococcus*).

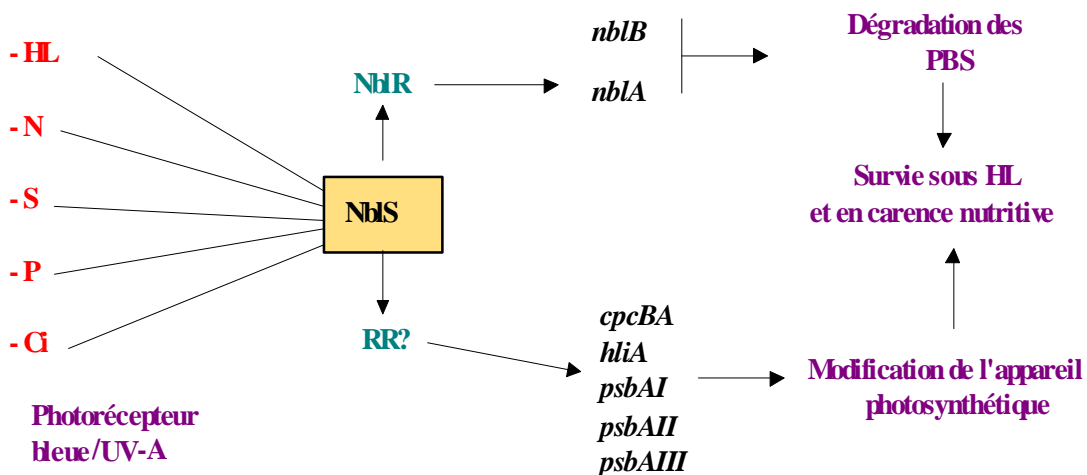


Figure 27. Modèle décrivant le rôle de NblS dans le contrôle des réponse au stress de forte lumière (HL) et aux carences nutritives (N : azote, S : soufre, P : phosphate, Ci : carbone inorganique), et dans le contrôle de certains processus liés à l'absorption directe de lumière bleue/UVA (D 'après van Waasbergen *et al.*, 2001).

De façon intéressante, la comparaison entre les écotypes de *Prochlorococcus* adaptés à forte et faible lumière a révélé des différences au niveau de la réponse heat-shock à une forte lumière. Ceci reflète une aptitude accrue des écotypes de surface à activer un plus grand nombre de gènes et à provoquer une réponse plus importante des gènes *hsp*, ce qui est cohérent avec les différentes niches écologiques occupées par ces deux écotypes. En effet, ce phénomène pourrait représenter une stratégie de survie liée à la croissance dans les eaux de surface des océans (Partensky *et al.*, 1999). Il faudra évidemment déterminer si les changements des niveaux de transcrits sont associés à des variations au niveau protéique.

De plus, certains gènes *hsp* semblent intéressants car ils sont exprimés spécifiquement chez MIT9313 (*grpE*) ou chez MED4 (*clpC*, *clpP2*, *clpP3*) en réponse au stress lumineux. Le même type d'expérience sur d'autres stress (stress nutritifs, choc thermique...) permettrait d'identifier, pour chaque souche, les gènes impliqués dans une réponse générale au stress et ceux qui répondent plus spécifiquement à certains facteurs. Enfin, il pourrait également être intéressant de suivre le profil d'expression des différents gènes *hsp* lors de cycles jour-nuit afin d'essayer de comprendre comment les cellules réagissent aux variations de lumière rencontrées tout au long de la journée dans leur milieu naturel.

La découverte chez *Prochlorococcus*, non pas d'un phycobilisome comme chez les cyanobactéries typiques, mais d'une antenne interne (complexes Pcb-chl a_2/b_2) a suscité un certain nombre de questions. Il est alors apparu intéressant de comprendre le rôle, la localisation et l'origine évolutive de ces protéines pigmentaires ainsi que la différence existant entre les souches du même genre. Chez SS120, l'anneau formé par les Pcb autour du trimère de PS I permettrait de maximiser la capture de l'énergie lumineuse en profondeur (Bibby *et al.*, 2001). Chez les cyanobactéries d'eau douce, le supercomplexe IsiA-PS I induit par une carence en fer semble compenser la réduction du niveau de PS I par rapport au niveau de PS II et la diminution de la synthèse des phycobiliprotéines (Bibby *et al.*, 2001). La découverte de gènes *pcb* induits lors d'une carence en fer (*isiA*-like) chez SS120 et MIT9313, est de ce fait non seulement intéressante d'un point de vue physiologique (réponse au stress) mais également d'un point de vue évolutif.

Au vu de ces résultats présentés dans cette thèse, on peut émettre des hypothèses quant à l'évolution des gènes *pcb* chez *Prochlorococcus*. Il est possible que l'ancêtre commun de

Prochlorococcus et des *Synechococcus* marins ait possédé un gène *isiA*-like, similaire à ceux trouvés chez les cyanobactéries. Un événement de duplication pourrait avoir eu lieu rapidement après la différenciation initiale de *Prochlorococcus*. La divergence d'une seconde copie du gène *isiA/pcb* aurait permis un changement de fonction et un re-ciblage vers le PS II, alors que la première copie du gène aurait conservé sa fonction de régulation associée au PS I. C'est cette situation qui est observée aujourd'hui chez MIT9313. En revanche, la souche SS120 serait plus évoluée et aurait multiplié à la fois les gènes *pcb* associés au PS I et au PS II, supprimant le promoteur contrôlé par le fer chez une des deux copies du *pcb* associé au PS I. La présence à la fois d'une antenne constitutive PS I et PS II conférerait à cette souche un avantage adaptatif pour se développer à très faible lumière comme dans le bas de la couche euphotique. Enfin, chez MED4, supposée la plus évoluée, un seul gène associé au PS II a été maintenu, probablement parce qu'avec une lumière suffisante, une antenne supplémentaire pour le PS I n'est pas nécessaire (Figure 26).

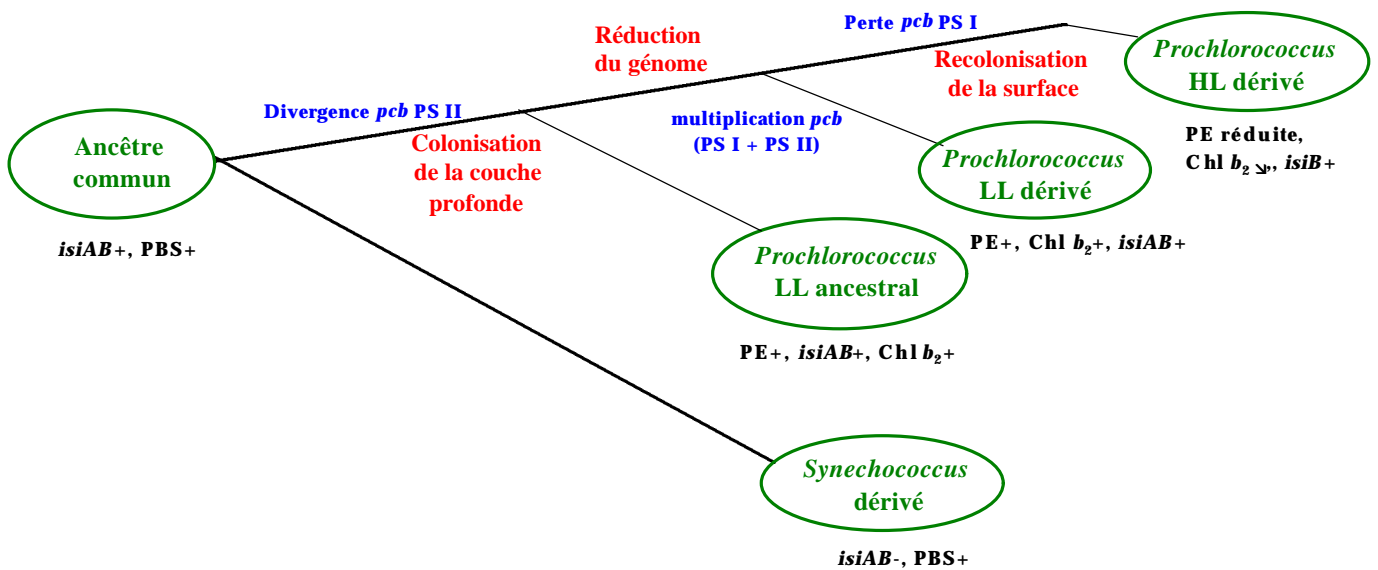


Figure 28. Scénario hypothétique de l'évolution de *Prochlorococcus*. LL= écotype de basse lumière, HL= écotype de haute lumière. Les événements évolutifs sont représentés en rouge. Les événements liés aux gènes *pcb* sont représentés en bleu.

III. Perspectives écologiques

Afin de comprendre la structure et le fonctionnement des écosystèmes marins, leurs réponses aux fluctuations des conditions environnementales à court et moyen terme, mais aussi leur évolution à plus long terme, il est indispensable d'étudier les mécanismes d'acclimatation et d'adaptation mis en place par les cyanobactéries pour répondre aux stress environnementaux. Ces 20 dernières années, l'essor des techniques de biologie moléculaire et de génétique a ouvert des perspectives considérables pour étudier ces phénomènes. La méthode la plus directe pour comprendre ces processus adaptatifs consiste à quantifier l'expression des gènes impliqués dans la réponse biologique aux variations environnementales. En effet, certains gènes permettent aux organismes de détecter les conditions de stress auxquelles ils sont soumis, puis de mettre en place des mécanismes pour se protéger (stress lumineux) ou pour compenser ces carences (stress nutritif). Ces gènes peuvent être spécifiques d'un stress ou d'une limitation, ou plus généraux. L'identification et la compréhension du fonctionnement de ces gènes et des protéines associées permettent d'élaborer des outils très sensibles (marqueurs moléculaires, Booth *et al.*, 2001), pour détecter la nature des facteurs limitants et leurs conséquences sur la distribution des communautés. Chez les cyanobactéries, différents gènes ont déjà été utilisés comme marqueurs de stress des populations. Par exemple, le niveau du transcrite du gène *ntcA*, codant un activateur transcriptionnel réprimé par l'ammonium, est induit chez *Synechococcus* lorsque les cellules sont soumises à une carence azotée (Lindell & Post, 2001). De la même façon, l'expression du gène *isiB* est un bon indicateur de l'état de carence en fer des cellules (Leonhardt & Straus, 1992). Une fois optimisés au laboratoire, ces marqueurs moléculaires pourront ensuite être utilisés pour déterminer le statut physiologique des populations dans différentes conditions de milieu. Une technique qui apparaît particulièrement prometteuse pour une utilisation en milieu océanique est la RT-PCR quantitative en temps réel, qui combine la sensibilité de la PCR et l'aspect quantitatif qui fait défaut aux autres techniques (voir partie I de la Conclusion). Ces propriétés devraient permettre de pallier la faible concentration de matériel vivant en milieu océanique tout en permettant l'analyse d'un grand nombre d'échantillons, indispensable dans un contexte océanographique (Holzendorff *et al.*, 2002).

Comme le gène *isiB*, les gènes *pcbB* chez MIT9313 ou *pcbC* chez SS120 pourraient constituer de bons marqueurs moléculaires de l'état physiologique des populations naturelles puisqu'ils semblent fortement exprimés conditions de carence en fer. De la même façon, les gènes *hsp*, notamment les gènes *groES/groEL* ou *dnaK*, sont connus pour être fortement

exprimés lors de certains stress ou carences et pourraient alors constituer de bons marqueurs moléculaires du stress en général. De manière plus générale, la disponibilité de quatre génomes complets de cyanobactéries marines combiné avec ces outils quantitatifs devraient amener au cours des dix prochaines années des modifications profondes de la manière d'étudier ces organismes dans les écosystèmes océaniques.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aiba, H., Nagaya, M. & Mizuno, T. (1993). Sensor and regulator proteins from the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC7942 that belong to the bacterial signal-transduction protein families: implication in the adaptative response to phosphate limitation. *Mol Microbiol* **8**, 81-91.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.

Appleby, J. L., Parkinson, J. S. & Bourret, R. B. (1996). Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* **86**, 845-8.

Apte, S. K., Fernandes, T., Badran, H. & Ballal, A. (1998). Expression and possible role of stress-responsive proteins in *Anabaena*. *J Biosci* **23**, 399–406.

Aravind, L. & Ponting, C. (1999). The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signaling proteins. *FEMS Microbiol Lett* **176**, 111-116.

Asada, K. (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In : Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants. *C.H. Foyer and P.M. Mullineaux, eds (Boca Raton, FL: CRC Press) , 77-104.*

Ashby, M. K. & Mullineaux, C. W. (1999). Cyanobacterial *ycf27* gene products regulate energy transfer from phycobilisomes to photosystems I and II. *FEMS Microbiol Lett* **181**, 253-260.

Ashby, M. K., Houmard, J. & Mullineaux, C. W. (2002). The *ycf27* genes from cyanobacteria and eukaryotic algae: distribution and implications for chloroplast evolution. *FEMS Microbiol Lett* **214**, 25-30.

- Bahl, H., Muller, H., Behrens, S., Joseph, H. & Narberhaus, F. (1995).** Expression of heat shock genes in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol Rev* **17**, 341-348.
- Bartsevich, V. & Shestakov, S. (1995).** The *dspA* gene product of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 influences sensitivity to chemically different growth inhibitors and has amino acid similarity to histidine protein kinases. *Microbiology*. **141**, 2915-2920.
- Behrenfeld, M. J., Bale, A. J., Zbigniew, S. K., Aiken, J. & Falkowski, P. J. (1996).** Confirmation of the iron limitation of phytoplankton photosynthesis in the equatorial Pacific Ocean. *Nature* **383**, 508-511.
- Bhaya, D., Vaultot, D., Amin, P., Takahashi, A. & Grossman, A. (2000).** Isolation of regulated genes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by differential display. *J Bacteriol* **182**, 5692-5699.
- Bhaya, D., Dufresne, A., Vaultot, D. & Grossman, A. (2002).** Analysis of the *hli* gene family in marine and freshwater cyanobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **215**, 209-19.
- Bibby, T. S., Nield, J. & Barber, J. (2001).** Iron deficiency induces the formation of an antenna ring around trimeric photosystem I in cyanobacteria. *Nature* **412**, 743-5.
- Bibby, T. S., Nield, J., Partensky, F. & Barber, J. (2001).** Oxyphotobacteria. antenna ring around photosystem I. *Nature* **413**, 590.
- Boekema, E. J., Hifney, A., Yakushevskaya, A. E., Piotrowski, M., Keegstra, W., Berry, S., Michel, K. P., Pistorius, E. K. & Kruijff, J. (2001).** A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria. *Nature* **412**, 745-748.
- Booth, M. G., Jeffrey, W. H. & Miller, R. V. (2001).** RecA Expression in Response to Solar UVR in the Marine Bacterium *Vibrio natriegens*. *Microb Ecol* **42**, 531-539.

- Borkovich, K. A., Kaplan, N., Hess, J. F. & Simon, M. I. (1989).** Transmembrane signal transduction in bacterial chemotaxis involves ligand-dependent activation of phosphate group transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1208-12.
- Bourret, R. B., Borkovich, K. A. & Simon, M. I. (1991).** Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* **60**, 401-41.
- Brown, J. L., North, S. & Bussey, H. (1993).** SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. *J Bacteriol* **175**, 6908-15.
- Bryant, D. A. (1981).** The photoregulated expression of multiple phycocyanin species. A general mechanism for the control of phycocyanin synthesis in chromatically adapting cyanobacteria. *Eur J Biochem* **119**, 425-9.
- Buchner, J. (1999).** Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci* **24**, 136-141.
- Bukau, B. & Horwich, A. L. (1998).** The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**, 351-66.
- Burnap, R. L., Troyan, T. & Sherman, L. A. (1993).** The highly abundant chlorophyll-protein complex of iron-deficient *Synechococcus* sp. PCC7942 (CP43') is encoded by the *isiA* gene. *Plant Physiol* **103**, 893-902.
- Bustos, S. A., Schaefer, M. R. & Golden, S. S. (1990).** Different and rapid responses of four cyanobacterial *psbA* transcripts to changes in light intensity. *J Bacteriol* **172**, 1998-2004.
- Campbell, L., Nolla, H. A. & Vault, D. (1994).** The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central North Pacific Ocean. *Limnol Oceanogr* **39**, 954-961.
- Campbell, E. L., Hagen, K. D., Cohen, M. F., Summers, M. L. & Meeks, J. C. (1996).** The *devR* gene product is characteristic of receivers of two-component regulatory systems and is essential for heterocyst development in the filamentous cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC 29133. *J Bacteriol* **178**, 2037-43.

- Caplan, A. J., Cyr, D. M. & Douglas, M. G. (1993).** Eukaryotic homologues of *Escherichia coli* dnaJ: a diverse protein family that functions with hsp70 stress proteins. *Mol Biol Cell* **4**, 555-63.
- Chang, C., Kwok, S. F., Bleecker, A. B. & Meyerowitz, E. M. (1993).** Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two- component regulators. *Science* **262**, 539-44.
- Cheng, M. Y., Hartl, F. U., Martin, J., Pollock, R. A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E. M., Hallberg, R. L. & Horwich, A. L. (1989).** Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* **337**, 620-5.
- Chiang, G. G., Schaefer, M. R. & Grossman, A. R. (1992).** Complementation of a red-light-indifferent cyanobacterial mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9415-9.
- Chisholm, S. W. (1992).** Phytoplankton size. In *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea*, pp. 213-237. Edited by P. G. Falkowski & A. D. Woodhead. New york: Plenum Press.
- Chitnis, P. R. & Nelson, N. (1991).** Molecular cloning of the genes encoding two chaperone proteins of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* **266**, 58-65.
- Chow, W. S. (1994).** Photoprotection and photoinhibitory damage. In *Advances in molecular and cell biology, molecular processes of photosynthesis*, pp. 151-196. Edited by J. Barber. Connecticut: Jai Press.
- Chow, K. C. & Tung, W. L. (1998).** Overexpression of dnaK/dnaJ and groEL confers freeze tolerance to *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 502-5.
- Clarke, A. K., Soitamo, A., Gustafsson, P. & Oquist, G. (1993).** Rapid interchange between two distinct forms of cyanobacterial photosystem II reaction-center protein D1 in response to photoinhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9973-7.

- Clarke, A. K. & Eriksson, M. J. (1996).** The cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 possesses a close homologue to the chloroplast ClpC protein of higher plants. *Plant Molecular Biology* **31**, 721-730.
- Clarke, A. K., Schelin, J. & Porankiewicz, J. (1998).** Inactivation of the *clpP1* gene for the proteolytic subunit of the ATP- dependent Clp protease in the cyanobacterium *Synechococcus* limits growth and light acclimation. *Plant Mol Biol* **37**, 791-801.
- Collier, J. L. & Grossman, A. R. (1992).** Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *J Bacteriol* **174**, 4718-26.
- Collier, J. L. & Grossman, A. R. (1994).** A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria. *Embo J* **13**, 1039-47.
- Conway de Macario, E., Dugan, C. B. & Macario, A. J. (1994).** Identification of a *grpE* heat-shock gene homolog in the archaeon *Methanosarcina mazei*. *J Mol Biol* **240**, 95-101.
- Cotner, J. B., Peele, E. R., Bentzen, E. & Ammerman, J. W. (1997).** Phosphorus-limited plankton growth in the Sargasso Sea. *Aquat Microb Ecol* **13**, 141-9.
- Craig, E. A., Gambill, B. D. & Nelson, R. J. (1993).** Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Rev* **57**, 402-414.
- D'Agostino, I. B., Deruere, J. & Kieber, J. J. (2000).** Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol* **124**, 1706-1717.
- Dahl, M. K., Msadek, T., Kunst, F. & Rapoport, G. (1992).** The phosphorylation state of the DegU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **267**, 14509-14.
- de Hostos, E. L., Togasaki, R. K. & Grossman, A. (1988).** Purification and biosynthesis of a derepressible periplasmic arylsulfatase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* **106**, 29-37.

- De Saizieu, A., Certa, U., Warrington, J., Gray, C., Keck, W. & Mous, J. (1998).** Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* **16**, 45-48.
- Derre, I., Rapoport, G. & Msadek, T. (1999).** CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **31**, 117-31.
- Diamant, S., Ben-Zvi, A. P., Bukau, B. & Goloubinoff, P. (2000).** Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery. *J Biol Chem* **275**, 21107-13.
- Ellis, R. J. & Hartl, F. U. (1999).** Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 102-10.
- Eriksson, M. J. & Clarke, A. K. (1996).** The heat shock protein ClpB mediates the development of thermotolerance in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* **178**, 4839-46.
- Eriksson, M. J. & Clarke, A. K. (2000).** The *Escherichia coli* heat shock protein ClpB restores acquired thermotolerance to a cyanobacterial *clpB* deletion mutant. *Cell Stress Chaperones* **5**, 255-64.
- Eriksson, M. J., Schelin, J., Miskiewicz, E. & Clarke, A. K. (2001).** Novel form of ClpB/HSP100 protein in the cyanobacterium *Synechococcus*. *J Bacteriol* **183**, 7392-7396.
- Ewalt, K. L., Hendrick, J. P., Houry, W. A. & Hartl, F. U. (1997).** In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* **90**, 491-500.
- Fabret, C., Feher, V. A. & Hoch, J. A. (1999).** Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J Bacteriol* **181**, 1975-83.

- Falk, S., Samson, G., Bruce, D., Huner, N. P. A. & Laudenbach, D. E. (1995).** Functional analysis of the iron-stress induced CP 43' polypeptide of PS II in the cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC 7942. *Photosynth Res* **45**, 51-60.
- Fayet, O., Ziegelhoffer, T. & Georgopoulos, C. (1989).** The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol* **171**, 1379-85.
- Fislage, R., Berceanu, M., Humboldt, Y., Wendt, M. & Oberender, H. (1997).** Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **25**, 1830-5.
- Freeman, B. C. & Morimoto, R. I. (1996).** The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *Embo J* **15**, 2969-79.
- Garcia-Fernandez, J. M., Hess, W. R., Houmard, J. & Partensky, F. (1998).** Expression of the *psbA* gene in the marine oxyphotobacteria *Prochlorococcus* spp. *Arch Biochem Biophys* **359**, 17-23.
- Garcia-Dominguez, M., Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C. & Florencio, F. J. (2000).** Light-dependent regulation of cyanobacterial phytochrome expression. *J Bacteriol* **182**, 38-44.
- Garczarek, L., Hess, W. R., Holtzendorff, J., van der Staay, G. W. & Partensky, F. (2000).** Multiplication of antenna genes as a major adaptation to low light in a marine prokaryote. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4098-101.
- Garczarek L., van der Staay G. W., Hess W. R., Le Gall F. & Partensky F. (2001).** Expression and phylogeny of the multiple antenna genes of the low-light-adapted strain *Prochlorococcus marinus* SS120. *Plant Mol Biol* **46**, 683-693.
- Gegner, J. A., Graham, D. R., Roth, A. F. & Dahlquist, F. W. (1992).** Assembly of an MCP receptor, CheW, and kinase CheA complex in the bacterial chemotaxis signal transduction pathway. *Cell* **70**, 975-82.

Georgopoulos, C., Liberek, K., Zylicz, M. & Ang, D. (1994). Properties of the heat shock proteins of *Escherichia coli* and the autoregulation of the heat shock response. In : R. I. Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgopoulos (ed), *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y. , 209-249.

Gething, M. J. & Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45.

Glatz, A., Horvath, I., Varvasovszki, V., Kovacs, E., Torok, Z. & Vigh, L. (1997). Chaperonin genes of the *Synechocystis* PCC 6803 are differentially regulated under light-dark transition during heat stress. *Biochem Biophys Res Commun* **239**, 291-7.

Glatz, A., Vass, I., Los, D. A. & Vigh, L. (1999). The *Synechocystis* model of stress: From molecular chaperones to membranes. *Plant Physiol Biochem* **37**, 1-12.

Glover, J. R. & Lindquist, S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**, 73-82.

Goericke, R. & Repeta, D. J. (1992). The pigments of *Prochlorococcus marinus* : the presence of divinyl chlorophyll *a* and *b* in a marine prochlorophyte. *Limnol Oceanogr* **37**, 425-433.

Goericke, R. & Welschmeyer, N. A. (1993). The marine prochlorophyte *Prochlorococcus* contributes significantly to phytoplankton biomass and primary production in the Sargasso Sea. *Deep-Sea Res* **40**, 2283-2294.

Golden, S. S., Brusslan, J. & Haselkorn, R. (1986). Expression of a family of *psbA* genes encoding a photosystem II polypeptide in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *EMBO J* **5**, 2789-2798.

Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A. P., Tomoyasu, T. & Bukau, B. (1999). Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13732-7.

Gottesman, S. & Maurizi, M. R. (1992). Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol Rev* **56**, 592-621.

Gottesman, S. (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **30**, 465-506.

Gottesman, S., Wickner, S. & Maurizi, M. R. (1997). Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev* **11**, 815-823.

Gottesman, S. (1998). Protecting the neighborhood: extreme measures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2731-2.

Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y. & Sauer, R. T. (1998). The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev* **12**, 1338-47.

Grebe, T. W. & Stock, J. B. (1999). The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol* **41**, 139-227.

Green, B. R. & Durnfold, D. G. (1996). The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 685-714.

Green, L. S. & Grossman, A. R. (1988). Changes in sulfate transport characteristics and protein composition of *Anacystis nidulans* R2 during sulfur deprivation. *J Bacteriol* **170**, 583-7.

Grimaud, R., Kessel, M., Beuron, F., Steven, A. C. & Maurizi, M. R. (1998). Enzymatic and structural similarities between the *Escherichia coli* ATP- dependent proteases, ClpXP and ClpAP. *J Biol Chem* **273**, 12476-81.

Grossman, A., Bhaya, D. & Collier, J. L. (1994). Specific and general responses of cyanobacteria to macronutrient deprivation. In *Torriani-Gorini A, Yagil E and Silver S (eds) Phosphate in Microorganisms*. ASM Press, Washington, DC , 112-118.

Grossman, A. R., Bhaya, D., Apt, K. E. & Kehoe, D. M. (1995). Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: diversity, control and evolution. *Annu Rev Genet* **29**, 231-288.

Grossman, A. & Kehoe, D. M. (1997). Phosphorelay control of phycobilisome biogenesis during complementary chromatic adaptation. *Photosyn Res* **53**, 95-108.

Hakenbeck, R. & Stock, J. ,B. (1996). Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. *Methods Enzymol.* **273**, 281-300.

Hall, H. K., Karem, K. L. & Foster, J. W. (1995). Molecular responses of microbes to environmental pH stress. *Adv Microb Physiol* **37**, 229-72.

Hankamer B., Nield J., Zheleva D., Boekema E., Jansson S. & Barber J. (1997). Isolation and biochemical characterization of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II in vivo. *Eur J Biochem* **243**, 422-429.

Harrison, C. J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., Hartl, F. & Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science* **276**, 431-5.

Hawes, I. (1990). Eutrophication and vegetation development in maritime Antarctic lakes. *In Kerry KR and Hempel G (eds) Antarctic Ecosystems. Ecological Change and Conservation. Springer- Verlag, Berlin , 83-90.*

He, Q., Dolganov, N., Bjorkman, O. & Grossman, A. R. (2001). The high light-inducible polypeptides in *Synechocystis* PCC6803. Expression and function in high light. *J Biol Chem* **276**, 306-14.

Hecker, M., Schumann, W. & Volker, U. (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**, 417-28.

- Hecker, M. & Volker, U. (1998).** Non-specific, general and multiple stress resistance of growth- restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the sigmaB regulon. *Mol Microbiol* **29**, 1129-36.
- Herman, C. & D'Ari, R. (1998).** Proteolysis and chaperones: the destruction/reconstruction dilemma. *Curr Opin Microbiol* **1**, 204-9.
- Hess, J. F., Bourret, R. B. & Simon, M. I. (1988).** Histidine phosphorylation and phosphoryl group transfer in bacterial chemotaxis. *Nature* **336**, 139-43.
- Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A. & Ikeuchi, M. (2001).** DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell* **13**, 793-806.
- Hirani, T., Suzuki, I., Murata, N., Hayashi, H. & Eaton-Rye, J. J. (2001).** Characterization of a two-component signal transduction system involved in the induction of alkaline phosphatase under phosphate-limiting conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol.* **45**, 133-144.
- Hoch, J. A. & Silhavy, T. J. (1995).** Two-Component Signal Transduction. *ASM Press, Washington DC* .
- Holm-Hansen, O., Lubin, D. & Heibling, E. W. (1993).** Ultraviolet radiation and its effect on organisms in aquatic environments. *In: Young AR, Bjorn LO, Moan J, and Nultsch W (eds) Environmental UV Photobiology* , 319-425.
- Holtendorff, J., Partensky, F., Jacquet, S., Bruyant, F., Marie, D., Garczarek, L., Mary, I., Vaultot, D. & Hess, W. R. (2001).** Diel expression of cell cycle-related genes in synchronized cultures of *Prochlorococcus* sp. strain PCC 9511. *J Bacteriol* **183**, 915-920.
- Holzendorff, J., Marie, D., Post, A., Partensky, F., Rivlin, A. & Hess, W. R. (2002).** Synchronized expression of *ftsZ* in natural *Prochlorococcus* populations of the Red Sea. *Environ Microbiol* **4**, 644-53.
- Homuth, G., Mogk, A. & Schumann, W. (1999).** Post-transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis dnaK* operon. *Mol Microbiol* **32**, 1183-97.

- Horton, P., Ruban, A. V. & Walters, R. G. (1996).** Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 655-684.
- Horváth, I., Glatz, A., Varvasovszki, V., Török, Z., Páli, T., Balogh, G., Kovács, E., Nádasdi, L., Benkő, S., Joó, F. & Vígh, L. (1998).** Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of *hsp17* as a "fluidity gene". *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 3513-3518.
- Hossain, M. M. & Nakamoto, H. (2002).** HtpG plays a role in cold acclimation in cyanobacteria. *Curr Microbiol* **44**, 291-6.
- Hossain, M. M. & Nakamoto, H. (2003).** Role for the cyanobacterial HtpG in protection from oxidative stress. *Curr Microbiol* **46**, 70-6.
- Howarth, R. W., Marino, R. & Cole, J. J. (1988).** Nitrogen fixation in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. 2. Biogeochemical controls. *Limnol Oceanogr* **33**, 688-701.
- Huang, L., McCluskey, M. P., Ni, H. & LaRossa, R. A. (2002).** Global gene expression profiles of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 in response to irradiation with UV-B and white light. *J Bacteriol* **184**, 6845-58.
- Hughes, J., Lamparter, T., Mittmann, F., Hartmann, E., Gartner, W., Wilde, A. & Borner, T. (1997).** A prokaryotic phytochrome. *Nature* **386**, 663.
- Hulett, F. M. (1996).** The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**, 933-939.
- Hwang, B. J., Park, W. J., Chung, C. H. & Goldberg, A. L. (1987).** *Escherichia coli* contains a soluble ATP-dependent protease (Ti) distinct from protease La. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5550-4.
- Ishiura, M., Kutsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C. R., Tanabe, A., Golden, S. S., Johnson, C. H. & Kondo, T. (1998).** Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* **281**, 1519-1523.

- Jakob, U., Lilie, H., Meyer, I. & Buchner, J. (1995).** Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo. *J Biol Chem* **270**, 7288-7294.
- Jordan P., Fromme P., Witt H. T., Klukas O., Saenger W., Krauss N. (2001).** Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411**, 909-917.
- Jung, K., Tjaden, B. & Altendorf, K. (1997).** Purification, reconstitution, and characterization of KdpD, the turgor sensor of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**, 10847-52.
- Kamberov, E. S., Atkinson, M. R., Chandran, P. & Ninfa, A. J. (1994).** Effect of mutations in *Escherichia coli glnL (ntrB)*, encoding nitrogen regulator II (NRII or NtrB), on the phosphatase activity involved in bacterial nitrogen regulation. *J Biol Chem* **269**, 28294-9.
- Kamiya, N. & Shen, J. R. (2003).** Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 98-102.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. & Tabata, S. (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 Res* **3**, 109-136.
- Kaneko, T. & Tabata, S. (1997).** Complete genome structure of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol* **38**, 1171-1176.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., Yamada, M., Yasuda, M. & Tabata, S. (2001). Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res* **8**, 205-13; 227-53.

Kehoe, D. M. & Grossman, A. R. (1996). Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* **273**, 1409-12.

Kehoe, D. M. & Grossman, A. R. (1997). New classes of mutants in complementary chromatic adaptation provide evidence for a novel four-step phosphorelay system. *J Bacteriol* **179**, 3914-21.

Kim, D. & Forst, S. (2001). Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology* **147**, 1197-1212.

Kovacs, E., van der Vies, S. M., Glatz, A., Torok, Z., Varvasovszki, V., Horvath, I. & Vigh, L. (2001). The chaperonins of *Synechocystis* PCC 6803 differ in heat inducibility and chaperone activity. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 908-15.

Kruger, E., Volker, U. & Hecker, M. (1994). Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. *J Bacteriol* **176**, 3360-3367.

Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M. K. & Hartl, F. U. (1992). Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356**, 683-9.

LaRoche, J., Boyd, P. W., McKay, R. M. L. & Geider, R. J. (1996). Flavodoxin as an *in situ* marker for iron stress in phytoplankton. *Nature* **382**, 802-805.

LaRoche, J., van der Staay, G. W., Partensky, F., Ducret, A., Aebersold, R., Li, R., Golden, S. S., Hiller, R. G., Wrench, P. M., Larkum, A. W. & Green, B. R. (1996). Independent evolution of the prochlorophyte and green plant chlorophyll *a/b* light-harvesting proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15244-8.

- Laudenbach, D. E. & Straus, N. A. (1988).** Characterization of a cyanobacterial iron stress-induced gene similar to *psbC*. *J Bacteriol* **170**, 5018-26.
- Lee, S. Y., Prochaska, D. J., Fang, F. & Barnum, S. R. (1998).** A 16.6-kilodalton protein in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 plays a role in the heat shock response. *Curr Microbiol* **37**, 403-407.
- Lee, S. Y., Owen, H. A., Prochaska, D. J. & Barnum, S. R. (2000).** HSP16.6 is involved in the development of thermotolerance and thylakoid stability in the unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Curr Microbiol* **40**, 283-287.
- Lehel, C., Los, D., Wada, H., Gyorgyei, J., Horvath, I., Kovacs, E., Murata, N. & Vigh, L. (1993).** A second *groEL*-like gene, organized in a *groESL* operon is present in the genome of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* **268**, 1799-804.
- Lemos, J. A., Chen, Y. Y. & Burne, R. A. (2001).** Genetic and physiologic analysis of the *groE* operon and role of the HrcA repressor in stress gene regulation and acid tolerance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **183**, 6074-6084.
- Leonhardt, K. & Straus, N.A. (1992).** An iron stress operon involved in photosynthetic electron transport in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *J Gen Microbiol* **138**, 1613-21.
- Levchenko, I., Luo, L. & Baker, T. (1995).** Disassembly of the Mu transposase tetramer by the ClpX chaperone. *Genes Dev.* **9**, 2399-2408.
- Li, H. & Sherman, L. A. (2000).** A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J Bacteriol* **182**, 4268-77.
- Li, X. & Wang, X. (2000).** Application of real-time polymerase chain reaction for the quantitation of interleukin-1beta mRNA upregulation in brain ischemic tolerance. *Brain Res Brain Res Protoc* **5**, 211-7.

- Liang, J., Scappino, L. & Haselkorn, R. (1992).** The *patA* gene product, which contains a region similar to CheY of *Escherichia coli*, controls heterocyst pattern formation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5655-9.
- Liang, P. & Pardee, A. B. (1992).** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-71.
- Liang, P., Averboukh, L. & Pardee, A. B. (1993).** Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res* **21**, 3269-75.
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. & Zylicz, M. (1991).** *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2874-8.
- Lindell, D. & Post, A. F. (2001).** Ecological aspects of *ntcA* gene expression and its use as an indicator of the nitrogen status of marine *Synechococcus* spp. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3340-9.
- Lindquist, S. & Craig, E. A. (1988).** The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* **22**, 631-77.
- Liu, W., Qi, Y. & Hulett, F. M. (1998).** Sites internal to the coding regions of *phoA* and *pstS* bind PhoP and are required for full promoter activity. *Mol Microbiol* **28**, 119-130.
- Liu, Y., Levit, M., Lurz, R., Surette, M. G. & Stock, J. B. (1997).** Receptor-mediated protein kinase activation and the mechanism of transmembrane signaling in bacterial chemotaxis. *Embo J* **16**, 7231-40.
- Llorca, O., Galan, A., Carrascosa, J. L., Muga, A. & Valpuesta, J. M. (1998).** GroEL under heat-shock. Switching from a folding to a storing function. *J Biol Chem* **273**, 32587-3294.
- Loiseaux-de Goër, S. (1994).** Plastid lineages. In *Progress in Phycological Research*, pp. 137-177. Edited by F. E. Round & D. J. Chapman: Biopress Ltd.

Loomis, W. F., Shaulsky, G. & Wang, N. (1997). Histidine kinases in signal transduction pathways of eukaryotes. *J Cell Sci* **110**, 1141-5.

Lupas, A. & Stock, J. (1989). Phosphorylation of an N-terminal regulatory domain activates the CheB methylesterase in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **264**, 17337-42.

Macario, A. J., Simon, V. H. & Conway de Macario, E. (1995). An archaeal gene upstream of *grpE* different from eubacterial counterparts. *Biochim Biophys Acta* **1264**, 173-7.

Macario, A. J., Lange, M., Ahring, B. K. & De Macario, E. C. (1999). Stress genes and proteins in the archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 923-967.

Mally, A. & Witt, S. N. (2001). GrpE accelerates peptide binding and release from the high affinity state of DnaK. *Nat Struct Biol* **8**, 254-7.

Mann, N. H. & Scanlan, D. J. (1994). The SphX protein of *Synechococcus* species PCC 7942 belongs to a family of phosphate-binding proteins. *Mol Microbiol* **14**, 595-6.

Martin, J. H., Coale, K. H., Johnson, K. S., Fitzwater, S. E., Gordon, R. M., Tanner, S. J., Hunter, C. N., Elrod, V. A., Nowicki, J. L., Coley, T. L., Barber, R. T., Lindley, S., Watson, A. J., Van Scoy, K., Law, C. S., Liddicoat, M. I., Ling, R., Stanton, T., Stockel, J., Collins, C., Anderson, A., Bidigare, R., Ondrusek, M., Latasa, M., Millero, F. J., Lee, K., Yao, W., Zhang, J. Z., Friederich, G., Sakamoto, C., Chavez, F., Buck, K., Kolber, Z., Greene, R., Falkowski, P., Chsiholm, S. W., Hoge, F., Swift, R., Yungel, J., Turner, S., Nightingale, P., Hatton, A., Liss, P. & Tindale, N. W. (1994). Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. *Nature, London* **371**, 123-129.

Martin, J. & Hartl, F. U. (1997). Chaperone-assisted protein folding. *Curr Opin Struct Biol* **7**, 41-52.

Martin, J. & Hartl, F. U. (1997). Chaperone-assisted protein folding. *Curr Opin Struct Biol* **7**, 41-52.

- Mary, I. & Vault, D. (2003).** Two-component systems in *Prochlorococcus* MED4: Genomic analysis and differential expression under stress. *FEMS Microbiol. Lett.* (submitted).
- Maurizi, M. R., Clark, W. P., Kim, S. H. & Gottesman, S. (1990).** ClpP represents a unique family of serine proteases. *J Biol Chem* **265**, 12546-12552.
- Miao, B., Davis, J. E. & Craig, E. A. (1997).** Mge1 functions as a nucleotide release factor for Ssc1, a mitochondrial Hsp70 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **265**, 541-52.
- Mizuno, T., Kaneko, T. & Tabata, S. (1996).** Compilation of all genes encoding Bacterial Two-component Signal Transducers in the Genome of Cyanobacterium, *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *DNA Research* **3**, 407-414.
- Mizuno, T. (1997).** Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res* **4**, 161-8.
- Mizuno, T. (1998).** His-Asp phosphotransfer signal transduction. *J Biochem (Tokyo)* **123**, 555-63.
- Mogk, A., Homuth, G., Scholz, C., Kim, L., Schmid, F. X. & Schumann, W. (1997).** The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Embo J* **16**, 4579-90.
- Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rudiger, S., Roder, D., Langen, H. & Bukau, B. (1999).** Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *Embo J* **18**, 6934-49.
- Moore, L. R., Goericke, R. & Chisholm, S. W. (1995).** Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Mar Ecol Prog Ser* **116**, 259-275.
- Moore, L. R., Rocap, G. & Chisholm, S. W. (1998).** Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* **393**, 464-467.

Moore, L. R., Rocap, G. & Chisholm, S.W. (1998). Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Nature* **393**, 464-467.

Moore, L.R. & Chisholm, S.W. (1999). Photophysiology of the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*: Ecotypic differences among cultured isolates. *Limnol. Oceanogr* **44**, 628-638.

Morel, A., Ahn, Y.-W., Partensky, F., Vaultot, D. & Claustre, H. (1993). *Prochlorococcus* and *Synechococcus*: a comparative study of their size, pigmentation and related optical properties. *Journal of Marine Research* **51**, 617-649.

Morimoto, R. I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* **12**, 3788-96.

Motohashi, K., Watanabe, Y., Yohda, M. & Yoshida, M. (1999). Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK.J-GrpE set and ClpB chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7184-9.

Msadek, T., Kunst, F. & Rapoport, G. (1994). MecB of *Bacillus subtilis*, a member of the ClpC ATPase family, is a pleiotropic regulator controlling competence gene expression and growth at high temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5788-5792.

Nagaya, M., Aiba, H. & Mizuno, T. (1993). Cloning of a sensory-kinase-encoding gene that belongs to the two- component regulatory family from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Gene* **131**, 119-24.

Nagaya, M., Aiba, H. & Mizuna, T. (1994). The *sphR* product, a two-component system response regulator protein, regulates phosphate assimilation in *Synechococcus* sp. strain PCC7942 by binding to two sites upstream from the *phoA* promoter. *J Bacteriol* **176**, 2210-2215.

- Nakamoto, H., Suzuki, N. & Roy, S. K. (2000).** Constitutive expression of a small heat-shock protein confers cellular thermotolerance and thermal protection to the photosynthetic apparatus in cyanobacteria. *FEBS Lett* **483**, 169-174.
- Nelson, K. E., Clayton, R. A., Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Nelson, W. C., Ketchum, K. A., McDonald, L., Utterback, T. R., Malek, J. A., Linher, K. D., Garrett, M. M., Stewart, A. M., Cotton, M. D., Pratt, M. S., Phillips, C. A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Eisen, J. A., Fraser, C. M. & et al. (1999).** Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**, 323-9.
- Netzer, W. J. & Hartl, F. U. (1998).** Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem Sci* **23**, 68-73.
- Nimura, K., Yoshikawa, H. & Takahashi, H. (1994).** Identification of *dnaK* multigene family in *Synechococcus* sp. PCC7942. *Biochem Biophys Res Commun* **201**, 466-71.
- Nimura, K., Takahashi, H. & Yoshikawa, H. (2001).** Characterization of the *dnaK* multigene family in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *J Bacteriol* **183**, 1320-8.
- Ninfa, A. J. & Magasanik, B. (1986).** Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5909-13.
- Ninfa, E. G., Stock, A., Mowbray, S. & Stock, J. (1991).** Reconstitution of the bacterial chemotaxis signal transduction system from purified components. *J Biol Chem* **266**, 9764-70.
- Nixon, B. T., Ronson, C. W. & Ausubel, F. M. (1986).** Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7850-4.

- Oguchi, K., Nimura, K., Yoshikawa, H. & Takahashi, H. (1997).** Sequence and analysis of a *dnaJ* homologue gene in Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **236**, 461-466.
- Ohlsen, K. L., Grimsley, J. K. & Hoch, J. A. (1994).** Deactivation of the sporulation transcription factor Spo0A by the Spo0E protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1756-60.
- Omata, T., Andriesse, X. & Hirano, A. (1993).** Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Mol Gen Genet* **236**, 193-202.
- Padan, E. & Cohen, Y. (1982).** Anoxygenic photosynthesis. In : Carr NG and Whitton BA (eds) *The biology of Cyanobacteria*. Blackwell, Oxford, and University of Clifornia Press, Berkeley , 215-235.
- Pakrasi, H. B., Goldenberg, A. & Sherman, L. A. (1985).** Membrane development in the cyanobacterium, *Anacystis nidulans* during recovery from iron starvation. *Plant Physiol* **79**, 290-295.
- Park, Y. I., Sandstrom, S., Gustafsson, P. & Oquist, G. (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. *Mol Microbiol* **32**, 123-129.
- Parkinson, J. C. & Kofoid, E. C. (1992).** Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**, 71-112.
- Parsell, D. A. & Lindquist, S. (1993).** The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* **27**, 437-96.
- Parsell, D. A., Kowal, A. S., Singer, M. A. & Lindquist, S. (1994).** Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**, 475-478.

- Partensky, F., LaRoche, J., Wyman, K. & Falkowski, P. G. (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. *Photosynth Res* **51**, 209-222.
- Partensky, F., Hess, W. R. & Vaulot, D. (1999).** *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 106-127.
- Partensky, F. & Garczarek, L. (2003).** The photosynthetic apparatus of chlorophyll b- and d-containing oxyphotobacteria. In *Photosynthesis in Algae. Advances in Photosynthesis Series, Vol.13* (ed. Larkum A.W.D.) (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands) (in press).
- Perego, M., Hanstein, C., Welsh, K. M., Djavakhishvili, T., Glaser, P. & Hoch, J. A. (1994).** Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell* **79**, 1047-55.
- Porankiewicz, J. & Clarke, A. K. (1997).** Induction of the heat shock protein ClpB affects cold acclimation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* **179**, 5111-5117.
- Porankiewicz, J., Schelin, J. & Clarke, A. K. (1998).** The ATP-dependent Clp protease is essential for acclimation to UV-B and low temperature in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Mol Microbiol* **29**, 275-283.
- Porankiewicz, J., Wang, J. & Clarke, A. (1999).** New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol Microbiol* **32**, 449-458.
- Potts, M. (1994).** Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* **58**, 755-805.
- Prasad, J., McJarrow, P. & Gopal, P. (2003).** Heat and Osmotic Stress Responses of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in Relation to Viability after Drying. *Appl Environ Microbiol* **69**, 917-25.

- Pratt, L. A. & Silhavy, T. J. (1995).** Identification of base pairs important for OmpR-DNA interaction. *Mol Microbiol* **17**, 565-73.
- Queitsch, C., Hong, S. W., Vierling, E. & Lindquist, S. (2000).** Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 479-92.
- Rajaram, H., Ballal, A. D., Apte, S. K., Wiegert, T. & Schumann, W. (2001).** Cloning and characterization of the major *groESL* operon from a nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain L-31. *Biochim Biophys Acta* **1519**, 143-6.
- Ranson, N. A., White, H. E. & Saibil, H. R. (1998).** Chaperonins. *Biochem J* **333**, 233-42.
- Ray, J. M., Bhaya, D., Block, M. A. & Grossman, A. R. (1991).** Isolation, transcription, and inactivation of the gene for an atypical alkaline phosphatase of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* **173**, 4297-309.
- Riethman, H. C. & Sherman, L. A. (1988).** Purification and characterization of an iron stress-induced chlorophyll-protein from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Biochim Biophys Acta* **935**, 141-51.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. & Stanier, R. Y. (1979).** Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* **111**, 1-61.
- Rippka, R., Coursin T., Hess W. R., Lichtle C., Scanlan D. J., Palinska K. A., Itean I., Partensky F., Houmard J. & Herdman M. (2000).** *Prochlorococcus marinus* Chisholm et al. 1992 subsp. *pastoris* subsp. nov. strain PCC 9511, the first axenic chlorophyll a2/b2-containing cyanobacterium (Oxyphotobacteria). *Int J Syst Evol Microbiol* **5**, 1833-1847.
- Ritossa, F. (1962).** A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**, 571-573.
- Rohrwild, M., Pfeifer, G., Santarius, U., Muller, S. A., Huang, H. C., Engel, A., Baumeister, W. & Goldberg, A. L. (1997).** The ATP-dependent HslVU protease from *Escherichia coli* is a four-ring structure resembling the proteasome. *Nat Struct Biol* **4**, 133-9.

- Roy, S. K., Hiyama, T. & Nakamoto, H. (1999).** Purification and characterization of the 16-kDa heat-shock-responsive protein from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which is an -crystallin-related, small heat shock protein. *Eur. J. Biochem.* **262**, 406-416.
- Ruddon, R. W. & Bedows, E. (1997).** Assisted protein folding. *J Biol Chem* **272**, 3125-8.
- Salotra, P., Singh, D. K., Seal, K. P., Krishna, N., Jaffe, H. & Bhatnagar, R. (1995).** Expression of DnaK and GroEL homologs in *Leuconostoc esenteroides* in response to heat shock, cold shock or chemical stress. *FEMS Microbiol Lett* **131**, 57-62.
- Sanchez, Y. & Lindquist, S. L. (1990).** HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* **248**, 1112-5.
- Sanders, B. M. (1993).** Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit Rev Toxicol* **23**, 49-75.
- Scanlan, D. J., Bourne, J. A. & Mann, N. H. (1997).** A putative transcriptional activator of the Crp/Fnr family from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH 7803. *J Appl Phycol* **8**, 565-567.
- Scheibel, T., Neuhofen, S., Weikl, T., Mayr, C., Reinstein, J., Vogel, P. D. & Buchner, J. (1997).** ATP-binding properties of human Hsp90. *J Biol Chem* **272**, 18608-18613.
- Schelin, J., Lindmark, F. & Clarke, A. K. (2002).** The *clpP* multigene family for the ATP-dependent Clp protease in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Microbiology* **148**, 2255-2265.
- Schluchter, W. M. & Bryant, D. A. (1992).** Molecular characterization of ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase in cyanobacteria: cloning and sequence of the *petH* gene of *Synechococcus* sp. PCC 7002 and studies on the gene product. *Biochemistry* **31**, 3092-102.
- Schmitz, G., Schmidt, M. & Feierabend, J. (1996).** Characterization of a plastid-specific HSP90 homologue: identification of a cDNA sequence, phylogenetic descent and analysis of its mRNA and protein expression. *Plant Mol Biol* **30**, 479-92.

Schwarz, R. & Grossman, A. R. (1998). A response regulator of cyanobacteria integrates diverse environmental signals and is critical for survival under extreme conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11008-13.

Selosse, M. A. & Loiseaux-de-Goer, S. (1997). La saga de l'endosymbiose - Les mitochondries et les plastes, témoins et acteurs de l'évolution. *La Recherche* **296**, 36-41.

Shanklin, J., DeWitt, N. D. & Flanagan, J. M. (1995). The stroma of higher plant plastids contain ClpP and ClpC, functional homologs of *Escherichia coli* ClpP and ClpA: an archetypal two-component ATP-dependent protease. *Plant Cell* **7**, 1713-22.

Shearstone, J. R. & Baneyx, F. (1999). Biochemical Characterization of the Small Heat Shock Protein IbpB from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**, 9937-9945.

Sherman, M., Soejima, T., Chui, W. & van Heel, M. (1998). Multi-variate analysis of single unit cells in electron crystallography. *Ultramicroscopy* **74**, 179-199.

Shimada, A., Nishijima, M. & Maruyama, T. (1995). Seasonal abundance of *Prochlorococcus* in Suruga Bay, Japan in 1992-1993. *Journal of Oceanography* **51**, 289-300.

Sidler, W. (1994). Phycobilisome and phycobiliprotein structure. *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (ed. Bryant, D.A.) 139-216 (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands).

Singh, S. K., Grimaud, R., Hoskins, J. R., Wickner, S. & Maurizi, M. R. (2000). Unfolding and internalization of proteins by the ATP-dependent proteases ClpXP and ClpAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8898-903.

Skarphol, K., Waukau, J. & Forst, S. A. (1997). Role of His243 in the phosphatase activity of EnvZ in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 1413-6.

Smith, D. R., Doucette-Stamm, L. A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicaire, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., Reeve, J. N. & et al. (1997). Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol* **179**, 7135-55.

Squires, C. L., Pedersen, S., Ross, B. M. & Squires, C. (1991). ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J Bacteriol* **173**, 4254-4262.

Squires, C. & Squires, C. L. (1992). The Clp proteins: proteolysis regulators or molecular chaperones? *J Bacteriol* **174**, 1081-5.

Steed, P. M. & Wanner, B. L. (1993). Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. *J Bacteriol* **175**, 6797-809.

Stiller, J. W. & Hall, B. D. (1997). The origin of red algae: implications for plastid evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4520-5.

Stock, J. B., Ninfa, A. D. & Stock, A. M. (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptative responses in bacteria. *Microbiology Review* **53**, 450-490.

Stock, J. B., Stock, A. M. & Mottonen, J. M. (1990). Signal transduction in bacteria. *Nature* **344**, 395-400.

Straus, N. A. (1994). Iron deprivation: physiology and gene regulation. In : *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (ed. Bryant, D.A.) 731-750 (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands).

Suzuki, I., Los, D. A., Kanasaki, Y., Mikami, K. & Murata, N. (2000). The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*. *Embo J* **19**, 1327-34.

- Suzuki, I., Kanasaki, Y., Mikami, K., Kanehisa, M. & Murata, N. (2001).** Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*. *Mol Microbiol.* **40**, 235-244.
- Tanaka, N. & Nakamoto, H. (1999).** HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria. *FEBS Lett* **458**, 117-123.
- Tandeau de Marsac, N. & Cohen-Bazire, G. (1977).** Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 1635-1639.
- Tandeau de Marsac, N. & Houmard, J. (1993).** Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol Rev* **104**, 119-190.
- Tetenkin, V. L., Golitsin, V. M. & Gulyaev, B. A. (1998).** Stress protein of cyanobacteria CP36: interaction with photoactive complexes and formation of supramolecular structures. *Biochemistry (Mosc)* **63**, 584-91.
- Thingstad, T. F. & Rassoulzadegan, F. (1995).** Nutrient limitations, microbial food webs, and 'biological C-pumps': suggested interactions in a P-limited Mediterranean. *Marine Ecology - Progress Series* **117**, 299-306.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997).** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **24**, 4876-4882.
- Throup, J. P., Koretke K. K., Bryant A. P., Ingraham K. A., Chalker A. F., Ge Y., Marra A., Wallis N. G., Brown J. R., Holmes D. J., Rosenberg M., Burnham M. K. (2000).** A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **35**, 566-576.
- Tomitani, A., Okada, K., Miyashita, H., Matthijs, H. C. P., Ohno, T. & Tanaka, A. (1999).** Chlorophyll *b* and phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts. *Nature* **400**, 159-162.

- Torok, Z., Goloubinoff, P., Horvath, I., Tsvetkova, N. M., Glatz, A., Balogh, G., Varvasovszki, V., Los, D. A., Vierling, E., Crowe, J. H. & Vigh, L. (2001).** *Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3098-3103.
- Turgay, K., Hamoen, L. W., Venema, G. & Dubnau, D. (1997).** Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **11**, 119-128.
- van Heel, M., Harauz, G. & Orlova, E.V. (1996).** A new generation of the IMAGIC image processing system. *J. Struct. Biol.* **116**, 17-24.
- van Liere, L. & Walsby, A. E. (1982).** Interactions of cyanobacteria with light. In : Carr NG and Whitton BA (eds) *The biology of Cyanobacteria*. Blackwell, Oxford, and University of California Press, Berkeley , 9-47.
- van Waasbergen, L. G., Dolganov, N. & Grossman, A. R. (2002).** *nblS*, a gene involved in controlling photosynthesis-related gene expression during high light and nutrient stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Bacteriol* **184**, 2481-2490.
- Vaulot, D., Marie, D., Olson, R. J. & Chisholm, S. W. (1995).** Growth of *Prochlorococcus*, a photosynthetic prokaryote, in the equatorial Pacific Ocean. *Science* **268**, 1480-1482.
- Vaulot, D., Partensky, F., Neveux, J., Mantoura, R. F. C. & Llewellyn, C. (1990).** Winter presence of prochlorophytes in surface waters of the northwestern Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography* **35**, 1156-1164.
- Veldhuis, M. J. W., & Kraay G. W. (1993).** Cell abundance and fluorescence of picoplankton in relation to growth irradiance and nitrogen availability in the Red Sea. *Neth J Sea Res* **31**, 135-145.

- Versteeg, S., Escher, A., Wende, A., Wiegert, T. & Schumann, W. (2003).** Regulation of the *Bacillus subtilis* heat shock gene *htpG* is under positive control. *J Bacteriol* **185**, 466-74.
- Walker, M.S. & DeMoss, J.A. (1993).** Phosphorylation and dephosphorylation catalyzed in vitro by purified components of the nitrate sensing system, NarX and NarL. *J Biol Chem* **268**, 8391-8393.
- Wang, J., Hartling, J. A. & Flanagan, J. M. (1997).** The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP- dependent proteolysis. *Cell* **91**, 447-56.
- Wang, N., Shaulsky, G., Escalante, R. & Loomis, W. F. (1996).** A two-component histidine kinase gene that functions in *Dictyostelium* development. *Embo J* **15**, 3890-8.
- Wanner (1993).** Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *Journal of Cellular Biochemistry* **51**, 47-54.
- Ward, M. J. & Zusman, D. R. (1997).** Regulation of directed motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **24**, 885-893.
- Waterbury, J. B., Watson, S. W., Valois, F. W. & Franks, D. G. (1986).** Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. In *Photosynthetic Picoplankton*, pp. 71-120. Edited by T. Platt & W. K. W. Li.
- Watson, G. M. F., Scanlan, D. J. & Mann, N. H. (1996).** Characterization of the genes encoding a phosphate-regulated two component sensory system in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH7803. *FEMS Microbiol Lett* **142**, 105-109.
- Watson, G. M. F. & Tabita, F. R. (1996).** Regulation, unique gene organization, and unusual primary structure of carbon fixation genes from a marine phycoerythrin-containing cyanobacterium. *Plant Mol Biol* **32**, 1103-1115.
- Watson, K. (1990).** Microbial stress proteins. *Adv Microb Physiol* **31**, 183-223.
- Wawrzynow, A., Banecki, B. & Zylicz, M. (1996).** The Clp ATPases define a novel class of molecular chaperones. *Mol Microbiol* **21**, 895-899.

- Werner-Washburne, M. & Craig, E. A. (1989).** Expression of members of the *Saccharomyces cerevisiae hsp70* multigene family. *Genome* **31**, 684-9.
- West, A. H. & Stock, A. M. (2001).** Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**, 369-76.
- Wetzstein, M., Volker, U., Dedio, J., Lobau, S., Zuber, U., Schiesswohl, M., Herget, C., Hecker, M. & Schumann, W. (1992).** Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *dnaK* locus from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **174**, 3300-10.
- Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R. & Jakob, U. (1992).** Hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature* **358**, 169-170.
- Woese, C. R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221-271.
- Wolk, C. P. (1996).** Heterocyst formation. *Annu Rev Genet* **30**, 59-78.
- Wu, J. F., Sunda, W., Boyle, E. A. & Karl, D. M. (2000).** A putative transcriptional activator of the Crp/Fnr family from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH 7803. *Science* **289**, 759-762.
- Wurgler-Murphy, S. M. & Saito, H. (1997).** Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem Sci* **22**, 172-6.
- Yamanaka, G., Glazer, A. N. & Williams, R. C. (1980).** Molecular architecture of a light-harvesting antenna. Comparison of wild type and mutant *Synechococcus* 6301 phycobilisomes. *J Biol Chem* **255**, 11104-10.
- Yeh, K. C., Wu, S. H., Murphy, J. T. & Lagarias, J. C. (1997).** A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* **277**, 1505-8.
- Zhulin, I., Taylor, B. & Dixon, R. (1997).** PAS domains S-boxes in Archea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem Sci* **22**, 331-333.

Zhulin, I. & Taylor, B. (1998). Correlation of PAS domains with electron transport associated proteins in completely sequenced microbial genomes. *Mol Microbiol* **29**, 1522-1523.

Annexes

ANNEXES

Annexe 1 (Article 4) : « Expression différentielle des gènes de l'antenne et du noyau chez *Prochlorococcus* PCC 9511 (Oxyphotobactérie) cultivée en cycle jour-nuit »

I. Résumé

Les changements continuels de la lumière solaire incidente durant la journée obligent les oxyphototrophes, tels que le procaryote marin *Prochlorococcus*, à moduler la vitesse de synthèse et de dégradation de leurs composants photosynthétiques. La façon dont ce phénomène naturel influence l'expression des gènes photosynthétiques n'a jamais été étudiée chez cette oxyphotobactérie de grande importance écologique. Dans cette étude, la souche de surface *Prochlorococcus* sp. PCC 9511 a été cultivée en grand volume en cycle jour-nuit (12 h:12 h) mimant les conditions trouvées dans la couche supérieure des océans équatoriaux. Le gène *pcbA*, codant le complexe majeur collecteur de lumière, présente de fortes variations des niveaux de transcrits durant la journée, avec deux maxima, un avant le début de l'illumination et l'autre à peu près à la fin de la photopériode. En revanche, le niveau d'ARNm de *psbA* (codant la sous-unité D1 du centre réactionnel II), le transcrit monocistronique de *psbD* (codant D2) et le transcrit dicistronique du gène *psbDC* sont tous faiblement corrélés à l'irradiation lumineuse, avec un minimum vers minuit et un maximum à midi. L'existence d'un second pic durant la période d'obscurité pour le transcrit monocistronique de *psbC* (codant une des protéines du centre réactionnel de l'antenne du PS II) suggère l'implication d'une régulation post-traductionnelle. L'expression différentielle des gènes du centre et de l'antenne externe pourrait constituer un mécanisme de régulation de la taille de l'antenne qu'utiliseraient les cellules de *Prochlorococcus* pour faire face au flux de photons en excès dans la couche supérieure des océans vers midi. Après observation des extrémités 5' de tous les transcrits, un motif conservé 5'-TTGATGA-3' a pu être identifié à l'intérieur des promoteurs potentiels de *psbA* et *pcbA*.

II. Article

Annexe 2 (Article 5) : « Expression des gènes associés au cycle cellulaire dans des cultures synchronisées de *Prochlorococcus* sp. strain PCC 9511 »**I. Résumé**

Le cycle cellulaire de la cyanobactérie marine possédant de la chlorophylle *b*, *Prochlorococcus*, est fortement synchronisé en conditions naturelles. Afin de comprendre les mécanismes moléculaires liés à ce phénomène, *dnaA* et *ftsZ*, deux gènes clés associés au cycle cellulaire, ont été clonés, séquencés, et leur expression étudiée. Une culture axénique de *Prochlorococcus* sp. strain PCC 9511 a été cultivée en turbidostat avec un cycle jour-nuit (12 h-12 h), pendant deux semaines. Un régime de lumière dynamique a été utilisé pour simuler les conditions naturelles trouvées dans la couche supérieure des océans. Ce traitement a permis une forte synchronisation du cycle cellulaire, mesurée par cytométrie en flux. Le niveau des ARNm de *dnaA* et *ftsZ* a été mesuré à 4 h d'intervalle pendant quatre cycles de division constitutifs. Les deux gènes ont montré des profils d'expression jour-nuit avec des maxima pendant la phase de réplication (S). Des expériences de Western blot ont indiqué que le pic de FtsZ se produisait pendant la nuit, c'est à dire, au moment de la division. L'accumulation des transcrits de ces gènes, impliqués dans la réplication et la division, est donc coordonnée chez *Prochlorococcus* sp. strain PCC 9511 et doit jouer un rôle crucial pour déterminer la réplication de l'ADN et la division cellulaire.

II. Article

RESUME

Prochlorococcus est le plus petit et le plus abondant organisme unicellulaire photosynthétique des océans. Il est exceptionnel de par sa dominance, son adaptation aux environnements pauvres en nutriments, sa forte densité de la surface jusqu'à des profondeurs de 200 m et sa composition pigmentaire unique. Afin de mieux comprendre comment cet organisme s'adapte et s'acclimata à de telles conditions, les mécanismes de réponse au stress ont été étudiés.

Les systèmes de transduction à deux composants, composés d'histidine kinases et de régulateurs de réponse, sont des éléments importants permettant aux bactéries de détecter et de s'acclimater rapidement aux changements de leur environnement. L'analyse du génome de la souche *Prochlorococcus* MED4, adaptée aux conditions océaniques de surface, a révélé un très petit nombre de gènes codant ces systèmes (5 kinases et 6 régulateurs) ainsi qu'une très faible diversité de ces systèmes. Une étude par RT-PCR quantitative a révélé que certains gènes de régulateurs sont activés par un stress de forte lumière alors que la plupart des gènes de ces systèmes sont réprimés par un choc thermique.

Les cyanobactéries répondent également à un excès lumière en régulant l'expression des gènes codant les protéines heat-shock. L'étude de l'expression de ces gènes, réalisée sur la souche d'eau douce *Synechocystis* sp. PCC 6803, la souche marine de surface *Prochlorococcus* MED4, et la souche marine de profondeur *Prochlorococcus* MIT9313, a montré une régulation dynamique de la réponse heat-shock reflétant les différentes niches écologiques dans lesquels ces souches évoluent.

Enfin, chez certaines cyanobactéries, l'utilisation d'une antenne externe (composée de protéines IsiA) autour du photosystème (PS) I permet de compenser la diminution des phycobilisomes et du niveau de PS I en réponse à une carence en fer. Le même type d'arrangement autour du PS II chez *Prochlorococcus* SS120, semble être une stratégie qui maximise la capture de l'énergie lumineuse en profondeur. L'étude de l'expression des gènes *pcb*, codant les complexes collecteurs de lumière, chez *Prochlorococcus*, a permis de mettre en évidence la présence de gènes *isiA*-like induit par une carence en fer. Ces résultats suggèrent que les contraintes environnementales ont dû avoir un effet direct sur l'évolution des gènes *pcb* chez *Prochlorococcus*.

Cette étude a donc permis de mettre en évidence de nouvelles caractéristiques de la réponse au stress de *Prochlorococcus* qui pourront nous aider à mieux comprendre son abondance dans l'océan mondial.

Mots clés : *Prochlorococcus*, stress, systèmes à deux composants, protéines heat-shock, *pcb*

ABSTRACT

Prochlorococcus is the smallest and the most abundant unicellular photosynthetic organism in the ocean. It has proven exceptional from its predominance, its adaptation to nutrient-deprived environments, its occurrence at high density from the surface down to depths of 200 m and its remarkable pigment composition. To better understand how this organism adapt and acclimate to such conditions, stress response mechanisms have been studied.

Two-component signal transduction systems, composed of histidine sensory kinases and response regulators, are important elements that allow bacteria to sense and to acclimate rapidly to changes in their environment. The analysis of *Prochlorococcus* MED4 genome, a strain adapted to surface oceanic conditions, revealed only few systems (5 histidine kinases and 6 response regulators) and a low diversity of these systems. Moreover, quantitative RT-PCR analyses revealed that some response regulator genes are induced by high light stress whereas most of two-component genes are down-regulated by cold and heat shock.

Cyanobacteria also acclimate to high light exposure by controlling the expression of heat-shock genes. The study of gene expression on the freshwater strain *Synechocystis* sp. PCC 6803, the marine high light-adapted strain *Prochlorococcus* MED4, and the marine low light-adapted strain *Prochlorococcus* MIT9313, revealed a dynamic regulation of heat-shock response reflecting the different ecological niches where strains have evolved.

Finally, the utilization of an extra antenna (composed of IsiA proteins) for PSI seems to compensate the decrease in phycobilisome and PSI levels in response to iron deficiency. A similar arrangement in *Prochlorococcus* SS120 strain would be used to maximize the capture of light energy at depth. The study of *pcb* gene expression, encoding light harvesting proteins, in *Prochlorococcus* showed the presence of *isiA*-like genes induced by iron deficiency. These results suggested that the evolution of *pcb* genes has been driven directly by environmental constraints.

This study has highlighted new characteristics of the *Prochlorococcus* stress response that will help to better understand its predominance in the ocean.