



**HAL**  
open science

# Les antennes photosynthétiques des organismes marins picophytoplanctoniques des genres *Ostreococcus* et *Synechococcus*: structure et photoacclimatation

Christophe Six

► **To cite this version:**

Christophe Six. Les antennes photosynthétiques des organismes marins picophytoplanctoniques des genres *Ostreococcus* et *Synechococcus*: structure et photoacclimatation. Biochimie, Biologie Moléculaire. Paris 6, 2005. Français. NNT: . tel-01118134

**HAL Id: tel-01118134**

**<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01118134>**

Submitted on 18 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)



# THESE DE DOCTORAT

spécialité Océanologie Biologique

présentée par

**Christophe SIX**

pour obtenir le grade de :

**Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)**

**Les antennes photosynthétiques  
des organismes marins picophytoplanctoniques  
des genres *Ostreococcus* et *Synechococcus* :  
structure et photoacclimatation**

Soutenue le 8 avril 2005

Composition du jury :

**François Lallier**, Professeur UPMC, SB Roscoff.....*Président*  
**Hugo Scheer**, Professeur, Institut de botanique, Université de Munich.....*Rapporteur*  
**Jacques Neveux**, Chargé de Recherche 1 CNRS-IRD, ARAGO Banyuls-sur-mer.....*Rapporteur*  
**Nicole Tandeau de Marsac**, Directrice de Recherche CNRS, Institut Pasteur.....*Examinatrice*  
**Jean-Claude Thomas**, Maître de conférence CNRS-ENS.....*Expert invité*  
**Yves Lemoine**, Professeur de l'Université de Lille I, ELICO.....*Co-directeur de thèse*  
**Frédéric Partensky**, Directeur de Recherche CNRS, SB Roscoff..... *Co-directeur de thèse*

**Les antennes photosynthétiques  
des organismes marins picophytoplanctoniques  
des genres *Ostreococcus* et *Synechococcus* :  
structure et photoacclimatation**

*"Marine biologists have been slow to recognize that the smaller phytoplankton elements which pass through the finest nets are of great importance in the productivity of the oceans"*

*Wood and Davis (1956).*

## Merci...

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent à Frédéric Partensky pour l'encadrement de qualité dont j'ai bénéficié. Son recul scientifique, sa disponibilité, sa patience, son dynamisme, sa confiance et sa bonne humeur quasi-constante ont été essentiels à mon travail de thèse. J'ai conscience de la rareté d'un encadrement si agréable et je lui porte ma plus profonde gratitude ainsi qu'une amitié sincère. J'espère seulement ne pas avoir été un compagnon de bureau insupportable !...

Un énorme merci à Jean-Claude Thomas avec qui la collaboration est toujours très agréable. Lorsque nous nous sommes rencontrés à L'ENS durant mon DEA en 2000, je ne me doutais pas qu'il allait en réalité me prodiguer la majeure partie des connaissances qui ont été nécessaires à la réalisation de ma thèse. Mon estime pour lui va au-delà des aspects professionnels, Qu'il soit lui aussi certain de ma gratitude et de mon amitié sincère.

Je remercie vivement Yves Lemoine. Il a cru en moi dès mon stage de DEA et m'a ouvert les portes de la recherche sur les microalgues. Pour cela, je lui dois beaucoup. Un grand merci aussi pour toutes ces discussions sur la fluorescence chlorophyllienne.

Je remercie Daniel Vaulot de m'avoir accepté au laboratoire, pour la confiance qu'il m'a portée jusqu'ici ainsi que pour ses conseils judicieux.

Merci à Anne Créach et François Gevaert. Dès la maîtrise, ils m'ont permis de faire mes premiers pas dans la recherche en phycoologie. Je leur en suis extrêmement reconnaissant.

Parmi les remerciements qui me tiennent le plus à cœur, ceux qui s'adressent aux Greens de l'équipe Plancton Océanique occupent une place de choix. La bonne conduite d'un travail de trois-quatre années ne saurait se faire sans une bonne ambiance de travail. La convivialité et l'entraide qui règnent dans cette équipe ont été essentielles à mon travail. J'adresse un merci spécial à Laurence (Maman, aurais-je une sœur secrète ??...) et à Alexis. Ils sont devenus, avec plus ou moins de temps, mes meilleurs amis Roscovites. En espérant n'oublier personne, je remercie aussi très fort Francisco & Monica, Julia & Jens, Isa, Alexandra, Dominique, Florence, Fabienne, Claire, Nathalie, Laure, Fabrice, Sam, Manon, Ludo, Nick, Mathieu, Laetitia, Aude, Delphine, Bastien, Antoine, Khadidja, Agnès, Bertrand... Un merci aux relents d'amertume à Pierre pour les bons moments passés ensemble...

Je remercie chaleureusement les autres amis de la Station pour la bonne ambiance générale qui y règne et les divers moments de complicité : Stéphane, Cédric, Vivek, Sophie, Vincent... Et aussi à Gilles qui fait partie du petit monde de la station !,... J'adresse un merci particulier au personnel technique que l'on oublie trop souvent.

Claudia Steglisch et Heiko Lokstein sont remerciés pour l'encadrement dévoué qu'ils m'ont témoigné durant mon séjour à Berlin.

Je remercie les participants de MARGENES pour les formidables réunions de travail ponctuées de moments inoubliables à Warwick, Berlin et Naples ; notamment Ilka, Anne, Martin, Sophie, Arne, Alexandra et Anton.

Merci à mes amis du Nord de la France pour ne pas m'avoir oublié malgré la distance et le temps qui passe : Rudy, Gaëtan, Luigi, Luigi & Laetitia, Cécile & David, Alex & Cécile, Mathieu, Hugues,, Tof Pruv & Vivie, Ptit Bouze & Mimie, Crevette, Boze... Un merci chaleureux et particulier à Dominique.

Enfin, merci à ma Maman et ma famille pour m'avoir toujours fait confiance. Pardon pour ne pas être plus présent.

## *Liste des abréviations*

**AC** : Adaptation chromatique  
**ACC** : Adaptation chromatique complémentaire  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ADP** : Adénosine diphosphate  
**ATP** : Adénosine triphosphate  
**AP** : Allophycocyanine  
**CAB** : “Chlorophyll *a* binding protein”  
**Chl** : Chlorophylle  
**CR** : Centre réactionnel  
**ddm** : Dodécyl-maltoside  
**DGGE** : “Denaturing gel gradient electrophoresis”  
**EDTA** : Acide éthylène diamine tétracétique  
**FCP** : “Fucoxanthin chlorophyll binding protein”  
**FISH-TSA** : “Fluorescence in situ hybridisation-tyramide signal amplification”  
**HEPES** : Acide N-2-hydroxyéthylpipirazine-N’-2-éthanosulfonique  
**HLIP** : “High-light inducible protein”  
**HPLC** : Chromatographie liquide haute pression  
**LHC** : “Light harvesting system”  
**MET** : Microscopie électronique à transmission  
**OG** : Octyl-glucoside  
**ORF** : Cadre ouvert de lecture  
**NPQ** : Extinction de fluorescence non photochimique  
**PAM** : “Fluorimètre pulse amplitude modulated”  
**PBP** : Phycobiliprotéine  
**PBS** : Phycobilisome  
**PC** : Phycocyanine  
**PCB** : Phycocyanobiline  
**PCP** : “Peridinin chlorophyll binding protein”  
**PE** : Phycoérythrine  
**PEB** : Phycoérythroiline  
**PEC** : Phycoérythrocyanine  
**PVB** : Phycoviolibiline  
**PS** : Photosystème  
**PUB** : Phycourobiline  
**Tris** : Tris-(hydroxyméthyl)-aminoéthane  
**TGGE** : Temperature gel gradient electrophoresis  
**UV** : Ultraviolet

## Liste des figures

**Figure 1 :** Distribution mondiale des concentrations en chl a (image SeaWIFS)

**Figure 2 :** Cellules de *Prochlorococcus* sp. (gauche) et *Synechococcus* sp. (droite) visualisés en TEM, d'après Johnson & Sieburth (1979) et Chisholm et al. (1988).

**Figure 3 :** Analyse par cytométrie en flux d'un échantillon prélevé dans le Pacifique équatorial (45 m). *Synechococcus* est distingué sur la base de son contenu en phycoérythrine et en chl et peut ainsi être discriminé sur les cytogrammes A : fluorescence de la chl en fonction de SSC (side scatter : diffusion de la lumière à 90° qui est fonction de la taille cellulaire) ou B : fluorescence de la phycoérythrine versus fluorescence de la chl. Les cellules de *Prochlorococcus* sont identifiées sur les mêmes cytogrammes par leur faible fluorescence orange (due à la PE) et leur plus faible SSC alors que les picoeucaryotes présentent une quantité de chl et un SSC par cellule plus importants (Partensky, 1999).

**Figure 4 :** Photo en microscopie électronique à transmission de picoplancton marin concentré de Grand Banks d'après Johnson & Sieburth (1982). Les cellules phytoplanctoniques mesurent approximativement 1 µm et sont de nature procaryote et eucaryote. C : cyanobactérie ; s : prasinophyte écaillé ; f : *Micromonas pusilla*.

**Figure 5 :** Représentation schématique (Chrétiennot-Dinet et al., 1995) et photos en microscopie électronique d'*Ostreococcus tauri* (Ral et al. 2004). Gauche : N noyau, Mt Mitochondrie, G Golgi, A amidon, P plaste. Droite : division cellulaire, l'échelle est à 0.4 µm.

**Figure 6 :** Représentation du transfert d'électrons photosynthétiques chez les bactéries anoxygéniques pourpres.

**Figure 7 :** Appareil photosynthétique partiel de *Synechococcus* sp. avec schématisation détaillée des réactions photosynthétiques oxygéniques.

**Figure 8 :** Les différentes configurations d'antennes photosynthétiques chez les grands groupes d'organismes phytoplanctoniques.

**Figure 9 :** Modèle structural du complexe protéique du PSII incluant les cofacteurs du transfert d'électrons (Stewart & Brudvig 1998). Représentation structurale d'une protéine de l'antenne interne CP47, d'après Barber et al. (2000a).

**Figure 10 :** Schéma du transfert d'électrons le long des potentiels redox associés aux différents transporteurs d'électrons chez les plantes supérieures. Q : quinone, Cyt : cytochrome, Rk : protéine de Rieske, X : transporteur inconnu, Fd : ferredoxine. Les chiffres indiquent les potentiels redox et la flèche en pointillés illustre la possibilité d'un transfert cyclique d'électrons.

**Figure 11 :** Diagramme illustrant la similarité de l'organisation des hélices transmembranaires entre le CRI et le CRII, d'après Barber et al. (2000b).

**Figure 12 :** Modèle d'organisation des polypeptides et des cofacteurs du PSI chez les cyanobactéries. La position exacte du PsaM par rapport aux autres sous-unités n'est pas connue. Les transporteurs d'électrons identifiés par spectroscopie comprennent le donneur primaire d'électrons, P700 (une paire spéciale de Chl *a*), les accepteurs primaires et secondaires d'électrons, A<sub>0</sub> (Chl *a*) et A<sub>1</sub> (phylloquinone) et 3 clusters Fer-Soufre, F<sub>A</sub>, F<sub>B</sub> et F<sub>X</sub> (Chitnis et al. 1995 ; Krauss et al. 1996).

**Figure 13 :** Gauche : Photos en microscopie électronique de *Pseudoanabaena* sp. PCC 7409 A : vue générale ; B & C : zoom sur les espaces interthylacoïdaux, les flèches pointent des PBS, d'après Bryant (1979). Milieu : PBS de *Calothrix* sp. PCC 7601 visualisés en TEM, d'après Sidler (1994) et Droite : Représentation schématique de deux différentes structures de PBS. A : Modèle

d'organisation de PBS hémidiscoïdal à cœur tricylindrique type *Synechocystis* sp. PCC 6714. B : Modèle d'organisation du PBS hémidiscoïdal à cœur pentacylindrique d'*Anabaena* sp. Théoriquement, huit projections radiales peuvent être fixées à ce type de PBS.

**Figure 14 :** Etats d'agrégation des PBP, de l'hétérodimère à l'hexamère, d'après Sidler et al. (1994).

**Figure 15 :** Formule chimique et maxima d'absorption des phycobilines liées aux PBP, d'après Grossman et al. (2001).

**Figure 16 :** Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de PBP cyanobactériennes : C-PC (A), R-PCII des *Synechococcus* marins (B), AP (C), et des C-PEs de *Synechococcus* marins connues à ce jour. D et E: C-PEII et I de *Synechococcus* sp. WH7803 respectivement ; E et F : C-PEI et II de *Synechococcus* sp. WH8020 respectivement, G et H : C-PEI et II de *Synechococcus* sp. WH8103 respectivement, d'après Ong & Glazer (1991).

**Figure 17 :** Distribution des chromophores chez différents types de PC, d'après Sidler et al. (1994).

**Figure 18 :** Spectres d'absorption relative de PE d'algues rouges.

**Figure 19 :** Gauche : SDS-PAGE (15% acrylamide) de PBS de *Synechococcus* sp. PCC 7002 (1), *Anabaena* sp. PCC 7120 (2), *Mastigocladus laminosus* (3 ; Marqueurs de taille (4), d'après Sidler et al. (1994). Droite : Représentation schématique du PBS de *Synechocystis* sp. PCC 6701 d'après Glazer (1989). Un bras est composé des complexes hexamériques de PBP liés par un linker spécifique. Les sous-unités sont désignées par leur lettre grecque ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) avec en exposant la PBP qu'elles constituent (PE, PEC, PC ou AP). Les linkers sont notés L avec en exposant leur masse moléculaire en kDa et en indice leur localisation (R pour bras, RC pour la jonction cœur-bras, CM pour la jonction cœur membrane et C pour coeur).

**Figure 20 :** Interaction du linker MpeC avec les hexamères distaux de PEII chez *Synechococcus* sp. WH8020, d'après Wilbanks & Glazer (1993).

**Figure 21 :** Représentation schématique d'un cœur de PBS tricylindrique type *Synechocystis* sp. PCC 6701. Les sous-unités sont désignées par une lettre grecque avec en exposant le type de chaîne. Les linkers sont notés L avec en exposant leur masse moléculaire en kDa et en indice leur localisation d'après Sidler et al. (1994 ; C pour le cœur, CM pour la jonction cœur-membrane).

**Figure 22 :** Haut : Structure du linker  $L_{CM}$  chez plusieurs souches de cyanobactéries d'eau douce, les chiffres indiquent la numérotation des résidus aminoacides. Loop : boucle ; Rep : régions répétées de type linker séparées par des régions Arm (bras). Bas : architecture des cœurs de PBS chez les mêmes souches, d'après Sidler et al. (1994).

**Figure 23 :** Représentation schématique et photo en microscopie électronique (vue faciale) du cœur de PBS pentacylindrique d'*Anabaena* sp. PCC 7120 (Ducret et al. 1998).

**Figure 24 :** Schéma simplifié de la biosynthèse des phycobilines.

**Figure 25 :** Schéma d'arrangement des chromophores  $f$  et  $s$  au sein d'un trimère de C-PC (Mimuro 1986b, a). Les PCBs  $\beta$ -155 et  $\alpha$ -84 sont des chromophores  $s$  et  $\beta$ -84 est le chromophore  $f$ .

**Figure 26 :** Illustration du transfert orienté d'énergie au sein du PBS, des bras vers les PS, d'après Sidler et al. (1994).

**Figure 27 :** Gauche : Modèle structural d'un bras de PBS de *Mastigocladus laminosus*. Les polypeptides linkers sont représentés en noir et numérotés de 1 à 7, les complexes AP en blanc, PC, hachurés et PEC ponctués. Les linkers sont dénommés selon leur masse moléculaire et leur position, d'après Reuter & Nickel-Reuter (1992). Droite : modèle structural du PBS de

*Synechococcus* sp. PCC 6301 avec la description complète des complexes présents. Le polypeptide qui pourrait ancrer le PBS aux thylacoïdes est représenté par un ovale noir, les carrés hachurés représentent les CR et chl associées. Les sous-unités sont désignées par leur lettre grecque ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) avec en exposant la PBP qu'elles constituent (PE, PEC, PC ou AP). Les linkers sont notés L avec en exposant leur masse moléculaire en kDa et la PBP avec laquelle ils interagissent (PE, PC PEC ou AP), et en indice leur localisation (R pour bras, RC pour la jonction cœur bras et CM pour la jonction cœur membrane), d'après Grossman et al. (1993).

**Figure 28** : Régions génomiques des gènes et clusters de gènes codant pour les composants des PBS de *Fremyella diplosiphon* (A), *Synechococcus* spp. PCC 6301 (B) et PCC 7002, et *Anabaena* sp. PCC 7120, d'après Grossman et al. (1993). L'espacement entre les clusters *apcEA1B1C* et *cpB2A2H2I2D2* de *Fremyella diplosiphon* est de 4 kbp. L'épaisseur des flèches est une indication de l'abondance du transcrit en question. Chez *Fremyella diplosiphon*, l'induction de ces gènes dépend de l'environnement lumineux (voir adaptation chromatique à la fin de l'intro). Flèches en points: lumière rouge, flèches en pointillés : lumière verte, flèches pleines : transcrit constitutif, d'après Grossman et al. (2001).

**Figure 29** : Régions génomiques du PBS de *Mastigocladus laminosus*. D'après Sidler et al. (1994).

**Figure 30** : Région génomique partielle des gènes relatifs au PBS de *Synechococcus* sp. WH8020, d'après Wilbanks & Glazer (1993).

**Figure 31** : Modèle d'évolution des gènes de PBP et du développement du PBS proposé par Apt et al. (1995), voir le texte.

**Figure 32** : Structure du Lhcb1 de poids déterminé par cristallographie électronique (a ; (Kuhlbrandt et al. 1994)). Les bandes bleues indiquent la position approximative de la bicouche lipidique. Sur cette représentation, les hélices sont nommées A à D et les hélices B, C et A correspondent aux hélices 1, 2 et 3 respectivement. Les molécules de chl sont représentées par des anneaux porphyrines et les molécules supposées être des chl a ont été noircies. Modèle moléculaire d'assemblage des protéines LHC (b).

**Figure 33** : Organisation schématique du LHCII en association avec le dimère de CRII.

**Figure 34** : Cladogramme non enraciné montrant les relations entre les séquences des protéines Lhc chez *Arabidopsis thaliana* d'après Jansson (1999b).

**Figure 35** : Schéma du CRI avec son antenne interne photosynthétique.

**Figure 36**: Cladogramme des gènes des protéines Cab à trois hélices transmembranaires chez *Chlamydomonas reinhardtii*, d'après Elrad et al. (2004).

**Figure 37** : Chromatogramme de *Micromonas pusilla*, montrant la composition pigmentaire typique des Mamiellales (Prasinophyceae). F. Rodriguez, (données non publiées). Cette souche (RCC372) a la particularité de posséder une chl particulière, la chl CS-170. MgDVP : Mg-divinyl phaeoporphyrine *a*; Neo : noxanthine ; Pras : prasinoxanthine ; Viol : violaxanthine ; Zea : zéaxanthine ; Lut : lutéine ; Unk car : caroténoïde inconnu ; car : carotène.

**Figure 38** : Spectres d'absorption (a) et distribution verticale (b) des genres *Synechococcus* et *Prochlorococcus* en Atlantique subtropical (Juin 1996), d'après Ting et al. (2002).

**Figure 39** : Arbre phylogénétique des souches de *Prochlorococcus* (ARN 16S) d'après Moore et al. (1998).

**Figure 40** : Distribution verticale des cyanobactéries du genre *Prochlorococcus* estimée par dot-blot en Mer Rouge, d'après Fuller et al. (2003).

**Figure 41** : Appareil photosynthétique schématique de *Prochlorococcus* sp. MIT9313 en carence en fer. Remarquez la couronne partielle de 8 Pcb autour des dimères de PSII et la couronne

complète de 18 Pcb autour du PSI. C'est aussi la situation observée en conditions de culture normales chez SS120, alors que MIT9313 perd sa couronne autour du PSI lors du fer est présent dans le milieu de culture. Chez MED4, il n'y jamais de couronne autour du PSI, quelle que soit les conditions de milieu (+ /- Fe). Schéma d'après Partensky & Garczarek (2003) et photographies en MET d'après Bibby et al. (2003).

**Figure 42** : Comparaison des régions génomiques des PBP de *Synechococcus* sp. WH8102, de deux souches de *Prochlorococcus*. de profondeur (MIT9313 et SS120) et d'une souche de *Prochlorococcus* de surface (MED4).

**Figure 43** : Arbre phylogénétique général des cyanobactéries basé sur les séquences d'ARNr 16S, d'après Fuller et al., (2003).

**Figure 44** : Arbre phylogénétique des *Synechococcus* marins (cluster 5.1) basé sur les séquences de l'ARNr 16S, d'après Fuller et al., (2003).

**Figure 45** : Trois cytogrammes présentant des populations de *Synechococcus* marins à différentes stations et différentes saisons (Olson et al. 1990). Le cytogramme B montre trois populations, ces populations peuvent être plus ou moins entremêlées (A & C)

**Figure 46** : Variations des spectres d'excitation de fluorescence de la fraction picoplanctonique marine en fonction de la richesse nutritive et de la profondeur du prélèvement en Atlantique tropical NE, d'après Lantoine (1995).

**Figure 47** : Arbre phylogénétique des Prasinophyceae fondé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 18S. Les valeurs de bootstrap présentées correspondent respectivement aux méthodes Neighbour Joining et Maximum de Parsimonie, d'après Guillou et al. (2004).

**Figure 48** : Arbre phylogénétique des Mamiellales fondé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 18S. Les valeurs de bootstrap présentées correspondent respectivement aux méthodes Neighbour Joining et Maximum de Parsimonie, d'après Guillou et al. (2004).

**Figure 49** : Distribution des genre *Micromonas*, *Ostreococcus* et *Bathycoccus* déterminées par hybridation in situ (FISH-TSA) le long d'un transect dans l'océan Indien (Not, 2003).

**Figure 50** : Arbre phylogénétique des souches d'*Ostreococcus* (Maximum likelihood), d'après Rodriguez et al. (sous presse).

**Figure 51** : Réduction du nombre de thylacoïdes chez *Synechococcus* sp. WH7803 acclimaté à différentes irradiances. De haut en bas : 1330 (A), 160 (B) et 30 (C)  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . D'après Kana & Glibert (1987).

**Figure 52** : Photographie en MET des PBS de faible (A) et forte lumière (B). Gel LiDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (C) montrant les profils polypeptidiques de PBS de *Spirulina maxima* cultivée à 60 (1) et 400  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (2), et Modèle de structure du PBS en forte (D gauche) et faible lumière (D droite), d'après Garnier et al. (1994).

**Figure 53** : Spectres d'absorption in vivo chez *Fremyella diplosiphon* cultivée en lumière verte (pointillés) et rouge (continu) d'après Campbell (1996).

**Figure 54** : Représentation des mécanismes de régulation de l'ACC par phosphorylation chez *Fremyella diplosiphon*, d'après Grossman et al. (2001).

**Figure 55** : Différences morphologiques observées par microscopie photonique entre les filaments de *Fremyella diplosiphon* cultivées en lumière blanche (haut) et rouge (bas), d'après Bennet & Bogorad (1973). Echelle : 26  $\mu\text{m}$ .

**Figure 56** : Modèles de structure des bras de PBS chez *Nostoc* sp. MAC en lumière rouge (gauche) et verte (droite), d'après Anderson et al. (1983).

**Figure 57** : Modèle de PBS semi-discoïde (a) et semi-ellipsoïde (b), leur association au PSII et les cœurs de PBS associés chez *Phormidium* sp. acclimaté en lumière rouge (a) et verte (b), d'après Westermann & Wehrmeyer (1995). PC : PBP en points, PE : PBP sombres, AP : PBP blanches.

**Figure 58** : Spectres d'excitation de fluorescence (gauche) de *Synechococcus* sp. CC9311 acclimaté en lumière blanche (ligne fine), et bleue (ligne épaisse) et cinétique d'acclimatation après un shift en lumière verte chez la même souche, d'après Palenik (2001).

**Figure 59** : Arbre phylogénétique de *Synechococcus* marins. CA : adaptation chromatique, NCA pas d'adaptation chromatique.

**Figure 60** : diagramme illustrant les appellations courantes des phénomènes ondulatoires en fonction de leur longueur d'onde. L'énergie d'un quantum donné dépend de sa longueur d'onde.

**Figure 61** : Diagramme présentant l'évolution du nombre de taxa au cours des grandes périodes géologiques.

**Figure 62** : Fracture transversale de cellule de *Synechococcus* sp. WH8113 illustrant les différents systèmes membranaires cyanobactériens. L'insert correspond à la partie encadrée de l'enveloppe cellulaire comprenant la membrane cytoplasmique (CM), la couche de peptidoglycane (P), la membrane externe (OM), et la couche de surface (S). Les thylacoïdes (T) sont aussi indiqués. Echelle : 200 nm, d'après Samuel et al. (2001).

**Figure 63** : Structure de l'enveloppe bactérienne chez les bactéries de type Gram – (a ; exemple de *Staphylococcus aureus*) et Gram + (b ; exemple de *Escherichia coli*). La structure générale de la paroi des oxyphotobactéries est généralement de type Gram -. NAM : acide N-acétyl-muramique ; NAG : N-acétyl glucosamine

**Figure 64** : Immuno-localisation de caroténo-protéines chez *Prochlorothrix hollandica* (A) et *Synechococcus* sp. (B), d'après Bullerjhan & Sherman (1986).

**Figure 65** : Structure moléculaire de la caroténo-protéine de *Arthrospira maxima* après analyse par cristallographie, d'après Kerfeld et al. (1997, 2003).

**Figure 66** : Modèle moléculaire illustrant les dimères de thymine occasionnés par les radiations UV sur l'ADN.

**Figure 67** : Structure des composés UV-protecteurs : la MAA-gly (A) monosubstituée, la shinorine bisubstituée (B), la MAA-oligosaccharide de *Nostoc commune* (Bohm et al. 1995) avec R1 : galactose, xylose, acide glucuronique et R2 : galactose, glucose, glucosamine (C), la scytonémine (D), d'après Proteau et al. (1993).

**Figure 68** : Spectres d'absorption de la MAA-oligosaccharide dans l'eau (A ; Böhm et al., 1995) et de la scytonémine dans le tétrahydrofurane (Proteau et al. 1993).

**Figure 69** : Spectres d'absorption de fractions enrichies en thylacoïdes de *Synechococcus* sp. WH8102 acclimaté à trois intensités lumineuses.

**Figure 70** : Version couleur de profils IEF comparatifs reflétant les proportions relatives des PBP dans le PBS de *Synechococcus* sp. WH8102 cultivé de 15 à 700  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

**Figure 71** : Etude bidimensionnelle des linkers de taille moyenne du PBS de *Synechococcus* sp. WH8102. Droite : profil monodimensionnel de PBS annoté (15  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) et visualisation sous UV. Gauche : analyse résolutive en deux dimensions de la région des linkers de taille moyenne. Les chiffres entre parenthèses sont les coordonnées théoriques des spots de linkers déterminées à l'aide du génome (Point isoélectrique ; Masse moléculaire en kDa).

**Figure 72** : Arbre phylogénétique des séquences partielles d'ARN 16S avec détail sur le cluster 5.1. La méthode utilisée est celle du Neighbour Joining avec correction de Kantor-Jukes. Les séquences partielles de *Synechococcus* spp. M11.1 et M21B3 et M16.17 (rouge) ont été ajoutées à

l'alignement initial. M21.B3 est une souche issue du même prélèvement que M16.17 et aussi capable d'adaptation chromatique. NCA : souche ne pratiquant pas l'AC.

**Figure 73** : Evolution du rapport PUB :PEB chez *Synechococcus* spp. M11.1 et M16.17 lors d'un transfert de lumière blanche à bleue (A) et bleue à blanche (B).

**Figure 74** : Spectres d'excitation de fluorescence *in vivo* de *Synechococcus* spp. M16.17 (A) et M11.1 (B) adaptés en lumière bleue, blanche et verte.

**Figure 75** : Chromatogramme typique de *Synechococcus* spp. M16.17 ou M11.1, en lumière bleue, blanche ou verte.

**Figure 76** : Filtrats de cellules de *Synechococcus* sp. M16.17 cultivé en lumière blanche (A1) et bleue (A2), dissociation de la fraction soluble sur gradient de viscosité (B), fractions colorées du gradient (C).

**Figure 77** : Spectres d'absorption des fractions colorées des gradients de viscosité de *Synechococcus* sp. M16.17 cultivé en lumière bleue (A) et blanche (B), normalisés au maximum de PUB. Des résultats similaires ont été obtenus pour *Synechococcus* sp. M11.1.

**Figure 78** : Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence des complexes majoritaires de PE chez *Synechococcus* sp. M16.17 cultivé en lumière blanche (A) et bleue (B), et de la PE mineure insensible à la couleur de la lumière (C). Les mêmes complexes ont été isolés chez M11.1.

**Figure 79** : Modèle de composition des bras des PBS de *Synechococcus* spp. M11.1 et M16.17 en lumière blanche et bleue.

**Figure 80** : Spectres d'émission de fluorescence *in vivo* (exc 495 nm) au cours du stress UV (gauche) et d'absorption *in vivo* normalisés au pic de chl dans le rouge, avant et après stress UV (droite).

**Figure 81** : Réactions immunologiques contre les PE de *Synechococcus* sp. WH8102 avant et après stress UV.

**Figure 82** : Gradient de viscosité obtenu après purification des PBS de *Synechococcus* sp. WH8102.

**Figure 83** : Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence des PBS de *Synechococcus* sp. WH8102 avant et après exposition d'une culture au UV.

**Figure 84** : Profil SDS-PAGE de PBS de *Synechococcus* sp. WH8102 : Culture témoin (A), Culture ayant subi un stress UV fraction inférieure (B) et supérieure (C).

**Figure 85** : Scénario des photodommages encourus par les PBS lors d'une exposition brutale aux UV, et modèle de PBS acclimaté à une faible dose d'UV chez *Synechococcus* sp. WH8102.

**Figure 86** : Gradient de viscosité suivant la dissociation des thylacoïdes de *Synechococcus* sp. WH8102 cultivé à  $700 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (A) et spectres d'absorption des fractions orange et vertes (B). Chromatogramme (C) et profil SDS-PAGE (D) de la fraction supérieure jaune du gradient de viscosité.

**Figure 87** : Elution de la fraction orange sur colonne DEAE (absorption à 490 nm ; Gauche) et spectre d'absorption de la fraction purifiée (Droite).

**Figure 88** : Structure de la région génomique conservée incluant le gène putatif de caroténoprotéine chez *Synechococcus* spp. WH8102, WH7803, RCC307 et CC9311. Car : caroténoprotéine, két : kétolase putative, gène hypothétique conservé.

**Figure 89** : Arbre phylogénétique des séquences peptidiques de caroténoprotéines cyanobactériennes (Neighbour-joining avec valeurs de bootstrap).

**Figure 90** : Arbre phylogénétique des séquences peptidiques des  $\beta$ -carotène kétolases et hydroxylases (CrtR) cyanobactériennes (Neibourg-joining avec valeurs de bootstrap).

## *Liste des tableaux*

**Tableau 1** : Complexes des CRI et II contenant de la Chl *a* chez les cyanobactéries et les chloroplastes (Valeurs consensus de différentes sources, d'après Green & Durnford (1996).

**Tableau 2** : Distribution des chromophores sur les PE de cyanobactéries et d'algues rouges (Sidler et al., 1994).

**Tableau 3** : Protéines antennaires à Chl *a/b* des plantes supérieures d'après (Durnford et al. 1996).

**Tableau 4** : Caractérisation de caroténo-protéines de l'enveloppe cellulaire chez plusieurs oxyphotobactéries. P.M. : Poids Moléculaire ; Memb. ext. : Membrane externe ; Memb. cyto. : membrane cytoplasmique ; nd : donnée non mentionnée.

**Tableau 5** : Rapports pigmentaires des fractions enrichies membranaires en tykacoides de *Synechococcus* sp. WH8102 acclimate à trois intensités lumineuses.

**Tableau 6** : Rapports pigmentaires à la chl *a* des pigments membranaires majeurs avant et après 1 h d'exposition aux UV, chez *Synechococcus* sp. WH8102.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	- 14 -
<b>I Picophytoplancton marin et photosynthèse</b> .....	- 14 -
A/ Les organismes picophytoplanctoniques.....	- 16 -
B/ Photosynthèse oxygénique et antennes photosynthétiques .....	- 21 -
1) Les réactions photosynthétiques oxygéniques claires et les complexes pigmentaires associés.....	- 21 -
2) Les antennes extrinsèques aux membranes : les phycobilisomes .....	- 30 -
a) Structure des phycobilisomes .....	- 30 -
b) Biosynthèse des phycobiliprotéines .....	- 42 -
c) Le transfert orienté d'énergie au sein du phycobilisome.....	- 43 -
d) Principaux modèles structuraux de phycobilisomes .....	- 46 -
e) Nature, organisation et évolution des gènes de phycobiliprotéines .....	- 47 -
3) Les antennes intrinsèques à chl a/b .....	- 54 -
a) Les plantes supérieures .....	- 55 -
b) Les algues vertes.....	- 59 -
<i>Les Chlorophyceae</i> .....	- 59 -
<i>Les Prasinophyceae</i> .....	- 60 -
c) Les oxyphotobactéries a chl <i>b</i> .....	- 61 -
C/ Adaptation et phylogénie du picophytoplancton marin .....	- 62 -
1) <i>Prochlorococcus</i> .....	- 63 -
2) <i>Synechococcus</i> .....	- 68 -
3) Les Prasinophyceae.....	- 73 -
<b>II Photoprotection et photoacclimation</b> .....	- 79 -
A/ Photophysiole des phycobilisomes .....	- 79 -
1) La réponse à l'intensité lumineuse .....	- 79 -
2) Acclimation à la qualité de la lumière : l'adaptation chromatique chez les cyanobactéries .....	- 81 -
a) Le cas des oxyphotobactéries d'eau douce.....	- 81 -
b) L'adaptation chromatique chez les cyanobactéries marines .....	- 88 -
3) L'impact des UV sur les phycobilisomes .....	- 91 -
B/ L'enveloppe cellulaire des oxyphotobactéries, un système particulier.....	- 94 -
1) Une enveloppe bactérienne singulière .....	- 94 -
2) Mobilité et agrégation .....	- 96 -
3) Les caroténo-protéines de l'enveloppe cellulaire .....	- 97 -
a) Généralités .....	- 97 -
b) Les caroténo-protéines hydrophobes .....	- 98 -
c) Les caroténo-protéines hydrophiles .....	- 99 -
d) Conclusions .....	- 101 -
C/ Les molécules spécifiquement impliquées dans la photoprotection contre les UV .....	- 103 -
1) Les Acides Aminés à Mycosporine.....	- 104 -
2) La scytonémine .....	- 106 -
3) Les polysaccharides extracellulaires.....	- 107 -
4) L'implication des caroténoïdes, conclusions.....	- 107 -

CHAPITRE I : Caractérisation de la photophysologie de la souche de *Synechococcus* sp. WH8102 ..... - 109 -

CHAPITRE II : Structure et photoacclimatation des phycobilisomes de *Synechococcus* sp. WH8102 ..... - 127 -

CHAPITRE III : L'adaptation chromatique de groupe IV chez les *Synechococcus* marins..... - 142 -

CHAPITRE IV : Photodommages et photoprotection chez les *Synechococcus* marins.... - 158 -

CHAPITRE V : Les antennes photosynthétiques des Mamiellales : le cas d'*Ostreococcus tauri* ..... - 177 -

**CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES** ..... - 199 -

**REFERENCES** ..... - 205 -

## **INTRODUCTION**

Les océans couvrent environ 70% de la surface du globe et représentent ainsi un environnement physico-chimique d'une grande importance pour notre planète, celui où, selon toute vraisemblance, est apparue la vie il y a quelque cinq milliards d'années. Les organismes vivants peuplant les eaux marines sont couramment répartis en plusieurs classes selon leur habitat, leur mode de vie ou encore leur dépendance vis-à-vis des phénomènes physiques, comme les courants. Ainsi le plancton (de *plagktos*, errant) est l'ensemble des organismes vivants (uni ou pluricellulaires) qui flotte dans les eaux, sans pouvoir s'opposer aux courants marins, à l'inverse du necton capable de déplacements indépendants (poissons adultes, mammifères marins, *etc...*). On différencie le plancton végétal (phytoplancton) et le plancton animal (zooplancton). Bien que certains organismes planctoniques puissent atteindre des tailles importantes comme les méduses, la majorité du plancton est de taille microscopique et représente un compartiment basal des réseaux trophiques marins.

Le plancton est classiquement divisé en plusieurs classes de taille. Ainsi, le microplancton mesure entre 20 et 200  $\mu\text{m}$ , le nanoplancton entre 2 et 20  $\mu\text{m}$  et le picoplancton moins de 2-3  $\mu\text{m}$ . Le microphytoplancton et le nanophytoplancton, comme les diatomées et les dinoflagellés, ont tendance à dominer les eaux côtières ou enrichies en nutrilites par des phénomènes physiques locaux comme les upwelling. Le picophytoplancton, quant à lui, est présent partout, souvent en abondance, mais il ne domine la biomasse chlorophyllienne que dans les eaux du large. Il présente une composante procaryote importante, constituée par deux genres cyanobactériens principaux *Prochlorococcus* et *Synechococcus* (Partensky et al. 1999a, b, Scanlan and West 2002), ainsi que d'une multitude de petits eucaryotes photosynthétiques dont l'importante diversité commence seulement à être appréhendée (Guillou et al. 2004, Moon-van der Staay et al., 2001). Parce qu'il est répandu sur presque les trois quarts de la surface du globe, le picophytoplancton marin est écologiquement très important. En effet, grâce à la photosynthèse oxygénique, le picophytoplancton contribue de façon importante aux échanges gazeux (oxygène, dioxyde de carbone) entre l'atmosphère et l'océan. Ce processus photochimique se caractérise par une absorption de la lumière solaire ayant pour conséquence l'absorption d'une molécule de dioxyde de carbone et l'émission d'une molécule de dioxygène, et a pour but la production de molécules énergétiques et l'élaboration de sucres. Chez tous les organismes photosynthétiques, la capture des photons solaires par l'appareil photosynthétique est facilitée par des « antennes », structures protéiques liant des chromophores, dont la nature et la composition pigmentaire est très variable. En effet, ceux-ci sont soumis à de grandes variations de la quantité et de la qualité de la lumière.

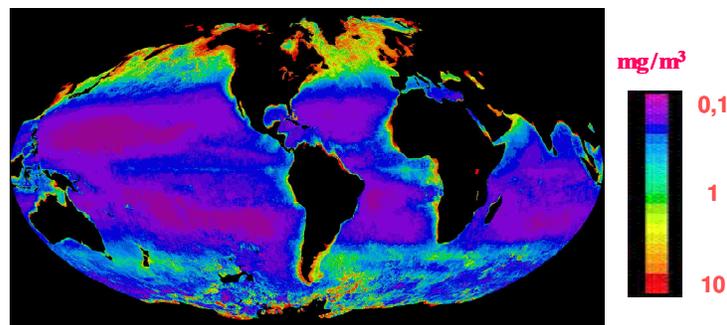
Il existe un gradient d'intensité de lumière décroissant de la surface vers les eaux profondes et nous verrons plus loin que certains organismes picophytoplanctoniques se sont adaptés aux variations spatiales de la quantité de lumière. De plus, à cause des propriétés optiques de l'eau, la lumière parvenant en profondeur est plus riche en radiations bleu-vert, alors que dans les eaux superficielles l'essentiel du spectre lumineux solaire est présent. Les eaux de surface et de profondeur constituent ainsi des environnements lumineux très distincts. Il existe de plus un gradient horizontal de variation de la quantité et de la qualité de la lumière. Les eaux côtières sont souvent chargées de nombreuses particules de nature diverse et laissent peu pénétrer la lumière. De plus, ces particules, organiques (phytoplancton) ou inorganiques (substances humiques, etc.) sont souvent à l'origine d'un enrichissement des eaux côtières en radiations jaune-vert. En revanche, les eaux du large sont beaucoup moins riches en particules. Elles sont claires et présentent ainsi un coefficient d'atténuation de la lumière très faible. Les radiations bleues y sont abondantes. Enfin, l'ensemble de l'océan mondial est aussi soumis à des variations temporelles de la lumière à plusieurs échelles de temps (passage de nuages, cycles journaliers et saisonniers, etc...).

Afin d'optimiser les processus de photosynthèse, les organismes picophytoplanctoniques ont dû développer des phénomènes d'adaptation (au sens évolutif) et d'acclimatation (au sens physiologique) aux variations spatio-temporelles des propriétés de la lumière solaire. Afin de comprendre la façon dont le picophytoplancton régule sa photophysologie en fonction de la quantité et de la qualité de la lumière, il est indispensable d'étudier au laboratoire des souches clonales d'organismes picophytoplanctoniques représentatifs des communautés naturelles. C'est dans ce contexte scientifique et en privilégiant cette dernière approche que ce travail de thèse a été réalisé. Notre étude s'est intéressée tout d'abord à la structure des antennes photosynthétiques de plusieurs organismes picophytoplanctoniques intéressants, dont le picoeucaryote *Ostreococcus*, mais surtout les cyanobactéries marines du genre *Synechococcus*, avant d'étudier la réponse des antennes de ces dernières à la quantité et à la qualité de la lumière. Cette thèse de doctorat est présentée sous la forme d'une synthèse bibliographique détaillée suivie des divers travaux organisés en cinq chapitres.

## **I Picophytoplancton marin et photosynthèse**

### **A/ Les organismes picophytoplanctoniques**

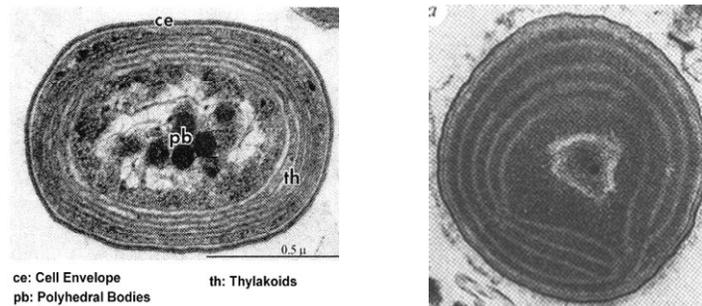
Les océanographes ont longtemps considéré les vastes zones centrales des océans comme de véritables déserts biologiques. Ces régions très pauvres en sels nutritifs et en chlorophylle (Chl, Figure 1), semblaient en effet incompatibles avec une prolifération du phytoplancton, compartiment basal des réseaux trophiques marins. Les observations des traits de filet à phytoplancton en microscopie photonique et les comptages de cellules confirmaient en effet la faible quantité d'organismes présents ainsi que de la faible biodiversité globale. Les organismes phytoplanctoniques considérés alors comme majeurs tels que les diatomées et les dinoflagellés mesurant entre 20 et 200  $\mu\text{m}$  (microphytoplancton) présentent en effet une distribution globale essentiellement côtière, et leurs concentrations chutent considérablement dès que l'on s'éloigne des eaux du plateau continental. Cependant, les quantités de chlorophylle (chl) détectées au milieu des océans ne concordaient pas avec le faible nombre d'organismes phytoplanctoniques recensés. Durant les 25 dernières années, des investigations plus poussées et des progrès technologiques importants ont permis aux océanologues de mettre progressivement en évidence que ces zones océaniques recélaient en fait une grande variété d'organismes photosynthétiques de taille micrométrique, ce qui a bouleversé notre conception des écosystèmes pélagiques.



**Figure 1 :** Distribution mondiale des concentrations en chl a (image SeaWiFS)

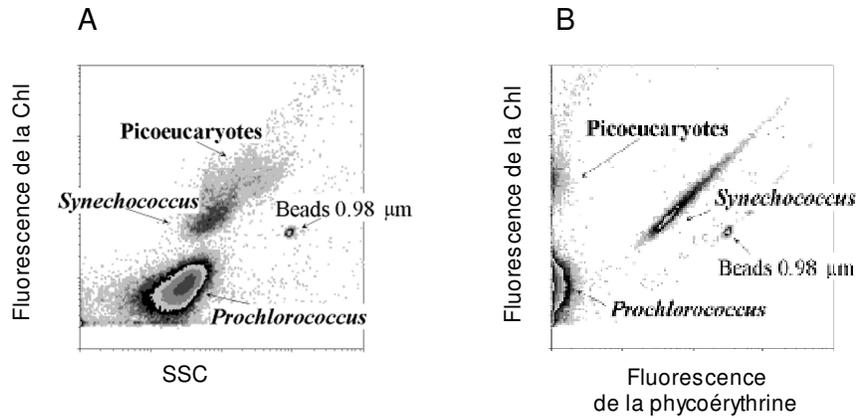
C'est vers la fin des années 1970 que plusieurs études montrèrent que la fraction picophytoplanctonique (0.2-2  $\mu\text{m}$ ) des eaux océaniques contenait un grand nombre de bactéries photosynthétiques à fluorescence orange (Sieburth 1978b, a, Johnson & Sieburth 1979, Waterbury et al. 1979). Ils les retrouvèrent jusqu'à plusieurs centaines de mètres de profondeur en

mer d'Arabie, des Sargasses, dans le Golfe du Pérou, en Atlantique Nord, et plus périodiquement dans le port de Woods Hole, les concentrations en cellules atteignant des valeurs de l'ordre de  $10^3$ - $10^4$  cellules. mL<sup>-1</sup>. Observant une morphologie commune pour la majorité des cellules à fluorescence orange ainsi qu'un mode de division dans un seul plan, ces auteurs assignèrent ces organismes au genre *Synechococcus* déjà connu en eau douce (Figure 2). D'autres types cellulaires ont été découverts par (Johnson & Sieburth 1979) mais la difficulté à les isoler en culture empêcha une bonne caractérisation de ces organismes. Constatant l'ubiquité et l'abondance de ces oxyphotobactéries, la communauté scientifique commençait à soupçonner leur importance écologique. De nombreuses souches de *Synechococcus* marins furent isolées en culture notamment par Waterbury qui dans un article qui fait encore référence aujourd'hui fit une description détaillée de leur diversité, leur biologie et leur écologie (Waterbury et al. 1986).



**Figure 2 :** Cellules de *Prochlorococcus* sp. (gauche) et *Synechococcus* sp. (droite) visualisés en MET, d'après Johnson & Sieburth (1979) et Chisholm et al. (1988), respectivement.

Les découvertes n'en étaient toutefois qu'à leur début. Une innovation technologique permit une explosion des études relatives au picophytoplancton. Initialement développée dans le secteur biomédical, l'application de la cytométrie en flux à l'océanographie fut en effet un pas décisif pour l'étude du picophytoplancton. Les cytomètres en flux permettent de visualiser facilement ces petits organismes planctoniques ainsi que de ségréger les différentes populations selon leur taille et leur pigmentation (Figure 3 ; Legendre & Yentsch 1989). De plus l'énumération des cellules est aisée et précise. A l'aide de cette technique, Chisholm et coll. (Chisholm et al. 1988, Chisholm 1992) découvrirent, isolèrent en culture et décrivent un nouveau type d'oxyphotobactérie planctonique marine qu'il nommèrent *Prochlorococcus marinus*.

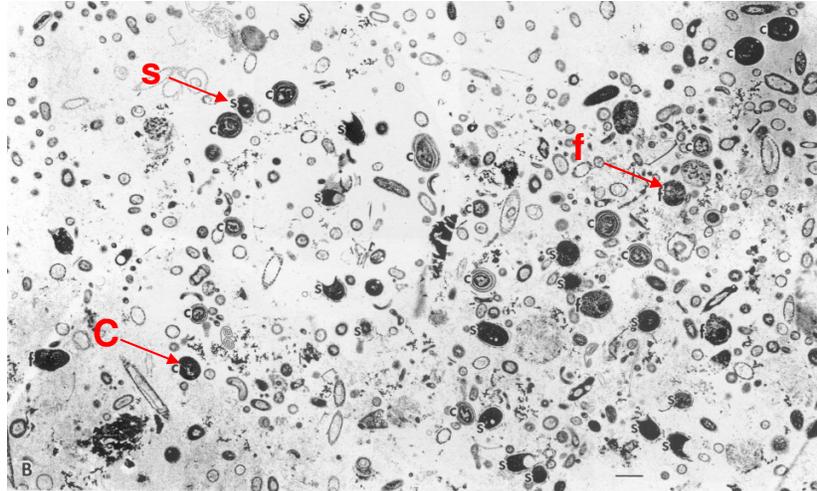


**Figure 3 :** Analyse par cytométrie en flux d'un échantillon prélevé dans le Pacifique équatorial (45 m). *Synechococcus* peut être distingué sur la base de son contenu en phycoérythrine et en Chl ainsi que par sa taille cellulaire. Il peut ainsi être discriminé sur les cytogrammes. A : fluorescence de la Chl en fonction de SSC (side scatter : diffusion de la lumière à 90° qui est fonction de la taille cellulaire). B : fluorescence de la phycoérythrine *versus* fluorescence de la Chl". Les cellules de *Prochlorococcus* sont identifiées sur les mêmes cytogrammes par leur faible fluorescence orange (due à la phycoérythrine) et leur plus faible SSC alors que les picoeucaryotes présentent une quantité de Chl et un SSC par cellule plus fort (Partensky, 1999).

Cet organisme qui ne mesure pas plus de 0,7 µm, ainsi difficilement visualisable en microscopie photonique, avait en fait été déjà visualisé en MET par Johnson & Sieburth (1979 ; Figure 2). Son ultrastructure avait alors été présentée comme type II de par l'accolement des thylacoïdes, contrairement aux *Synechococcus* typiques qui constituaient le type I. Les travaux de Chisholm et al. (1988) et Olson et al. (1990) montrèrent que *Prochlorococcus* est extrêmement abondant dans les océans, atteignant des concentrations de plus de  $10^5$  cellules.mL<sup>-1</sup>. De plus, sa pigmentation s'est avérée tout à fait singulière puisque ces cellules contiennent notamment de la divinyle-chl *a* et *b*, de la chl *b* (chez certaines souches seulement) de l' $\alpha$ -carotène et des traces de phycoérythrine, le pigment majeur chez la plupart des *Synechococcus* marins. Les analyses phylogénétiques révélèrent que *Prochlorococcus* est pourtant un cousin proche de ces derniers (Chisholm et al. 1992). La multiplication des études écologiques depuis sa découverte en 1988 a révélé que cette oxyphotobactérie est sans doute l'organisme photosynthétique à la fois le plus petit et le plus abondant sur Terre (Partensky et al. 1999b).

Les profils cytométriques de picophytoplancton marin montrent aussi la présence d'une troisième population d'organismes photosynthétiques, moins abondants mais de taille plus importante et contenant plus de chl (Figure 3). Cette population est constituée de picoeucaryotes dont l'existence est en réalité connue depuis très longtemps (Cole 1937 ; Parke 1949 ; Butcher 1952). Leur importance écologique n'a toutefois été réalisée que vers les années 1980 (Johnson &

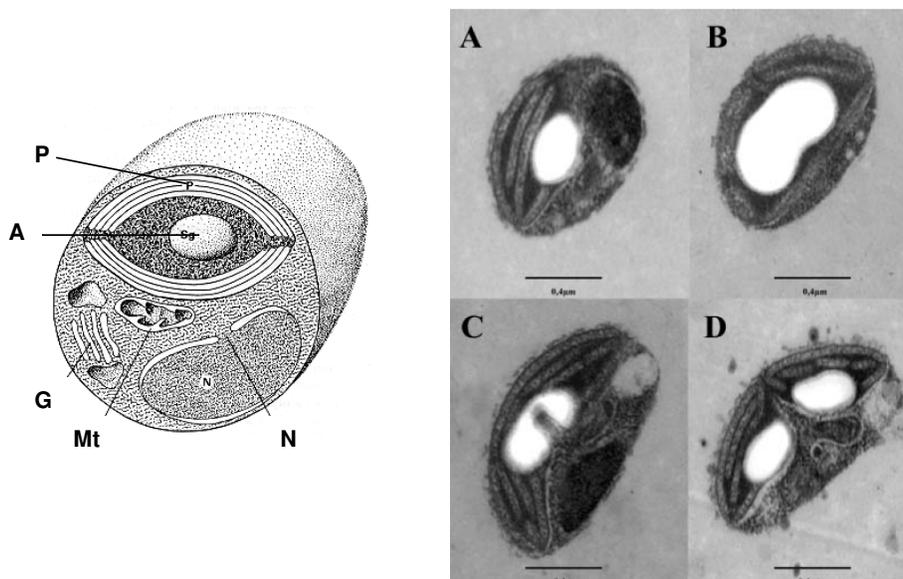
Sieburth 1982, Murphy & Haugen 1985; Shapiro & Guillard 1986). La méthodologie classique d'étude des microalgues marines consistait en l'analyse de souches isolées en culture. Dans un article de 1982, Johnson et Sieburth ont visualisé les communautés picoplanctoniques directement par microscopie électronique en transmission (Figure 4) et ont sensibilisé la communauté scientifique à l'importance des picoeucaryotes photosynthétiques, notamment *Micromonas pusilla* et une prasinophyte écaillée ressemblant d'après les photos à *Bathycococcus prasinos*.



**Figure 4** : Photo en MET de picoplancton marin concentré de Grand Banks d'après Johnson & Sieburth (1982). Les cellules phytoplanctoniques mesurent approximativement 1  $\mu\text{m}$  et sont de nature procaryote et eucaryote. **C** : cyanobactérie ; **s** : prasinophyte écaillé ; **f** : *Micromonas pusilla*

Les morphologies souvent similaires des picoeucaryotes marins ont rendu leur classification taxonomique difficile, même par microscopie électronique. Les classifications étaient jusque là basées sur la présence de flagelles, d'écaillés ou encore sur la pigmentation. Puisque ces organismes sont souvent dépourvus de caractères morphologiques qui permettent de les reconnaître aisément, ce sont encore une fois les innovations technologiques et plus précisément les techniques de biologie moléculaires qui ont permis des avancées importantes sur la diversité et l'écologie des picoeucaryotes marins. Parmi ces techniques, citons notamment les bibliothèques de clones (Guillou et al. 2004 ; Massana et al. sous presse) permettant des études phylogénétiques indépendantes de la cultivabilité des organismes, la TGGE ou la DGGE (Temperature ou Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) donnant des indications sur la diversité des communautés, et les études par hybridation *in situ* (FISH-TSA ; Not et al. 2002, Not et al. 2004) permettant l'énumération *in situ* de taxons, voire d'espèces. Par ailleurs, notons aussi l'utilité des analyses pigmentaires par HPLC des communautés picophytoplanctoniques, car

certaines classes picophytoplanctoniques possèdent des pigments caractéristiques (Jeffrey 1980, Jeffrey & Mantoura 1996, Jeffrey et al. 1997, Jeffrey et al. 1999). Ces analyses ont révélé que les picoeucaryotes marins sont extrêmement diversifiés et de nouvelles classes ont récemment été décrites (Guillou et al. 1999, Eikrem et al. sous presse). Parmi ces organismes, on trouve ainsi des représentants des groupes des Chlorophyta (Chlorophyceae, Prasinophyceae, Trebouxiophyceae, etc...), Heterokontophyta (Pelagophyceae, Bolidophyceae, Chrysophyceae, etc...), Prymnesiophyta et Cryptophyta. Une classe importante au sein des picoeucaryotes marins photosynthétiques est celle des Prasinophyceae (de « *Prasinos* » faisant référence à la couleur vert poireau) et au sein de celle-ci, l'ordre des Mamiellales regroupe des espèces particulièrement intéressantes. Citons notamment *Mantoniella squamata*, *Bathycoccus prasinos* ainsi que *Micromonas pusilla*, la première espèce picophytoplanctonique décrite, tout d'abord sous le nom de *Chromulina pusilla* (Butcher 1952). Une autre Mamiellale qui fait l'objet d'un des articles présenté dans cette thèse est le genre *Ostreococcus*. Cette petite algue verte a été isolée dans une lagune, l'étang de Thau, située à proximité de l'Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-mer (Courties et al. 1994). Cette lagune est un environnement particulier : en connection avec la Mer Méditerranée par trois canaux, la température oscille entre 4 et 27°C et la salinité entre 24 et 38 pour mille. Tout comme *Prochlorococcus* est le plus petit procaryote oxyphototrophe connu à ce jour, *Ostreococcus tauri* est actuellement le plus petit eucaryote marin photosynthétique (coccoïde d'environ 0.8 µm ; Chrétiennot-Dinet et al. 1995 ; Figure 5).



**Figure 5** : Représentation schématique (gauche ; Chrétiennot-Dinet et al., 1995) et photos en microscopie électronique d'*Ostreococcus tauri* (droite ; Ral et al. 2004) illustrant une division cellulaire.

Gauche : N noyau, Mt Mitochondrie, G Golgi, A amidon, P plaste. Droite : division cellulaire, l'échelle est à 0.4  $\mu\text{m}$ .

Il possède une structure extrêmement compactée avec un noyau, un appareil de Golgi, une mitochondrie, un chloroplaste et un grain d'amidon, le tout au sein d'un compartiment cytoplasmique très réduit. Sa pigmentation, typique des Prasinophyceae, comprend des pigments particuliers tels que la Mg 3,8-divinylphaeoporphyrine  $a_5$  (MgDVP), l'uriolide et la prasinoxanthine, se distinguant ainsi de la pigmentation plus simple des Chlorophyceae. Bien qu'initialement trouvé dans une lagune côtière, *Ostreococcus* apparaît aujourd'hui comme très ubiquiste puisque de nombreuses souches ont été isolées dans diverses mers et océans (Rodriguez et al., sous presse).

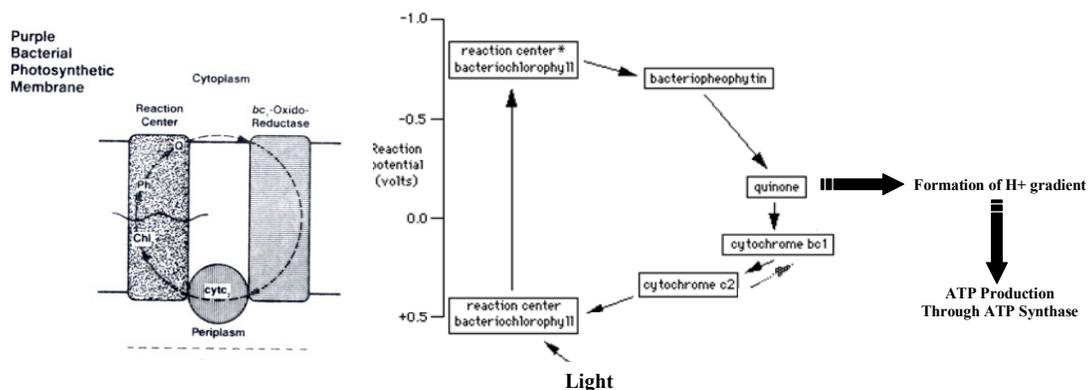
Depuis la découverte et la prise de conscience de l'importance du picophytoplancton marin tant procaryote qu'eucaryote, les travaux sur ces organismes se sont multipliés, dans des domaines aussi variés que l'écologie, la diversité, la physiologie, la génétique et l'évolution, mais jusqu'à la fin du siècle dernier, l'étendue des connaissances est restée relativement limitée. Cependant, grâce notamment à la petite taille de leurs génomes, plusieurs souches picoplanctoniques marines ont récemment fait l'objet de programmes de séquençage complets de leurs génomes. Ainsi plusieurs génomes de souches de *Prochlorococcus*, *Synechococcus* ainsi que d'*Ostreococcus* ont été publiés ou sont en cours de séquençage ou d'annotation. En parallèle avec les approches expérimentales, l'étude et la comparaison de ces génomes vont permettre une compréhension approfondie de l'évolution de ces organismes ainsi que faciliter le développement des études génétiques et protéomiques.

## **B/ Photosynthèse oxygénique et antennes photosynthétiques**

### **1) Les réactions photosynthétiques oxygéniques claires et les complexes pigmentaires associés**

La photosynthèse est un processus essentiel sur notre planète car elle permet la transformation de l'énergie lumineuse solaire en énergie chimique avec comme corollaire, l'absorption d'une molécule de dioxyde de carbone. Du fait de leur abondance dans les vastes zones océaniques, les organismes picoplanctoniques qui réalisent la photosynthèse sont notamment des acteurs prépondérants de la régulation du climat planétaire et du cycle biogéochimique du carbone. Il existe deux types principaux de photosynthèse. Les procaryotes phototrophes sont largement répartis entre les phyla du domaine eubactérien comprenant les bactéries vertes sulfureuses, filamenteuses, les bactéries pourpres, les héliobactéries et les

cyanobactéries<sup>1\*</sup>. Les premières pratiquent un mode de photosynthèse considéré comme primitif dit « anoxygénique » (sans dégagement d'oxygène), alors que les cyanobactéries pratiquent la photosynthèse dite « oxygénique ». Les organismes (procaryotes) pratiquant la photosynthèse anoxygénique sont classés en plusieurs types (Beja et al. 2002). Les bactéries dites pourpres non-sulfureuses (*Chloroflexus*, *Rhodospseudomonas*, *Roseobacter*, etc...) utilisent un complexe pigment-protéine principal, un photosystème (PS), composé de deux protéines principales (L et M) codées par les gènes *puf* et liant de la bactériochlorophylle *a*, absorbant dans le rouge relativement lointain (Deisenhofer & Michel 1989). Le PS des ces organismes est analogue avec le PSII trouvé chez tous les oxyphototrophes (voir ci-après, Michel & Deseinoffer 1988, Barber 1988). Les bactéries vertes sulfureuses et les Héliobactéries (*Heliobacter*, *Chlorobium*, etc...) utilisent un PS liant aussi de la bactériochlorophylle *a* et utilisant un complexe fer-soufre, analogue au PSI de la photosynthèse oxygénique (Pierson & Olson 1989, Schubert et al. 1998, Fyfe et al. 2002). La photosynthèse anoxygénique est basée sur un transfert cyclique des électrons au sein de membranes et conduit à la formation d'un gradient de pH entre le cytosol et le périplasma (Figure 6). Cette acidification provoque un flux de protons au travers des ATP-synthétase accompagné d'une synthèse d'ATP.

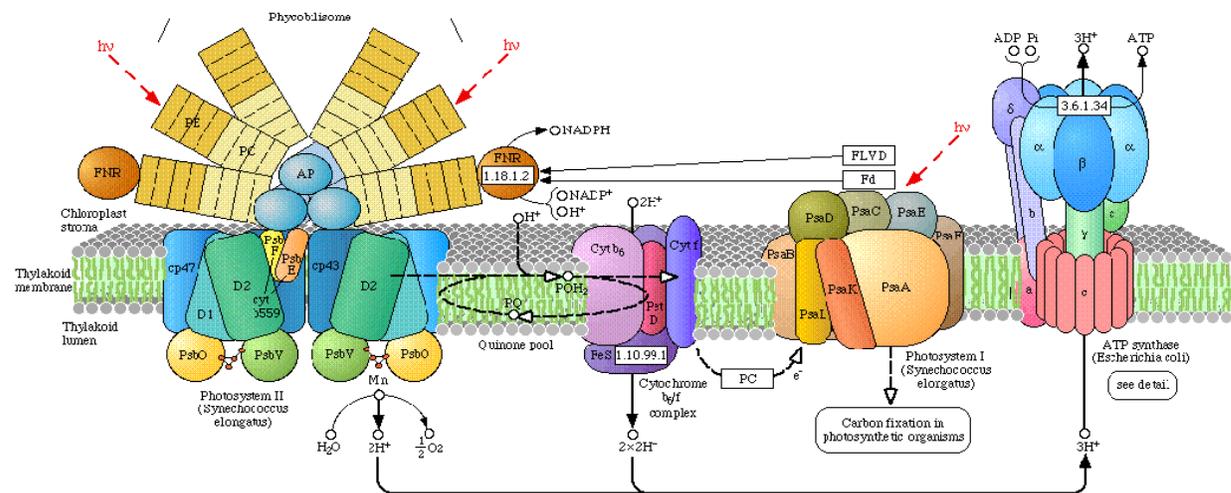


**Figure 6 :** Représentation schématique du transfert d'électrons photosynthétiques chez les bactéries anoxygéniques pourpres, modifié de Yurkov & Beatty (1998).

La photosynthèse oxygénique serait apparue il y a environ 3,5 milliards d'années (Awramik 1992). Les réactions photosynthétiques oxygéniques sont classiquement divisées en

<sup>1</sup> Le mot « cyanobactérie » vient du grec *cyanos* et se réfère à la couleur bleu-verte de certaines souches de ces organismes en culture. Une partie de mon travail de thèse illustre et explique la diversité des pigmentations trouvées chez les cyanobactéries qui sont loin d'être toutes bleu-vertes... Ainsi, dans cette thèse, le mot « cyanobactérie » dont le sens étymologique est dépassé sera souvent remplacé par le mot « oxyphotobactérie » qui paraît certes plus compliqué mais qui a le mérite d'être exact, puisqu'il désigne des bactéries pratiquant la photosynthèse oxygénique.

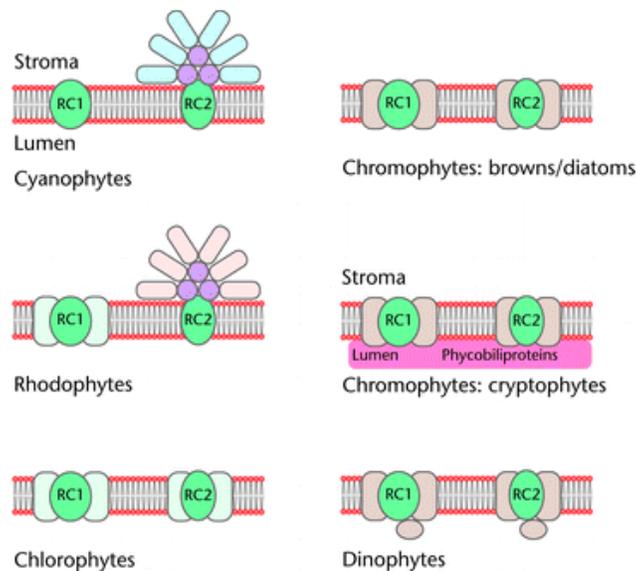
réactions « claires » et « sombres ». Les premières sont localisées au sein de sacs membranaires appelés thylacoïdes, qui sont libres dans le cytosol chez les procaryotes et confinés dans un chloroplaste chez les cellules eucaryotes, séparant le cytosol (chez les procaryotes) ou le stroma (chez les eucaryotes) du lumen. Ces membranes contiennent quatre complexes multiprotéiques principaux à l'origine du transfert d'électrons : deux PS (I et II), le cytochrome  $b_6/f$  et l'ATP synthase (Figure 7). La structure des PS est généralement décrite comme un centre réactionnel (CR) composé de deux protéines liant de la chl et du  $\beta$ -carotène, accompagné d'une antenne photosynthétique composée d'assemblages de complexes pigment-protéine de nature variée selon l'organisme considéré.



**Figure 7** : Appareil photosynthétique partiel de *Synechococcus* sp. Montrant les quatre principaux complexes protéiques présents dans les membranes photosynthétiques, avec schématisation détaillée des réactions photosynthétiques oxygéniques. Selon [http://www.genome.jp/dbget-bin/get\\_pathway?org\\_name=syn&mapno=00195](http://www.genome.jp/dbget-bin/get_pathway?org_name=syn&mapno=00195)

Chez la plupart des oxyphotobactéries connues, l'antenne photosynthétique du PSII est constituée par un macrocomplexe de phycobiliprotéines (PBP) hydrophiles, le phycobilisome (PBS), et le PSI ne possède souvent pas d'antenne externe propre. Les Rhodophyta possèdent aussi des PBS en tant qu'antenne principale du PSII et une antenne intramembranaire associée au PSI liant de la chl et des caroténoïdes. D'autres groupes tels que les Cryptophyta possèdent aussi de grandes quantités de PBP mais qui ne sont pas organisés en PBS. Chez les oxyphotobactéries à chl *b* que sont *Prochlorococcus*, *Prochloron* et *Prochlorothrix*, on trouve à la place du PBS un assemblage de protéines à six hélices transmembranaires nommées Pcb (pour Prochlorophyte Chl binding proteins ; Bibby et al. 2003b, Garczarek et al. 2000b, La Roche et al. 1996).

Chez les plantes supérieures et les algues, les antennes photosynthétiques des deux PS (ou seulement du PSI chez les algues rouges) sont des assemblages de polypeptides membranaires à trois hélices transmembranaires de la famille des protéines CABs (« Chl *a* binding protein ») ou apparentés. Elles lient différents types de chls et de caroténoïdes selon les organismes. On distingue classiquement les protéines de type LHC (Light-Harvesting Complex) présentes chez les chlorobiontes, et les protéines dites FCP (Fucoxanthin Chl binding Proteins) présentes chez des groupes taxonomiques aquatiques tels que les Heterokontophyta, Chrysophyta, Dinophyta, *etc.* Les organismes à LHC utilisent comme pigment accessoire majoritaire la chl b alors que les organismes à FCP contiennent une majorité de xanthophylles telles que la fucoxanthine ou la péricidine.

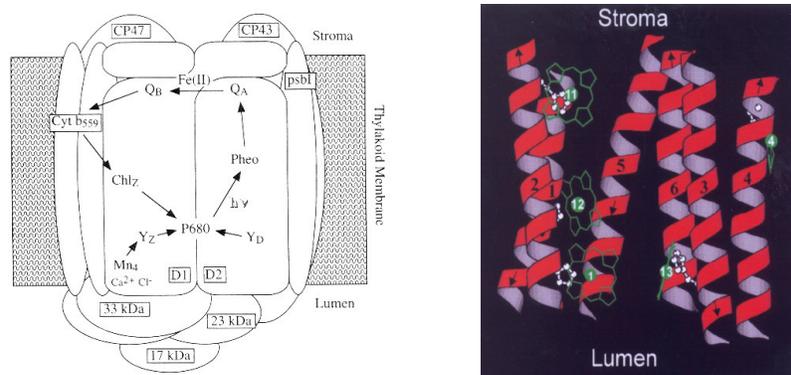


**Figure 8 :** Les différentes configurations d’antennes photosynthétiques chez les grands groupes d’organismes phytoplanctoniques. Les centres réactionnels (RC) sont représentés en vert, les antennes intrinsèques de type LHC en bleu-vert, de type FCP et PCP en mauve. Les PBP libres des Cryptophyceae sont représentées en fushia. Les PBS des cyanobactéries en bleu (certaines souches n’ont pas de PE) et ceux des Rhodophyta en rouge.

Il existe ainsi chez les organismes phytoplanctoniques une grande diversité au niveau de la nature et de l’agencement des antennes photosynthétiques au sein des thylacoïdes (Figure 8). Ces complexes pigments-protéines peuvent présenter des pigmentations (chls, caroténoïdes, phycobilines) et des localisations (extrinsèque/intrinsèque, présente ou non au niveau du PSI) très différentes.

L’énergie lumineuse est capturée par les antennes photosynthétiques qui vont la transférer à l’un des CR. Le CRII, associé en dimère au sein des membranes, est composé d’ une douzaine

de sous-unités protéiques (Figure 9). Les polypeptides principaux sont D1<sup>2</sup> et D2 (des protéines d'environ 30 kDa codées respectivement par les gènes *psbA* et *psbD*), les sous-unités  $\alpha$  (*psbE*) et  $\beta$  (*psbF*) du cyt b<sub>559</sub>, deux protéines formant l'antenne interne du PSII, CP47 (*psbB*) et CP43 (*psbC*) et Psb0, une protéine extrinsèque de 33 kDa, placée du côté luminal de la membrane thylacoïdale et impliquée dans la photolyse de l'eau. Dans le PSII, seules les protéines du D1, D2, CP43 et CP47 sont chromophorylées. Ces deux dernières sont les antennes internes du CR II (Pakrasi 1995) liant la majorité de la Chl *a* (12 à 25 molécules) et du  $\beta$ -carotène du CR II (Pakrasi 1995; Rhee et al. 1998), et transférant l'énergie d'excitation issue des antennes photosynthétiques majeures vers une paire de chl particulières nommées P680 et disposées entre D1 et D2 (Pakrasi 1995). CP43 et CP47 ont une structure similaire (Bricker 1990, Sayre & von Wrobelboerner 1994), constituée de six hélices transmembranaires avec les extrémités N- et C-terminales situées coté stroma. La principale différence entre ces protéines est la taille de la boucle entre les hélices transmembranaires 5 et 6 qui est plus longue d'environ 150 résidus chez CP47 (Bricker & Frankel 2002, Barber 2002, Clarke et al. 2002, de Weerd et al. 2002a, de Weerd et al. 2002b, Fyfe et al. 2002, Ishikawa et al. 2002, Kashino et al. 2002, Nayak et al. 2002, Nield et al. 2002, Smith et al. 2002, Wang et al. 2002, Kamiya & Shen 2003). La boucle de celle-ci est en contact avec PsbO et serait notamment impliquée dans la stabilisation du groupement manganèse présent a la surface de la face lumineuse du PSII (Vermaas et al. 1987, Frankel & Bricker 1995, Enami et al. 1997). Ces caractéristiques structurales ont été confirmées par la détermination de la structure tridimensionnelle du CR II à une résolution de 8 Å (Rhee et al. 1998, Rhee 2001).

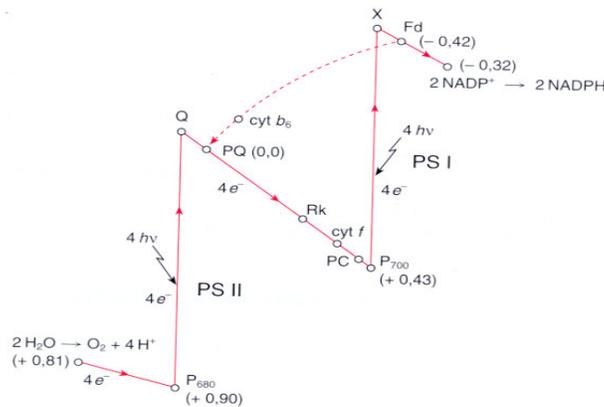


**Figure 9** : Modèle structural du complexe protéique du PSII incluant les cofacteurs du transfert d'électrons (Stewart & Brudvig 1998 ; voir texte). Représentation structurale d'une protéine de l'antenne interne, CP47, d'après Barber et al. (2000a).

<sup>2</sup> La lettre D est due au profil de migration "diffus" de ces protéines observé sur les premiers gels SDS-PAGE présentant ces protéines (Satoh, 1982). Elles ont de plus tendance à former un dimère que l'on détecte vers 60 kDa

L'énergie collectée par les antennes va modifier le potentiel redox des chl P680, leur permettant de céder un électron à des molécules de phéophytine *a*, leur accepteur primaire. Le P680 revient alors à son potentiel initial sous la forme P680<sup>-</sup> et récupère l'électron perdu auprès de son donneur primaire, une tyrosine de la protéine D1 dite tyrosine Z (Y<sub>Z</sub>). Ce résidu le récupère lui-même auprès du complexe d'atomes de manganèse se situant du côté luminal du PSII qui peut céder jusqu'à quatre électrons qu'il obtient en une fois par la photolyse de deux molécules d'eau. Cette dernière libère quatre protons et une molécule de dioxygène (Figure 9). La réduction de la phéophytine va donner lieu à celle de la quinone A (Q<sub>A</sub>). Cette dernière va réduire la quinone B (Q<sub>B</sub>) qui va initier le transfert photosynthétique d'électrons au sein des thylacoïdes. Un transport cyclique des électrons est possible par l'intermédiaire du cytochrome b559 et d'une molécule de chl de la protéine D1. Toutefois, le fonctionnement précis du PSI n'est pas encore entièrement compris et fait l'objet de recherches actives.

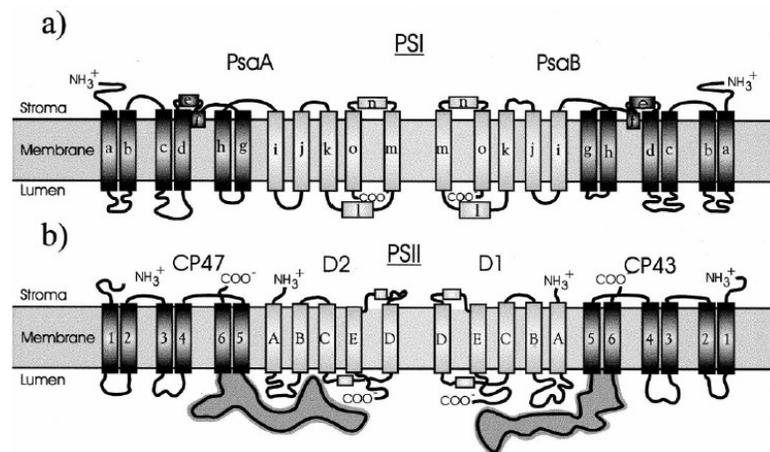
Les électrons vont alors être transférés le long d'une chaîne de transporteurs constituée notamment par la plastoquinone mobile, la protéine de Rieske, le cytochrome f et la plastocyanine, elle aussi mobile. Les électrons vont ainsi cheminer du PSII au PSI le long de cette chaîne de transporteurs d'électrons ordonnés selon leur potentiel redox (Figure 10).



**Figure 10** : Schéma du transfert d'électrons le long des potentiels redox associés aux différents transporteurs d'électrons chez les plantes supérieures. Q : quinone, Cyt : cytochrome, Rk : protéine de Rieske, Fd : ferredoxine. Les chiffres indiquent les potentiels redox et la flèche en pointillés illustre la possibilité d'un transfert cyclique d'électrons. Les transporteurs propres au CR sont détaillés en figure 9 et 12.

Le PSI a été mis en évidence en premier par Kok en 1960, de par son maximum d'absorption qui se situe dans le rouge lointain (700 nm). Son dimère de chl pièges est ainsi appelé P700 (Krauss et al. 1993). La structure du complexe PSI de *Synechococcus elongatus* a été déterminée à une résolution de 4 Å par cristallographie aux rayons X (Schubert et al. 1997). Le

CRI est constitué d'un centre réactionnel composé de deux grosses protéines de 58 à 70 kDa selon les organismes, PsaA et PsaB (Tableau 1), et fonctionne comme une oxydoréductase plastocyanine-ferrédoxine. Ces deux protéines portent un grand nombre de molécules de chromophores (75-100 chl *a* et 12-15  $\beta$ -carotène) Contrairement à celle du CRII, l'antenne interne du CRI est complètement intégrée au sein des molécules PsaA et PsaB, constituées de 11 domaines transmembranaires. Cependant, il y a une similitude flagrante d'organisation structurale d'une part entre les 6 domaines N-terminaux de PsaA/B constituant l'antenne interne du RCI et CP43/CP47 et d'autre part entre les cinq domaines C-terminaux de PsaA/B constituant le cœur du CRI et les 5 domaines de D1 et D2 (Figure 11 ; Barber et al. 2000b).



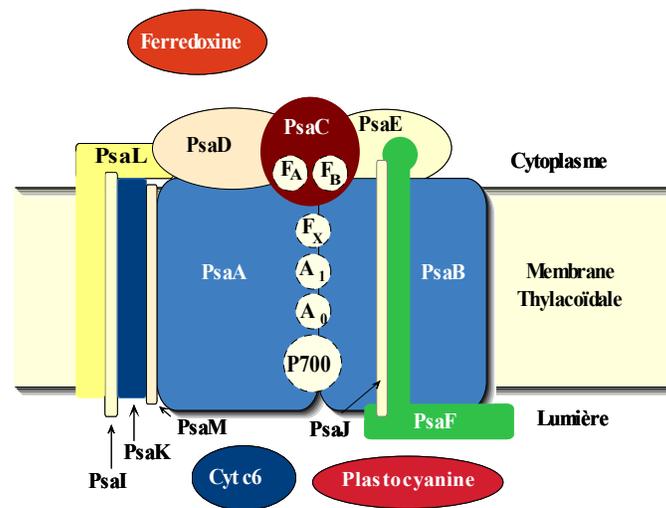
**Figure 11 :** Diagramme illustrant la similarité de l'organisation des hélices transmembranaires entre le CRI et le CRII, d'après Barber et al. (2000b). Le CRI est composé de deux protéines principales, PAsaA et PsaB, alors que le CRII est composé des protéines D1 et D2 entourées par une antenne interne composée des protéines CP43 et CP47. La structure globale est toutefois similaire.

**Tableau 1 :** Complexes des CRI et II contenant de la Chl *a* chez les cyanobactéries et les chloroplastes (Valeurs consensus de différentes sources, d'après Green & Durnford (1996).

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

PsaA et PsaB ont une migration aberrante sur gel et leur masse moléculaire apparente est fautive. Les séquences disponibles permettent de l'évaluer respectivement à 83 et 82 kDa.

Une série de cofacteurs est indispensable au fonctionnement du PSI : des chl ( $A_0$ ), la phylloquinone ( $A_1$ ) et des groupements fer-soufre ( $F_A$ ,  $F_B$  et  $F_X$  ; Golbeck 1987, Setif 1992, Green & Salter 1996, Malkin 1996, Nugent 1996, Scheller et al. 1997, Brettel 1997). Les cofacteurs du PSI qui participent à la chaîne de transfert d'électrons sont liés aux protéines PsaA, PsaB et PsaC (Scheller et al. 1997; Chitnis et al. 1995). Le CRI contient aussi 8 autres polypeptides dont certains contiennent des segments transmembranaires, mais aucune de ces protéines ne semblent lier de pigments (Figure 12 ; Chitnis et al. 1995; Green & Salter 1996).



**Figure 12** : Modèle d'organisation des polypeptides et des cofacteurs du PSI chez les cyanobactéries. La position exacte du PsaM par rapport aux autres sous-unités n'est pas connue. Les transporteurs d'électrons identifiés par spectroscopie comprennent le donneur primaire d'électrons, P700 (une paire spéciale de Chl *a*), les accepteurs primaires et secondaires d'électrons, A<sub>0</sub> (Chl *a*) et A<sub>1</sub> (phylloquinone) et 3 clusters Fer-Soufre, F<sub>A</sub>, F<sub>B</sub> et F<sub>X</sub> (Chitnis et al. 1995, Krauss et al. 1996).

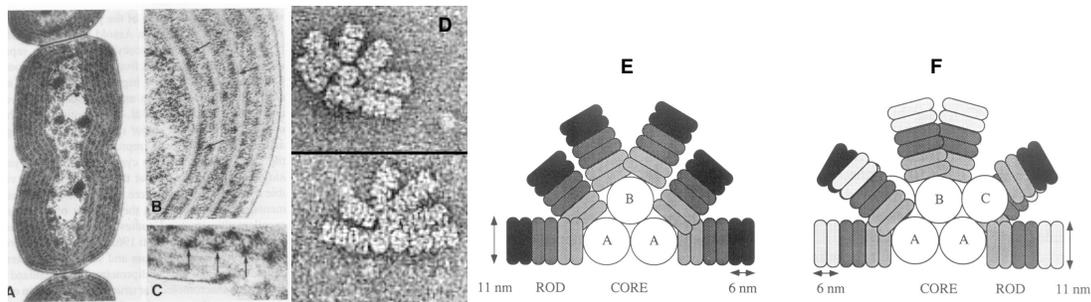
Quelques picosecondes après l'absorption de photons par un pigment antennaire, l'état excité P700\* cède un électron au puissant réducteur A<sub>0</sub> et passe à l'état P700<sup>+</sup>. Cette séparation de charge est stabilisée par le passage de l'électron de A<sub>0</sub> à A<sub>1</sub> et ce dernier passe cet électron aux trois groupements fer-soufre successifs F<sub>A</sub>, F<sub>B</sub> et F<sub>X</sub>. Ceux-ci vont enfin transférer l'électron à la ferrédoxine liant 2 fer-soufre et associée à une autre flavoprotéine, la ferrédoxine-NADP réductase (FNR ; 45 kDa) qui facilite le passage des électrons depuis la ferrédoxine jusqu'au NADP<sup>+</sup>. Le P700<sup>+</sup> récupère l'électron qu'il a cédé auprès de la plastocyanine, transporteur d'électrons libres dans le lumen (Figure 12).

Le transfert d'électrons au sein des thylacoïdes a trois conséquences fondamentales qui caractérisent la photosynthèse oxygénique. Tout d'abord, le complexe Mn de la face lumineuse du PSII est responsable de la photolyse de l'eau et provoque la formation d'oxygène. Ensuite, suite à cette photolyse et l'oxydation de transporteurs tels que la plastoquinone, les réactions photosynthétiques claires conduisent à l'acidification du lumen. Ce gradient de pH électrochimique transthylacoïdal va générer un flux de protons au travers des complexes ATP synthases qui vont synthétiser de l'ATP dans le stroma ou le cytosol chez les procaryotes. Enfin, le transfert d'électrons s'achève par la formation d'un puissant réducteur, la NADPH. Celle-ci et l'ATP vont être utilisés dans les réactions photosynthétiques sombres afin d'incorporer une molécule de CO<sub>2</sub> dans le ribulose 1, 5 biphosphate par action enzymatique de la Rubisco.

## 2) Les antennes extrinsèques aux membranes : les phycobilisomes

### a) Structure des phycobilisomes

Certains groupes tels que les Rhodophyta et la plupart des cyanobactéries ne présentent pas d'antennes photosynthétiques intrinsèques associées au PSII, cette fonction étant assurée par des macrostructures de taille considérable (de 7000 à 15000 kDa) visualisables en microscopie électronique à transmission en coloration négative (Figure 13) : les PBS. Ces macrocomplexes protéiques présentent un cœur sur lequel sont fixés des projections radiaires (ou bras). Les structures connues de PBS présentent des variations avec des formes hémisphériques, hémidiscoïdes ou en paquet. Le cœur peut être bi, tri ou pentacylindrique.

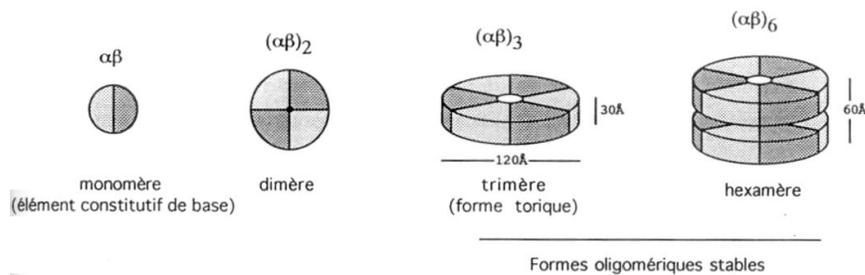


**Figure 13** : Photos en microscopie électronique de *Pseudoanabaena* sp. PCC 7409 (A) et zoom sur les espaces interthylacoïdaux (B & C), les flèches pointent des PBS, d'après Bryant et al. (1979), PBS de *Calothrix* sp. PCC 7601 visualisés en TEM, d'après Sidler (1994 ; D). Représentation schématique de deux différentes structures de PBS. E : Modèle d'organisation de PBS hémidiscoïdal à cœur tricylindrique type *Synechocystis* sp. PCC 6714. F : Modèle d'organisation du PBS hémidiscoïdal à cœur pentacylindrique d'*Anabaena* sp. Théoriquement, huit projections radiaires peuvent être fixées à ce type de PBS (Sidler, 1994).

#### *Structure et propriétés des bras des phycobilisomes*

Les PBS sont composés de complexes pigments-protéines nommés PBP dont l'existence est connue depuis très longtemps (Esenbeck 1836, Kützing 1843) ; pour une revue historique voir Tandeau de Marsac 2003). Elles arborent des couleurs très vives et sont souvent très fluorescentes. Au début des années 1900, la cristallisation de certaines PBP permit de mettre en évidence une certaine ressemblance avec les globines du fait qu'elles sont composées d'une partie protéique et d'une partie pigmentaire solidement fixée, similaire aux pigments biliaires animaux (Kylin 1910, Kylin 1912 ; Lemberg 1928, 1930). L'étude des PBS commença réellement dans les années 60 : (Gantt & Conti 1965, 1966a, b) réalisèrent une série d'expériences sur les algues rouges qui leur permit d'isoler des « granules » associés aux thylacoïdes. Ces granules étaient essentiellement composés de PBP. Quatre types d'apoprotéines correspondant aux PBP

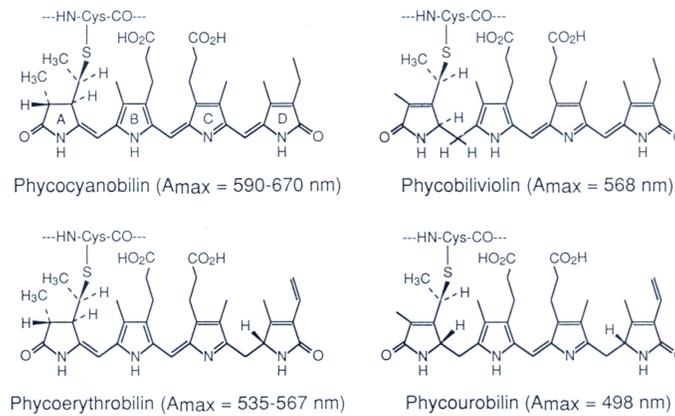
nommées phycocyanine (PC), phycoérythrine (PE ; d'*erythros*, rouge), phycoérythrocyanine (PEC) et allophycocyanine (AP) sont connus à ce jour. Les apoPBP sont composées de deux peptides principaux de 15-20 kDa appelés chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Le plus petit état d'agrégation des PBP est un hétérodimère ( $\alpha\beta$ ) pouvant s'agréger jusqu'à former des hexamères  $\alpha\beta_6$  (Figure 14). Les hexamères de PE et de PC ont une structure discoïdale d'environ 120 angströms de diamètre et 60 angströms de hauteur, au centre de laquelle se situe un espace libre. Les hexamères de PE et PC sont capables de s'empiler les uns sur les autres pour former des cylindres creux : les projections radiaires ou bras du PBS. Les états d'agrégation des PBP en solution dépendent du protocole de purification (notamment le tampon utilisé) ainsi que de l'organisme source, mais les états les plus stables sont les trimères et les hexamères. *In vitro*, le passage de la forme trimère à hexamère est pH-dépendante (O'Carra & Killilea 1971; Bennett & Bogorad 1971). La présence d'anions chaotropes tels que le thiocyanate ou le perchlorate est nécessaire à l'obtention de solutions stables de monomères non dénaturés (MacColl et al. 1971a, MacColl et al. 1971b, MacColl et al. 1980, Maccoll et al. 1981).



**Figure 14** : Etats d'agrégation des PBP, de l'hétérodimère à l'hexamère, d'après Sidler et al. (1994).

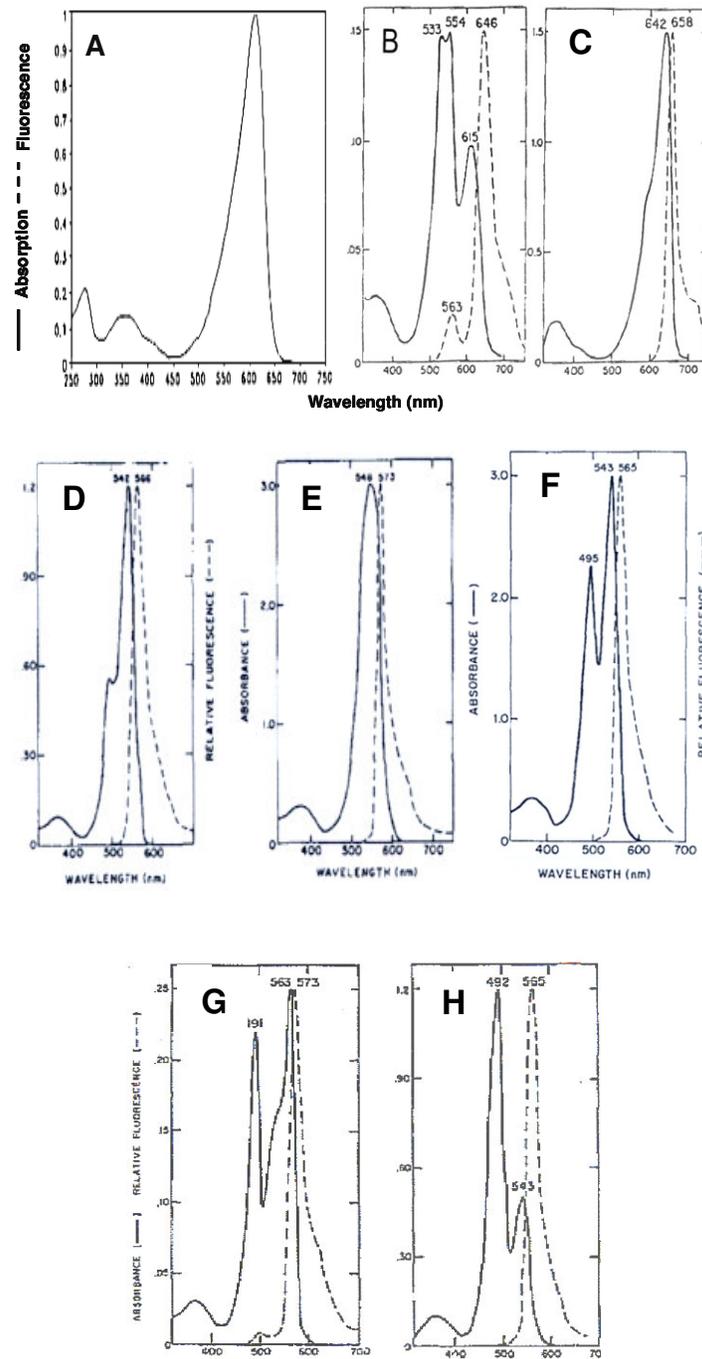
Quartiers clairs : sous-unité  $\alpha$ , quartiers foncés : sous-unité  $\beta$ .

Quatre chromophores isomères (les phycobilines) présents dans les PBP ont été décrits chez les cyanobactéries et les algues rouges : la phycocyanobiline (PCB), la phycoérythrobiline (PEB), la phycobilivoline (PVB) et la phycourobiline (PUB ; Figure 15). Les phycobilines sont des groupements tetrapyrroles linéaires liés à l'apoprotéine par des liaisons thioéthers, généralement par le cycle A. Toutefois, certains chromophores peuvent être aussi être reliés par le cycle D. Les bilines diffèrent simplement entre elles par le nombre de doubles liaisons dans la molécule, mais ces différences font qu'elles présentent des propriétés spectroscopiques nettement distinctes.



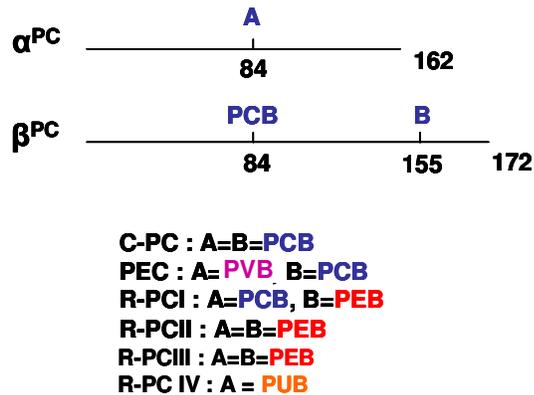
**Figure 15 :** Formule chimique semi-développée et maxima d'absorption des phycobilines liées aux PBP, d'après Grossman et al.(2001).

Les classes de PBP se distinguent notamment par l'un de leurs chromophores dit « accepteur terminal d'énergie » (voir le paragraphe 'transfert orienté d'énergie'). Chez la PC, la PEC et l'AP, ce chromophore est toujours une PCB alors que chez la PE, c'est une molécule de PEB. A des fins de classification, des lettres ont été attribuées aux PE et aux PC correspondant initialement aux types d'organismes à partir desquels elles ont été initialement isolées : les R-PBP étaient issues des Rhodophyta et les C-PBP des cyanobactéries. (Airth 1956) nommèrent des PEs provenant d'algues rouges primitives (les Bangiophyceae) B-PE car à l'époque, elles présentaient des propriétés spectroscopiques différentes des autres PEs connues chez les Rhodophyta. Les fondements de cette nomenclature devenue obsolète ont aujourd'hui été abandonnés, mais les lettres préfixes sont encore souvent mentionnées. Elles se réfèrent aujourd'hui plutôt à des types spectraux qu'à l'origine taxonomique de l'organisme source. Par exemple, la PC est dite C-PC lorsqu'elle ne lie que du PCB (Figure 16A) et R-PC quand elle lie au moins une molécule de PEB (Figure 16B), ces deux types de PC étant rencontrées chez les cyanobactéries comme chez les algues rouges. Notons que la PEC est une PBP proche de la PC, la différence étant la présence d'une PVB. Un système de nomenclature plus rigoureux a été proposé par (MacColl 1998) mais les dénominations proposées ne sont pas utilisées dans la littérature.



**Figure 16 :** Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de PBP cyanobactériennes : C-PC (A), R-PCII des *Synechococcus* marins (B), AP (C), et des C-PEs de *Synechococcus* marins connues à ce jour. D et E: C-PEII et I de *Synechococcus* sp. WH7803 respectivement ; E et F : C-PEI et II de *Synechococcus* sp. WH8020 respectivement, G et H : C-PEI et II de *Synechococcus* sp. WH8103 respectivement, d'après Ong & Glazer (1991).

La C-PC est l'une des PBP les plus étudiées. Sa structure est bien connue et elle a servi de modèle pour extrapoler les modèles structuraux des autres PBP. Elle possède trois sites de fixation de chromophores, illustrés en figure 17. Les R-PC présentent des séquences très proches de la C-PC, mais elles portent au moins une molécule de PEB substituée à une PCB de la C-PC. La R-PCI est rencontrée chez les Rhodophyta et la R-PCII chez certains *Synechococcus* marins (Ong & Glazer 1987). Ces deux PC sont plus proches entre elles qu'elles ne le sont de la PEC (de Lorimier et al. 1993). Par ailleurs, une PC tout à fait particulière a été décrite par Swanson et al. (1991) chez *Crocospaera watsonii* (WH8501). Elle a la particularité de posséder une molécule de PUB sur la sous-unité  $\alpha$  et deux PCB sur la sous-unité  $\beta$ . Notons que toutes ces PC ont conservé le chromophore accepteur PCB situé en  $\beta$ -84.



**Figure 17** : Distribution des chromophores chez différents types de sous-unités de PC, d'après Sidler et al. (1994). A et B sont substituants variables selon le type de PC.

Parce que leurs séquences sont proches, il est admis que la structure et le fonctionnement des PE sont similaires à ceux de la C-PC. Toutefois, les PE portent plus de chromophores, et dans des proportions très variées. Les PE d'algues rouges sont les R- et B-PE. Elles lient 5 chromophores, dont une majorité de PEB (Tableau 2) qui confèrent à ces organismes une couleur rougeâtre. Les R-PE portent des PUB qui leur permettent d'absorber dans le bleu (vers 500 nm ; Figure 18).

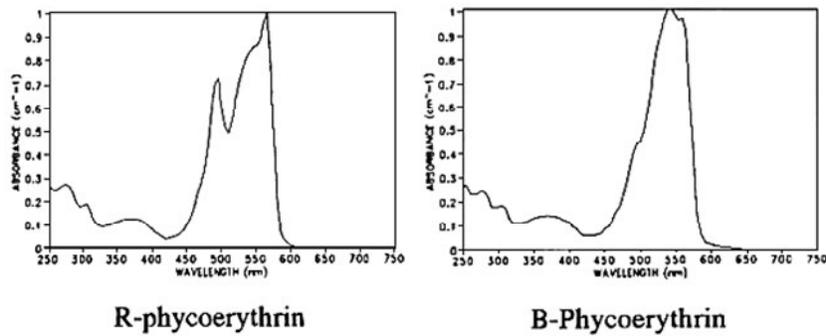


Figure 18 : Spectres d'absorption relative caractéristique de la R- et de la B-PE d'algues rouges.

Les C-PE sont des PBP portant 5 à 6 chromophores (PEB et/ou PUB). Chez les cyanobactéries d'eau douce, ces PE ne portent que des molécules de PEB, comme par exemple chez *Calothrix* sp. PCC 7601 (= *Fremyella diplosiphon* ; Tableau 2), *Nostoc* sp. et *Synechocystis* sp PCC 6701. Beaucoup de cyanobactéries marines du genre *Synechococcus* présentent deux types de C-PE, dites PEI et PEII (Ong et al. 1984, Ong & Glazer, 1991). Ces PE diffèrent dans leur séquence en acides aminés et peuvent porter jusqu'à six chromophores, le chromophore supplémentaire étant lié en  $\alpha$ -75. La PEI porte uniquement (WH7803 et WH8020) ou majoritairement (WH8103) de la PEB, alors que la PEII porte toujours une quantité relative de PEB inférieure à celle de PUB (Figure 16 ; Ong & Glazer 1991). Chez *Crocospheera watsonii*, l'une des PE porte 5 PUB pour une seule PEB (Swanson et al. 1991). De par la PC et la PE qu'elle possède, cette cyanobactérie marine présente une forte absorption dans la région bleu-vert du spectre lumineux. La grande variété de pigmentation existant parmi les PE fait que seule la PEB placée en  $\beta$ -82 est invariable (Tableau 2). A ce jour, aucune PBP cyanobactérienne ne porte plus de deux bilines différentes, mais ce n'est en revanche pas le cas chez certaines PBP de Cryptophyceae (Sidler 1994).

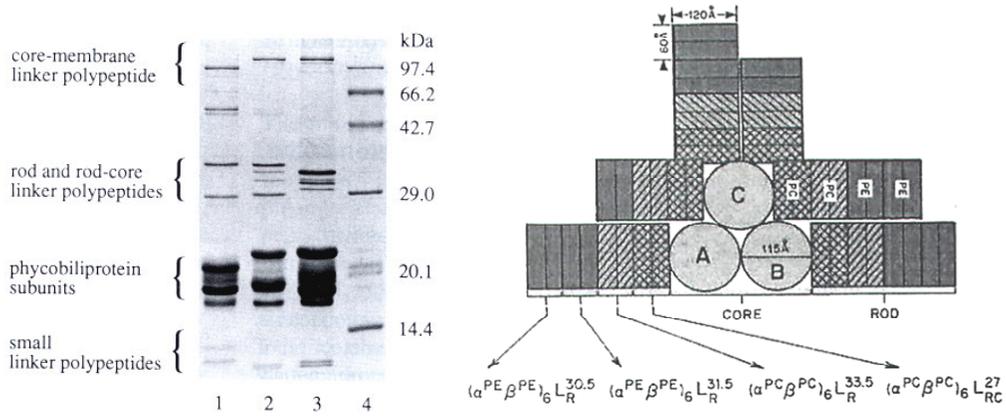
Tableau 2 : Distribution des chromophores sur les PE de cyanobactéries et d'algues rouges (Sidler, 1994).

Strain	Chromophore binding Sites					
	$\alpha$ -75	$\alpha$ -83	$\alpha$ -140	$\beta$ -50/61	$\beta$ -82	$\beta$ -159
<i>Calothrix</i> sp. PCC 7601 PE (I)		PEB	PEB	PEB	PEB	PEB
<i>Synechococcus</i> sp. WH 8020 PE(I)		PEB	PEB	PEB	PEB	PEB
<i>Synechococcus</i> sp. WH 8020 PE(II)	PUB	PEB	PEB	PUB	PEB	PEB
<i>Synechococcus</i> sp. WH 8103 PE(I)		PEB	PUB	PUB	PEB	PEB
<i>Synechococcus</i> sp. WH 8103 PE(II)	PUB	PUB	PUB	PUB	PEB	PEB
<i>Synechocystis</i> sp. WH 8501 PE(I)		PUB	PUB	PUB	PEB	PUB
<i>Porphyridium cruentum</i> b-PE, PE (I)		PEB	PEB	PEB	PEB	PEB

Au sein d'un hétérodimère  $\alpha\beta$ , chacun des chromophores interagit avec un résidu aspartyl de façon analogue à l'interaction covalente avec le résidu cystéinyl de la liaison thioéther. Ce type d'interaction a une conséquence sur les propriétés optiques des phycobilines et donc leur rôle dans l'absorption et le transfert d'énergie. Ainsi, les phycobilines sont maintenues en conformation ouverte au sein des PBP, alors que la conformation plus « naturelle » des phycobilines libres en solution est cyclique. Cette dernière conformation est caractérisée par une absorption importante dans les UV et moindre dans le visible. En conformation ouverte, c'est l'absorption dans le visible qui est prépondérante (Scheer et al. 1977). Les bilines libres (ou associées à des apoprotéines dénaturées) fluorescent très peu et ceci indique que l'énergie d'excitation est rapidement perdue au travers de processus de relaxation qui sont non radiatifs (notamment des rotations autour des doubles liaisons et des photoisomérisations). Au sein des PBP, ces processus sont inhibés par l'environnement stable et rigide dans lequel les bilines sont maintenues. C'est pourquoi les PBP natives possèdent des rendements de fluorescence très élevés.

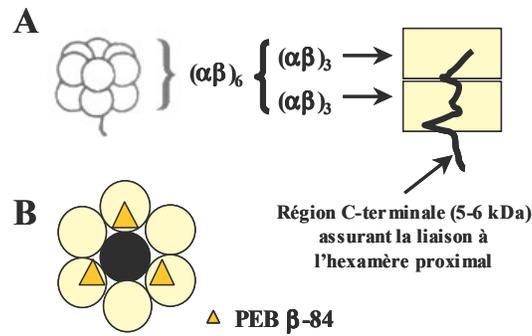
#### *Les polypeptides de liaison*

En 1974, Gantt & Lipschultz (1974) proposèrent que les PBS de l'algue rouge unicellulaire *Porphyridium cruentum* seraient composés de 84% de B-PE, 11% de PC et 5% d'AP. Mais, en 1977, Tandeau de Marsac & Cohen-Bazire montrèrent chez des cyanobactéries d'eau douce que les PBS sont en fait composés de 85% de PBP ainsi que 15 % d'autres protéines non pigmentées (Tandeau de Marsac & Cohen-bazire 1977). Ces dernières protéines, de masse moléculaire variable (Figure 19), se sont avérés être des polypeptides de liaison dits « linkers » insérés au centre des hexamères de PBP et maintenant ainsi la structure du PBS. Le plus grand linker est le linker cœur-membrane ( $L_{CM}$ ) qui présente souvent une centaine de kDa. La plupart des autres linkers ont une masse oscillant entre environ 30 et 40 kDa à l'exception des linkers dits «  $L_C$  » de très petite taille.



**Figure 19 :** Gauche : SDS-PAGE (15% acrylamide) de PBS de *Synechococcus* sp. PCC 7002 (1), *Anabaena* sp. PCC 7120 (2), *Mastigocladus laminosus* (3 ; Marqueurs de taille (4), d'après Sidler (1994). Droite : Représentation schématique du PBS de *Synechocystis* sp. PCC 6701 d'après Glazer (1989). Un bras est composé des complexes hexamériques de PBP liés par un linker spécifique. Les sous-unités sont désignées par leur lettre grecque ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) avec en exposant la PBP qu'elles constituent (PE, PEC, PC ou AP). Les linkers sont notés L avec en exposant leur masse moléculaire en kDa et en indice leur localisation (R pour bras, RC pour la jonction cœur-bras, CM pour la jonction cœur membrane et C pour coeur).

Les cyanobactéries marines et les Rhodophyta ont la particularité de posséder des polypeptides de liaison pigmentés associés à la PE (Apt et al. 2001, Wilbanks & Glazer 1993b). Par exemple, chez *Rhodella* spp., les trimères de PE peuvent être isolés sous forme  $(\alpha\beta)_3\gamma$  où la sous-unité  $\gamma$  est un linker liant de la PUB. Chez la cyanobactérie marine *Synechococcus* sp. WH8020, Wilbank & Glazer (1993) ont caractérisé un linker associé à la PEII nommé MpeC (Figure 20). Il présente des propriétés classiques de linker avec une masse moléculaire d'environ 32 kDa et un pI de 8,9. En revanche, ce linker a la particularité de porter une molécule de PUB, probablement en position 49, l'autre cystéine étant non substituée.

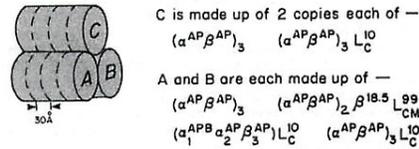


**Figure 20** : Interaction du linker MpeC avec les hexamères distaux de PEII chez *Synechococcus* sp. WH8020, reproduit d'après Wilbanks & Glazer (1993). A : schématisation en vue latérale de deux hexamères de PEII, B : vue du dessus, les triangles symbolisent les chromophores PEB accepteurs.

Le rôle exact de la PUB fixée au linker dans le transfert d'énergie n'a jamais été démontré. Il est probable que ces linkers pigmentés ont été modifiés au cours de l'évolution, afin de pouvoir absorber la lumière bleu-vert et la transmettre à un chromophore accepteur terminal PEB β-84 mais d'autres mécanismes plus subtils pourraient être proposés. La présence de ce chromophore représente un trait d'adaptation remarquable aux conditions environnementales.

#### *Le cœur du PBS*

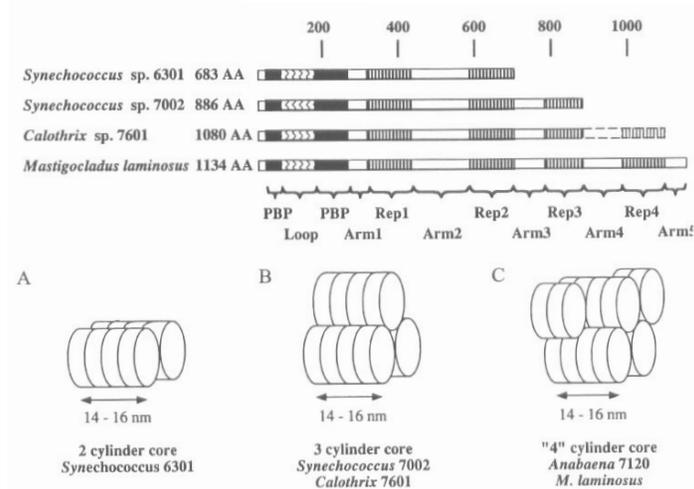
Plusieurs types de protéines composent le cœur des PBS. En plus des chaînes classiques d'AP ( $\alpha^{AP}$  et  $\beta^{AP}$ ), on trouve aussi d'autres peptides aux caractéristiques de PBP ( $\alpha^{APB}$  et  $\beta^{18.5}$ ), de linkers ( $L_C$ ), ou présentant des caractéristiques combinées ( $L_{CM}$ ). Les cœurs de PBS tricylindriques présentent deux cylindres basaux adjacents à la membrane thylacoïdale. Le troisième cylindre est composé de quatre trimères d'AP (abs 650 nm) et transmet l'énergie lumineuse collectée par les bras aux composants des cylindres basaux (MacColl 1998). Ces derniers présentent tous deux une structure pseudo-trimérique plus complexe dont la composition est explicitée en figure 21.



**Figure 21** : Représentation schématique d'un cœur de PBS tricylindrique type *Synechocystis* sp. PCC 6701. Les sous-unités sont désignées par une lettre grecque avec en exposant le type de chaîne. Les linkers sont notés L avec en exposant leur masse moléculaire en kDa et en indice leur localisation d'après Sidler (1994 ; C pour le cœur, CM pour la jonction cœur-membrane).

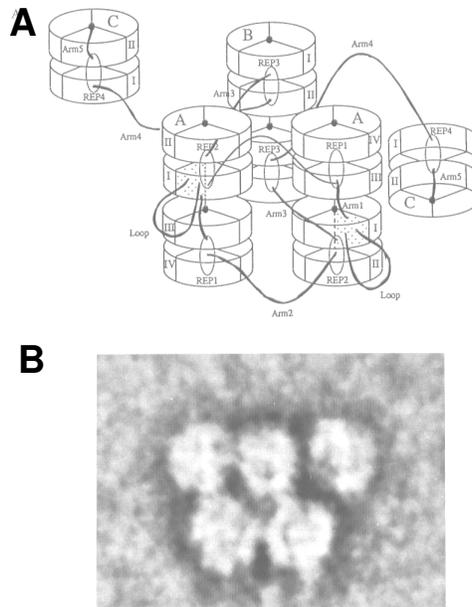
En 1975, Glazer & Bryant (1975) ont isolé un complexe d'AP contenant la chaîne  $\alpha^{APB}$  et notèrent que ses propriétés optiques concordent avec un rôle d'accepteur terminal ou un rôle de pontage entre les formes moins énergétiques d'AP et l'accepteur final d'énergie du PBS. La sous-unité  $\beta^{18.5}$  est une protéine qui présente des caractéristiques de type PBP et porte une molécule de PCB. Le linker  $L_C$ , d'une dizaine de kDa, stabilise la structure du cœur et induit un changement des propriétés spectroscopiques de l'AP (Betz et al. 1993). Chez la cyanobactérie thermophile *Mastigocladus laminosus*, Fuglistaller et al. (1987) ont isolé différents complexes d'AP contenant ou non un linker et ont ainsi pu observer l'influence du linker  $L_C^{8.9}$  sur les propriétés optiques des trimères d'AP. Ils ont mis en évidence que ce linker induit un déplacement du maximum d'absorption de la sous-unité  $\beta^{AP}$  vers les grandes longueurs d'onde et diminue sa fluorescence. Les mutants dépourvus de ce linker présentent des PBS plus susceptibles à la chaleur (Maxson et al. 1989). La cristallisation du complexe d'AP- $L_C^{7.8}$  a permis d'analyser sa structure à 2.2 angströms (Reuter et al. 1999). Ce travail est le seul montrant l'association d'un polypeptide de liaison avec des sous-unités de PBP.

Le polypeptide de liaison  $L_{CM}$  aussi appelé polypeptide de liaison « ancre », jouerait plusieurs rôles cruciaux : la stabilisation de la structure du cœur, une modification des propriétés spectroscopiques des sous-unités de PBP associées, la jonction entre le cœur et la membrane thylacoïdale, ainsi que le transfert d'énergie aux thylacoïdes. La  $L_{CM}$  est une grosse protéine dont la masse est comprise entre 75 et 128 kDa selon les organismes et sa séquence contient une boucle qui pourrait servir à la fixation du PBS sur la membrane. Possédant une partie PBP homologue à l'AP et liant une molécule de PCB, la  $L_{CM}$  est aussi essentielle au transfert de l'énergie aux PS. Le maximum d'absorption de ce chromophore est lointain par rapport aux autres PCB du cœur (680 nm) et de fait, il est tout comme  $\alpha^{APB}$  un candidat possible pour la fonction d'accepteur terminal du PBS.



**Figure 22** : Haut : Structure du polypeptide de liaison  $L_{CM}$  chez plusieurs souches de cyanobactéries d'eau douce, les chiffres indiquent la numérotation des résidus aminoacides. Loop : boucle ; Rep : régions répétées de type polypeptide de liaison séparées par des régions Arm (bras). Bas : architecture des cœurs de PBS chez les mêmes souches, d'après Sidler. (1994).

Chaque PBS contient deux molécules de  $L_{CM}$  dont la séquence présente souvent trois domaines polypeptide de liaison conservés, soit 6 domaines au total, ce qui correspond au nombre d'hexamères d'AP présents dans un cœur tricylindrique tel que celui de *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Figure 22). Les  $L_{CM}$  étudiées jusqu'à aujourd'hui peuvent présenter de deux à quatre domaines polypeptide de liaison et ce nombre est corrélé au nombre de bras associés au cœur (Glauser et al. 1992, Grossman et al. 1993). Il est très probable que chaque domaine polypeptide de liaison des deux  $L_{CM}$  lie chacun un hexamère d'AP stabilisant ainsi la structure entière du cœur du PBS. Des études impliquant des mutants dépourvus de  $L_{CM}$  fonctionnelle ont montré qu'il est impossible d'associer les PBS dans ces conditions, et les PBP s'accumulent alors librement dans les cellules (Bryant 1986, Bryant et al. 1991). Par ailleurs, comme pour la plupart des polypeptide de liaisons, il a été montré chez *Mastigocladus laminosus* qu'une partie de la  $L_{CM}$  (une vingtaine de kDa de la région C-terminale) modifie les propriétés spectrales des trimères d'AP (Gottschalk et al. 1994).



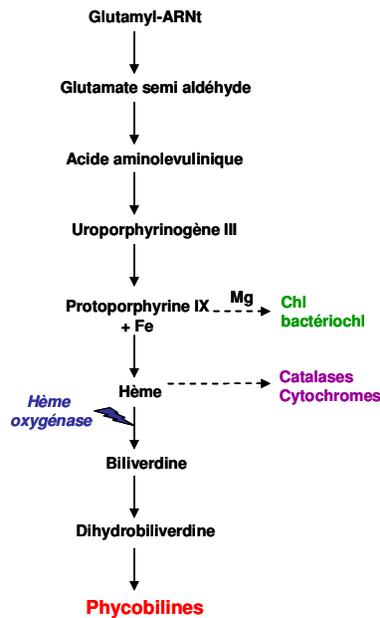
**Figure 23:** Représentation schématique avec arrangement putatif des linkers (A) et photo en microscopie électronique (B ; vue faciale) du cœur de PBS pentacylindrique d'*Anabaena* sp. PCC 7120 d'après Ducret et al. (1998).

Le cœur tricylindrique à six projections radiales est la structure la plus fréquemment rencontrée chez les PBS de cyanobactéries. Toutefois, des cyanobactéries telles qu'*Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena variabilis* et *Mastigocladus laminosus* possèdent un PBS à cœur pentacylindrique (Ducret et al. 1998, Bryant et al. 1991) ; Figure 23). Dans ce type de cœur, les trois cylindres centraux ont la même composition qu'un cœur tricylindrique et les deux autres demi-cylindres sont composés de trimères d'AP  $(\alpha\beta)_3L_C^9$  et  $(\alpha\beta)_3$ . La  $L_{CM}$  de ces organismes présente une masse moléculaire de 120 kDa (Isono & Katoh 1987, Glauser et al. 1992) et contient 4 domaines homologues aux polypeptide de liaisons dont un pourrait interagir avec les hexamères d'AP supplémentaires. Après clivage d'une petite partie de la  $L_{CM}$ , il est d'ailleurs possible de reconstituer un cœur tricylindrique. De plus, *Anabaena* et *Mastigocladus* contiennent quatre polypeptide de liaisons  $L_{RC}$  codés par les gènes *cpcG1-4*, qui assurent la jonction entre les hexamères de l'AP du cœur et les hexamères proximaux de PC des bras. Chez *Mastigocladus laminosus* et *Anabaena* sp. PCC 7120, au moins trois des produits des gènes *cpcG* sont présents dans le PBS. Il a été montré chez cette dernière souche que les gènes de ces polypeptide de liaisons sont compris dans un grand opéron *cpcBACDEFG1G2G3G4* (Bryant et al. 1991) contenant aussi des gènes de lyases. En microscopie électronique, ce type de PBS apparaît en effet structurellement différent du « classique » PBS à cœur tricylindrique (Ducret et al., 1998), et un modèle de structure comprenant un cœur pentacylindrique avec huit projections périphériques

a été proposé. Dans ce modèle, les deux  $L_{CM}$  lient les hexamères d'AP du cœur et les deux hexamères supplémentaires.

**b) Biosynthèse des phycobiliprotéines**

La formation des groupements tetrapyrroliques tels que les hèmes, les Chl et les bilines est initiée avec la synthèse de l'acide  $\delta$ -aminolevulinique à partir de dérivés du glutamate (Figure 24). Chez l'algue rouge *Cyanidium caldarium*, des études *in vivo* ont montré que le protohème et la biliverdine IX peuvent servir de précurseurs à la biosynthèse de la PCB (Brown et al. 1981, Beale & Cornejo 1984, Brown et al. 1984). Les études *in vitro* ont montré que des extraits de cette algue rouge présentent une activité capable de convertir l'hème en biliverdine IX et cette dernière en PVB (Beale & Cornejo 1991b, a, c; Schluchter & Glazer 1997), ceci en présence de NADPH, de ferrédoxine, de FNR et soit d'une activité hème oxygénase, soit d'une enzyme de synthèse de phycobiline (Cornejo & Beale 1988). La synthèse des bilines et des apoprotéines auxquelles elles sont associées dans le PBS est synchronisée (Alvey et al. 2003). Une partie de ces résultats a été retrouvée chez les cyanobactéries (Cornejo 1997).



**Figure 24 :** Schéma simplifié de la biosynthèse des phycobilines. Les réactions de formation de l'hème sont communes pour les chl et les phycobilines jusqu'à l'étape Protoporphyrine IX.

Les bilines peuvent être liées aux apoprotéines par des enzymes dénommées lyases. Certaines enzymes peuvent remplir une double fonction, liant puis isomérisant une biline en une

autre. Ces enzymes semblent spécifiques d'un site de chromophorylation de l'apoprotéine et/ou du chromophore qu'elle lie. La fixation d'un chromophore en  $\alpha^{\text{PC}}$ -84 est catalysée par des lyases dimériques (Fairchild et al. 1991, Fairchild et al. 1992), codées par les gènes *cpcE* et *cpcF*. Le complexe CpcEF présente une cinétique classique de type Michaelis-Menten avec la sous-unité  $\alpha^{\text{PC}}$  mais n'a aucune action sur la sous-unité  $\beta^{\text{PC}}$  (Fairchild & Glazer 1994). Cet enzyme est capable de catalyser l'addition de PCB (C-PC) ou de PEB (R-PC), mais présente plus d'affinité pour la PCB.

Chez *Fremyella diplosiphon* (= *Calothrix* sp. PCC 7601 = *Tolythrix* sp. PCC 7601), le tandem de gènes *cpeYZ* se situe en aval de l'opéron codant pour les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la PE et présentent une forte homologie avec les gènes *cpeYZ* de *Synechococcus* sp. WH8020 impliqués dans la synthèse de la PE, ainsi qu'avec *cpeEF*. Des expériences de complémentation de mutants suggèrent que les produits de *cpeYZ* pourraient être une lyase catalysant la fixation d'une PEB sur la PE (Kahn et al. 1997).

La lyase/isomérase dimérique codée par les gènes *pecE* et *pecF* catalysant la fixation et l'isomérisation de la PCB en PVB (en PEC-84 chez *Mastigocladus laminosus*) a été très étudiée (Jung et al. 1995, Storf et al. 2001, Zhao et al. 2000, Zhao et al. 2002). Les études in vitro ont montré que cette réaction est séquentielle et nécessite notamment la présence de cations divalents tels que  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Mn}^{2+}$  (Zhao et al. 2002). Ces auteurs ont montré que PecE est responsable de la fixation de la PCB et PecF de son isomérisation en PVB. La cinétique de cette PCB lyase/isomérase est relativement lente et similaire à celle d'une simple PCB-lyase (Fairchild & Glazer, 1994).

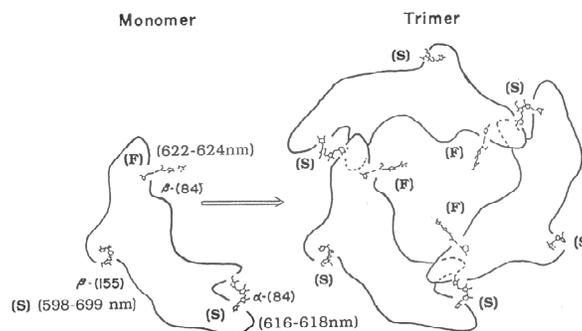
Chez les PE d'algues rouges et de cyanobactéries marines, peu de choses sont connues à ce jour, mais il est probable qu'une ou plusieurs enzymes soient capables de fixer la PEB à différents sites des PE et de les isomériser en PUB selon une réaction similaire à la PCB lyase/isomérase.

### **c) Le transfert orienté d'énergie au sein du phycobilisome**

Les niveaux d'énergie des phycobilines dans une PBP ne sont pas équivalents. Alors que toutes les phycobilines d'une PBP donnée absorbent de l'énergie d'excitation, la fluorescence de la protéine est due aux chromophores qui absorbent le plus loin. Les analyses de polarisation de fluorescence ont ainsi montré que les PE et PC contiennent deux types de chromophores, le type sensible « *s* » et le type fluorescent « *f* » (Sidler 1994). Les phycobilines qui absorbent l'énergie d'excitation pour la transférer sont appelées « donneurs » et constituent le type *s* alors que les bilines qui reçoivent l'énergie et fluorescent sont appelées « accepteur » et constituent le type *f*.

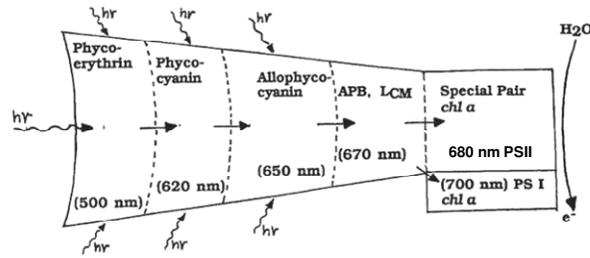
Dans ce contexte, c'est la C-PC qui a été la mieux étudiée et la conformation des PE étant très similaire, on pense qu'elles fonctionnent de la même façon.

Dans la C-PC, les bilines  $\alpha$ -84 et  $\beta$ -155 sont des donneurs et  $\beta$ -84, conservée chez tous les types de PC est un accepteur (Schirmer et al. 1986). Chez les PE, le chromophore accepteur terminal est la PEB placée en  $\beta$ -82, conservée dans tous les types de PE. L'accepteur est un chromophore qui est en relation avec l'orifice central des trimères de PBP alors que les donneurs sont situés à la périphérie des disques (Figure 25). Les PE présentent plus de chromophores  $s$  à la périphérie des disques que les PC, et dans le cas des PE de cyanobactéries marines, la PUB est ainsi toujours un chromophore donneur.



**Figure 25 :** Schéma d'arrangement des chromophores  $f$  et  $s$  au sein d'un trimère de C-PC (Mimuro 1986b, a). Les PCBs  $\beta$ -155 et  $\alpha$ -84 sont des chromophores  $s$  et  $\beta$ -84 est le chromophore  $f$ .

Les nombreux travaux d'A.N. Glazer et collaborateurs suggèrent que les chromophores  $s$  des deux sous-unités transfèrent l'énergie au chromophore  $f$  accepteur terminal. Les chromophores accepteurs sont arrangés verticalement dans le cylindre central des bras et assurent un transfert d'énergie très rapide d'hexamères en hexamères vers le cœur du PBS et, *in fine*, à la chl des PS. L'ordre d'agencement des PBP, PE (abs 495/545-560 nm), PC (abs 620 nm) et AP (650 nm), correspond de fait à un ordre croissant d'énergie de transition, avec la PE placée à la périphérie et l'AP au centre du PBS (Figure 26). A titre d'exemple, chez *Synechocystis* sp. PCC 6701, chacun des 12 hexamères de PE du PBS porte 30 PEB et les 12 hexamères de PC, 18 PCB, soit un total de 576 chromophores dans les bras du PBS. En se basant sur les temps de transfert d'énergie des chromophores donneurs aux accepteurs, le temps de vie moyen de la fluorescence d'une PBP et le temps de transfert d'un hexamère à un autre, Glazer (1989) arrive à la conclusion que l'efficacité de transfert d'un tel système est supérieure à 95%.



**Figure 26** : Illustration du transfert orienté d'énergie au sein d'un PBS à PE, de l'extrémité des bras vers les PS, modifié d'après Sidler (1994).

Notons que le cas des PBS de cyanobactéries marines et de Rhodophyta, qui présentent des polypeptides de liaisons de PE chromophorylés, est intéressant. Ces polypeptides de liaisons lient de la PUB qui, dans les sous-unités de PBP, est un chromophore donneur. Toutefois, ces polypeptides de liaisons se trouvent à l'intérieur des disques de PBP et une position périphérique du chromophore est de fait difficilement envisageable. La façon dont fonctionnent ces chromophores PUB fixés aux polypeptides de liaisons reste aujourd'hui mal comprise.

Au regard des propriétés spectroscopiques très différentes de la PE et de la PC, il est aisé de comprendre que le transfert d'énergie est orienté de la PE vers la PC. Mais comment peut-on expliquer un tel transfert orienté entre disques de PC (ou de PE) contenant des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  identiques ? Comme indiqué plus haut, chaque disque contient un polypeptide de liaison spécifique. Ce sont les interactions du polypeptide de liaison avec le chromophore accepteur d'un disque donné, modifiant les propriétés spectroscopiques du chromophore  $f$ , qui vont conférer les propriétés de transfert orienté de l'énergie (Yu et al. 1981, Wendler 1986). Par exemple, dans le cas du PBS de *Synechocystis* PCC 6701 (Figure 19), l'absorption et l'émission de fluorescence du complexe  $(\alpha^{PC}\beta^{PC})_6L_{RC}^{27}$  sont plus lointaines que celles du complexe  $(\alpha^{PC}\beta^{PC})_6L_{RC}^{33.5}$  (pour revue voir Glazer 1989 et Sidler 1994). Ainsi le transfert se fait bien de l'hexamère distal à l'hexamère proximal dans un assemblage de disques d'une PBP donnée.

L'organisation et le fonctionnement du cœur sont moins bien compris mais semble obéir aux mêmes lois de transfert orienté d'énergie. Les propriétés d'émission de fluorescence des PC  $(\alpha^{PC}\beta^{PC})_6L_{RC}^{27}$  et ses homologues dans le cas des cyanobactéries d'eau douce) et celles d'absorption de l'AP assurent à cette dernière un rôle d'accepteur d'énergie efficace. Les cylindres d'un cœur tricylindrique contiennent deux copies de chacun des complexes accepteurs terminaux aux propriétés spectroscopiques similaires :  $(\alpha_1^{APB}\alpha_2^{AP}\beta_3^{AP})L_C^{10}$  et  $(\alpha^{AP}\beta^{AP})_2\beta^{18.6}L_{CM}^{99}$ . Chaque  $L_{CM}$  et  $\alpha^{APB}$  possèdent un groupement PCB qui confère au complexe qui les porte une absorption et une émission de fluorescence maximales à 670 et 680 nm, respectivement. Les complexes  $(\alpha^{APB}\alpha^{AP}\beta^{AP})L_C^{10}$  pourraient faire le lien entre les complexes AP de faible énergie et le complexe

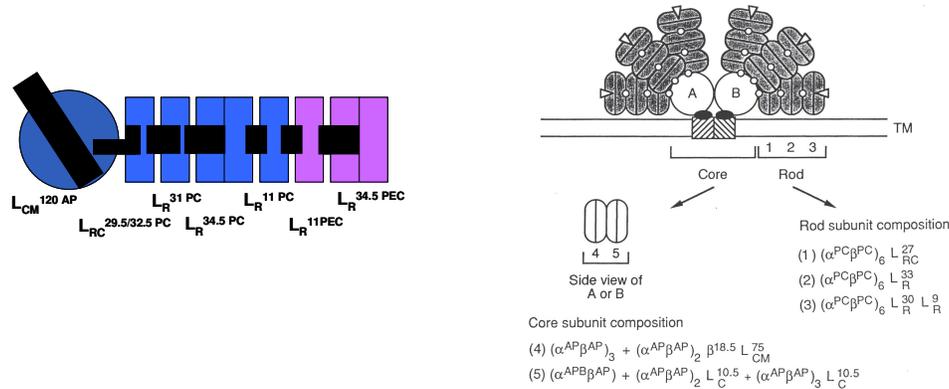
$(\alpha^{AP}\alpha^{AP})_2\beta^{18.6}L_{CM}^{99}$ . Des mutants de *Synechocystis* sp. PCC 6803 déficients en sous-unités  $\beta^{18.5}$  et  $\alpha^{APB}$  ont été construits, et le phénotype observé était essentiellement une diminution du transfert d'énergie aux PS, mais celui-ci n'est pas interrompu (Mullineaux 1994). Le chromophore de la  $L_{CM}$  est probablement l'accepteur terminal du PBS, et son émission correspond d'ailleurs à l'absorption du CRII, connu pour être le principal accepteur de l'énergie collectée par le PBS.

#### **d) Principaux modèles structuraux de phycobilisomes**

La synthèse des travaux de spectroscopie, biochimie, immunologie, cristallographie et de biologie moléculaire a conduit à l'établissement de modèles structuraux de PBS chez quelques cyanobactéries d'eau douce.

Les souches de *Synechococcus* spp. PCC 6301 et PCC 7942 possèdent un PBS relativement simple : un cœur bicylindrique sur lequel s'articule six projections radiaires uniquement composées de C-PC (Figure 27 droite). Ce type de PBS semi-discoïde, présent chez beaucoup de cyanobactéries d'eau douce, a une masse relativement faible de 7,000 kDa (Glazer et al. 1983). Chacun des deux cylindres du cœur est composé de deux hexamères et possède les quatre types de sous-unités d'AP ainsi que les polypeptides de liaisons  $L_{CM}$  et  $L_C$ . Quatre types de polypeptides de liaisons sont associés aux projections radiaires.  $L_{RC}^{27}$  assure la jonction des bras au cœur. L'extension des projections est possible par addition des polypeptides de liaisons 33, 30 et 9 et des hexamères de C-PC. Trois disques de PC sont classiquement présents dans les bras de ces PBS.

La structure des bras du PBS de *Mastigocladus laminosus* a aussi été étudiée en détail (Reuter 1993). Cette cyanobactérie contient de la PEC à l'extrémité des projections radiaires et une PC de type C-PC. Dans une série d'articles, ces auteurs ont analysé les propriétés des PBP et des polypeptides de liaisons et ont reconstitué la structure des bras du PBS de *Mastigocladus laminosus* (Figure 27 gauche). Cinq polypeptides de liaisons de PC et deux polypeptides de liaisons de PEC ont été mis en évidence sur gel (Reuter & Nickel-Reuter, 1992) et leur localisation déterminée notamment par analyse de complexes issus de la dissociation ménagée du PBS. Le cœur contient deux polypeptides de liaisons cœur-bras  $L_{RC}^{PC29.5}$  et  $L_{RC}^{PC32}$ . Les polypeptides de liaisons  $L_R^{PC31}$  et  $L_R^{PC34.5}$  coordonnent la jonction entre les premiers complexes de PC, et deux polypeptides de liaisons de faible poids moléculaire  $L_R^{PC11}$  et  $L_R^{PEC34.5}$  permettent l'association des complexes suivants de PC et PEC. Enfin, le dernier disque de PEC est lié par un petit polypeptide de liaison  $L_R^{PEC4.5}$ .



**Figure 27** : Gauche : Modèle structural d'un bras de PBS de *Mastigocladus laminosus*. Les polypeptides de liaisons sont représentés en noir, les complexes AP en bleu foncé, PC, bleu clair et PEC violets. Les linkers sont dénommés selon leur masse moléculaire et leur position, d'après Reuter (1993) Droite : modèle structural du PBS de *Synechococcus* sp. PCC 6301 avec la description complète des complexes présents. Le polypeptide qui pourrait ancrer le PBS aux thylacoïdes est représenté par un ovale noir, les carrés hachurés représentent les CR et chl associées. Les sous-unités sont désignées par leur lettre grecque ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) avec en exposant la PBP qu'elles constituent (PE, PEC, PC ou AP). Les linkers sont notés L avec en exposant leur masse moléculaire en kDa et la PBP avec laquelle ils interagissent (PE, PC PEC ou AP), et en indice leur localisation (R pour bras, RC pour la jonction cœur bras et CM pour la jonction cœur membrane), d'après Grossman et al. (1993).

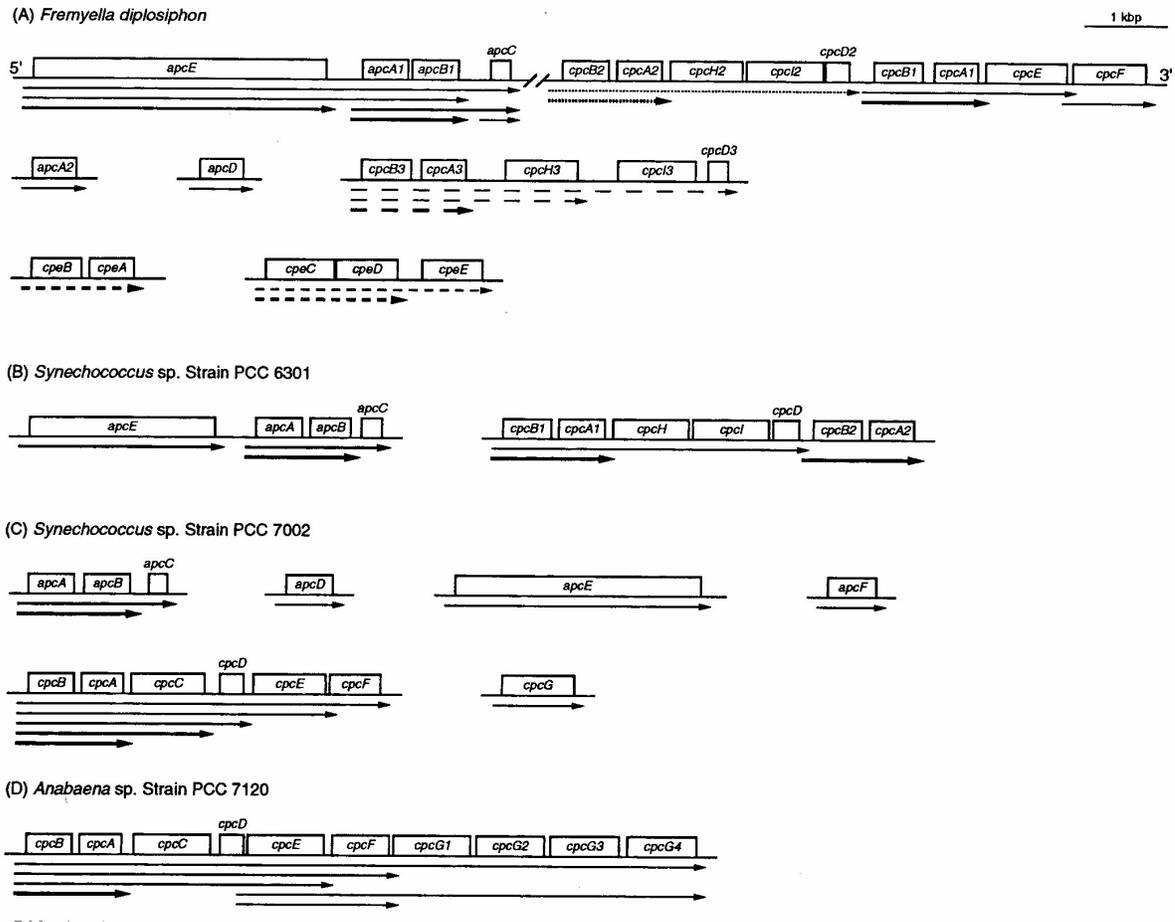
## e) Nature, organisation et évolution des gènes de phycobiliprotéines

### *Nature et organisation des gènes de PBP*

Durant les vingt dernières années, un grand nombre de séquences de gènes impliqués dans la structure et la régulation générale des PBS a été déterminé, par séquençage de gènes, de régions génomiques et plus récemment de génomes entiers. Cette masse d'informations a beaucoup apporté à nos connaissances sur la nature et l'organisation des gènes impliqués dans la structure et la biosynthèse des PBP, des linkers et des phycobilines et sur l'évolution des PBS en général. Chez les cyanobactéries, ces gènes sont souvent regroupés au sein de régions plus ou moins spécialisées (clusters). Ce phénomène fut tout d'abord remarqué chez *Fremyella diplosiphon* chez qui les gènes d'AP et de PC sont regroupés en un vaste fragment génomique (Figure 28). Une nomenclature relativement claire a émergé afin de désigner communément des gènes homologues d'organismes distincts. Ainsi, les gènes impliqués dans la synthèse de l'AP, la C-PC et les R-PC sont désignés *apc*, *cpc* et *rpc*, respectivement. Les gènes relatifs à la PEC sont nommés *pec*. Enfin, les gènes cyanobactériens de PE sont désignés *cpe* ou *mpe*, selon qu'ils codent pour des protéines de PEI ou de PEII, respectivement. Ces gènes sont suivis de lettres désignant le peptide pour lequel ils codent. Par exemple, *apcA* code pour la sous-unité  $\alpha$  d'une AP et *mpeB* pour la sous-unité  $\beta$  d'une PEII. Les lettres autres que A et B réfèrent la plupart du temps à des

linkers ou des sous-unités de lyases de phycobiline.

Les gènes *apcAB* et les autres gènes codant pour les composants du cœur sont exprimés de façon constitutive. Les gènes des deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de toutes les PBP sont toujours disposés en tandem et cotranscrits. Les linkers sont souvent contigus aux sous-unités de PBP auxquelles ils sont inféodés, et souvent cotranscrits. Les gènes *apcC* codant pour le petit linker  $L_C$  et *apcE* codant pour la  $L_{CM}$  se trouvent à proximité des gènes *apcAB* chez la plupart des oxyphotobactéries à PBS étudiées à ce jour. Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7002 et *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, on observe toutefois un operon *apcABC* et *apcE* se trouve seul dans une région séparée. Les patterns d'accumulation des transcrits de ces gènes peuvent être très variables selon les organismes, et même au sein d'un organisme donné. Par exemple, chez *Fremyella diplosiphon*, plusieurs types de transcrits ont été détectés : *apcAB* (1.4 kb), *apcABC* (1.8 kb), *apcC* (0.4 kb), *apcE* (3.2 kb) et l'opéron entier *apcEABC* (6 kb, Grossman et al. 2001). Le gène de la sous-unité APB, *apcD*, est généralement totalement isolé des autres gènes du cœur. Toutefois, chez *Gloeobacter*, il est proche de l'opéron codant les polypeptides des bras du PBS.



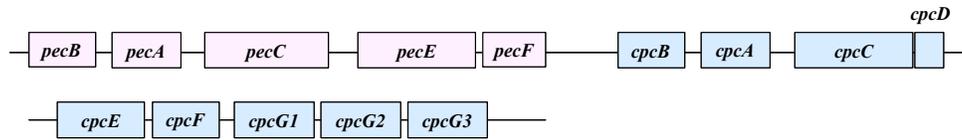
**Figure 28 :** Régions génomiques des gènes et clusters de gènes codant pour les composants des PBS de *Fremyella diplosiphon* (A), *Synechococcus* spp. PCC 6301 (B) et PCC 7002, et *Anabaena* sp. PCC 7120, d'après Grossman et al. (1993). L'espacement entre les clusters *apcE*A1B1C et *cpcB2*A2H2I2D2 de *Fremyella diplosiphon* est de 4 kbp. L'épaisseur des flèches est une indication de l'abondance du transcrite en question. Chez *Fremyella diplosiphon*, l'induction de ces gènes dépend de l'environnement lumineux (voir adaptation chromatique à la fin de l'intro). Flèches en points: lumière rouge, flèches en pointillés : lumière verte, flèches pleines : transcrite constitutif, d'après Grossman et al. (2001).

Chez *Synechococcus* sp. PCC 7002 et *Anabaena* sp. PCC 7120, les gènes codant pour les linkers sont placés en aval des gènes *cpcBA*. Ces derniers sont ainsi immédiatement suivis par les gènes de linker *cpcC* ( $L_R^{33}$ ) et *cpcD* ( $L_R^9$ ) présents dans les bras uniquement constitués de PC de ces deux souches. Chez *Synechococcus* sp. PCC 7002, la mutation du gène du linker 33 conduit à la formation de bras à un seul disque alors que le type sauvage en présente deux (de Lorimier et al. 1990a, de Lorimier et al. 1990b). On observe aussi la présence des gènes *cpcE* et *cpcF* codant pour la lyase dimérique impliquée dans la fixation de la molécule de PCB positionnée en  $\alpha$ -84. *Synechococcus* spp. PCC 6301 et PCC 7942 qui possèdent aussi des bras de PBS à C-PC, ont chacun

deux sets de gènes *cpcBA* séparées par 2,5 kb (Figure 28B). Toutefois, ces gènes codent tous pour des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de PC identiques. Chez des organismes capables d'adapter chromatiquement, on peut trouver deux à trois exemplaires du tandem de gènes de PC qui sont régulés selon les conditions environnementales telles que la qualité de la lumière (voir le paragraphe sur l'adaptation chromatique) ou la disponibilité en nutriments. Par exemple, les gènes *cpcB3A3* de *Fremyella diplosiphon* codent pour une PC très pauvre en résidus soufrés et sont exprimés en condition de carence en soufre (Mazel & Marliere 1989). Les gènes de *Fremyella diplosiphon* sont aussi très regroupés (Conley et al. 1986, Lomax et al. 1987).

Chez *Mastigocladus laminosus*, les gènes codant pour les sous-unités de la PEC et de la PC se trouvent au sein d'un même opéron. Comme chez la plupart des autres cyanobactéries, on trouve juste en aval un gène de linker et les gènes *pecE* et *pecF* codant pour la lyase/isomérase (Figure 29).

**Gènes *pec* & *cpc***

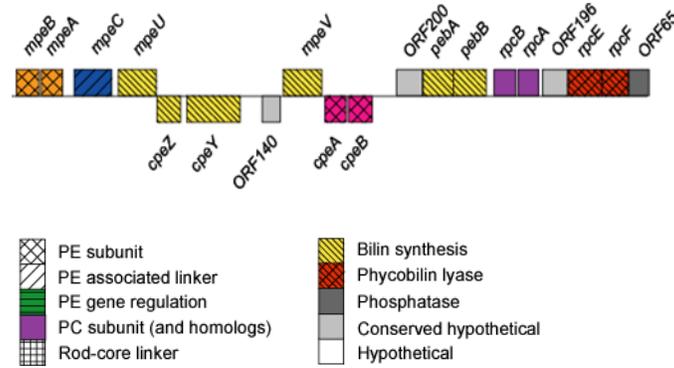


**Gènes *apc***



**Figure 29 :** Régions génomiques du PBS de *Mastigocladus laminosus*. D'après Sidler (1994).

Chez les cyanobactéries marines, on trouve souvent une PC portant une ou deux PEB (voire une PUB, Swanson et al. 1991). Ainsi, les *Synechococcus* marins telles que les souches WH7803, WH8103 et WH8020, possèdent une R-PCII portant deux PEB (et un chromophore PCB accepteur) dont les sous-unités sont codées par les gènes *rpcBA*. Chez les cyanobactéries océaniques, la majeure partie des PBP sont des PE, souvent de deux classes différentes (PEI et PEII) codées par les gènes *cpe* et *mpe* respectivement.



**Figure 30** : Région génomique partielle des gènes relatifs au PBS de *Synechococcus* sp. WH8020, d'après Wilbanks & Glazer (1993).

Chez la cyanobactérie marine *Synechococcus* sp. WH8020, les gènes codants pour les sous-unités principales de la PC et des PE sont regroupés dans une région de 15 kDa (Figure 30 ; Wilbanks & Glazer, 1993). Ce type de cyanobactéries possèdent des bras de PBS complexes et montre un bon exemple de regroupement des gènes relatifs à la structure et la biosynthèse des PBS. A la suite ce tandem *rpeBA* se trouve un gène à fonction inconnue (*orf196*) puis deux gènes présentant une forte homologie avec les sous-unités de lyase de PC, et ainsi nommés *rpeE* et *rpeF*. Les gènes codant pour les sous-unités de la PEII (*mpeBA*) sont suivis par celui du linker chromophorylé MpeC et sont très probablement co-transcrits. En ce qui concerne les gènes PEI, On remarque la présence d'une série de gènes impliqués dans la biosynthèse des phycobilines tels que *mpeUV*, *cpeZY* (PEI), *pebAB* (transformation de la biliverdine en PEB ; Alvey et al, 2003) et de gènes hypothétiques conservés chez d'autres organismes et qui ont probablement un rôle lié à la physiologie du PBS encore inconnu. Ces données sont les seules caractérisant la région génomique du PBS d'une cyanobactérie marine.

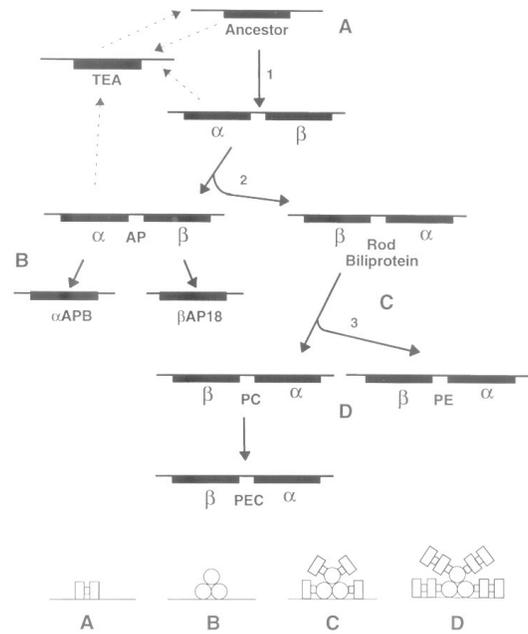
#### Evolution des PBP

Les alignements de séquences protéiques de PBP montrent sans ambiguïté qu'un grand nombre de résidus aminoacides sont très conservés (Apt et al. 1995). Les fonctions possibles de ces zones conservées sont d'être des sites de fixation des chromophores, de maintenir la stabilité de la conformation physico-chimique de ces derniers, ainsi que du dimère  $\alpha\beta$ . Cette forte similarité suggère aussi que la conformation tertiaire des différentes PBP est similaire. Les analyses phylogénétiques des séquences de PBP montrent que toutes ces protéines dérivent d'une protéine ancestrale commune.

Le domaine PBP accepteur terminal de la  $L_{CM}$  présente une séquence plus proche des

sous-unités  $\alpha$  que des sous-unités  $\beta$ . Son origine est incertaine et plusieurs possibilités ont été proposées par Apt et al. (1995 ; Figure 31, flèches en pointillé). Si ce domaine descend directement du même ancêtre que les PBP, la similarité avec les sous-unités  $\alpha$  pourrait refléter des caractéristiques ancestrales à partir desquelles les sous-unités  $\beta$  pourraient avoir divergé, ou une évolution convergente entre ce domaine de la  $L_{CM}$  et des sous-unités  $\alpha$ . Une autre hypothèse serait que le domaine accepteur terminal proviendrait d'une duplication de sous-unité  $\alpha$  à un stade plus tardif de l'évolution des PBP. Par ailleurs, il apparaît aussi probable que des domaines de linkers aient fusionné avec le domaine accepteur terminal pour former la  $L_{CM}$ .

Selon le modèle proposé par Apt et al. (1995 ; Figure 31), la duplication d'un gène ancestral a généré un tandem de gènes de PBP (étape 1). Cette paire de gènes aurait divergé et co-évolué pour former les deux types de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . La co-transcription de ces gènes en tandem a dû aider à conserver la stoechiométrie 1:1 nécessaire à l'hétérodimérisation. La spécialisation en sous-unités distinctes semble avoir été une étape décisive dans l'évolution des PBP. Les différences dans les micro-environnements des chromophores entre les deux types de sous-unités se sont avérées indispensables à l'établissement d'un transfert d'énergie orienté, représentant une force évolutive considérable (Huber 1989). La duplication donna naissance à deux lignées évolutives, celle du cœur du PBS (AP) et celle des projections radiales (PC et PE ; étape 2).



**Figure 31** : Modèle d'évolution des gènes de PBP et du développement du PBS proposé par Apt et al. (1995), voir le texte.

Les deux sous-unités de l'AP divergèrent l'une de l'autre, et après une nouvelle duplication donnèrent naissance aux éléments  $\alpha^{APB}$  et  $\beta^{18.5}$  du cœur du PBS. Le développement du cœur comprenant des sous-unités spécialisées dont la  $L_{CM}$ , a été essentiel à un transfert d'énergie efficace entre l'AP et les chl des centres réactionnels. L'hétérodimère précurseur des PBP des projections radiaires s'est dupliqué pour former la PC (puis la PEC) et les sous-familles de PE (étape 3). Ces gènes ont co-évolué avec les linkers compris dans les bras. Durant l'évolution des différentes sous-unités des PBP, le nombre de chromophores par sous-unité a augmenté, accroissant la capacité d'absorption par protéine. La nature de ces chromophores a également changé, permettant l'absorption des faibles longueurs d'onde. Un cas notable de ce processus évolutif est celui des apoprotéines de PEII de *Synechococcus* marins pouvant lier une majorité de PUB absorbant les lumières bleues (absorption à 495 nm). Un exemple extrême est le PBS de la cyanobactérie marine fixatrice d'azote *Crocospaera watsonii* (WH8501 ; Swanson et al., 1991). Sa PC porte une molécule de PUB, ce qui est unique à ce jour au sein de la famille des PC. Les bras sont aussi composés de deux PE portant cinq bilines, dont quatre PUB pour une seule PEB. Les PUB sont ainsi les chromophores donneurs au seul chromophore PEB accepteur présent. Cet organisme a probablement l'un des PBS les mieux adaptés à capter la lumière bleue, majoritaire dans certains environnements marins.

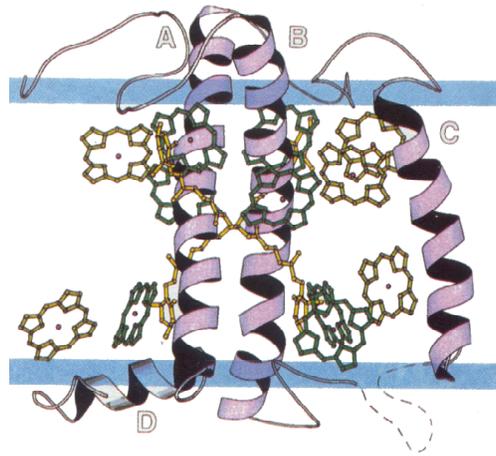
Ainsi, les deux forces évolutives prédominantes ayant conduit aux PBP semblent avoir été

l'établissement d'un transfert orienté de l'énergie ainsi que le développement de la capacité à absorber les courtes longueurs d'onde. Les cyanobactéries marines semblent ainsi posséder des antennes photosynthétiques très perfectionnées et forment un groupe monophylétique, bien séparé des cyanobactéries d'eau douce ; les données actuelles suggèrent d'ailleurs que ces organismes sont plus proches de l'ancêtre des plastes des Rhodophyta que des cyanobactéries d'eau douce.

Par ailleurs, Apt et al. (1995) suggèrent que puisque les organismes contenant de la PE ne présentent pas d'homogénéité phylogénétique ni morphologique ni moléculaire, les gènes de PE ont certainement été perdus de façon indépendante dans plusieurs lignées. D'autre part, chez certaines souches dépourvues de PE telles que *Mastigocladus laminosus* et *Anabaena* spp., une duplication tardive des gènes de PC a donné naissance à la PEC qui a évolué vers des caractéristiques spectrales relativement proches de la PE. Toutes les PEC semblent avoir divergé à partir d'une même protéine ancestrale.

### **3) Les antennes intrinsèques à chl a/b**

La plupart des organismes qui pratiquent la photosynthèse oxygénique possèdent des antennes photosynthétiques composées d'un assemblage de protéines pigmentées à trois hélices transmembranaires (Figure 32). Il en existe deux types principaux : celles liant la chl *b* présentes dans la lignée verte (Chlorobiontes) et qui sont appelées LHC, et celles liant une majorité de xanthophylles, telle que la fucoxanthine ou la péridinine, présentes chez les organismes à chl *c* (diatomées, dinoflagellés, prymnésiophytes, algues brunes, etc.) et qui sont appelées respectivement FCP (« Fucoxanthin chlorophyll protein ») ou PCP (« Peridinin chlorophyll protein »). L'antenne à chl *a* du photosystème I des algues rouges et des Cryptophyceae fait partie de la même famille que ces dernières (Durnford et al. 1999). Nous nous limiterons ici aux LHC présentes chez les plantes supérieures et les algues vertes.



**Figure 32** : Structure du Lhcb1 de pois déterminé par cristallographie électronique (Kühlbrandt et al. 1994). Les bandes bleues indiquent la position approximative de la bicouche lipidique. Sur cette représentation, les hélices sont nommées A à D et les hélices B, C et A correspondent aux hélices 1, 2 et 3 respectivement.

#### a) Les plantes supérieures

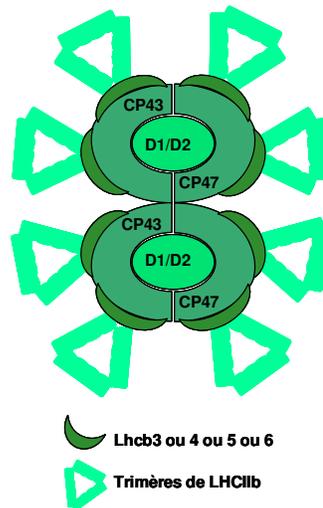
Chez les plantes supérieures, le système antennaire est généralement divisé en deux parties, le LHCII et le LHCI, associés respectivement au PSII et au PSI, et comprenant au total une dizaine de types distincts de protéines différemment pigmentées. Ces protéines codées par une famille multigénique sont dénommées Lhca pour le PSI et Lhcb pour le PSII, puis par un chiffre permettant de les identifier. Chacun de ces complexes est constitué de protéines à trois hélices transmembranaires codées dans le génome nucléaire et liant de la chl *a* et de la chl *b* dans des rapports variables (Tableau 3) ainsi que des xanthophylles telles que la lutéine, la néoxanthine, la violaxanthine, *etc...* Tous ces polypeptides partagent un motif générique très hydrophobe d'environ 22 kDa contenant trois acides aminés invariants (glutamate, arginine et glycine), les autres résidus étant plus variables mais toujours hydrophobes (Jansson, 1999). Ce sont ces régions qui portent les chromophores. Les trois hélices forment l'essentiel de la structure protéique et sont reliées par des ponts salins arginine-glutamate. Bien que de plusieurs gènes de LHC aient été séquencés au début des années 1990 (notamment au travers de banques d'EST), le séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* (Bennetzen 2001) a fait de cette Brassicaceae le modèle dominant en biologie végétale des plantes supérieures et a notamment permis l'étude de la totalité des gènes relatifs aux antennes LHC.

**Tableau 3** : Protéines antennaires à Chl *a/b* typiques des plantes supérieures avec le gène et le rapport pigmentaire chl *a* / chl *b* correspondant, d'après Durnford et al. (1996).

Complexe pigment-protéine	Gène	Rapport Chl <i>a/b</i>
LHCI-680A	<i>lhca3</i>	1.4
		1.9
		3.1
LHCI-680B	<i>lhca2</i>	nd
LHCI-730	<i>lhca1</i>	2.3
	<i>lhca2</i>	2.9
		3.2
LHCII	<i>lhcb1</i>	1.4
	<i>lhcb2</i>	1.33
	<i>lhcb3</i>	
CP29	<i>lhcb4</i>	2.3
		2.8
		3.1
CP26	<i>lhcb5</i>	1.8
		2.2
		3.3
CP24	<i>lhcb6</i>	0.9
		1.6
CP22	<i>psbS</i>	6

Le premier complexe Chl-protéine mis en évidence est le LHCII qui constitue l'antenne majeure à Chl *a/b* du PSII chez les chlorobiontes. Les polypeptides de ce complexe possèdent une masse moléculaire comprise entre 24 et 29 kDa et représentent généralement environ un tiers de la quantité totale en protéines des membranes thylacoïdales, liant environ 50 % de la Chl totale. La connaissance de la structure des protéines de type LHC est essentielle à la compréhension du fonctionnement du complexe. La structure du cristal de Lhcb1 et le modèle atomique qui en découla permit de localiser 7 chl *a* et 5 chl *b* (Figure 33 ; Kühlbrandt et al., 1994 ; Green & Duford, 1996) et deux molécules de lutéine structurellement importantes (Tremolieres et al. 1994, Bassi & Dainese 1992, Jansson 1994). Chez les plantes vasculaires, la partie distale du LHCII est constituée de trois types de polypeptides étroitement associés en trimères formant le LHCIIb, et codés par les gènes nucléaires *Lhcb1-3* (Jansson 1994, 1999a). Les rapports de ces protéines varient selon les conditions environnementales (Machold 1991). Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe 5 gènes *Lhcb1* dont l'expression est extrêmement variable et ce gène a aussi été mis en évidence chez une vingtaine d'autres plantes (Jansson et al. 1992). Chez *Arabidopsis thaliana*, les protéines matures codées par ces gènes désignés Lhcb1.1, Lhcb1.2 et Lhcb1.3 sont identiques alors que les polypeptides Lhcb1.4 et Lhcb1.5 sont similaires entre eux et divergent des trois premiers. Il existe plusieurs formes trimériques. Lhcb1 peut former seul un homotrimère mobile ou un hétérotrimère mobile ou non selon qu'il est associé à Lhcb2 ou à

Lhcb3. Chez *Arabidopsis thaliana*, quatre gènes lhcb2 sont présents dans le génome et semblent résulter d'une duplication récente car les séquences des quatre protéines matures sont quasiment identiques. Le gène *Lhcb3*, souvent de taille moindre, n'est présent qu'en une seule copie. Toutefois ceci n'est pas une généralité puisque par exemple, les genres *Petunia* et *Lycopersicon* en possèdent plusieurs copies.

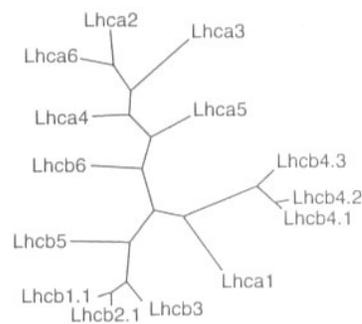


**Figure 33 :** Organisation schématique du LHCII en association avec le dimère de CR. Les centres réactionnels sont composés de l'hétérodimère D1/D2 entouré de l'antenne interne (CP43/CP47) et de l'antenne périphérique composée de protéines Lhc.

Trois autres protéines antennaires possèdent une structure similaire aux peptides du LHCII : Lhcb4-6, aussi respectivement connues sous les noms de CP29, CP26 et CP24 (Grossman et al. 1995, Green & Durnford 1996). Ces polypeptides sont probablement organisés en monomères (un monomère par PSII ; Figure 33). Le rapport chl *b*:chl *a* de ces protéines est plus faible que chez les protéines du LHCII et elles portent 5 à 10 % de la chl totale associée au PSII (Tableau 3 ; Allen 1992, Peter & Thorbner 1991, Pickersky et al. 1991, Barber & Kühlbrandt 1999, Pineau et al. 2001). Ces protéines occupent une position proximale dans le complexe antennaire et leur étroite association avec le centre du PSII permet le transfert de l'énergie d'excitation du trimère de LHCII au CR, par l'intermédiaire des protéines de l'antenne interne (CP43 et CP47 ; Camm & Green 1989, Bassi & Dainese 1992, Harrer et al. 1998). Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe trois copies de *Lhcb4* assez divergentes dont une est faiblement exprimée (*Lhcb4.3*). Les gènes *Lhcb5* et *6* sont en copie simple chez *Arabidopsis thaliana* et en multiples copies chez *Lycopersicon*, *Petunia*, *Nicotiana tabacum*, et *Oryza*. Une observation intéressante est que les gènes *Lhcb4* et *Lhcb6* codant pour CP29 et CP24 sont plus proches des gènes *Lhca* que des gènes *Lhcb* (Figure 34). Ceci va en faveur de l'hypothèse qui propose que le

système antennaire ancestral des chlorobiontes était de type LHCI (Durnford et al. 2003).

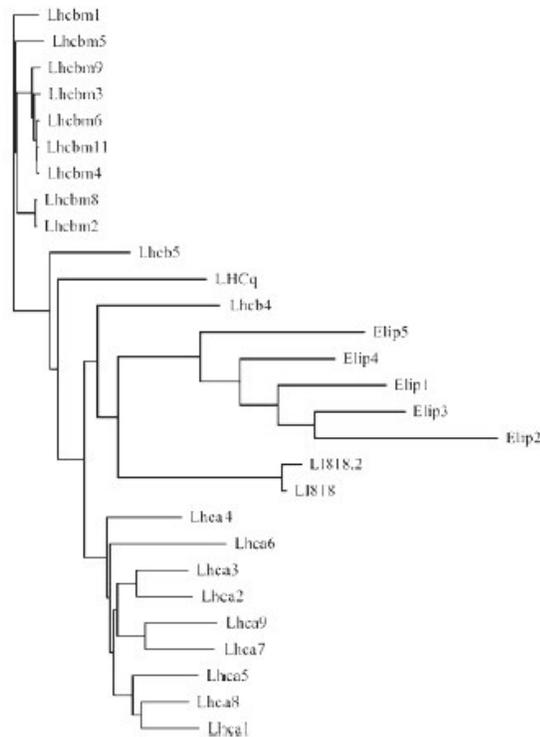
Le modèle de Kuhlbrandt et al. (1994), déterminé d'après la structure du cristal de Lhcb1 résolue à 3,4 angströms, a permis de déduire que le LHCI contient cinq unités LHCIb., trois à quatre complexes mineurs, le tout formant un ensemble oligomérique intrathylacoïdal (Horton et al. 1996). En ce qui concerne la composition en caroténoïdes, d'une façon générale, les carotènes sont surtout liés par des protéines codées dans le génome chloroplastique alors que celles portant les xanthophylles sont souvent codées par des gènes nucléaires. Ainsi, on trouve le  $\beta$ -carotène principalement associé au CR et la néoxanthine, violaxanthine, anthéroxanthine et la zéaxanthine aux antennes.



**Figure 34** : Cladogramme non enraciné montrant les relations entre les séquences des protéines Lhc chez *Arabidopsis thaliana*, d'après Jansson (1999b).

Deux types de complexes Chl-protéines codés par les gènes *Lhca1-6* sont associés au PS I (Figure 35). L'un d'entre eux est responsable d'un maximum de fluorescence à 77 K à 730 nm (LHCI-730) et est composé d'hétérodimères des polypeptides Lhca1 et Lhca4. Le second fluoresce à plus courte longueur d'onde (LHCI-680), suggérant une organisation différente des Chl associées (Bassi & Simpson 1987, Palsson et al. 1995), et est composé d'hétéro- ou d'homodimères des protéines Lhca2 et Lhca3. La fonction de protéines Lhca1 et Lhca4 est encore mal comprise. De même, la structure et la fonction des protéines Lhca5 et Lhca6, également associées au PSI, restent incertaines (Jansson, 1999). Le LHCI contribue pour 100-120 Chl *a* sur un total de 210 molécules de Chl *a* associées au PSI (Jansson, 1994). Les gènes *Lhca* qui codent pour les différentes protéines du LHCI sont beaucoup plus divergentes les uns des autres que ne sont les gènes *Lhcb* (Durnford et al. 1999, Jansson 1999).





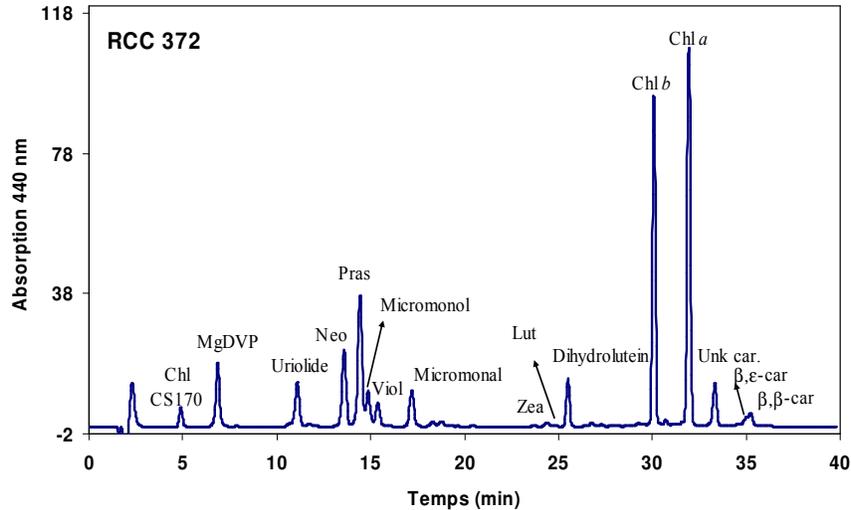
**Figure 36:** Cladogramme des gènes des protéines Lhc et ELIP (à trois hélices transmembranaires) chez *Chlamydomonas reinhardtii*, d'après Elrad et al. (2004).

Malgré la présence d'homologies au niveau des hélices transmembranaires, il n'est pas possible de faire correspondre les différents types de Lhcb des Chlorophyceae avec ceux définis chez les plantes (Green & Pichersky 1994, Jansson, 1994, Elrad et al., 2004). Ces études supportent l'hypothèse proposant que les gènes de *Lhcb* ont donné naissance à une descendance multiple juste après la séparation entre les plantes et les algues vertes (Elrad et al., 2004, Tokutsu et al. 2004). Les gènes *Lhca* des Chlorophyceae sont en revanche assez proches de ceux des plantes supérieures et ceci est en faveur de l'hypothèse proposant un système antennaire ancestral des chlorobiontes de type LHCI (Dunford, 2003).

### *Les Prasinophyceae*

Les Prasinophyceae sont des algues vertes planctoniques considérées comme primitives, dont la radiation branche à la base de la lignée verte (voir partie phylogénie des Prasinophyceae ci-après). En particulier, en comparaison avec les Chlorophyceae, ces microalgues possèdent une pigmentation particulière pouvant présenter des quantités significatives de pigments rares chez les

algues vertes tels que l'uriolide, la prasinoxanthine, la siphonaxanthine, le  $\gamma$ -carotène, *etc.* (Egeland et al. 1997, Yoshii et al. 2003, Figure 37).



**Figure 37** : Chromatogramme de *Micromonas pusilla*, montrant la composition pigmentaire typique des Mamiellales (Prasinophyceae), d'après F. Rodriguez, (données non publiées). Cette souche (RCC372) a la particularité de posséder une chl spéciale, la chl CS-170. MgDVP : Mg-divinyl phaeoporphyrine  $a_5$  ; Neo : noxanthine ; Pras : prasinoxanthine ; Viol : violaxanthine ; Zea : zéaxanthine ; Lut : lutéine ; Unk car. : caroténoïde inconnu ; car. : carotène.

Le système antennaire photosynthétique des Prasinophyceae Mamiellales a été étudié essentiellement chez *Mantoniella squamata* dans une série d'articles publiés dans les années 1990 (Fawley et al. 1986, Rhiel & Bryant 1993, Rhiel et al. 1993, Schmitt et al. 1994, Schmitt et al. 1993, Jiao & Fawley 1994). Ces études ont nourri l'idée maintenant généralement admise que *Mantoniella squamata*, et plus largement les Prasinophyceae, possèdent une antenne unique primitive en association avec les deux photosystèmes, un argument largement utilisé dans la théorie de l'endosymbiose (Dunford, 2003 ; Tokutsu et al., 2004). Le fonctionnement de cette antenne n'a pas été réellement étudié.

### c) Les oxyphotobactéries à chl *b*

La découverte de la présence d'une antenne intrinsèque à Chl *a/b* remplaçant les phycobilisomes chez certaines oxyphotobactéries (*Prochloron*, *Prochlorothrix* et *Prochlorococcus*) a tout d'abord amené à spéculer sur une éventuelle relation d'ancestralité de ces organismes procaryotiques vis-à-vis des chloroplastes des plantes supérieures et des algues vertes (voir *e.g.*

Lockhart et al. 1993), ce qui a valu un temps à ces organismes l'appellation de « Prochlorophytes », une terminologie aujourd'hui obsolète. En effet, les analyses phylogénétiques groupent sans équivoque les oxyphotobactéries « vertes » (à Chl *b*) avec les cyanobactéries à phycobilisomes et montrent de plus que les trois genres connus à ce jour ne forment pas un groupe monophylétique au sein de la radiation des cyanobactéries (Turner et al. 2001, Partensky & Garczarek 2003).

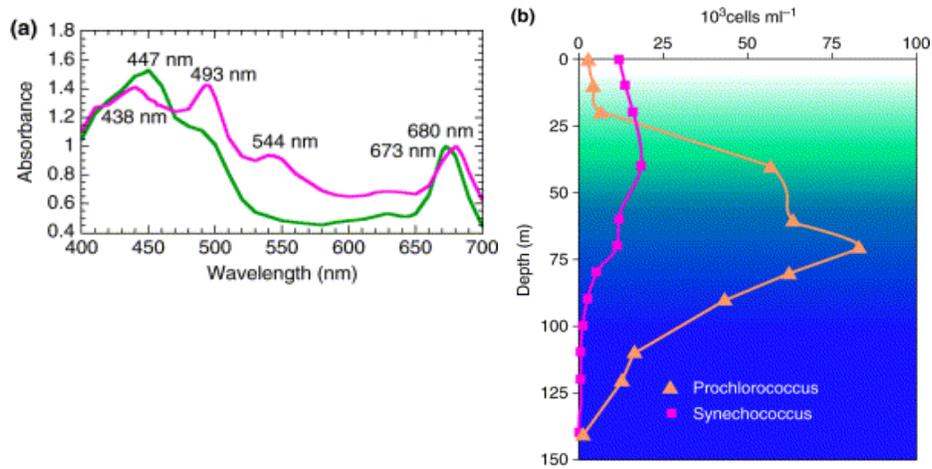
Le séquençage des gènes d'antenne de ces organismes a dévoilé que les protéines pour lesquelles ils codent, dénommés Pcb (Prochlorophyte chl *b* binding protein), possèdent six hélices transmembranaires, les distinguant nettement des LHCs à trois hélices décrits dans le paragraphe précédent. Des comparaisons de séquences révèlent que cette famille de protéines d'antennes procaryotiques à Chl *a/b* aurait évolué par duplication et divergence d'un gène codant pour une protéine impliquée dans la réponse à la carence en fer, IsiA (Laudenbach & Straus 1988, Burnap et al. 1993, Larkum 2003). IsiA fait partie de la même famille que CP43 et CP47 dont elle dérive probablement (van der Staay et al. 1998, Geiss et al. 2001a, Geiss et al. 2001b, Partensky & Garczarek 2003, Garczarek et al. 2003). Il a récemment été mis en évidence qu'IsiA est capable de former une couronne de 18 protéines autour des trimères de PSI de cyanobactéries d'eau douce, et aurait ainsi un rôle de collecte de la lumière (Bibby et al. 2001, Boekema et al. 2001). La même organisation a été ensuite retrouvée chez les Pcb formant l'antenne du PSI de certaines souches de *Prochlorococcus* mais, chez ces organismes, d'autres types de Pcb forment également une couronne partielle autour des dimères de PSII (Bibby et al. 2003a, Bibby et al. 2003b). Le même type d'organisation des protéines d'antennes est trouvé chez *Prochloron*.

Deux gènes codant pour cette antenne collectrice (*pcbA* et *pcbC*) ont été identifiés chez *Prochloron*, et trois chez *Prochlorothrix* (van der Staay et al., 1998, Chen et al. 2005). Les gènes *pcbA*, *B* et *C* présents chez *Prochlorothrix* sont cotranscrits et codent respectivement pour des polypeptides de 32, 33 et 38 kDa (van der Staay et al., 1998). Chez *Prochlorococcus*, les caractéristiques pigmentaires et le nombre et la nature des protéines de l'antenne majeure varient selon les souches examinées (Partensky et al. 1997; voir paragraphe suivant).

## **C/ Adaptation et phylogénie du picophytoplancton marin**

Les oxyphotobactéries *Prochlorococcus* et *Synechococcus* sont des composants essentiels de la fraction marine picophytoplanctonique. Ces deux genres sont phylogénétiquement très proches (Urbach et al. 1992). Ces organismes diffèrent par leur distribution horizontale et verticale dans la colonne d'eau, ainsi que par leur pigmentation. Comme explicité ci-avant, *Prochlorococcus* possèdent des antennes de type intrinsèque, les Pcb, et *Synechococcus* des PBS. Les variations dans la structure

et les chromophores fixés par ces protéines antennaires vont conférer à ces organismes des capacités différentes d'absorption de la lumière présente dans le milieu marin et leur permettre de s'adapter à des niches différentes du point de vue de la qualité et/ou de la quantité de lumière disponible (Figure 38).



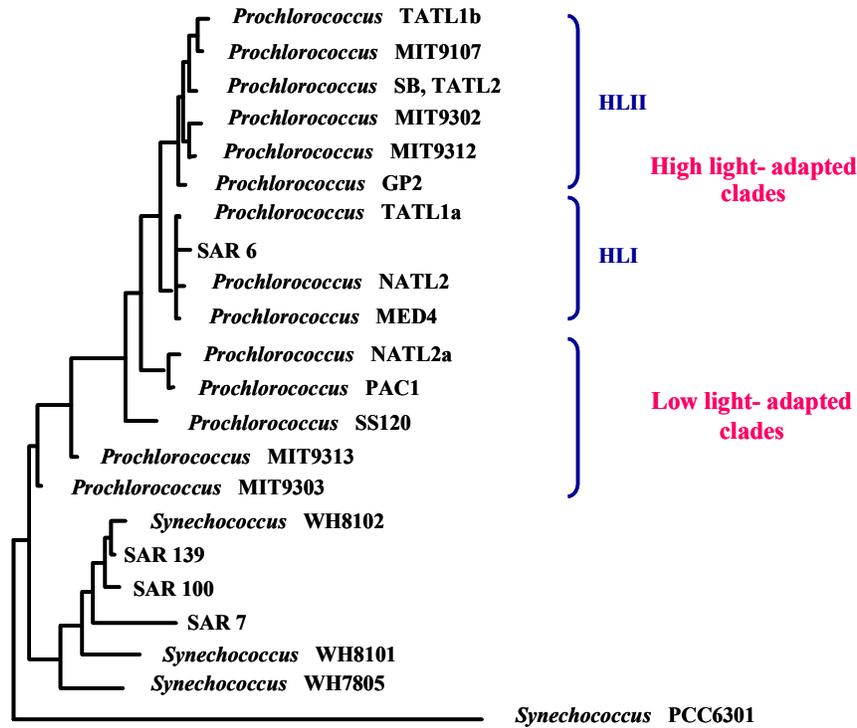
**Figure 38** : Spectres d'absorption *in vivo* (a ; vert : *Prochlorococcus*, rose : *Synechococcus*) et distribution verticale (b) des genres *Synechococcus* et *Prochlorococcus* en Atlantique subtropical (juin 1996), d'après Ting et al. (2002).

Chez les picoeucaryotes photosynthétiques marins, la distribution des modes d'adaptation aux variations des facteurs environnementaux, et notamment la lumière, sont beaucoup plus mal connus. Les premiers pas vers la compréhension de ces aspects de l'écologie de ces organismes ont récemment été entamés par quelques études sur les Mamiellales.

### 1) *Prochlorococcus*

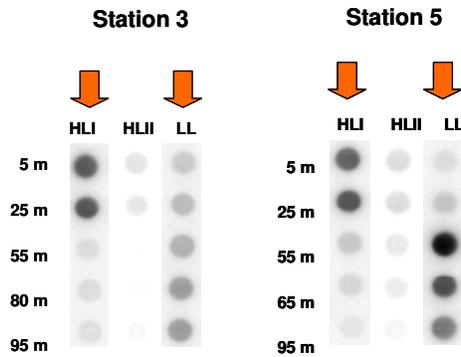
*Prochlorococcus* présente une répartition géographique limitée à  $40^\circ$  de latitude N et S, et domine généralement la fraction picophytoplanctonique des eaux oligotrophes et mésotrophes (Partensky et al. 1999b). L'étude de la photophysologie de souches isolées de *Prochlorococcus* a révélé qu'il existait une grande disparité dans les capacités d'acclimatation à différents niveaux d'intensité lumineuse (Moore et al. 1995, Moore et al. 1998). Ainsi des souches isolées dans les eaux de surface (comme MED4) sont capables de supporter d'importantes intensités lumineuses, jusqu'à environ  $450 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , alors que *Prochlorococcus* spp. MIT9313 et SS120 isolées en profondeur ne poussent qu'à de faibles niveaux lumineux. De plus, les souches de *Prochlorococcus* présentent des variations importantes du rapport chl *b*:chl *a*, *Prochlorococcus* sp. MED4 ayant par exemple un rapport chl *b*:chl *a* dix fois moindre que SS120. Le séquençage du gène de l'ARN 16S

a permis de constater que cette diversité physiologique se retrouvait au niveau phylogénétique (Figure 39). Ainsi les souches adaptées aux fortes lumières se regroupent au sein du clade HL (pour « high light »), lui-même composé de deux sous-clades (HLI et HLII), tandis que les souches de basse lumière apparaissent beaucoup plus diversifiées et se répartissent en divers clades regroupés sous le nom « LL » (pour « low light » ; Figure 39).



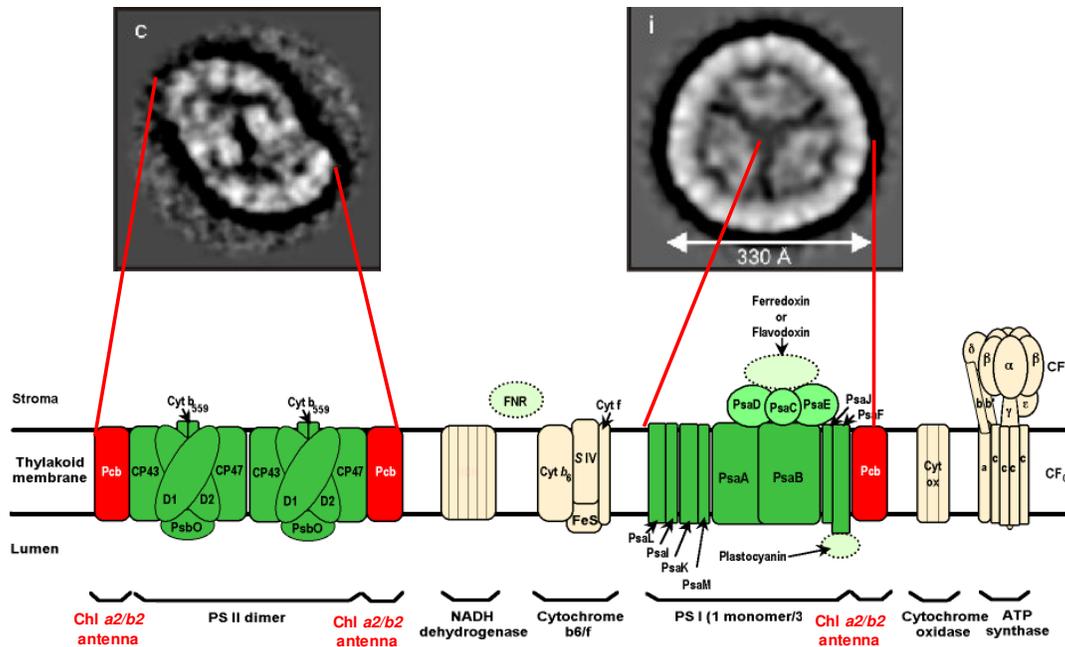
**Figure 39 :** Arbre phylogénétique de plusieurs souches de *Prochlorococcus* et quelques *Synechococcus* (ARN 16S) d'après Moore et al. (1998). On distingue les deux clades de *Prochlorococcus* de forte lumière (HLI et HLII) et le groupe plus disparate des souches de profondeur

Il existe ainsi des « phototypes » de *Prochlorococcus* qui ont développé des capacités d'adaptation à un environnement lumineux donné (forte et faible lumière), ces caractéristiques n'étant pas seulement phénotypiques mais aussi fixées génétiquement. Les techniques *in situ* utilisant des sondes moléculaires (ARN 16S) telles que l'hybridation *in situ* ou le dot-blot permettent d'étudier la distribution verticale des phototypes (Figure 40).



**Figure 40** : Distribution verticale des principaux clades du genre *Prochlorococcus* estimée par dot-blot en Mer Méditerranée à deux stations différentes (campagne PROSOPE), d'après Garczarek et al. (en préparation).

Les travaux sur les caractéristiques des antennes photosynthétiques des deux phototypes ont montré que leurs complexes antennaires présentent des traits d'adaptations spécifiques. Ainsi, la souche de surface MED4 possède une seule copie du gène *pcb*, codant pour l'antenne du PSII, alors que la souche SS120 en possède huit, dont trois associés au PSI et cinq au PSII (Garczarek et al. 2000a, Garczarek et al. 2000b, Garczarek et al. 2001, Bibby et al. 2003a, Bibby et al. 2003b). La multiplication des gènes *pcb* chez cette dernière souche semble représenter une adaptation évolutive à un environnement faiblement éclairé. Cependant, la situation n'est pas aussi tranchée qu'il y paraît, car la souche de basse lumière MIT9313 a seulement deux gènes *pcb*, le même nombre que la souche MI9312, qui appartient au clade HLII. Les systèmes antennaires de ces deux souches ne diffèrent donc guère que par leur rapport chl *b* : chl *a*, plus élevé chez la souche de profondeur même lorsque ces deux souches sont cultivées à même lumière. Il a été montré chez MIT9313 qu'un des deux gènes *pcb* code pour une antenne constitutive du PSII et l'autre pour une antenne du PSI de type IsiA, c'est-à-dire qu'elle n'est présente qu'en carence en fer (Bibby et al. 2003a, Bibby et al. 2003b). Comme MIT9313 est une souche primitive, il s'agit là vraisemblablement d'un caractère ancestral qui se serait perpétré chez certaines souches de surface comme MIT9312, alors que d'autres comme MED4 auraient totalement éliminé l'antenne ancestrale fer-dépendante de type PSI pour ne conserver que l'antenne du PSII. L'organisation des complexes antennaires autour des deux photosystèmes a pu être observé par microscopie électronique chez *Prochlorococcus* sp. MIT9313 dans différentes conditions d'enrichissement en fer (Bibby et al., 2003 ; Figure 41).

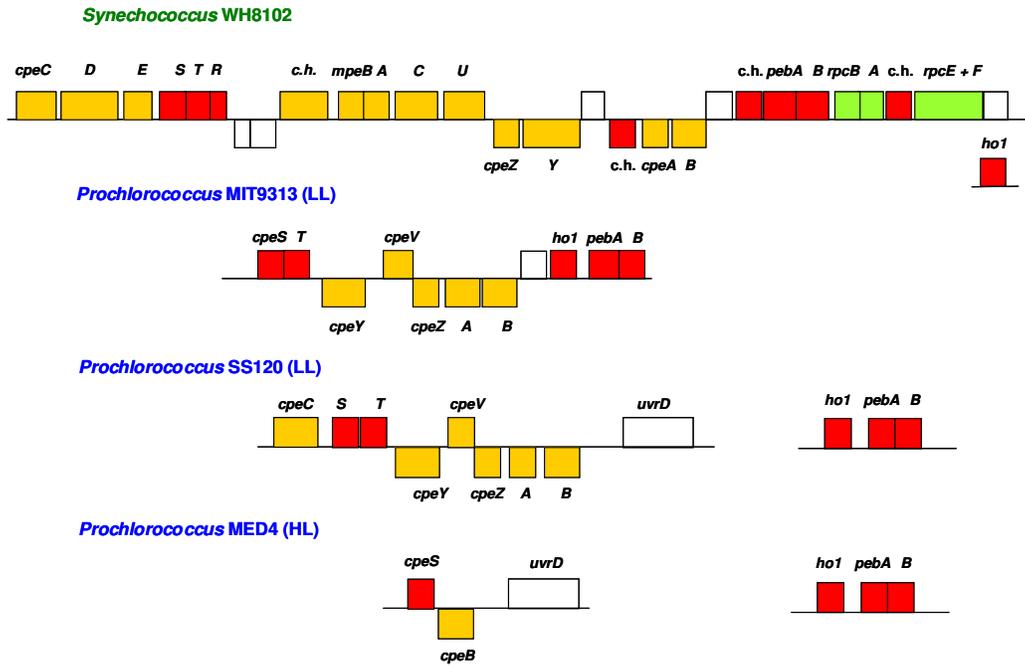


**Figure 41 :** Appareil photosynthétique schématique de *Prochlorococcus* sp. MIT9313 en carence en fer. Remarquez la couronne partielle de 8 Pcb autour des dimères de PSII et la couronne complète de 18 Pcb autour du PSI. C'est aussi la situation observée en conditions de culture normales chez SS120, alors que MIT9313 perd sa couronne autour du PSI lors du fer est présent dans le milieu de culture. Chez MED4, il n'y jamais de couronne autour du PSI, quelle que soit les conditions de milieu (+ /- Fe). Schéma d'après Partensky & Garczarek (2003) et photographies en MET d'après Bibby et al. (2003).

Le séquençage complet des génomes de plusieurs souches de *Prochlorococcus* a permis de mettre en évidence d'autres adaptations plus ou moins liées à l'adaptation à la niche lumineuse. Les photolyases sont des chromoprotéines impliquées dans la réparation de certains dommages à l'ADN notamment provoqués par une exposition intense au rayonnement UV. On trouve ainsi plusieurs gènes codant pour des photolyases chez la souche de surface MED4, alors que les souches MIT9313 et SS120 n'en ont aucun. De manière analogue, MED4 possède 22 gènes présentant de fortes homologues avec les HLIP (pour High Light Inducible Proteins) que l'on pense impliquées dans des mécanismes de photoprotection, alors que SS120 n'en possède que 13 et MIT9313 en a 9 (Bhaya et al. 2002).

L'un des exemples d'évolution moléculaire les plus spectaculaires est celui de l'opéron PBP. Comme nous l'avons vu précédemment, chez les *Synechococcus* marins tels que la souche WH8102, cet opéron est très développé, comme nous l'avons vu précédemment, puisque cette cyanobactérie utilise le PBS comme antenne photosynthétique majeure. Chez *Prochlorococcus*, cet opéron a été considérablement réduit et il ne reste plus chez la souche SS120 que 11 gènes

impliqués dans la synthèse de PE (Figure 42). C'est le nombre minimal pour avoir une PE fonctionnelle, et il a été montré qu'elle est capable de transférer l'énergie des photons au centre réactionnel du PSII, ce qui montre son rôle potentiel dans la capture des photons, même si elle, est présente qu'en très faible quantité dans la cellule (Lokstein et al. 1999).



**Figure 42 :** Comparaison des régions génomiques des PBP de *Synechococcus* sp. WH8102, de deux souches de *Prochlorococcus*. de profondeur (MIT9313 et SS120) et d'une souche de *Prochlorococcus* de surface (MED4).

MIT9313 possède un gène de moins, *cpeC*, codant pour un linker de PE. En conséquence, chez cette souche, l'énergie capturée par la PE ne peut pas être transmise au RCII (Lokstein et al., 1999). Enfin chez MED4, il ne reste plus que le gène *cpeB*, codant pour un homologue fortement dérivée de  $\beta^{PE}$ , ainsi que plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse de la PEB (*ho1*, *pebA* et *pebB*). Les niveaux d'expression de *cpeB* sont extrêmement faibles mais il a été proposé, mais non encore démontré, que son produit pourrait être impliqué dans la photoperception chez MED4 (Steglich et al. 2003a, b).

## 2) *Synechococcus*

Dispersé dans plusieurs clusters de la radiation cyanobactérienne, le genre *Synechococcus* est clairement polyphylétique (Figure 43). Cependant, les *Synechococcus* marins (*i.e.* les souches nécessitant une forte salinité pour se développer) forment un groupe homogène monophylétique (le cluster 5.1) et montrent une diversité génétique importante. Les analyses de la séquence de l'ARN 16S ont révélé que le cluster 5.1 est composé d'au moins 10 clades (Figure 44 ; Fuller et al., 2003). Les phylogénies basées sur le gène *rpoO1* montrent des résultats similaires. La diversité du cluster est mal comprise car peu de caractères phénotypiques ont pu être attribué à l'un ou l'autre des clades déterminés. Le clade III est considéré comme regroupant des cellules mobiles utilisant un type particulier de motilité (Brahamsha 1996b, a). Deux clades montrent une pigmentation spécifique : les *Synechococcus* appartenant au clade VIII sont dépourvus de PE et ceux du clade VI, de PUB (Fuller et al., 2003). Par ailleurs, le clade II est surprenant de par la variabilité des valeurs de PUB :PEB observées chez ces *Synechococcus* (de 0,5 à 1,9).

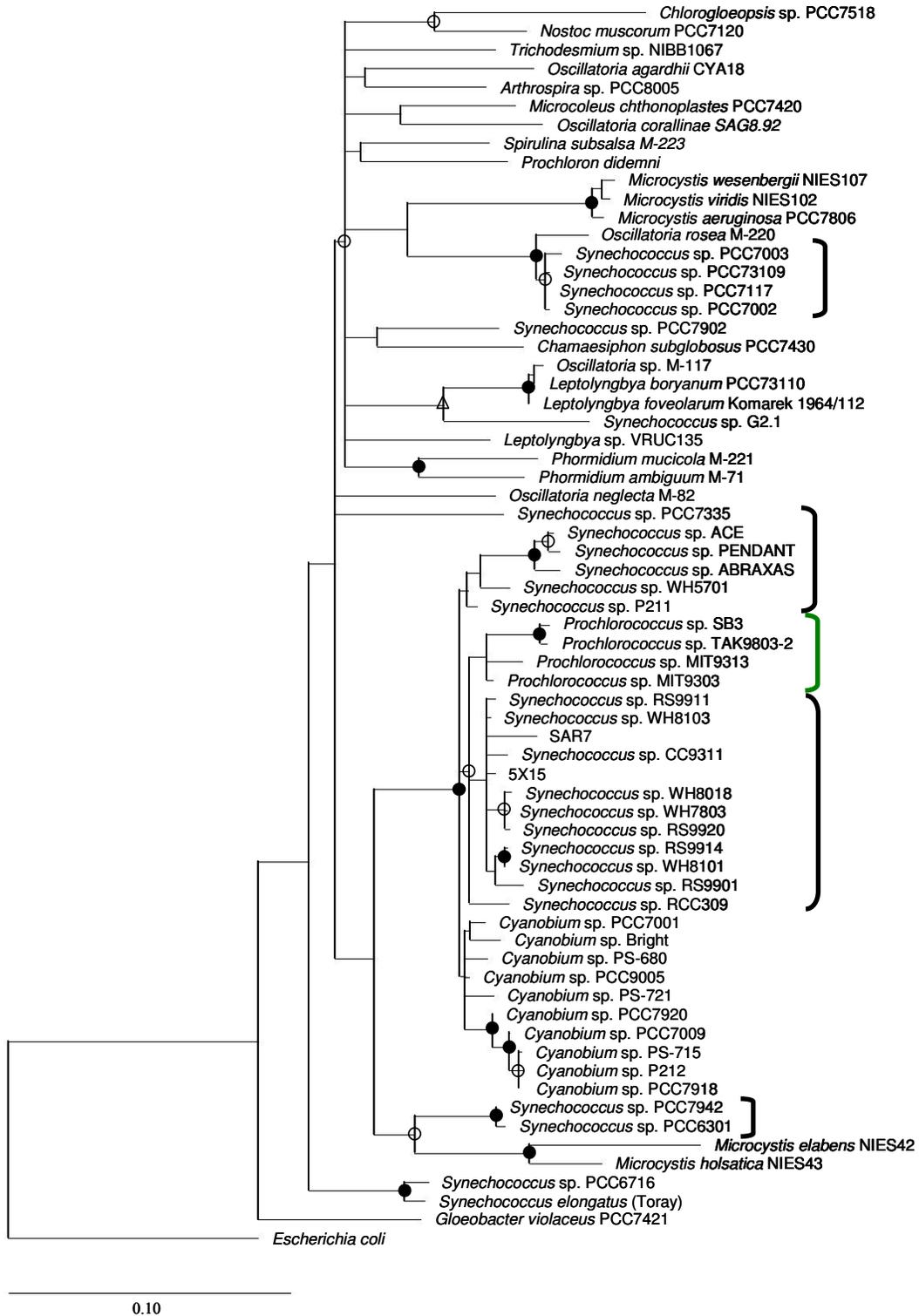
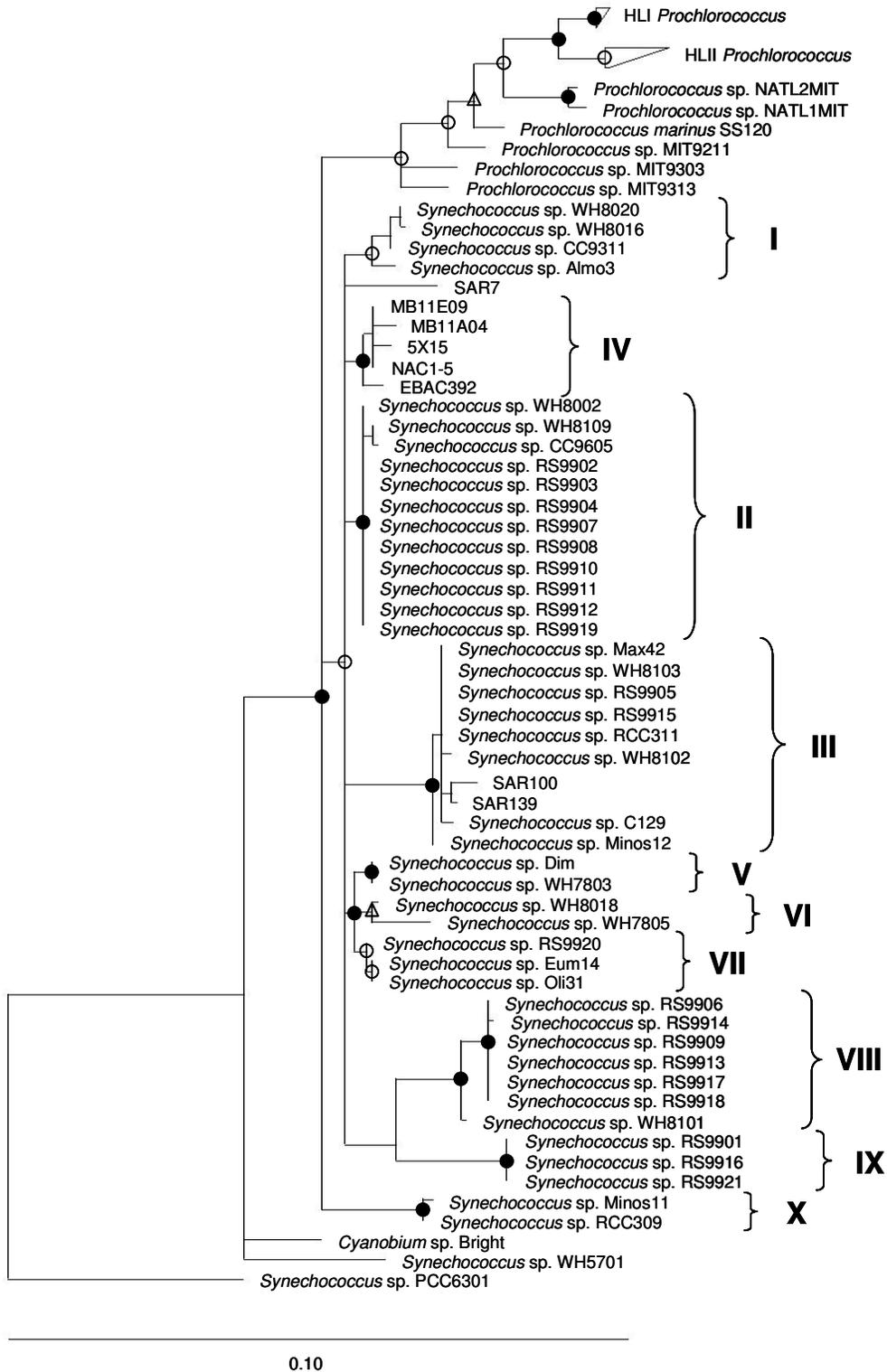


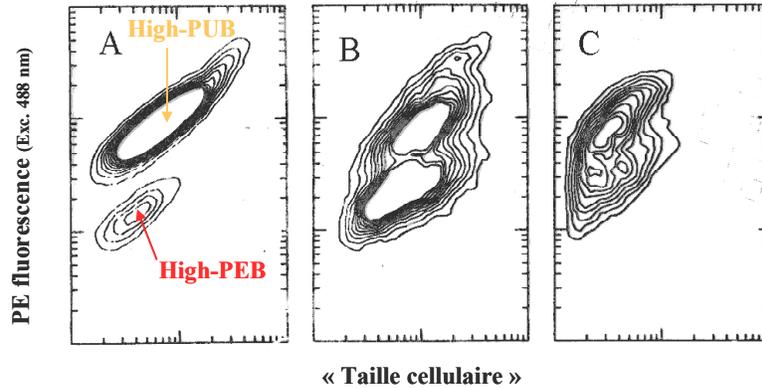
Figure 43 : Arbre phylogénétique général des cyanobactéries basé sur les séquences d'ARNr 16S, d'après Fuller et al., (2003). Le genre *Synechococcus* apparaît clairement comme polyphylétique.



**Figure 44** : Arbre phylogénétique des *Synechococcus* marins (cluster 5.1) basé sur les séquences de l'ARNr 16S, d'après Fuller et al., (2003). Les groupe des *Synechococcus* marin est divisé en une dizaine de clades plus ou moins distincts.

Jusqu'aujourd'hui, aucun phénomène d'écotypisme similaire à *Prochlorococcus* n'a pu être mis clairement en évidence chez les *Synechococcus* marins. Parmi les souches les plus citées, les clones WH8103 et WH7803 font l'objet d'études de photoacclimatation et ils ont été tous deux capables de pousser à de fortes intensités lumineuses (Kana & Glibert 1987a, Kana et al. 1988, Moore et al., 1995). La distribution en surface des *Synechococcus* marins suggère que beaucoup de ces organismes sont résistants aux fortes intensités lumineuses et aux UV (Toledo & Palenik 2003). Il est par ailleurs remarquable que ces souches peuvent aussi pousser à de très faibles intensités lumineuses. Il a été montré que les *Synechococcus* de profondeur fluorescent plus que ceux de surface, très probablement à cause de concentrations cellulaires en pigment différentes (Olson et al. 1990b, Vernet et al. 1990, Lantoine & Neveux 1997). Les *Synechococcus* marins semblent ainsi être très flexibles à l'intensité lumineuse, ce qui représente une stratégie de photoacclimatation différente de celle des phototypes de *Prochlorococcus*.

En revanche, la distribution horizontale (*i.e.* le long d'un gradient côte-large) des types optiques des *Synechococcus* marins est intéressante. Les premiers travaux sur ce sujet ont montré que les oxyphotobactéries océaniques à PE possèdent la plupart du temps de la PUB, ce qui n'avait pas été réalisé à partir de travaux sur les souches en culture (Olson et al. 1988, Olson et al. 1990b, Lantoine & Neveux 1997, Wood et al. 1998, Wood et al. 1999, Sherry & Wood 2001, Campbell & Iturriaga 1988). Plusieurs auteurs ont montré que les populations naturelles de *Synechococcus* marins présentent des propriétés optiques différentes selon le type d'eau qu'elles habitent. Les études de cytométrie en flux mettent en évidence deux populations de *Synechococcus* marins séparées par l'intensité de leur fluorescence orange (Figure 45). En effet, lorsque la longueur d'onde d'excitation du cytomètre est fixée à 488 nm, les cellules qui ne contiennent que de la PEB (exc max 545 nm) sur la PE fluorescent moins que les cellules contenant du PUB (exc 495 nm). Les quantités plus ou moins importantes de PUB donnent aux cellules un spectre d'action similaire à ceux des organismes à antennes chlorophyllienne (car la PUB absorbe aussi dans le bleu, à 495 nm).



**Figure 45 :** Trois cytogrammes présentant des populations de *Synechococcus* marins a différentes stations et différentes saisons (Olson et al. 1990). Cette figure illustrent la variabilité des propriétés optiques des communautés naturelles de *Synechococcus*. Le cytogramme B montre trois populations, ces populations peuvent être plus ou moins entremêlées (A & C)

Ces variations de la fluorescence orange ont ainsi pour origine les variations de la valeur du rapport PUB :PEB *in vivo* des communautés naturelles de *Synechococcus* marins et la valeur moyenne de ce rapport *in situ* est liée aux caractéristiques optiques de l'eau (Wood et al. 1998, Wood et al. 1999). Les eaux océaniques oligotrophes du grand large, pauvres en particules et substances jaunes, sont des environnements aquatiques où les radiations lumineuses bleues sont abondantes (eaux de type I). Les populations de *Synechococcus* de ces vastes zones présentent un rapport PUB : PEB élevé (1,4-1,8) qui leur permet d'absorber efficacement les radiations bleues. Au voisinage des côtes (meso à eutrophe), les eaux charrient de nombreuses particules minérales et biologiques qui modifient ses propriétés optiques en provoquant un enrichissement en radiations vertes (type II). Les rapports PUB : PEB sont alors moins élevés et les cellules absorbent plus efficacement ces radiations (Figure 46 ; Lantoiné & Neveux 1997).

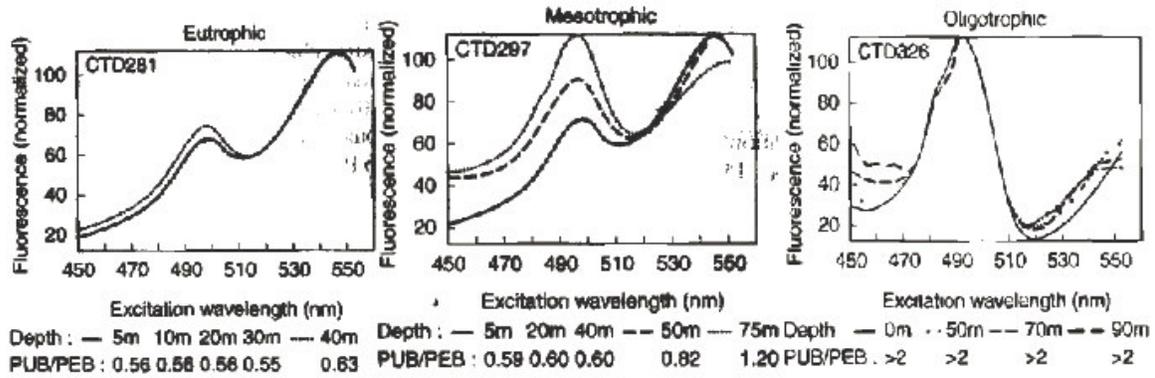


Figure 46 : Variations des spectres d'excitation de fluorescence de la fraction picoplanctonique marine en fonction de la richesse nutritive et de la profondeur du prélèvement en Atlantique tropical NE, d'après Lantoiné, 1995.

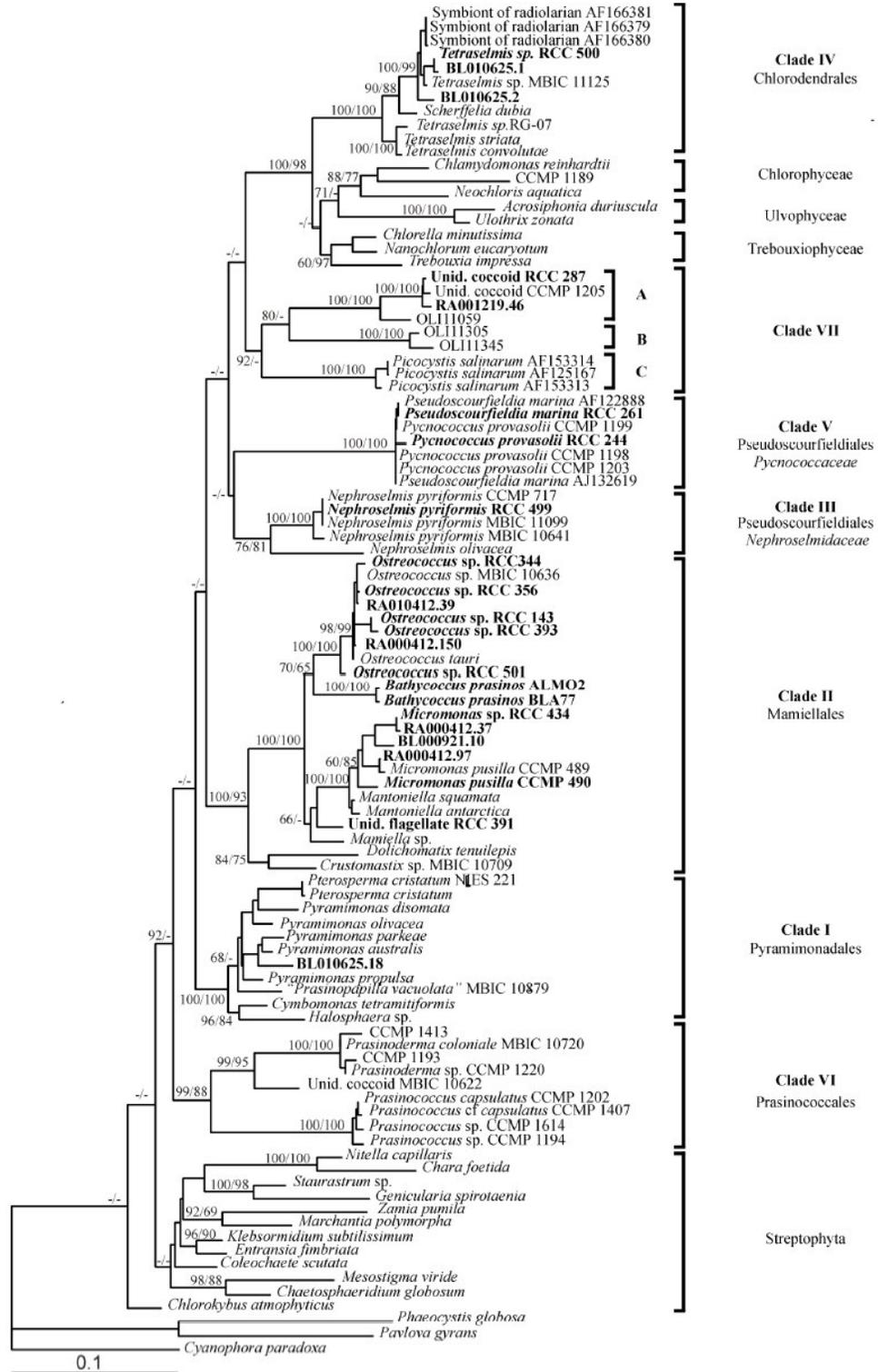
De plus, il semble que le rapport PUB : PEB varie avec la profondeur. Les cellules évoluant en profondeur présentent une intensité de fluorescence orange plus élevée que les cellules de surface, et les rapports PUB : PEB associés à ces cellules sont souvent élevés. Ces caractéristiques leur permettent de capter les faibles intensités de lumière bleue présentes en profondeur.

### 3) Les Prasinophyceae

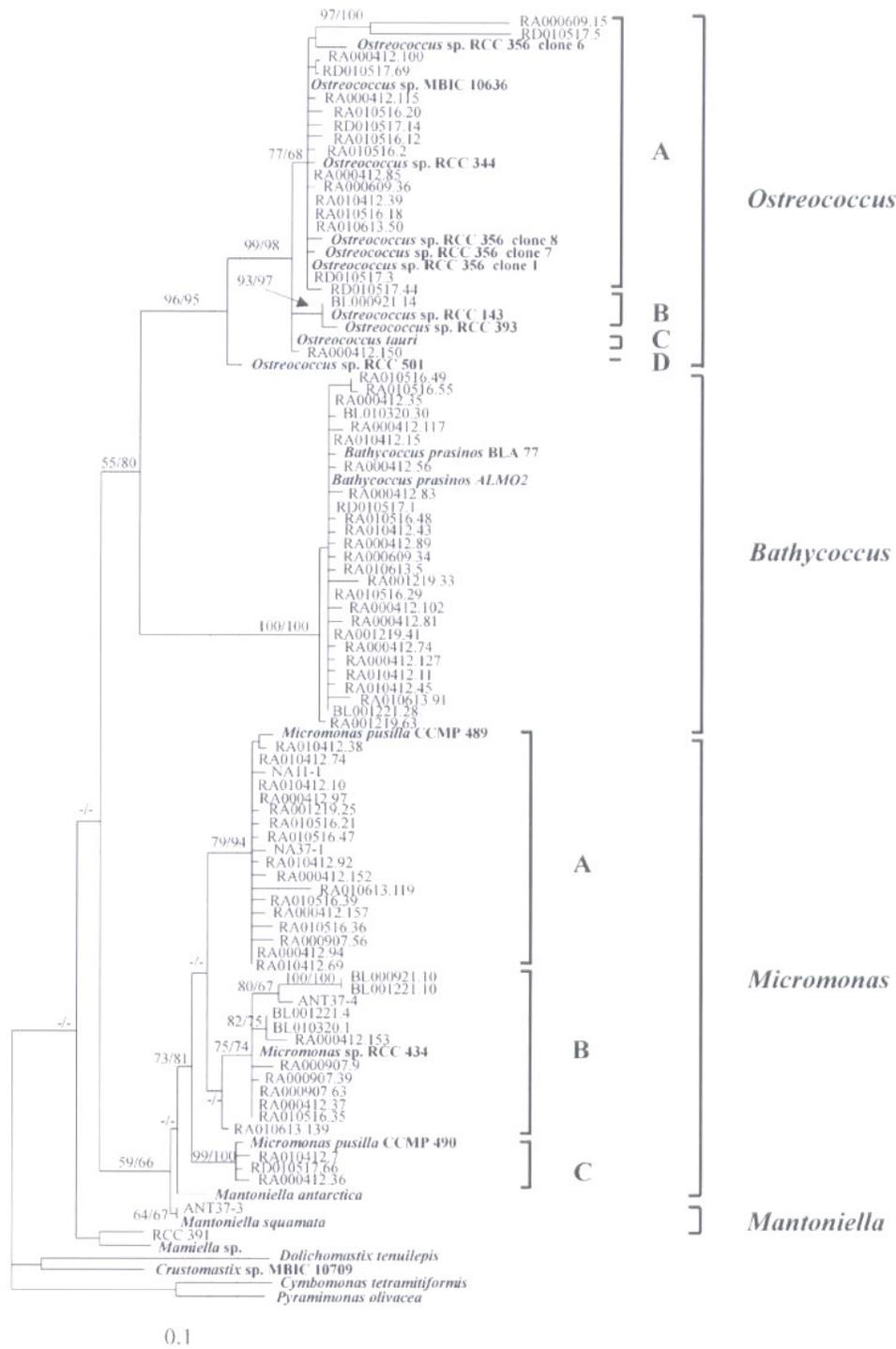
Les plantes vertes (les Viridiplantae *sensu* Cavalier-Smith 1981) sont composées de deux grands phyla monophylétiques établis sur des bases ultrastructurales et moléculaires (Bhattacharya et al. 1998, Marin & Melkonian 1999) : les Streptophyta comprenant les Charophyceae et les plantes terrestres (Bryophytes, Ptéridophytes, *etc.*), et les Chlorophyta (« algues vertes ») rassemblant notamment les classes des Ulvophyceae, Trebouxiophyceae, Chlorophyceae, *etc.* Le groupe des Prasinophyceae a longtemps été difficile à caractériser. Les analyses moléculaires phylogénétiques montrent que les Prasinophyceae sont un assemblage de plusieurs lignées indépendantes divergent très tôt dans l'évolution de la lignée verte (Sym & Pienaar 1993, Guillou et al. 2004). Toutes les Prasinophyceae appartiennent à la classe des Chlorophyta à l'exception de l'espèce d'eau douce *Mesostigma viride*. (Bhattacharya et al. 1998 ; Marin & Melkonian 1999). Lemieux et al. (2000) ont montré que *Mesostigma viride* possède beaucoup de gènes chloroplastiques qui ont été perdus chez les Streptophyta et les Chlorophyta mais qui sont présents chez des algues non vertes. La phylogénie moléculaire des Prasinophyceae marines a été récemment revue par Guillou et al. (2004) et sept clades ont été mis en évidence (Figure 47). Parmi ces clades, celui des Mamiellales est composé de genres tels que *Ostreococcus*, *Bathycoccus* et *Micromonas*. L'analyse fine de ces trois genres montre que *Bathycoccus* est un groupe homogène,

alors que *Micromonas* et *Ostreococcus* présentent des sous-groupes (Figure 48). *Micromonas* semble être composé de trois groupes qui sont aussi différenciables par leur morphologie ou des modes de nage différents, et qui peuvent cohabiter dans certaines zones côtières (Diez et al. 2001a, Diez et al. 2001b).

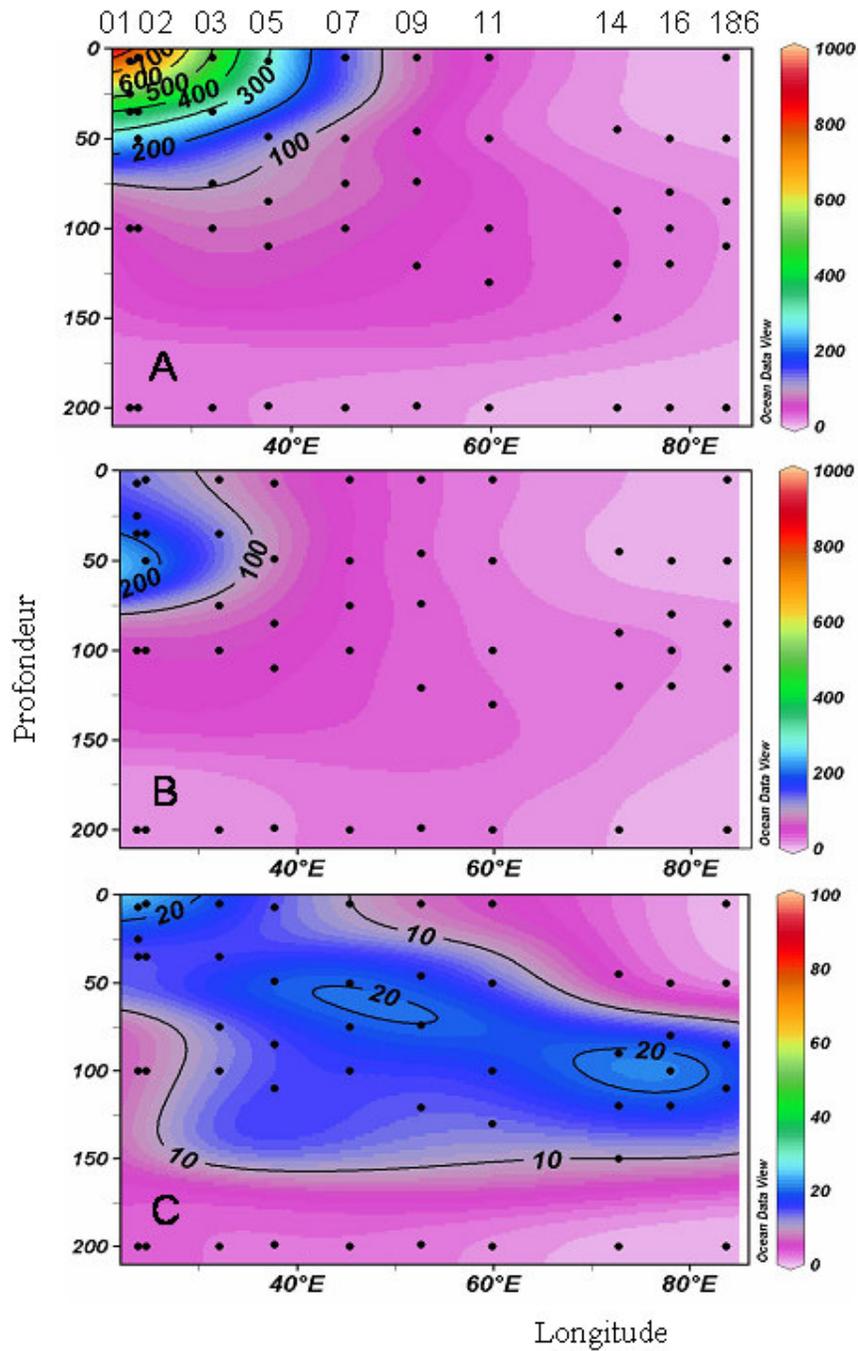
Si le fait que ces organismes marins sont largement ubiquistes est connu depuis relativement longtemps, les études visant à étudier précisément leur écologie ne font que débiter (Not et al. 2004, Worden et al. 2004). Les études *in situ* ont montré que, bien que les picoeucaryotes ne soient pas dominants dans la fraction picophytoplanctonique, ils contribuent de façon importante à la biomasse picophytoplanctonique et au transfert trophique potentiel de carbone dans cette classe de taille (Worden et al., 2004). Les genres *Micromonas*, *Ostreococcus* et *Bathycoccus* qui partagent certains points communs (ils appartiennent à l'ordre des Mamiellales, présentent une pigmentation spécifique et une très petite taille de 2-3  $\mu\text{m}$ ) semblent avoir connu un certain succès écologique. L'ubiquité de *Micromonas pusilla* est ainsi manifeste, puisqu'on retrouve ce genre dans des zones aussi variées que la Mer des Caraïbes, des Sargasses, Méditerranée, en Manche, l'Océan Pacifique équatorial et nord-ouest, l'Océan Indien et Arctique (Figure 49 ; Throndsen 1970, Throndsen 1976, Not 2003, Worden et al. 2004). Cette espèce peut par ailleurs dominer la fraction picoplanctonique eucaryote dans des zones côtières (Figure 49 ; Not et al., 2004). Dans l'Océan Indien, *Bathycoccus prasinos* et *Micromonas pusilla* présentent une répartition côtière, alors qu'*Ostreococcus* est moins abondant et plus ubiquiste. Dans l'étang de Thau, ce genre peut représenter une part considérable du phytoplancton (Courties et al., 1994).



**Figure 47 :** Arbre phylogénétique des Prasinophyceae fondé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 18S. Les valeurs de bootstrap présentées correspondent respectivement aux méthodes Neighbour Joining et Maximum de Parsimonie, d'après Guillou et al. (2004). Les Mamiellales correspondent au clade II.



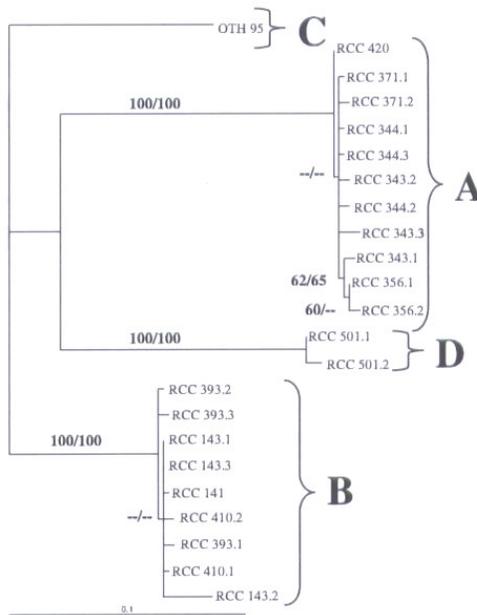
**Figure 48 :** Arbre phylogénétique des Mamiellales fondé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 18S. Les valeurs de bootstrap présentées correspondent respectivement aux méthodes Neighbour Joining et Maximum de Parsimonie, d'après Guillou et al. (2004).



**Figure 49** : Distribution des genre *Micromonas* (A), *Ostreococcus* (B) et *Bathycoccus* (C) déterminées par hybridation *in situ* (FISH-TSA, cellules.mL<sup>-1</sup>) le long d'un transect dans l'océan Indien, d'après Not, (2003).

L'importance des cyanobactéries *Prochlorococcus* et *Synechococcus* en termes d'abondance et de productivité primaire peut partiellement s'expliquer par la différenciation écotypique. Aucune preuve de ce phénomène n'avait été mise en évidence chez les picoeucaryotes photosynthétiques.

Récemment, Rodriguez et al. (sous presse) ont analysé une douzaine de souches d'*Ostreococcus* et ont déterminé leur phylogénie (Internal Transcribed Spacer), leur caryotypes, leur pigmentation et leur courbes taux de croissance versus intensité de lumière de culture. Les analyses phylogénétiques ont montré la présence de quatre clades (Figure 50 ; Guillou et al., 2004). Les clades A, C et D regroupent des souches isolées de la surface a 65 m de profondeur, *Ostreococcus tauri* formant un clade a lui seul. Le clade B regroupe des souches isolées en profondeur (90-120 m) dans des zones géographiques éloignées. Ces souches présentent des propriétés caryotypiques différentes des autres souches et possèdent des rapports chl *b*:chl *a* plus importants ainsi qu'un pigment supplémentaire similaire à une chl *c*. De plus, l'étude des taux de croissance de ces souches de profondeur a montré qu'elles sont incapables de pousser a de fortes intensités lumineuses, ce qui n'est pas le cas des souches des autres clades. Il semble donc que le genre *Ostreococcus* ait développé un phénomène de différenciation écotypique au cours de l'évolution.



**Figure 50** : Arbre phylogénétique des souches d'*Ostreococcus* (Maximum likelihood), d'après Rodriguez et al. (sous presse).

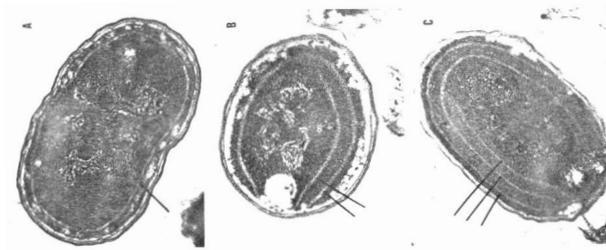
Les génomes de deux autres souches d'*Ostreococcus* que *O. tauri*, une de profondeur (RCC141) et une californienne, sont en cours de séquençage. La comparaison de ces génomes combinée à des études expérimentales permettra la compréhension des mécanismes évolutifs et physiologiques à la base de cette différenciation. Par ailleurs, des études *in situ* sont nécessaires pour confirmer la répartition du clade B en profondeur à des stations géographiques éloignées.

## II Photoprotection et photoacclimatation

### A/ Photophysiology des phycobilisomes

#### 1) La réponse à l'intensité lumineuse

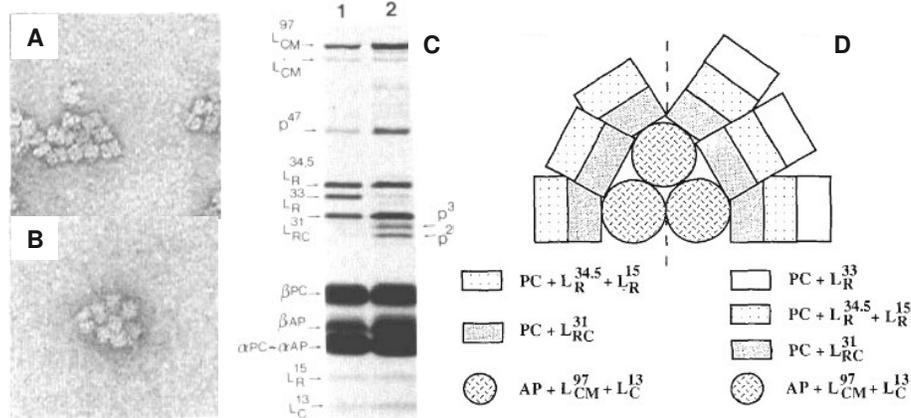
La disponibilité de la lumière dans l'environnement naturel est très variable et les organismes doivent réguler l'utilisation de la lumière en permanence. Les plantes qui poussent dans des environnements sombres produisent typiquement davantage de thylacoïdes par chloroplaste et ont des rapports grana:stroma et PS I/PS II supérieurs à ceux mesurés chez les plantes de haute lumière (Melis, 1991). De même, il est maintenant bien établi que les plantes qui poussent dans des conditions de faible intensité lumineuse possèdent davantage de protéines d'antenne par rapport à la quantité de centres réactionnels (Anderson & Eiserling 1986). Des observations similaires ont été rapportées chez les cyanobactéries. Quand *Synechococcus* sp. WH7803 et *Synechococcus* sp. PCC 6301 sont cultivés sous forte intensité lumineuse, le nombre de thylacoïdes concentriques est réduit (Figure 51 ; Kana & Glibert 1987; Allen 1968 , Vierling 1980). Cette réduction est accompagnée d'une diminution de la concentration en pigments (PBP et en chl *a*) qui vise à diminuer les capacités d'absorption de la cellule. La présence d'une grande quantité de pigments sous une forte intensité lumineuse conduirait rapidement à la formation d'espèces activées de l'oxygène et à l'intoxication de la cellule (Niyogi et al. 1997, Niyogi 1999). Ces processus sont en général accompagnés d'un changement du rapport PSI :PSII et du transport d'électrons photosynthétiques (Fujita 1997, Fujita et al. 2001). A forte lumière, on peut atteindre un rapport 1 :1 contre généralement 4 :1 à basse lumière (Barlow & Alberte 1985).



**Figure 51** : Réduction du nombre de thylacoïdes chez *Synechococcus* sp. WH7803 acclimaté à différentes irradiances. De gauche à droite : 1330, 160 et 30  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . D'après Kana & Glibert (1987).

Chez *Microcystis aeruginosa*, les bras des PBS ne comportent que deux hexamères (Raps 1985). Lorsque cette oxyphotobactérie est cultivée à forte lumière, la structure de ces complexes

n'est pas modifiée, probablement à cause de la petite taille de ces PBS. En revanche, chez beaucoup d'organismes à PBS, les bras contiennent au moins trois hexamères et la structure des complexes varie selon l'intensité lumineuse. Chez *Synechococcus* sp. PCC 7002, le rapport PC :AP diminue d'un facteur 1,8 entre 20 et 1260  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Cette variation provient du fait que les bras des PBS de forte lumière sont plus courts car ils ont perdu le complexe  $(\alpha\beta)_6L_R^{33}$  (de Lorimier et al. 1992). Des observations similaires ont été reportées chez divers organismes (dont des algues rouges) et l'expression des gènes impliqués a été étudiée (Barlow & Alberte 1985, Belknap & Haselkorn 1987, de Lorimier et al. 1992, Nomsawai et al. 1999, Ritz et al. 2000, Miskiewicz et al. 2002). Chez *Spirulina maxima*, Garnier et al. (1994) ont observé que de façon concomitante à la disparition de  $L_R^{33}$ , trois polypeptides apparaissent sur les gels en condition de forte lumière (Figure 52). La synthèse mais aussi l'association de ces polypeptides au PBS sont lumière-dépendants. L'une de ces protéines pourrait être un chaperon.



**Figure 52 :** Photographie en MET des PBS de faible (A) et forte lumière (B). Gel LiDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (C) montrant les profils polypeptidiques de PBS de *Spirulina maxima* cultivée à 60 (1) et 400  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (2), et Modèle de structure du PBS en forte (D gauche) et faible lumière (D droite), d'après Garnier et al. (1994).

Les capacités de photoacclimatation de ces organismes reposent ainsi en grande partie sur un réarrangement des thylacoïdes (composition et surface) ainsi que sur une réduction de la taille de l'antenne photosynthétique. Les variations structurales du PBS en réponse à l'intensité lumineuse chez les organismes à deux PE n'ont jamais été étudiées.

## **2) Acclimatation à la qualité de la lumière : l'adaptation chromatique chez les cyanobactéries**

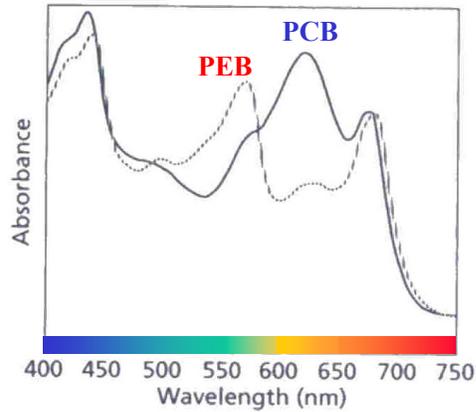
### **a) Le cas des oxyphotobactéries d'eau douce**

Il y a plus d'un siècle maintenant, certaines souches de cyanobactéries d'eau douce ont été remarquées pour leur capacité à changer de couleur lorsqu'on modifiait la qualité spectrale de la lumière de culture. Ce phénomène fut désigné « adaptation chromatique » (AC)<sup>3</sup> et il fut démontré plus tard que ce processus consiste en un changement de la composition des PBS (Bennett & Bogorad 1973). Les cyanobactéries d'eau douce peuvent être réparties en trois groupes, selon leur type de réponse à la qualité de la lumière (Tandeau de Marsac 1977). Le type I regroupe les organismes qui ne sont pas capables de modifier la composition pigmentaire de leur PBS en fonction de la longueur d'onde prédominante dans leur environnement lumineux. Le type II regroupe les souches qui synthétisent moins de PE en lumière rouge qu'en lumière verte. Dans ce type, la PC est toujours exprimée au même taux quelque soit la lumière. La plupart des souches capables d'AC examinées par Tandeau de Marsac (1977) présentaient une adaptation de groupe III. Ces oxyphotobactéries font varier les quantités relatives de PE et de PC de leur antenne photosynthétique. En lumière verte, la PE est plus synthétisée qu'en lumière rouge tandis que la PC est plus synthétisée en lumière rouge qu'en lumière verte. Ainsi le nombre d'hexamères de PC et de PE par bras varie selon la qualité de la lumière, permettant ainsi d'optimiser la collecte d'énergie (Campbell et al. 1996).

La cyanobactérie *Fremyella diplosiphon* (= *Calothrix* sp. PCC 7601 = *Tolypothrix* sp. PCC 7601), appartenant au type III (Tandeau de Marsac, 1977), est l'organisme qui a été le plus étudié quant au phénomène d'ACC. En lumière rouge, les cellules ne contiennent presque plus de PE mais possèdent jusqu'à trois hexamères de PC par bras de PBS avec leur linker spécifique, donnant une couleur bleu-verte aux cultures. En lumière verte, de nouveaux PBS sont synthétisés avec des projections radiaires composées d'un hexamère simple de PC et de trois hexamères de PE conférant cette fois une couleur rouge-noirâtre aux cultures. Ces phénomènes dépendant de la lumière sont réversibles et sont cohérents avec une optimisation de la collecte de la lumière puisque la PC et la PE capturent de façon optimale la lumière rouge et verte, respectivement (Figure 53).

---

<sup>3</sup> D'un point de vue sémantique, le terme « acclimatation chromatique » serait plus approprié pour qualifier ce phénomène d'un point de vue physiologique.



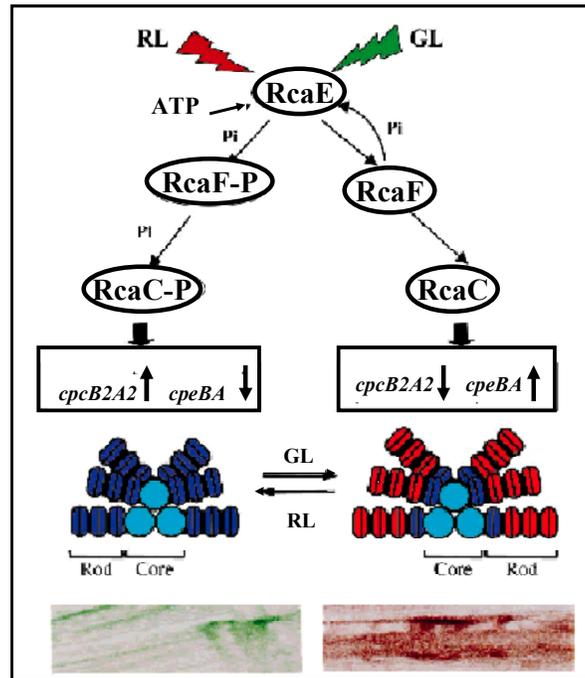
**Figure 53** : Spectres d'absorption in vivo chez *Fremyella diplosiphon* cultivée en lumière verte (pointillés) et rouge (continu) d'après Campbell (1996).

La connaissance des gènes de PBP souvent organisés en tandem avec leurs linkers associés a facilité la compréhension d'une partie des mécanismes impliqués dans l'ACC. Souvent, les transcrits polycistroniques codant pour les sous-unités des PBP codent aussi pour le linker associé. Chez *Fremyella diplosiphon*, trois opérons distincts codent pour les sous-unités  $\alpha^{\text{PC}}$  et  $\beta^{\text{PC}}$  (les gènes *cpcBA* ; Conley et al. 1988, Mazel 1988, Mazel & Marliere 1989). Les gènes *cpcB1A1* sont exprimés en toutes conditions et codent pour une PC constitutive dite  $\text{PC}_c$ . Cet opéron contient également les gènes *cpcE* et *F* codant pour une PCB-lyase spécifique d' $\alpha^{\text{PC}}$  (Fairchild & Glazer 1994). L'opéron *cpcB2A2* est uniquement activé sous lumière rouge et code pour une PC inducible dite  $\text{PC}_i$ . Cette PC est la PBP principale des bras du PBS de *Fremyella diplosiphon* cultivée sous lumière rouge. Les gènes *cpcH2*, *cpcI2* et *cpcD2* codant pour des linkers associés à la  $\text{PC}_i$  (Lomax et al. 1987) sont cotranscrits avec *cpcBA*. Par ailleurs, un troisième opéron *cpcB3A3*, ainsi que les gènes de linkers associés, sont activés seulement en conditions de carence en soufre (Mazel & Marliere 1989). Contrairement à la PC, il n'y a qu'un opéron *cpeBA*, codant pour les deux sous-unités de la PE (Mazel et al. 1986, Takemoto & Bogorad 1975 ; Sidler et al. 1986). Les gènes de linkers associés à la PE sont placés dans un opéron séparé *cpeCDE* (Federspiel & Scott 1992, Cogley et al. 2002). La transcription de ces deux opérons est toutefois très bien coordonnée sous lumière verte. Les gènes *cpeBA* sont liés aux gènes *cpeY* et *Z* qui codent probablement pour une PEB-lyase (Kahn et al. 1997). Ainsi, les gènes relatifs à la  $\text{PC}_i$  sont induits sous lumière rouge et ceux relatifs à la PE sous lumière verte. Sous lumière naturelle, les cellules contiennent des quantités relatives intermédiaires de PC et de PE et il existe ainsi un système photorécepteur capable d'éliciter les réactions de biosynthèse de tel ou tel opéron de façon quantitative, selon l'environnement lumineux.

Pour disséquer et comprendre les mécanismes régulateurs impliqués dans l'ACC, plusieurs mutants de *Fremyella diplosiphon* présentant des ACC anormales ont été étudiés : les mutants rouges, bleus, verts, noirs et turquoise. Le mutant rouge a cette couleur quelque soit la qualité de la lumière et synthétise de la PE, la PC<sub>i</sub> n'étant jamais exprimée. Le mutant bleu est plus bleu que le type sauvage en lumière rouge et il faut plus de lumière verte pour inhiber la synthèse de PC<sub>i</sub>. Le mutant vert montre une expression de PC<sub>i</sub> normale et mais l'opéron PE n'est jamais induit. Le mutant noir possède des quantités de PE et PC intermédiaires mais aucune ACC n'est observable. Enfin, le mutant turquoise présente une régulation normale de la PC<sub>i</sub> mais est incapable de synthétiser de la PE sous lumière verte. Ce jeu de mutants et leur complémentation ont permis de mettre en évidence l'implication de certains polypeptides dans la photoréception des signaux environnementaux.

Trois éléments majeurs régulateurs de l'ACC chez *Fremyella diplosiphon* ont été mis en évidence : RcaE, RcaF et RcaC. Ces polypeptides présentent d'importantes similarités avec les systèmes régulateurs bactériens à deux composants. RcaC code pour une protéine de 651 acides aminés présentant des homologies de séquence avec ces régulateurs, notamment un domaine capable de se fixer à l'ADN (Chiang et al. 1992, Kehoe & Grossman 1997). La phosphorylation de RcaC conduit à la synthèse de PC<sub>i</sub> et réduit considérablement celle de la PE (Figure 54). RcaE fut identifié notamment par complémentation des mutants noirs (Kehoe & Grossman 1996; Terauchi et al. 2004). Sa partie C-terminale est typique des senseurs-kinases bactériennes et sa partie N-terminale est similaire au domaine des phytochromes capables de lier une chaîne tétrapyrrole. La région centrale contient un domaine PAS peut-être impliqué dans des interactions protéines-protéines ou pouvant lier un groupe prosthétique (Taylor 1999). RcaE lie en effet un chromophore de type groupe tétrapyrrole sur l'une de ses cystéines (Grossman et al., 2001). Ces observations vont dans le sens d'un rôle de photorécepteur pour RcaE. L'un des mutants rouges fut complétement par RcaF, dont le gène se trouve à proximité de *naE*. Les diverses observations ont conduit à considérer RcaF comme un intermédiaire de phosphorylation entre le photorécepteur RcaE et RcaC (Kehoe & Grossman, 1997). Par ailleurs, deux facteurs de transcription putatifs ont été mis en évidence. Les protéines RcaA et RcaB, qui sont uniquement détectées sous lumière verte, se comportent ainsi comme des facteurs de transcription de l'expression de l'opéron *cpeBA* (Sobczyk et al. 1993, Schyns et al. 1998). Par ailleurs, un autre groupe a mis en évidence une protéine qu'ils ont nommée PepB, capable de se lier au promoteur de *cpeBA* sur le même motif de séquence que RcaA mais, cette fois-ci, quelque soit la qualité de la lumière de culture (Schmidt-Goff & Federspiel 1993). La présence d'un facteur de transcription dépendant de la qualité spectrale de la lumière, ou nécessitant l'activation d'un autre polypeptide

lui-même réactif à la lumière, reste à déterminer.



**Figure 54** : Représentation des mécanismes de régulation de l'ACC par phosphorylation chez *Fremyella diplosiphon*, d'après Grossman et al. (2001). Les photographies du bas de la figure montrent la différence de couleur des cultures selon la qualité spectrale de la lumière de culture.

Dans le modèle présenté dans la figure 54, RcaE, le photorécepteur putatif, perçoit le signal lumineux. La lumière rouge conduit RcaE à s'autophosphoryler et à transférer le groupement phosphate à RcaF. En l'absence de RcaE, il est très probable que RcaF interagisse avec d'autres éléments régulateurs donneurs de phosphate. RcaF peut alors transférer le groupement phosphate sur une histidine de RcaC qui va à son tour le transférer sur le domaine C- ou N-terminale récepteur. La partie N-terminale de RcaC est indispensable à l'ACC, alors que le rôle de la partie C-terminale est encore mal compris. En lumière verte, RcaC agit comme une phosphatase et bloque le transfert du phosphate en se liant à RcaF. Cette inhibition cause l'activation de *cpeBA* et l'inhibition de *cpcB2A2*.

Les polypeptides RcaEFC représentent un premier système régulateur qui, comme nous venons de le voir, constituent un réseau de phospho-relais complexe à plusieurs étapes. Un second système encore peu caractérisé agissant de concert avec le premier existe chez *Fremyella diplosiphon*, mais il ne semble réguler que la réponse à la lumière des opérons *cpeBA* et *cpeCDE* (PE). Les mutants dits « Tan » présentent une déficience dans ce second système de régulation de

la synthèse de la PE et contiennent peu de PE. Leur étude a permis de montrer l'implication d'au moins un gène, *cotB*, dans cette voie de régulation mais la fonction précise du produit de ce gène reste énigmatique (Balabas et al. 2003). Les mutants de *Fremyella diplosiphon* déficients dans les gènes *cpeYZ*, qui codent probablement pour des lyases (Kahn et al., 1997 ; Balabas, 2003), possèdent toujours de la PE portant du PEB et ceci implique qu'il existe une autre PE-lyase dans cet organisme. CotB présente en effet des similarités avec la classe des protéines lyases, et il est ainsi envisageable qu'il soit une PE-lyase. Toutefois, la séquence de CotB est assez divergente de CpeY et CpeZ et l'existence d'une autre PE-lyase, CpeF, a déjà été proposée. En réalité, la séquence de CotB est plus proche de la classe des protéines de type NblB. Ces dernières pourraient avoir un rôle dans le détachement de PBP durant la dégradation des PBS, observée en condition de carence (Dolganov & Grossman 1999). Toutefois, les mutants déficients en *cotB* présentent des réactions aux carences apparemment classiques.

Le système de régulation de la transcription des gènes de PBP en différentes qualités de lumière est très complexe et commence seulement à être élucidé. RcaD est un polypeptide capable de se fixer à deux régions du promoteur de l'opéron *cpcB2A2* et n'est détectable qu'en lumière rouge (Sobczyk et al. 1993, Sobczyk et al. 1994, Casey & Grossman 1994). Il serait ainsi un facteur de transcription de l'opéron *cpcB2A2* en lumière rouge (Sobczyk et al. 1994). Il a été montré plus tard que cette dernière protéine est aussi capable de se lier au promoteur des opérons *cpcB1A1* et *APC* mais pas à celui de l'opéron *cpeBA*, et que la phosphorylation de RcaD augmente probablement son affinité pour le promoteur de *cpcB2A2* (Noubir et al. 2002). Ces auteurs ont montré que *rcaD* est toujours co-transcrit avec un autre gène, *rcaG*, et proposèrent après analyse des séquences que les deux polypeptides interagissent, RcaG pouvant être une protéine capable de lier de l'ATP et d'activer RcaD, et/ou d'agir comme un chaperon facilitant l'interaction de celui-ci avec l'ADN. L'interaction entre RcaD et RcaG est probablement régie par l'état de phosphorylation de RcaD. Chez un mutant déficient dans le gène *rcaD*, l'expression de toutes les PBP est perturbée, ce qui est en accord avec le fait que le produit de ce gène se lie avec presque tous les promoteurs des opérons de PBP.

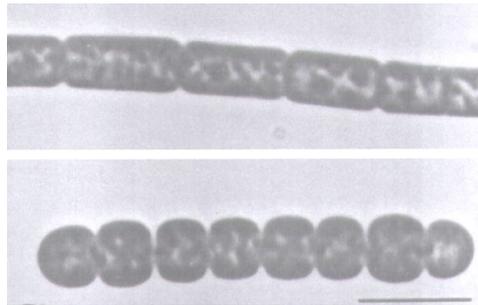
Par ailleurs, la complémentation d'un mutant de *Fremyella diplosiphon* présentant un taux de transcription très élevé de l'opéron *cpcB1A1* (PC constitutive) a permis d'affiner la compréhension de la régulation de cet opéron (Kahn & Schaefer 1997). Il a ainsi été montré que la protéine RpbA possède un motif de reconnaissance de l'ADN similaire à ceux trouvés chez des phages et des facteurs de transcription bactériens, et est capable de se lier au promoteur du tandem *cpcB1A1*. Il fonctionnerait ainsi comme un répresseur de transcription des gènes de la PC<sub>c</sub>.

Chez *Fremyella diplosiphon*, le polypeptide CpeR est un élément régulant l'expression des gènes *pebAB* et *cpeBA* (mais pas *cpeDE* ; Alvey et al. 2003, Cobley et al. 2002, Seib & Kehoe 2002). Lorsqu'un plasmide portant ce gène est introduit dans la souche sauvage, la PE est synthétisée en lumière rouge (Cobley et al., 2002) alors que chez un mutant où le gène *cpeR* a été inactivé, la transcription de la PE est inhibée (Cobley et al, 2002 ; Seib & Kehoe, 2002). La présence d'un groupe de gènes *cpeCDESTR* chez plusieurs cyanobactéries suggère qu'ils sont co-transcrits. Le gène *cpeR* n'a été observé que chez les organismes contenant de la PE mais pas uniquement chez les souches capables d'ACC et doit donc jouer un rôle de régulation plus global. Chez *Fremyella diplosiphon*, il a été suggéré qu'il existe un phospho-relais (RcaE) activant la transcription *cpeCDESTR* en lumière verte. Toutefois, c'est la transcription de *cpeCDESTR* et la traduction consécutive de CpeR qui déclenche la transcription de *cpeBA*. Ainsi, en la lumière verte, la cellule ne synthétiserait pas de sous-unités de PE avant d'avoir des linkers de PE disponibles (Cobley et al., 2002) et CpeR représenterait donc un véritable signal de transcription des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de PE ; la transcription des opérons *cpeCDESTR* et *cpeBA* s'opérerait ainsi en cascade génétique. Avec ce modèle, il est possible d'interpréter les phénotypes anormaux. Lorsqu'un plasmide contenant CpeR est introduit dans la souche sauvage, les linkers ne sont pas synthétisés et les sous-unités de PE s'accumulent dans le cytosol, comme le suggère les propriétés de fluorescence des PBS de cette souche modifiée. Dans le cas du mutant, la synthèse de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  est inhibée car CpeR n'initie pas leur transcription et la transcription des opérons *cpeCDESTR* et *cpeBA* est découplée (Cobley et al., 2002 ; Seib & Kehoe, 2002). Le mécanisme par lequel CpeR active la transcription de *cpeBA* est inconnu. Il se peut que ce polypeptide active un facteur de transcription, peut-être RcaA et/ou PepB (Sobczyk et al., 1993 ; Schyns et al., 1998 ; Schmidt-Goff & Federspiel, 1993).

Si CotB semble aussi être un activateur de la synthèse de PE en lumière verte, il doit agir de façon différente de CpeR. En effet, la perte de CotB diminue (et n'annule pas) la transcription de *cpeBA*, ainsi que de *cpeCDE*, alors que CpeR induit la transcription de *cpeBA* uniquement et son absence abolit totalement la transcription (Cobley, 2002 ; Seib & Kehoe, 2002). CotB doit donc probablement intervenir en amont de l'action de CpeR dans la transduction du signal, peut-être en augmentant directement (ou indirectement *via* un photorécepteur) l'efficacité de perception de la lumière verte (Balabas et al., 2003).

Tous les acteurs de cette régulation ne sont bien sûr pas connus et le réseau complexe d'interactions intervenant dans l'ACC de *Fremyella diplosiphon* est encore loin d'être compris dans sa globalité. Par exemple, des mutants turquoises (incapables d'activer *cpeBA*) ont été complétés par les gènes *trqA* et *B*, ces gènes codant pour des polypeptides voisins de

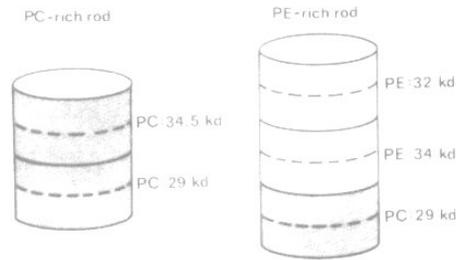
certaines phosphatases mais dont la fonction n'est pas précisément connue (Grossman et al., 2001). Jusqu'à présent, les investigations ont été surtout menées sur les réseaux de gènes impliqués directement dans la photophysologie des PBS. Toutefois, Benett & Bogorad (1973) ont également mis en évidence des modifications morphologiques entre les cellules cultivées en lumière verte et rouge et ceci suggère les processus mis en œuvre lors des phénomène d'ACC chez *Fremyella diplosiphon* sont complexes et ne se limitent probablement pas à une modification des rapports de PBP dans l'antenne photosynthétique (Figure 55 ; voir aussi le chapitre sur les hormogonies dans Bryant, 1994).



**Figure 55** : Différences morphologiques observées par microscopie photonique entre les filaments de *Fremyella diplosiphon* cultivées en lumière blanche (haut) et rouge (bas), d'après Bennet & Bogorad (1973). Echelle : 26  $\mu\text{m}$ .

Une étude récente utilisant des puces à ADN et des gels de protéines bidimensionnels chez *Fremyella diplosiphon* a ainsi mis en évidence l'implication de 17 gènes (et les polypeptides correspondants) dont la fonction n'est pas connue à ce jour dans l'adaptation à la qualité de la lumière (Stowe Evans et al. 2004). La construction de mutants déficients en ces gènes permettra une vision beaucoup plus globale des mécanismes complexes intervenants dans l'ACC chez *Fremyella diplosiphon*.

La cyanobactérie *Nostoc* sp. MAC est aussi capable d'AC (Kipe-Nolt 1982). Quand cet organisme est cultivé en lumière blanche, les cultures sont plutôt vertes et présentent un rapport équimolaire PE:PC (Anderson et al. 1983). En lumière verte à 30°C ou blanche à 39°C, les cultures deviennent brunes suggérant une synthèse accrue de PE ; le rapport PE:PC est alors en effet de 2:1 et un linker de type  $L_R^{34.5}$ , présent dans chez les cultures vertes, disparaît (Anderson et al. 1983). Ces auteurs ont donc proposé deux structures de bras de PBS selon la qualité de la lumière (Figure 56). Les régulations impliquant deux types de PC sont courantes chez les cyanobactéries d'eau douce pratiquant l'AC (Bryant & Cohen-Bazire 1981).



**Figure 56** : Modèles de structure des bras de PBS chez *Nostoc* sp. MAC en lumière rouge (gauche) et verte (droite), d'après Anderson et al. (1983).

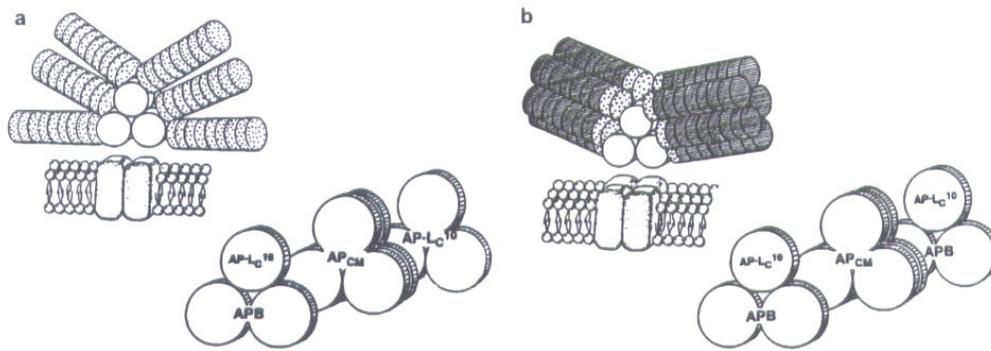
Cette souche de *Nostoc* sp. avait été classée en AC de groupe II par Kipe-Nolt et al. (1982) mais les données plus précises sur les PBS d'Anderson et al. (1983) situent plutôt cette cyanobactérie dans le groupe III. Les variations de composition des PBS en fonction de la température sont remarquables mais restent inexplicables.

*Synechocystis* sp. PCC 6701 pratique une AC de groupe II : seule la synthèse de PE est affectée par la qualité de la lumière (Tandeau de Marsac, 1977 ; Gingrich et al. 1982). *Synechocystis* sp. PCC 6701 possède un set de gènes  $\alpha^{PC}$  et  $\beta^{PC}$  (Anderson & Grossman 1990a) et les gènes codant pour la PE sont très similaires à ceux de *Fremyella diplosiphon* (Williams et al. 1980, Anderson & Grossman 1990b, a). Les transcrits de PE s'accumulent en lumière verte et sont réduits en lumière rouge. Des séquences nucléotidiques très homologues à celles observées chez *Fremyella diplosiphon*, contrôlant vraisemblablement l'expression, se trouvent en amont des gènes de PE. Toutefois, malgré des niveaux de transcrits de PE semblables à ceux de *Fremyella diplosiphon*, les quantités de PE présentes en lumière rouge sont différentes, suggérant l'implication d'une régulation post-transcriptionnelle.

## b) L'adaptation chromatique chez les cyanobactéries marines

Certaines algues rouges présentent des PBS de forme semi-ellipsoïde (Lichtlé & Thomas 1976 , Gantt 1981) couplés à un PSII sous forme tétramérique (Cunningham 1990 , Lange 1990). Les PBS des cyanobactéries marines du genre *Phormidium* ont la même forme, possédant un cœur trimérique et souvent au moins une dizaine de projections périphériques (Wehrmeyer 1988 ; Westermann 1993). Ces PBS possèdent une PC de type C-PC et une PE portant uniquement des PEB. L'étude de la souche *Phormidium* sp. C86 a permis de mettre en évidence un mode un peu particulier d'ACC de type III. Cette cyanobactérie adopte des PBS semi-discoïdes dépourvus de PE en lumière rouge et semi-ellipsoïde avec une majorité d'hexamères de PE en lumière verte (Figure 57 ; Westermann 1993, Ohki 1992). Les PBS de lumière rouge portent environ 500 PCB

et pèsent environ 7,000-7,500 kDa alors que ceux de lumière verte sont deux fois plus lourds et larges, et lient environ 1,400 PEB. Le nombre de bras est en effet différent selon la qualité de la lumière, avec six bras en lumière rouge et dix en lumière verte. Dans ce dernier cas, les PBS sont en relation avec un PSII tétramérique, de façon similaire à ce qui a été décrit chez les Rhodophyta (Cunningham et al. 1990, Lange 1990). Le nombre de PBS par surface de thylacoïdes varie aussi avec environ deux fois plus de complexes en lumière rouge qu'en lumière verte. Les rapports PBS:PSII observés chez *Phormidium* sp. C86 cultivé en lumière rouge et verte correspondent aux observations faites sur d'autres organismes présentant de façon invariable des PBS semi-discoïdes (Giddings 1983, Kursar & Alberte 1983) et semi-ellipsoïdes (Kursar & Alberte 1983, Cunningham et al., 1990; Lange, 1990). Il semble ainsi que ces deux observations soient physiologiquement liées.

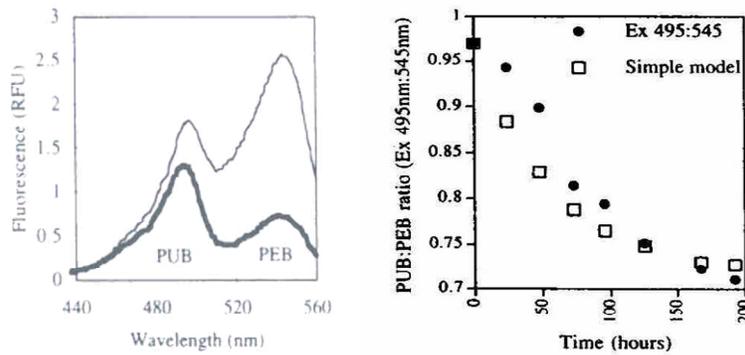


**Figure 57** : Modèle de PBS semi-discoïde (a) et semi-ellipsoïde (b), leur association au PSII et les cœurs de PBS associés chez *Phormidium* sp. acclimaté en lumière rouge (a) et verte (b), d'après Westermann & Wehrmeyer (1995). PC : PBP en points, PE : PBP sombres, AP : PBP blanches.

L'analyse du cœur des PBS de lumière rouge et verte chez *Phormidium* sp. C86 a révélé des différences de structure. Quelque soit la lumière, les cœurs sont classiquement composés des protéines  $\alpha^{AP}$ ,  $\beta^{AP}$ ,  $\alpha^{APB}$ ,  $\beta^{19.5}$ ,  $L_{CM}^{99}$  et  $L_C^{10}$  et présentent des masses moléculaires similaires (Westermann & Wehrmeyer, 1995). La différence majeure consiste en l'échange des deux complexes périphériques ( $(\alpha^{AP}\beta^{AP})_3L_C^{10}$ ) des PBS de lumière rouge contre deux  $(\alpha_2^{AP}\alpha^{APB}\beta_3^{AP})L_C^{10}$  en lumière verte. L'augmentation de la quantité relative d'accepteur terminal  $\alpha^{APB}$  a été aussi suggérée par une augmentation relative de la fluorescence lointaine *in vivo* et sur PBS intacts extraits de cellules cultivées en lumière verte. Cette augmentation de la proportion de complexe de type APB a aussi été observée chez *Porphyridium cruentum*, possédant des PBS semi-ellipsoïdes (Redecker et al. 1993). Les implications biophysiques de ces modifications structurales demeurent

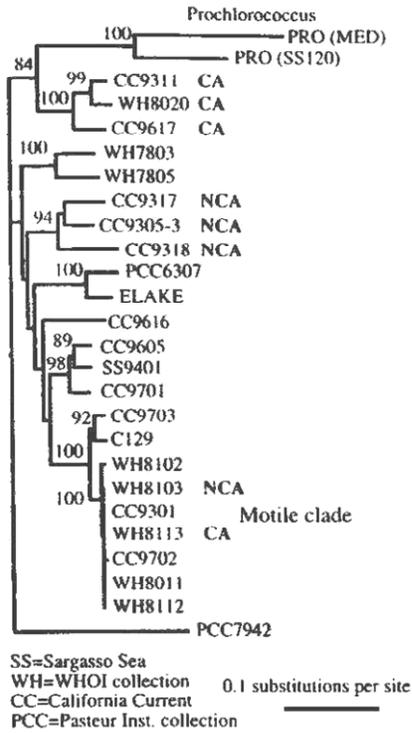
mal comprises.

La majorité des *Synechococcus* marins isolés en culture ne font pas varier leurs quantités relatives de phycobilines en fonction de la qualité de la lumière (Waterbury et al. 1986). Toutefois, Palenik (2001) a décrit un nouveau type d'adaptation chromatique chez certaines souches de *Synechococcus* marins (cluster 5.1) qu'il propose de nommer ACC de type IV (comm. pers.). Les changements observés consistent en des variations du rapport PUB:PEB (mesuré *in vivo*) selon que l'on cultive les cellules sous lumière bleue ou lumière blanche et/ou verte. De façon similaire à ce qui a été observé chez les souches d'eau douce, ces *Synechococcus* marins semblent ainsi optimiser la collecte de la lumière en augmentant la quantité relative de PUB sous lumière bleue et de PEB sous lumière verte (Figure 58). Les mécanismes physiologiques et les conséquences sur la structure des PBS demeurent à ce jour non étudiés.



**Figure 58** : Spectres d'excitation de fluorescence (gauche) de *Synechococcus* sp. CC9311 acclimaté en lumière blanche (ligne fine), et bleue (ligne épaisse) et cinétique d'acclimatation du rapport PUB : PEB après un shift en lumière verte chez la même souche. D'après Palenik (2001).

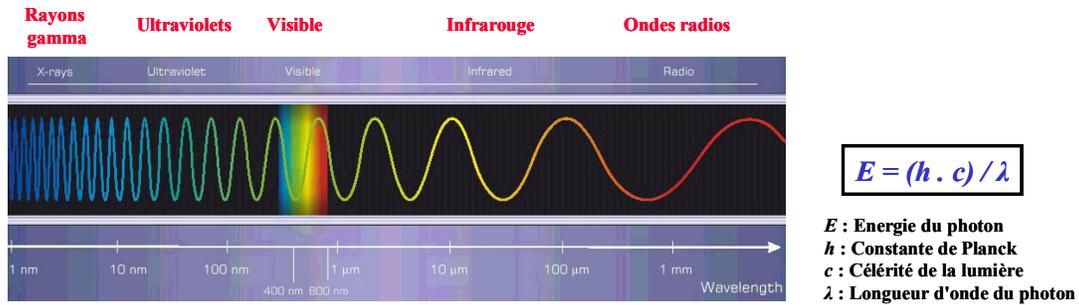
L'analyse phylogénétique basée sur l'analyse des séquences de l'ARN polymérase (*rpoC1*) conduite par (Palenik 2001) suggère que plusieurs *Synechococcus* capables de ce type d'adaptation chromatique sont regroupés au sein d'un même clade (Figure 59). Ce clade semble correspondre au clade I décrit par Fuller et al. (2003) sur la base d'une analyse phylogénétique de l'ARN 16S. Il regroupe notamment les souches WH8020 (dont une partie de la séquence génomique du PBS a été décrite par Wilbanks & Glazer 1993), CC9311 (dont le génome est en fin de séquençage) et CC9617. Il est toutefois remarquable que certaines des souches capables d'AC de type IV n'appartiennent pas à ce clade. Par exemple, la souche WH8113 appartient au clade « mobile » (clade III *sensu* Fuller et al. 2003) et est capable d'AC. Il semble ainsi que ce phénomène soit apparu plusieurs fois dans l'évolution, notamment par microspéciation à l'intérieur du clade III (Palenik 2001).



**Figure 59** : Arbre phylogénétique de *Synechococcus* marins, d'après Palenik (2001). CA : adaptation chromatique, NCA pas d'adaptation chromatique.

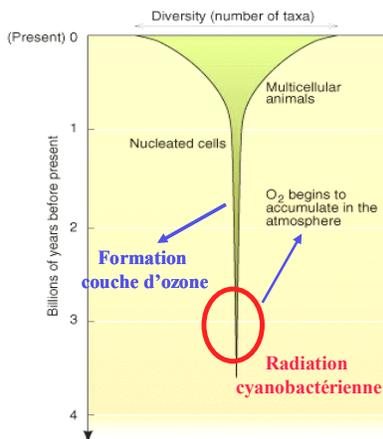
### 3) L'impact des UV sur les phycobilisomes

Les UV sont des radiations de courte longueur d'onde et sont de fait très énergétiques, l'énergie transportée par un photon étant inversement proportionnelle à sa longueur d'onde (Figure 60). On distingue arbitrairement 3 classes d'UV : les UVA (400-320 nm), les UVB (320-280 nm) et les UVC (280-100 nm). Ces derniers n'atteignent pas la surface de la planète car ils sont filtrés par la couche d'ozone stratosphérique. Les UVA et B sont atténués.



**Figure 60 :** Diagramme illustrant les appellations courantes des phénomènes ondulatoires en fonction de leur longueur d'onde. L'énergie d'un quantum donné dépend de sa longueur d'onde.

Il y a environ 3,5 milliards d'années, les rayonnements solaires étaient riches en rayonnements UV, et notamment en UVC (Cockell 2000). Les phénomènes de photoprotection vis-à-vis des UV trouvent leur origine à l'époque où les UV irradiaient la surface du globe, la couche d'ozone étant quasi inexistante. Les mécanismes de photoprotection vis-à-vis des UV étaient alors indispensables à la survie de ces organismes photosynthétiques primitifs. Cette époque correspond notamment à l'émergence de la radiation évolutive des oxyphotobactéries (Schopf 1992). Le dioxygène que ces organismes ont émis dans l'atmosphère a permis la formation progressive de la couche d'ozone, permettant une filtration totale des radiations UVC, les plus néfastes (Figure 61). Cependant, de nos jours, les UVB ont toujours un impact notable sur les organismes vivants, notamment le phytoplancton (Smith et al. 1992), et particulièrement dans le contexte actuel de la réduction de la couche d'ozone (Kerr 1993).



**Figure 61 :** Diagramme présentant l'évolution du nombre de taxa au cours des grandes périodes géologiques.

Dans les océans, les organismes planctoniques sont relativement bien protégés de ces radiations car leur pouvoir de pénétration dans l'eau est faible. Toutefois, les eaux de surface sont exposées et la profondeur de pénétration dépend des qualités optiques de l'eau. Dans les eaux claires des zones oligotrophes, on peut trouver des radiations UVA jusque quelques dizaines de mètres, les UVB étant plus vite atténués.

Les antennes photosynthétiques sont des cibles privilégiées des rayonnements UV. De par leur structure complexe, leur abondance dans les cellules et le fait que les PBP présentent une absorption significative dans la région UV, les PBS sont très sensibles à ces radiations. Il a par exemple été montré chez *Anabaena* sp. PCC 7120 que le rendement quantique de photodestruction des PBP est  $10^4$  fois plus élevé dans l'UV que dans le visible, et que le transfert d'énergie ne peut entrer en compétition avec les photodommages (Lao & Glazer 1996). Ces derniers travaux suggèrent que les dommages aux PBS par les UV sont plus importants que ceux infligés aux acides nucléiques. Chez *Spirulina platensis*, il a été montré que le transfert d'énergie est rapidement affecté et que les chromophores sont très vite dégradés, provoquant le phénomène de blanchissement des cultures (photobleaching ; Rajagopal et al. 1998).

Les effets des radiations UV sur les PBS des cyanobactéries ont été étudiés principalement sur les souches d'eau douce. Chez *Synechococcus* sp. PCC 7942, Plusieurs études ont montré que les UVB provoquent de sérieux dégâts sur ces antennes photosynthétiques. Les propriétés d'absorption, d'émission et d'excitation de fluorescence sont fortement modifiées et les PBP sont découplées (Sah et al. 1998). Après exposition de cultures de cet organisme, il se produit une altération importante des sous-unités  $\alpha^{PC}$  et  $\beta^{PC}$ , ainsi que des linkers associés  $L_R^{33}$  et  $L_R^{29}$ . De plus les composants du cœur tels que les linkers  $L_{CM}^{75}$  et  $L_{RC}^{31.5}$  étaient aussi dégradés (Pandey et al. 1997, Sah et al. 1998). Par ailleurs, des PBS préalablement isolés puis exposés aux UVB sont plus résistants à ces radiations (Pandey et al. 1997). Il semble que des changements de la conformation des bilines aient alors lieu, interrompant le transfert d'énergie entre la PC et l'AP (Jha et al. 2000). Une exposition prolongée conduit toutefois à une destruction des complexes. D'autres études ont caractérisé les dommages occasionnés par les UV sur la pigmentation d'une cyanobactérie à PE du genre *Nostoc* cultivée sur agarose (Araoz 1997). La dégradation des complexes a été plus rapide que celle de la chl *a* et des caroténoïdes et des changements dans la composition des bras ont été observés. Durant le stress UV, la PC était particulièrement touchée, notamment au niveau des acides aminés.

Il semble que les cyanobactéries contenant de la PE soient plus sensibles que les souches n'en possédant pas (Tyagi et al. 1992). Ainsi, des paramètres tels que la croissance, les quantités de pigments, la fixation de CO<sub>2</sub>, l'activité de certaines protéines telle que la nitrogénase (chez les

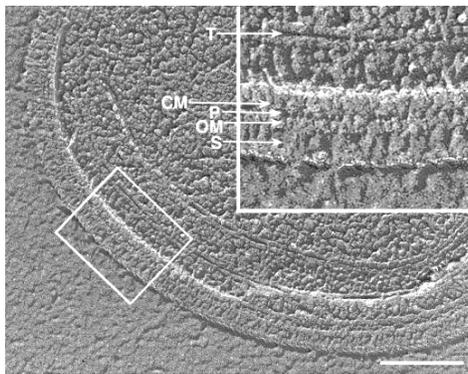
souches fixatrices d'azote) sont plus sensibles à une exposition aux UVB chez les souches à PE. Cette observation reste encore mal expliquée.

Les variations du transcriptome durant un stress UVB ont été analysées chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Huang et al. 2002). En conditions « normales » de culture, les gènes relatifs au PBS sont parmi les plus exprimés du génome. Les résultats montrent que tous les gènes de structure des PBS (PBP et linkers) sont réprimés dans les conditions de stress UVB et forte lumière. La cellule ne cherche donc pas réparer les dégâts mais plutôt à immédiatement diminuer l'absorption de ces radiations très énergétiques. De façon surprenante, Araoz et al. (1998) suggèrent que l'exposition aux UV active la synthèse de la PE chez les souches de *Nostoc* car ils ont observé une augmentation de l'émission de la fluorescence de cette PBP lors d'une exposition aux UV. Toutefois, cette augmentation importante est plus probablement due à une déconnection de la PE entraînant un accroissement de la fluorescence relative, plutôt qu'à un enrichissement des PBS en cette PBP.

## **B/ L'enveloppe cellulaire des oxyphotobactéries, un système particulier**

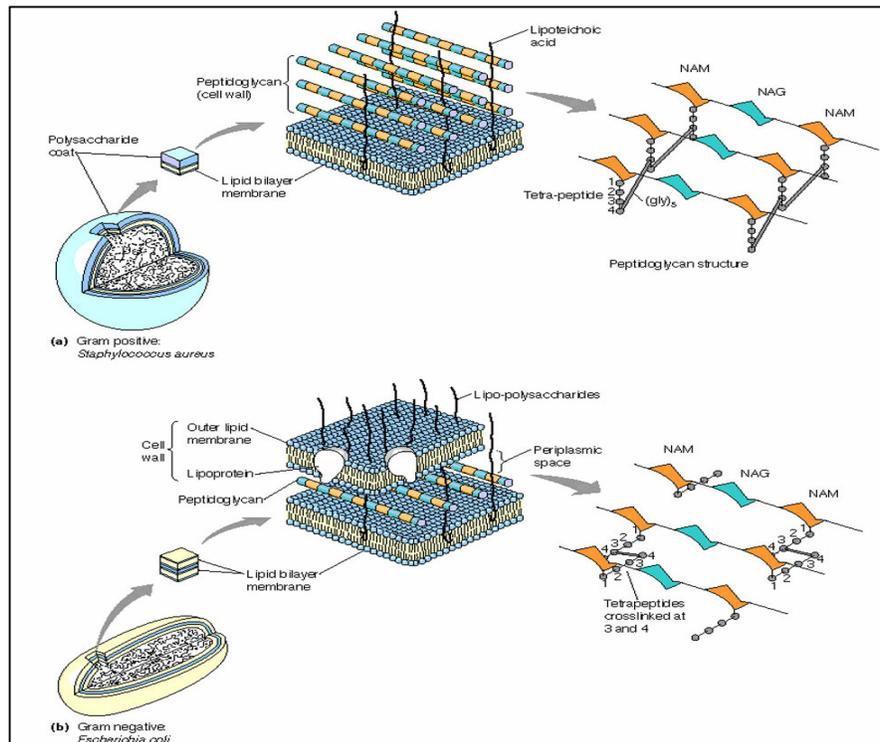
### **1) Une enveloppe bactérienne singulière**

Les oxyphotobactéries ont trois systèmes membranaires principaux: les membranes thylacoïdales, la membrane cytoplasmique et la membrane externe. L'enveloppe cellulaire regroupe la membrane cytoplasmique et la membrane externe (Figure 62).



**Figure 62** : Fracture transversale de cellule de *Synechococcus* sp. WH8113 illustrant les différents systèmes membranaires cyanobactériens. L'insert correspond à la partie encadrée de l'enveloppe cellulaire comprenant la membrane cytoplasmique (CM), la couche de peptidoglycane (P), la membrane externe (OM), et la couche de surface (S). Les thylacoïdes (T) sont aussi indiqués. Echelle : 200 nm, d'après Samuel et al. (2001).

Entre ces deux membranes s'intercale une couche de composés de type peptidoglycanes. La paroi est composée de la membrane externe et des peptidoglycanes. Ces caractéristiques structurales sont typiques des bactéries dites Gram- (les Gram + n'ont pas de membrane externe) et les oxyphotobactéries sont d'ailleurs généralement classées comme telles. Les structures de ces deux grands groupes bactériens sont détaillées dans la figure 63. Néanmoins, en dépit de cette communauté de structure avec les bactéries Gram-, l'enveloppe cellulaire oxyphotobactérienne regroupe des caractéristiques que l'on trouve soit chez les Gram- soit chez les Gram+ (Packer 1988, Hoiczky & Hansel 2000).



**Figure 63** : Structure de l'enveloppe bactérienne chez les bactéries de type Gram – (a ; exemple de *Staphylococcus aureus*) et Gram + (b ; exemple d'*Escherichia coli*). La structure générale de la paroi des oxyphotobactéries est généralement de type Gram -. NAM : acide N-acétyl-muramique ; NAG : N-acetyl glucosamine

L'enveloppe cyanobactérienne se distingue en effet des bactéries dites Gram- notamment de par l'épaisseur de la couche de peptidoglycanes s'intercalant entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe. Cette couche est assez fine chez la majorité des bactéries Gram-, alors qu'elle peut être très épaisse chez les cyanobactéries. A titre d'exemple, elle mesure 10 nm chez *Synechococcus* sp. (Golecki 1977) et atteint 700 nm chez les cyanobactéries de plus grande taille telles *Oscillatoria princeps* (Hoiczky & Baumeister 1995). Les analyses chimiques des

peptidoglycanes cyanobactériens ont montré que le degré d'entrecroisement entre les chaînes de peptidoglycanes et la muréine était souvent plus proche de ce que l'on rencontre chez les bactéries Gram+ que de ce qui est couramment observé chez les bactéries Gram- (Jurgens et al. 1983). Les pentapeptides impliqués dans l'entrecroisement présentent aussi certaines particularités (Salton 1994). De plus, les peptidoglycanes oxyphotobactériens sont complexés à des polysaccharides d'une façon très similaire à ce qui est rencontré chez les bactéries dites Gram+ (Jürgens 1990). Enfin, la présence de polysaccharides liés de façon covalente est tout à fait singulière (Packer & Glazer 1988).

Cette mosaïque de différentes caractéristiques bactériennes se retrouve aussi dans la membrane externe cyanobactérienne. Les lipopolysaccharides (LPS) cyanobactériens contiennent peu de phosphate et manquent souvent de kétodeoxyoctonate, un LPS commun des bactéries Gram- (Mikheyskaya et al. 1977). La membrane externe des oxyphotobactéries contient souvent des composés que l'on ne trouve habituellement pas chez les bactéries Gram- : des caroténoïdes (Resch & Gibson 1983), des acides gras originaux tel le  $\beta$ -hydroxypalmitate, des porines particulières (Hansel et al. 1998), *etc...* Cette liste de caractéristique de la paroi oxyphotobactérienne n'est pas exhaustive mais donne une idée de la singularité de ces enveloppes dont l'appartenance à l'un ou l'autre des deux grands groupes de parois bactériennes est loin d'être évidente.

## **2) Mobilité et agrégation**

La mobilité des cellules chez les cyanobactéries peut être vue comme une stratégie de photoprotection, bien que des considérations liées à la nutrition ne doivent pas être exclues. Il a été proposé que les cellules se protègent de la photoinactivation du PSII par auto-ombrage (Tilzer 1987, Pechar & Masojidek 1995) ou en fuyant les zones trop éclairées ou trop riches en UV. Ainsi, des migrations ont été observées dans la colonne d'eau vers les couches plus profondes et moins éclairées (Reynolds 1987) et certaines cyanobactéries d'Antarctique sont capables de fuir les habitats trop fortement irradiés par les UV (Quesada & Vincent 1997, Quesada et al. 1999).

Lorsqu'une culture de la cyanobactérie *Synechococcus elongatus* subit brusquement un éclairage important, on peut observer une agrégation des cellules, à des échelles de temps de l'ordre de quelques minutes. Ce mécanisme est altéré par la qualité de la lumière et la présence de substances affectant le transport photosynthétique d'électrons. Récemment, il a été suggéré que le système glutathione soit impliqué dans le déclenchement de l'agrégation. Celle-ci est ATP-dépendante et ne nécessite pas la synthèse de protéines *de novo* (Koblizek et al. 2000). De façon

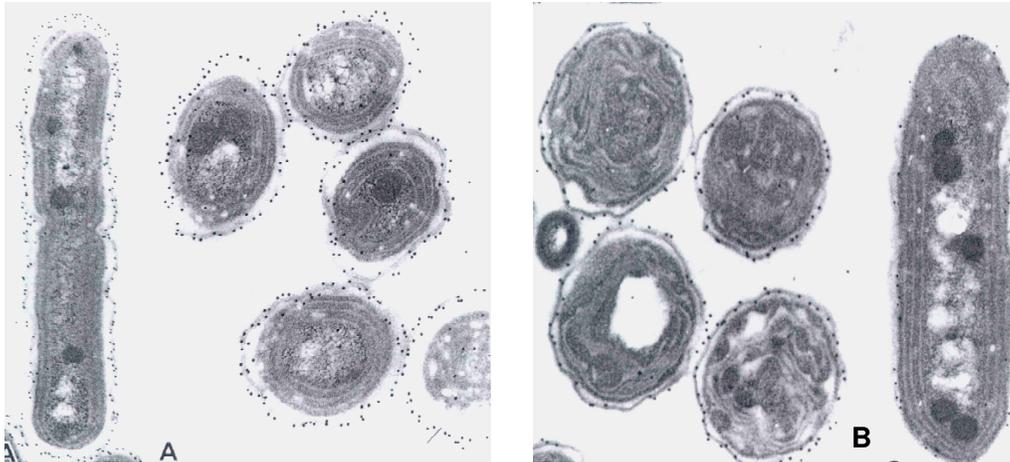
similaire, *Synechocystis* sp. PCC 6803 forment des agrégats lorsque des cellules sont brusquement soumises à des radiations UV. Les voies de transduction des signaux entre des molécules témoins du stress lumineux et les protéines de la membrane externe impliquées dans la mobilité sont encore mal connues.

### **3) Les caroténo-protéines de l'enveloppe cellulaire**

#### **a) Généralités**

Les caroténo-protéines cyanobactériennes ont été décrites pour la première fois en 1981 par Holt & Krogmann (Holt & Krogmann 1981). Les études qui suivirent et la relativement récente disponibilité de génomes complets ont permis de réaliser que ces protéines sont fréquentes chez les cyanobactéries, à l'exception des représentants du genre *Prochlorococcus* (Kerfeld et al. 2003b). Les séquences génomiques de *Crocospaera watsonii* et *Trichodesmium* sp., encore en cours d'annotation, ne semblent pas non plus présenter de gènes homologues à ceux présents chez la plupart des cyanobactéries.

Lorsque *Synechococcus* sp. WH7803 est cultivée en forte lumière, la concentration en  $\beta$ -carotène par cellule diminue parallèlement à celle de la Chl *a* (Kana et al. 1988). La concentration en zéaxanthine par cellule reste, quant à elle, constante. Ces différentes réponses suggèrent que le  $\beta$ -carotène et la majorité de la zéaxanthine cellulaire sont localisées dans des types membranaires différents. De précédentes études avaient en effet rapporté la présence de caroténoïdes, souvent des dérivés de la zéaxanthine, dans l'enveloppe cellulaire de différentes souches de *Synechococcus* d'eau douce (Holt & Krogmann 1981, Murata et al. 1981, Omata & Murata 1983, Resch & Gibson 1983) alors que le  $\beta$ -carotène est localisé dans les thylacoïdes. De façon analogue, K. Masamoto et K. Furukawa (1997) ont mis en évidence chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 une accumulation de zéaxanthine, lorsque cette cyanobactérie est cultivée sous forte lumière. Leurs observations les conduisent à suggérer que l'accumulation devait se situer dans l'enveloppe cellulaire. L'utilisation de technique immuno-cytologique afin de localiser les caroténo-protéines dans la cellule confirme cette hypothèse (Figure 64 ; Bullerjahn & Sherman 1986b, a).



**Figure 64** : Immuno-localisation de caroténo-protéines chez *Prochlorothrix hollandica* (A) et *Synechococcus* sp. (B), d'après Bullerjhan & Sherman (1986).

Plusieurs caroténo-protéines ont été isolées et caractérisées dans l'enveloppe cellulaire d'oxyphotobactéries. Les caractéristiques de certaines de ces protéines sont résumées dans le tableau 4 et explicitées dans les paragraphes suivants.

**Tableau 4** : Caractérisation de caroténo-protéines de l'enveloppe cellulaire chez plusieurs oxyphotobactéries. P.M. : Poids Moléculaire ; Memb. ext. : Membrane externe ; Memb. cyto. : membrane cytoplasmique ; nd : donnée non mentionnée. Les références bibliographiques correspondant à ces données sont mentionnées dans le texte.

Organisme	M.M. (KDa)	Caroténoïde lié	Absorption (nm)	Localisation	Hydrophilie
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714	45	Myxoxanthophylle ou zéaxanthine	nd	Enveloppe cellulaire	Hydrophobe
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	45 42	nd nd	450, 476, 516 460, 487	Memb. ext. Memb. cyto.	Hydrophobe
<i>Prochlorothrix hollandica</i>	56+58	Zéaxanthine	442, 462, 497	Memb. ext.	Hydrophile
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	nd	3'-Hydroxyéchinénone	nd	Enveloppe cellulaire	Hydrophile
<i>Synechococcus</i> sp.	23	Zéaxanthine, 13-cis-lutéine, lutéine	430, 460, 485	Enveloppe cellulaire	Hydrophile
<i>Spirulina maxima</i> <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> <i>Microcystis aeruginosa</i>	47	3'-hydroxyéchinénone	465, 495	Enveloppe cellulaire	Hydrophile

#### b) Les caroténo-protéines hydrophobes

Plusieurs protéines de ce type ont été observées dans l'enveloppe cellulaire de différentes oxyphotobactéries. Une caroténo-protéine hydrophobe de 45 KDa a été mise en évidence dans

l'enveloppe cellulaire de *Synechocystis* sp. PCC 6714 (Bullerjahn & Sherman, 1986). Plus la teneur en O<sub>2</sub> dans les cellules est importante, plus la quantité de caroténo-protéines insérées dans l'enveloppe cellulaire est importante. Par ailleurs, une étude immunologique avec un anticorps dirigé contre cette caroténo-protéine a révélé la présence d'une protéine similaire dans l'enveloppe cellulaire de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Bullerjahn & Sherman, 1986). De même, une caroténo-protéine de 45 KDa a également été découverte dans la membrane externe de *Synechococcus* sp. PCC 7942 et a été séquencée (Reddy et al. 1993). Trois pics d'absorption à 450, 476 et 516 nm ont été observés, mais les pigments impliqués n'ont pas caractérisés plus avant.

Une autre protéine de 42 KDa, présentant deux pics principaux d'absorption à 460 et 487 nm, a été mise en évidence dans la membrane cytoplasmique de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Masamoto et al. 1987). Cette protéine est jusqu'à aujourd'hui la seule qui semble associée aux thylacoïdes. Une accumulation de cette protéine durant la croissance sous forte lumière a été observée. Le gène *cbpA* codant pour l'apoprotéine a été séquencé et une photorégulation post transcriptionnelle a été démontrée par northern blot (Reddy et al. 1993). Le transcrit mesure 6,2 kb et pourrait représenter un opéron contenant *cbpA* et d'autres gènes non identifiés (Reddy et al. 1993, Masamoto et al. 1987). Des agents connus pour activer la formation de radicaux libres augmentent la transcription du gène *cbpA*, dont le niveau d'expression est très faible à lumière moyenne (Reddy et al. 1993).

Enfin, Jurgens & Weckesser (1985) ont caractérisé le contenu en caroténoïdes de la membrane externe de *Synechocystis* sp. PCC 6714. Trois pics d'absorption ont été observés, à 462, 485 et 513 nm. La zéaxanthine, un dérivé de l'échinénone, le  $\beta$ -carotène, une myxoxanthophylle, deux autres caroténoïdes liant un glycoside, ainsi qu'un caroténoïde polaire inconnu ont été détectés. Ce dernier n'a pas été observé dans les membranes cytoplasmiques et thylacoïdales. La zéaxanthine, la myxoxanthophylle et les deux caroténoïdes glycosidés sont les caroténoïdes majeurs de la membrane externe et représentent près de 75% des caroténoïdes membranaires totaux. La ou les éventuelles caroténo-protéines présente(s) chez cette souche n'ont pas été caractérisées.

### **c) Les caroténo-protéines hydrophiles**

Ces protéines ont été plus étudiées que les précédentes et la plupart d'entre elles appartiennent à un groupe de protéines formant une couche à la surface des cellules (ou "S-layer"). Les protéines de la S-layer sont souvent composées d'un ou plusieurs peptide(s) acide(s) lié(s) de façon non covalente aux LPS. Ces protéines hydrophiles sont localisées dans le cytosol ou faiblement liées à la surface externe de la membrane externe. C'est pourquoi il est possible

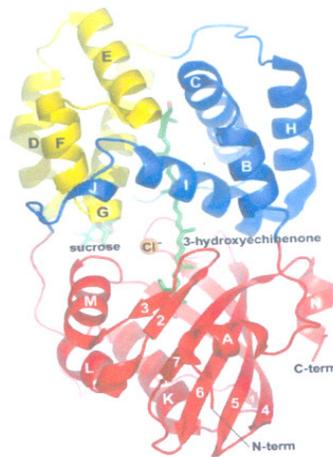
d'en retrouver une certaine quantité dans les milieux de cultures en phase stationnaire. Chez l'oxyphotobactérie « verte » *Prochlorothrix hollandica*, un complexe caroténo-protéique hydrophile acide a été caractérisé par (Engle et al. 1991). Ce complexe présente deux principaux pics d'absorption à 460 et 487 nm et est formé de deux polypeptides similaires de 56 et 58 KDa localisés dans la membrane externe de la cellule (surface externe). Ce dimère lie des LPS, ainsi que la majorité de la zéaxanthine cellulaire. Sous sa forme native à 77 K, il présente des pics d'absorption à 442, 462 et 497 nm. Le complexe protéique s'accumule 2 à 3 fois plus dans la membrane externe en condition de forte lumière qu'en lumière faible (Engle et al. 1991, Reddy et al., 1993).

Une caroténo-protéine liant 1 à 2 molécules de 3'-hydroxyechinénone a été clairement mise en évidence chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Wu & Krogmann 1997). Le génome de cette cyanobactérie ayant été entièrement séquencé, il a pu être déterminé, après séquençage de la partie N-terminale, que cette protéine est codée par le gène *shr1963*. Au niveau transcriptionnel, des études de puce à ADN ont montré que ce gène est très exprimé en réponse aux fortes lumières et aux radiations UV (Hihara et al. 2001). Un mutant dans lequel ce gène a été inactivé est en cours de caractérisation (Kerfeld 2004a, b).

Par ailleurs, il a été montré que les extraits solubles d'une souche de *Synechococcus* sp. contiennent une caroténo-protéine hydrophile (Diversé-Pierluissi & Krogmann 1988). Cette protéine serait cette fois-ci un dimère de deux polypeptides de 23 KDa présentant des pics d'absorption à 430, 460 et 485 nm. Les principaux caroténoïdes liés sont la zéaxanthine (83%), la 13-cis-lutéine (12%) et la lutéine (5%). Le complexe protéique lie approximativement 44 molécules de caroténoïdes. Des caroténo-protéines similaires ont été trouvées chez *Spirulina maxima*, *Aphanizomenon flos-aquae* et *Microcystis aeruginosa* (Holt & Krogmann, 1981). Il s'agit de polypeptides fixant de la 3'-hydroxyéchinénone (ou un caroténoïde proche) à raison de 20 à 40 molécules par protéine. Le tout a une masse moléculaire d'environ 47 KDa et les pics d'absorption se situent à 465 et 495 nm.

La caroténo-protéine la mieux caractérisée jusqu'à présent est celle présente chez *Arthrospira maxima*. Chez cette cyanobactérie, c'est la 3'-hydroxyéchinénone (HE) qui est liée par des interactions non covalentes à une apoprotéine probablement homodimérique. La configuration protéique provoque une courbure de la molécule et il en résulte un déplacement bathochromique du maximum d'absorption de la protéine (495 nm) de 45 nm par rapport à celui de la xanthophylle libre (450 nm). De plus, le temps de vie de l'état excité (S1) de la HE est diminué lorsqu'elle est associée à l'apoprotéine, montrant que la chromoprotéine possède une capacité de dissipation d'énergie importante (Polivka & Sundstrom 2004). A la suite d'une étude

de cristallisation (Kerfeld et al. 1997), la structure de cette protéine a récemment été déterminée à une résolution de 2,1 Å (Kerfeld et al. 2003a, Kerfeld et al. 2003b). Elle est constituée de deux domaines, une hélice alpha en région N-terminale et une partie C-terminale présentant une homologie avec les domaines NTF2 observés chez certains enzymes et dans des protéines eucaryotiques impliquées dans les échanges avec le compartiment nucléaire (Bullock et al. 1996). La molécule de HE est en contact avec ces deux domaines et est presque totalement isolée du solvant environnant (Figure 65).



**Figure 65** : Modèle de structure moléculaire de la caroténo-protéine *d'Arthrospira maxima* et de ses cofacteurs après analyse par cristallographie, d'après Kerfeld et al. (1997, 2003).

La structure de ce type de protéine est jusqu'à aujourd'hui unique parmi les protéines liant des xanthophylles. Quelques similarités existent cependant avec la protéine à astaxanthine de la carapace de homard, la  $\beta$ -crustacyanine (Cianci et al. 2002, Zagalsky 2003).

#### **d) Conclusions**

Les caroténoïdes sont des molécules présentes chez tous les organismes photosynthétiques. Ils peuvent remplir le rôle de pigment accessoire dans l'antenne collectrice de lumière, mais ont aussi un rôle important dans la photoprotection. Ils sont en effet à même de neutraliser les radicaux libres oxygénés et les triplets de chl, ainsi que de dissiper de l'énergie lumineuse excédentaire sous forme de chaleur. Le principal caroténoïde présent chez les oxyphotobactéries est la zéaxanthine. Cette xanthophylle est connue chez les eucaryotes pour ses propriétés photoprotectrices (cycle des xanthophylles). Bien qu'aucun cycle des xanthophylles n'ait été mis en évidence chez les procaryotes photosynthétiques, plusieurs travaux ont montré

que les xanthophylles jouent un rôle important dans la photoprotection chez les oxyphotobactéries (voir par exemple Lagarde et al. 2000). Lagarde & Vermaas (1999) ont étudié la réponse au stress lumineux d'un mutant de la cyanobactérie d'eau douce *Synechocystis* sp. PCC 6803 dont le gène codant pour la  $\beta$ -carotène hydroxylase a été inactivé, et donc dépourvu de zéaxanthine. Ces travaux montrent que le mutant accumule de la myxoxanthophylle en condition de forte lumière. Ils ont donc suggéré que ce caroténoïde doit remplir une fonction importante de photoprotection.

Les fortes lumières semblent accroître l'insertion de la plupart des caroténo-protéines dans l'enveloppe et les radicaux libres oxygénés, qui sont abondants en condition de stress lumineux, agissent de façon similaire (Kerfeld 2004a, b). De plus, il a été montré que l'expression des gènes *crbB* (Phytoène synthétase) et *crpP* (phytoène désaturase), qui sont à la base de la biosynthèse des caroténoïdes, est photorégulée (Fernandez-Gonzalez et al. 1998), ceci concordant avec la dynamique de l'insertion des caroténo-protéines dans l'enveloppe. Les caroténoïdes présents dans l'enveloppe cellulaire pourraient donc dissiper l'énergie lumineuse en excès sous forme de chaleur, avant qu'elle ne dégrade la cellule, notamment par l'intermédiaire des espèces activées de l'oxygène. D'un point de vue évolutif, on peut ainsi penser que le cycle des xanthophylles qui n'existe pas chez les cyanobactéries, représente une innovation des eucaryotes permettant une régulation plus fine de la gestion de l'énergie lumineuse.

Peu de renseignements sont disponibles sur la physiologie des caroténo-protéines de l'enveloppe cellulaire oxyphotobactérienne et les mécanismes physiologiques associés. Les séquences protéiques et nucléiques sont relativement rares (en particulier chez les cyanobactéries marines) et de fait, la régulation au niveau transcriptionnel est souvent mal connue. Par ailleurs, ces protéines sont difficiles à caractériser, notamment car les estimations de masse moléculaire présentent souvent des anomalies, que ce soit par SDS-PAGE, chromatographie d'exclusion de taille ou spectrométrie de masse (Kerfeld, 2004a, b).

Quelques hypothèses tout à fait spéculatives de mécanismes de photoprotection ont été proposées. Les évidences d'accumulation de ces protéines chez les souches d'eau douce sont nombreuses mais ce n'est pas le cas des souches marines chez qui la concentration cellulaire en zéaxanthine ne semble pas varier avec la lumière (Kana et al., 1988 ; Moore et al., 1995). Les mécanismes impliquant les caroténo-protéines diffèrent certainement entre ces deux types d'organismes. Chez les souches d'eau douce, il semble que la synthèse des caroténoïdes soit associée à celle des thylacoïdes (Hirschberg & Chamovitz 1994). Il existe donc un système de transport de ces composés jusqu'à l'enveloppe cellulaire. Des analyses de dichroïsme circulaire des apoprotéines recombinantes de caroténo-protéines suggèrent qu'elles adoptent une

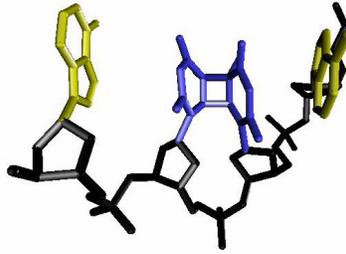
conformation stable, ce qui pourrait être en accord avec un rôle de transport de caroténoïdes (Kerfeld et al., 2004a, b). Les pigments pourraient être relargués ou transférés à une autre protéine, ou la caroténo-protéine directement insérée dans l'enveloppe. Par ailleurs, la caroténo-protéine d'*Arthrospira maxima* est capable de réagir avec les singulets d'oxygène à des taux comparables à ceux d'une superoxyde dismutase à cuivre (Kerfeld et al. 2003). Il est ainsi possible que ces protéines aient aussi un rôle de détoxification des espèces activées de l'oxygène.

## **C/ Les molécules spécifiquement impliquées dans la photoprotection contre les UV**

Le phytoplancton marin présente des réponses adaptatives complexes aux rayonnements UV, assurées notamment par la synthèse de molécules protectrices (Ehling-Schulz & Scherer 1999, Montecino et al. 2001). Les systèmes d'électrons  $\pi$  que contiennent ces molécules protectrices sont parmi les groupements les plus efficaces quant à l'absorption de radiations UV. On les trouve dans les doubles liaisons de molécules plus ou moins linéaires avec alternance de simples et doubles liaisons tels que les caroténoïdes, et dans des structures aromatiques et cycliques (Cockell & Knowland 1999). Outre les caroténoïdes, on trouve ainsi chez les oxyphotobactéries des pigments aromatiques tels que la scytonémine et des acides aminés à mycosporine (MAA).

Les niveaux de radiations UVB atteignant la surface de la Terre sont en augmentation de par la raréfaction de la couche d'ozone atmosphérique (Smith et al. 1992). Ces radiations sont biologiquement très actives. Elles endommagent les acides nucléiques (Kumar et al. 2004), les protéines et notamment des enzymes (Kumar et al. 2003), les systèmes membranaires (He & Hader 2002a, c, b), *etc...* L'appareil photosynthétique est bien sûr aussi affecté, particulièrement les antennes (voir paragraphe précédent, (Solov'ev et al. 2001), les CR (Friso et al. 1994, Krauss 2003, Vass et al. 2002) et la Rubisco (Wilson et al. 1995 ; Bischof et al. 2000, Bischof et al. 2002). L'ADN et les protéines sont parmi les premières cibles des U.V. car ces molécules absorbent directement ces radiations. Les dommages causés par les U.V.B sont des cassures de l'ADN simple et double brins, des la formation de dimères de cyclobutane et de pyrimidine-(6-4)-pyrimidone et dérivés (Peak & Peak 1986, Mitchell & Nairn 1989, Figure 66). Les UVA, moins énergétiques, ont des effets plus indirects sur les protéines et les acides nucléiques (Eisenstark 1989). Les analyses de type post-génomique (puces à ADN, électrophorèse bidimensionnelle de protéome) ont permis de constater que les UVB provoquent l'induction et la répression/dégradation de nombreux gènes et protéines chez plusieurs souches de cyanobactéries

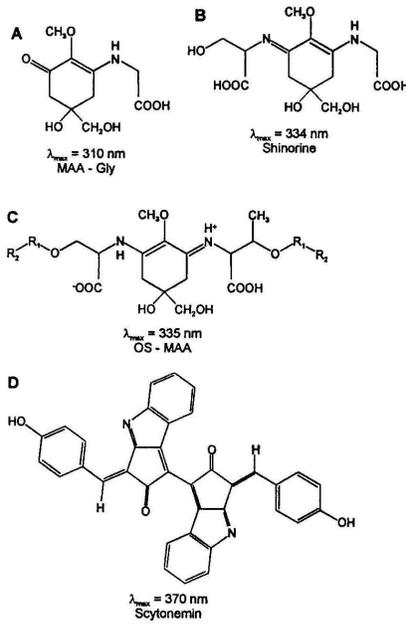
d'eau douce (Huang et al. 2002, Elhing-Schulz & Ferrer, 1999).



**Figure 66** : Modèle moléculaire illustrant les dimères de thymine occasionnés par les radiations UV sur l'ADN.

### 1) Les Acides Aminés à Mycosporine

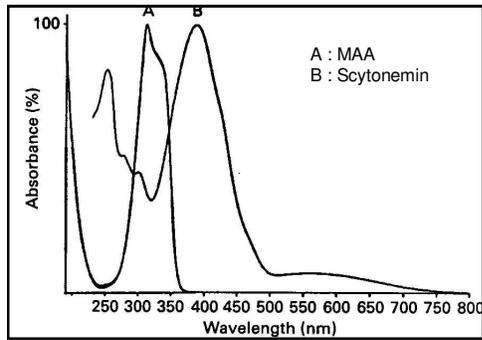
Les acides aminés à mycosporine (MAA) sont très largement répandus dans le monde vivant (Cockell & Knowland 1999), aussi bien chez les animaux, les champignons que chez les organismes photosynthétiques. Dans le milieu marin, environ 19 MAA ont été recensés à ce jour, largement répartis d'un point de vue taxonomique et géographique. Ceci souligne leur importance en tant que molécule photoprotectrice au sein du monde vivant. Les MAA sont des substances hydrophiles caractérisées par la présence d'un chromophore cyclohexanone ou cyclohexénimine, lié à un atome d'azote ou un groupement iminoalcool d'un acide aminé ou parfois à des oligosaccharides (Figure 67 ; Groniger et al. 2000). La diversité de ces composés réside dans la diversité des acides aminés et des groupements iminoalcool. Le maximum d'absorption se situe généralement entre 310 et 360 nm et la masse moléculaire est souvent proche de 300 Da. La synthèse de ces composés trouve probablement son origine dans les premières étapes de la voie métabolique du shikimate. Les MAA sont localisés au niveau des glycanes extracellulaires (S-layer) et la production de MAA est préférentiellement stimulée par les UVB (Rozema et al. 2002, Sinha et al. 2003).



**Figure 67** : Structure des composés UV-protecteurs : la MAA-gly (A) monosubstituée, la shinorine bisubstituée (B), la MAA-oligosaccharide de *Nostoc commune* (Bohm et al. 1995) avec R1 : galactose, xylose, acide glucuronique et R2 : galactose, glucose, glucosamine (C), la scytonémine (D), selon Proteau et al. (1993).

On trouve des MAA chez de nombreuses cyanobactéries (Garcia-Pichel 1993). Chez *Nostoc commune*, les MAA sont extracellulaires, liés à la matrice polysaccharidique par différents aminoacides. Deux MAA ont été isolés, l'un absorbant à 335 nm (Hill et al. 1994) et l'autre, lié à une glycine, absorbe à 312 nm et serait un agent quencher d'états excités de diverses molécules (Dunlap 1995, Sinha et al. 2003). Ces composés peuvent représenter jusqu'à 10% de la masse de matière sèche, alors que les MAA intracellulaires participent habituellement entre 0,16 et 0,84% du poids sec. On estime qu'environ deux photons sur trois sont absorbés par ces pigments avant que l'intérieur de la cellule ne soit irradié (Böhm et al., 1995). Ces MAA particuliers sont considérés comme unique dans le monde vivant.

La shinorine, un MAA bisubstitué contenant de la glycine et de la serine, absorbe à 334 nm. Elle a été mise en évidence chez les cyanobactéries *Anabaena* sp. et *Scytonema* sp. (Sinha et al. 2001a, Sinha et al. 2001b). D'autres composés proches semblant avoir la même fonction ont été découverts chez *Chlorogloeopsis* sp. PCC 6912 et *Spirulina subsalsa* (Portwich & Garcia-Pichel 2000, Montecino et al. 2001).



**Figure 68** : Spectres d'absorption de la MAA-oligosaccharide dans l'eau (A ; Böhm et al., 1995) et de la scytonémine dans le tétrahydrofurane, d'après Proteau et al. (1993).

## 2) La scytonémine

La scytonémine est un pigment brun-jaunâtre hydrophobe présentant une structure dimérique (Sinha & Hader 1998). Sa formule est basée sur des groupements indol et phénol et sa masse moléculaire est d'environ 545 Da. Il est probable que la scytonémine soit formée à partir de la condensation du tryptophane et de dérivés phenylpropanoïdes. La liaison entre ces unités est biochimiquement unique et la structure cyclique obtenue est dénommée squelette scytonémique. La synthèse de ce pigment est principalement stimulée par les UVA et la lumière bleue, de 315 à 425 nm (Garcia-Pichel et al. 1992, Ehling-Schulz et al., 1997). Il existe chez la plupart des cyanobactéries un seuil minimum de flux de photons à partir duquel la scytonémine commence à être synthétisée qui diffère selon les organismes (Cockell & Knowland, 1999).

La scytonémine purifiée absorbe préférentiellement vers 370-386 nm, mais aussi à 252, 278, et 300 nm. Elle est localisée au niveau de glycanes extracellulaires en relation avec la membrane externe, et est présente chez de nombreuses cyanobactéries d'eau douce engainées telles que *Fremyella* spp., *Nostoc* spp., *Oscillatoria* spp., *Rivularia* spp., *Synechococcus* spp., *Scytonema* spp., etc. (Groniger et al. 2000). Toutefois, les formes planctoniques contiennent rarement ce pigment, même si la présence d'un composé aux propriétés d'absorption similaires a déjà été rapportée dans un bloom phytoplanktonique (Llewellyn & Mantoura 1997). La scytonémine absorbe les rayonnements UV grâce à son système d'électrons  $\pi$  (Cockell & Knowland 1999) et forme, en entourant la cellule, un véritable bouclier contre les rayonnements UV. Ce pigment peut en effet induire à l'échelle de la cellule une atténuation des rayonnements à 320 nm allant jusqu'à 55% (Garcia-Pichel & Castenholz, 1993), mais pour des cellules se trouvant protégées par d'autres (colonies, aggrégation), la protection est très certainement bien plus importante.

### **3) Les polysaccharides extracellulaires**

La gaine de polysaccharides extracellulaires est une zone tampon entre la cellule et son environnement. La synthèse accrue de ces polysaccharides lors d'un stress UV permet de limiter les dommages induits par ces radiations. Les UVB stimulent ainsi la production de ces composés chez *Nostoc commune* (Elhing-Schulz et al., 1997). Les cultures irradiées présentent environ 3 fois plus de polysaccharides pariétaux que la culture témoin. Il a été proposé que la stimulation de la production de polysaccharides soit notamment destinée à mettre en place une matrice en vue de l'insertion de molécules photoprotectrices telles que les MAA (Elhing-Schulz et al., 1997).

Les MAA et la scytonémine semblent assez spécifiques du stress provoqué par les radiations UV. La proportion de ces derniers pigments dépend d'ailleurs de la proportion d'UVA et d'UVB des radiations appliquées. Toutefois, d'autres fonctions écologiques ne sont pas à exclure (Vincent 1993).

### **4) L'implication des caroténoïdes, conclusions**

Les mécanismes de photoprotection associés aux caroténoïdes chez les cyanobactéries sont mal compris tant pour la réponse aux fortes lumières (Kerfeld, 2004a, b) qu'aux UV. Il a été montré chez des mutants de *Synechococcus* sp. PCC 7942 accumulant des caroténoïdes que l'ampleur des destructions provoquées par les UVB est dépendante de la quantité de caroténoïdes accumulés, notamment de zéaxanthine. De fait, l'accumulation de caroténo-protéines dans l'enveloppe cellulaire en réponse aux fortes lumières peut aussi être observée lors de stress UV (voir paragraphe sur les caroténo-protéines) Toutefois, le rôle spécifique des caroténoïdes dans la photoprotection vis-à-vis des UV est controversé (Cockell & Knowland, 1999). Il semble que l'accumulation de caroténoïdes représente une réponse non spécifique au stress lumineux *sensu lato* (Elhing-Shulz et al., 1997). Par ailleurs, lorsque *Nostoc commune* est exposée à des radiations UV, on observe tout d'abord une augmentation des teneurs cellulaires en échinénone et en myxoxanthophylle. C'est ensuite que les pigments hydrosolubles de type MAA apparaissent parallèlement à une augmentation de la synthèse de polysaccharides. Enfin, la synthèse de la scytonémine est activée. La cinétique d'induction de ces différents composés photoprotecteurs suggère qu'il existe des voies de transduction des signaux distinctes (Elhing-Shulz et al., 1997).

# CHAPITRE I

## CARACTERISATION DE LA PHOTOPHYSIOLOGIE DE LA SOUCHE DE *SYNECHOCOCCUS* SP. WH8102

## CHAPITRE I : Caractérisation de la photophysologie de la souche de *Synechococcus* sp. WH8102

### Contexte de l'étude

A la suite de la découverte de *Prochlorococcus* et de la mise en évidence de son importance écologique (Chisholm et al. 1988, Olson et al. 1990a, Partensky et al. 1999a, b), les études *in situ* visant à préciser l'écologie de cette cyanobactérie se sont rapidement multipliées. De plus, l'isolement d'un ensemble de souches provenant de différents écosystèmes a permis des avancées décisives dans la compréhension de sa biologie, sa physiologie ou encore de ses propriétés optiques. L'une des découvertes-clés a été la mise en évidence "d'écotypes" de *Prochlorococcus* physiologiquement et génétiquement différents et adaptés à des niches lumineuses distinctes au sein la colonne d'eau (Moore et al. 1998). L'équipe « Plancton Océanique » de la Station Biologique de Roscoff a participé activement depuis 15 ans à l'amélioration des connaissances sur *Prochlorococcus*, notamment en étudiant et décrivant son appareil photosynthétique (Garczarek et al. 1998; Partensky & Garczarek 2003), et en particulier les complexes antennaires des différents écotypes (Partensky et al. 1997, Garczarek et al. 2000a, Bibby et al., 2001, 2003).

En revanche, les *Synechococcus* marins, bien que découverts près de dix ans avant *Prochlorococcus*, sont paradoxalement moins bien connus que ce dernier. La diversité génétique de ces cyanobactéries est importante, mais peu de traits phénotypiques (à part la mobilité) ont encore pu être reliés avec leur phylogénie (Toledo et al. 1999, Fuller et al. 2003). De plus, les études physiologiques sont rares, et la plupart du temps ne visent qu'un nombre limité de souches telles que WH7803 et WH8103 (Kana & Glibert 1987b, a, Kana et al. 1988, Moore et al. 1995).

Dans le contexte de la publication du premier génome de *Synechococcus* marin, celui de *Synechococcus* sp. WH8102, ma thèse a débuté par la caractérisation physiologique et pigmentaire de cette souche, qui nous a été confiée en novembre 2001 par Bianca Brahmsha (Scripps Institution, San Diego, USA). A l'époque, on ne connaissait guère de cette souche que son rapport PUB/PEB, ses propriétés de mobilité (Brahmsha 1996a) et sa capacité à être transformée (Brahmsha 1996a). C'est dans ce contexte scientifique que j'ai entamé l'étude chez WH8102 des variations d'une série de paramètres (croissance, pigments hydrophobes et hydrophiles, paramètres cytométriques, spectrophotométrie et spectrofluorimétrie) en fonction de l'intensité lumineuse. Si j'ai réalisé la plupart des mesures à Roscoff, les dosages CHN ont en revanche été réalisés à la Station Marine de Wimereux par Eric Lecuyer et François Gevaert et j'ai enregistré les spectres d'absorption *in vivo* à L'École Normale Supérieure (Paris) en collaboration

avec Jean-Claude Thomas. Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié en 2004 dans *Aquatic Microbial Ecology*, qui est présenté ci- après.

**Résumé de l'article « Photophysiology of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH8102, a new model organism »**

Les cyanobactéries du genre *Synechococcus* spp. constituent un composant essentiel et ubiquiste des écosystèmes marins. Le génome d'une des souches isolées en culture, WH8102, a récemment été entièrement séquencé. Puisqu'il peut aussi être manipulé génétiquement, ce clone peut potentiellement devenir un nouvel organisme modèle mais il reste cependant encore aujourd'hui très peu caractérisé, particulièrement en ce qui concerne sa pigmentation, ses propriétés optiques et sa photophysologie. *Synechococcus* sp. WH8102 présente un rapport phycourobiline:phycoérythrobiline très élevé (environ 1,9 à basse lumière), et est ainsi représentatif des populations de *Synechococcus* des zones oligotrophes de l'océan. Nous avons montré dans cette étude que cette souche peut pousser dans un vaste gradient d'intensité de lumière blanche continue, de moins de 15 à plus de 650  $\mu\text{mol photons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , avec un taux de croissance maximum ( $\mu_{\text{max}} = 1.13$ ) à 207  $\mu\text{mol photons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ( $I_{\text{max}}$ ). Après acclimatation aux fortes lumières, une chute du contenu cellulaire en chl *a*,  $\beta$ -carotène et PE a été observée, les concentrations étant quasi stationnaires au-delà de  $I_{\text{max}}$ . Cette chute des concentrations pigmentaires est certainement la conséquence d'une réduction de la surface des membranes thylacoïdales. Toutefois, les concentrations en zéaxanthine sont restées approximativement constantes quelle que soit l'intensité lumineuse ; la dynamique et la localisation du ou des pools de zéaxanthine et le rôle exact de ce pigment (pigment collecteur de lumière et/ou photoprotecteur) restent encore mal compris chez les *Synechococcus* marins. Les quantités cellulaires de carbone et d'azote n'ont pas varié avec l'intensité lumineuse de culture. Les variations des fluorescences orange et rouge mesurées par cytométrie en flux ont pu être corrélées aux variations des concentrations de PE et de chl *a*, respectivement. Enfin, les analyses spectrophotométriques de fractions enrichies en PBS obtenues à partir de cellules ayant poussées à différentes intensités lumineuses ainsi que les spectres d'émission de fluorescence *in vivo* montrent que ces antennes photosynthétiques subissent des changements au cours des phénomènes d'acclimatation à l'intensité lumineuse. Nos résultats suggèrent une réduction spécifique de la quantité de PE II relativement aux autres phycobiliprotéines.





















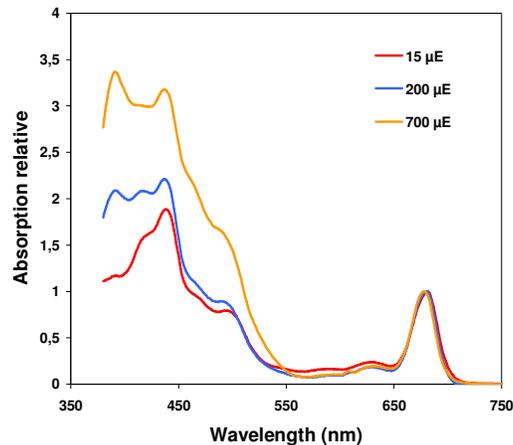






## Données complémentaires

Des fractions membranaires enrichies en thylacoïdes ont été isolées sur coussin de saccharose à 60 % par la méthode décrite dans la seconde partie du chapitre IV, à partir de cultures de *Synechococcus* sp. WH8102 acclimatées à 15, 250 et 700  $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ . Ces fractions ont été caractérisées par leur spectre d'absorption (Figure 69) et leur contenu pigmentaire (Tableau 5) par la procédure décrite dans l'article ci-avant.



**Figure 69** : Spectres d'absorption de fractions enrichies en thylacoïdes de *Synechococcus* sp. WH8102 acclimaté à trois intensités lumineuses.

**Tableau 5** : Rapports pigmentaires des fractions enrichies membranaires en thylacoïdes de *Synechococcus* sp. WH8102 acclimaté à trois intensités lumineuses.

Intensité lumineuse de culture ( $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ )	Zéaxanthine : Chl <i>a</i> (mol : mol)	$\beta$ -carotène : Chl <i>a</i> (mol : mol)
15	0,070	0,045
250	0,700	0,042
700	1,420	0,047

Ces analyses ont montré que les thylacoïdes subissent des changements importants quant à leur capacité d'absorption de façon comparable aux résultats obtenus sur cellules *in vivo* (Figure 2 de l'article), et les analyses pigmentaires ont révélé la présence des trois pigments principaux (chl *a*, zéaxanthine et  $\beta$ -carotène) dans les thylacoïdes dans des quantités relatives différentes selon l'intensité lumineuse. La comparaison des spectres normalisés au pic de chl *a* dans le rouge montre un accroissement important de l'absorption des caroténoïdes, visualisable par une augmentation de l'absorption dans la région bleue du spectre, ainsi que par la forme du spectre à

700  $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ , typique de celle des caroténoïdes. Ceci est confirmé par les valeurs de rapports pigmentaires avec une quantité relative de zéaxanthine 20 fois plus importante à forte lumière qu'à basse lumière. Les rapports  $\beta$ -carotène : chl *a* sont relativement stables en fonction de l'intensité lumineuse. Par ailleurs, on observe clairement une augmentation progressive de l'absorption dans les UV proches avec l'émergence progressive d'un pic à 393 nm. L'origine de ce maximum est inconnue. Il pourrait s'agir d'un composé induit en condition de forte lumière ayant pour fonction la photoprotection contre les radiations bleu-violet.

La stabilité du rapport  $\beta$ -carotène : chl *a* suggère que la majeure partie de ces deux pigments sont fixes sur les mêmes complexes, ces derniers étant sous exprimés en forte lumière. Ceci est en accord avec la littérature rapportant que chez les cyanobactéries, la chl *a* et le  $\beta$ -carotène sont majoritairement liés par les protéines des centres réactionnels D1, D2, CP43, CP47, PsaA et PsaB (voir introduction). La quantité importante de zéaxanthine dans ces fractions enrichies en thylacoïdes est plus intrigante. En effet, la littérature que chez les cyanobactéries, la zéaxanthine est généralement liée par des caroténo-protéines insérées dans l'enveloppe cellulaire. Seule la caroténo-protéine de *Synechococcus* sp. PCC 7942 de 42 kDa a été isolée à partir d'une fraction thylacoïdale. Si la zéaxanthine est aussi liée par ce type de protéines chez *Synechococcus* sp. WH8102, comme semble le suggérer la présence dans le génome d'un gène homologue à celui d'*Arthrospira maxima* (Kerfeld et al., 2003, 2004 a, b), une partie du pool de cette protéine est localisée dans les thylacoïdes comme dans le cas de la protéine de 42 kDa de *Synechococcus* sp. PCC 7942. Par ailleurs, les rapports zéaxanthine : chl *a* étant plus faibles dans ces fractions thylacoïdales que dans les extraits pigmentaires de cellules totales, il est probable qu'il y ait aussi un pool de zéaxanthine présent dans l'enveloppe cellulaire, fixé ou pas à une caroténo-protéine. La purification de la caroténo-protéine de WH8102 est décrite dans le chapitre IV.

## **CHAPITRE II**

# **STRUCTURE ET PHOTOACCLIMATION DES PHYCOBILISOMES DE *SYNECHOCOCCUS* SP. WH8102**

## CHAPITRE II : Structure et photoacclimatation des phycobilisomes de *Synechococcus* sp. WH8102

### Contexte de l'étude

La caractérisation générale de la photophysologie de *Synechococcus* sp. WH8102 (chapitre précédent) nous a conduit à observer des indices suggérant d'importants changements de la structure des PBS au cours des phénomènes d'acclimatation à l'intensité lumineuse. Les PBS de la plupart des *Synechococcus* marins (nous verrons au chapitre suivant que ce n'est pas une généralité) sont structurellement parmi les plus complexes connus à ce jour, car ils possèdent quatre types de PBP. Ces PBS très particuliers ont suscité une remarquable série d'articles de l'équipe d'Alexander N. Glazer (notamment Ong et al. 1984, Ong & Glazer 1987, 1991; Swanson et al. 1991, Wilbanks et al. 1991, Wilbanks & Glazer 1993b). Malgré cela, un certain nombre d'imprécisions demeuraient quant à la structure précise de ces PBS, notamment au niveau des "linkers", des protéines qui assurent la cohésion des bras en maintenant en place les différents disques de PBP.

En nous basant sur les données génomiques de *Synechococcus* sp. WH8102, nous avons ainsi entrepris une étude biochimique de la structure de ces linkers et de l'effet de la photoacclimatation sur leur composition. Ce travail, réalisé en étroite collaboration avec Jean-Claude Thomas (ENS Paris), a fait l'objet d'un article publié dans le *Journal of Bacteriology*. A noter que l'identification des linkers a été réalisée par Laurent Thion sur le spectromètre de masse de la Station Biologique de Roscoff.

Quelques résultats relatifs à cette étude et non reportés dans l'article ci-après sont présentés en fin de chapitre.

### Résumé de l'article « Two Novel Phycoerythrin-Associated Linker Proteins in the Marine Cyanobacterium *Synechococcus* sp . strain WH8102 »

La récente disponibilité de la séquence du génome de *Synechococcus* sp. WH8102 permet d'avoir une vue globale sur la structure complexe des PBS de cette picocyanobactérie marine. Les analyses génomiques révèlent plusieurs caractéristiques de ces complexes constitués d'un cœur d'AP et de projections radiaires composées elles-mêmes d'un type de PC et de deux types de PE (I et II). Alors que l'AP paraît similaire à celle communément observée chez beaucoup de souches d'eau douce, la PC possède seulement deux sous-unités principales ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et deux polypeptides linkers (CpcG1 et CpcG2). Aussi il est fortement probable qu'il y ait un unique

disque de PC par bras. Par ailleurs, nous avons découvert deux nouveaux polypeptides linkers apparemment associés aux hexamères de PE, et qui semblent être spécifiques des *Synechococcus* marins. Le premier (SYNW2000) est inhabituellement long (548 résidus) et résulte apparemment de la fusion d'un paralogue de MpeC, un polypeptide linker de la PE II, et de CpeD, un polypeptide linker de la PE I. Le second (SYNW1989) présente une taille plus classique (300 résidus) et est aussi un paralogue de MpeC. Les analyses biochimiques révèlent que, tout comme MpeC, ces deux nouveaux polypeptides linkers sont chromophorylés avec une ou plusieurs molécules de phycourobiline. Nos données suggèrent qu'ils sont tous deux associés (partiellement ou totalement) à la PE II et nous proposons ainsi de dénommer SYNW2000 et 1989 MpeD et MpeE, respectivement. De plus, nous montrons dans ce travail que la photoacclimatation du PBS aux fortes lumières conduit à une réduction importante de la quantité de MpeC dans ces complexes, alors que les deux nouveaux polypeptides linkers ne varient pas de façon significative. Des modèles d'organisation structurale du PBS sont proposés dans la discussion.















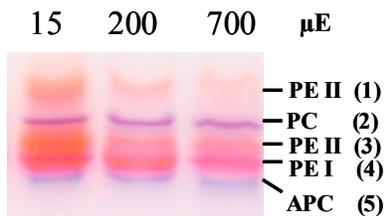






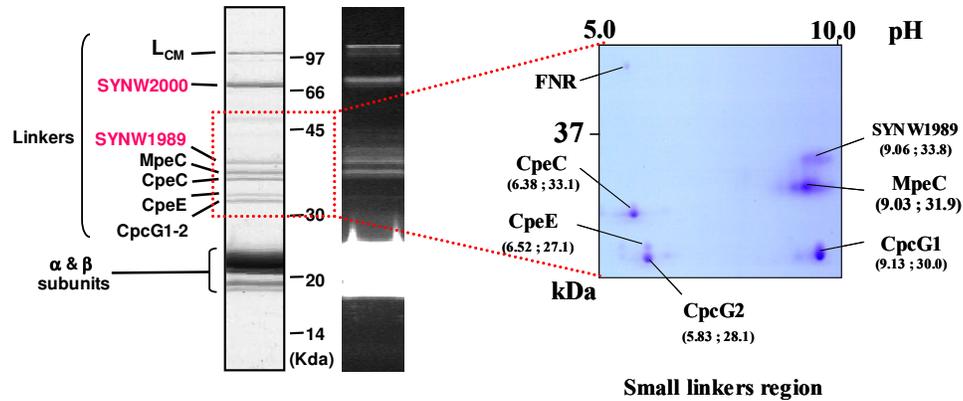
## Données complémentaires à cette étude

Les gels comparatifs en focalisation isoélectrique ont permis de présenter une preuve directe de la photorégulation des hexamères de PEII (Figure 5 de l'article). Ces gels sont très colorés et la fluorescence des PBP est spectaculaire. Sur le profil suivant en couleur (Figure 70), une ligne supplémentaire présente la composition relative des PBS de *Synechococcus* sp. WH8102 acclimaté à 700  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Cette dernière ligne présente légèrement moins de PEII que la ligne 250  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . La composition en polypeptides de liaison de cultures à 700  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  n'a pas été déterminée. Il est possible que le linker MpeE, que nous avons placé juste avant MpeC dans le modèle, soit sous-exprimé en très forte lumière. Le PBS perdrait alors un hexamère de plus.



**Figure 70** : Version couleur de profils IEF comparatifs reflétant les proportions relatives des PBP dans le PBS de *Synechococcus* sp. WH8102 cultivé de 15 à 700  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

L'analyse en électrophorèse dénaturante mono dimensionnelle combinée à la spectrométrie de masse nous a permis de détecter la quasi intégralité des linkers du PBS de *Synechococcus* sp. WH8102. Toutefois, l'électrophorèse dénaturante bidimensionnelle (masse moléculaire contre point isoélectrique) permet de séparer clairement les linkers de taille moyenne, une région difficilement résolue en système mono dimensionnel (Figure 71). À l'aide des données génomiques permettant de déterminer les valeurs théoriques de masse moléculaire et de point isoélectrique, l'analyse de la répartition des spots présents entre 30 et 50 kDa permet de visualiser l'ensemble des linkers de taille moyenne, y compris les deux linkers cœur-membrane ( $L_{RC}$ ) non résolus en une dimension (Figure 4 de l'article).



**Figure 71 :** Etude bidimensionnelle des linkers de taille moyenne du PBS de *Synechococcus* sp. WH8102. Gauche : profil monodimensionnel de PBS annoté ( $15 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) et visualisation par fluorescence sous UV. Droite : analyse résolutive en deux dimensions de la région des linkers de taille moyenne. Les chiffres entre parenthèses sont les coordonnées théoriques des spots de linkers déterminées à l'aide du génome (Point isoélectrique ; Masse moléculaire en kDa).

Les analyses spectroscopiques des PE de *Synechococcus* sp. WH8102 (Figure 7 de l'article) suggèrent que leur pigmentation est similaire à celles isolées par (Ong & Glazer 1991) chez la souche phylogénétiquement proche WH8103. Ces auteurs ont en effet déterminé que la PEI de *Synechococcus* sp. WH8103 lie cinq chromophores : 1 PEB + 1 PUB sur la sous-unité  $\alpha$  et 2 PEB + 1 PUB sur la sous-unité  $\beta$ . La PEII porte 6 chromophores : 3 PUB sur  $\alpha$  et 2 PEB + 2 PUB sur  $\beta$ . Afin d'établir avec certitude le fait que *Synechococcus* spp. WH8102 et WH8103 possèdent des PE identiques, les rapports molaires PUB :PEB des quatre sous-unités de PE de la souche WH8102 ont été déterminés. A partir des fractions purifiées de PE obtenue par focalisation isoélectrique en conditions natives, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de chacune des PE ont été séparées par électrophorèse dénaturante bidimensionnelle. Les propriétés d'absorption des spots dénaturés dans l'urée acide ont permis de déterminer les rapports PUB :PEB. Ceux-ci correspondent à ceux observés chez la souche WH8103 (Ong & Glazer 1991). Le fait que ces deux souches possèdent les mêmes complexes de PE mais un rapport PUB : PEB différent (0,8 pour WH8103 et 1,9 pour WH8102) pourrait s'expliquer par le fait que WH8102 ait un hexamère de plus par bras de PBS.

Par ailleurs, nous avons retrouvé un homologue du gène *aplA* décrit chez *Fremyella diplosiphon* dans les trois génomes de *Synechococcus* marins disponibles au laboratoire (Montgomery et al. 2004). Ce gène dont le produit pourrait être un photorécepteur, est bien conservé dans le génomes eds souches WH8102, WH7803 et RCC307 et est situé dans la région génomique du PBS. Chez WH8102, il correspond à SYNW1996.

## CHAPITRE III

# L'ADAPTATION CHROMATIQUE DE GROUPE IV CHEZ LES *SYNECHOCOCCUS* MARINS

## CHAPITRE III : L'adaptation chromatique de groupe IV chez les *Synechococcus marinus*

### Contexte de l'étude

Les phénomènes d'adaptation chromatique (AC) sont étudiés depuis très longtemps chez les oxyphotoobactéries d'eau douce. Chez les souches marines planctoniques, ce type d'acclimatation a longtemps semblé absent. Toutefois, certaines souches de *Synechococcus marinus* sont capables d'un mode d'AC originale, que l'on peut appeler de « groupe IV » par extension de la nomenclature existante (types I à III ; Tandeau de Marsac, 1977), et consistant en une acclimatation aux radiations vertes et bleues abondantes en milieu marin (Palenik 2001). En collaboration avec Craig Everroad (laboratoire de Michelle Wood, Oregon, USA), nous avons étudié les souches de *Synechococcus* spp. M16.17 et M11.1, isolées par M. Wood, et capables de s'adapter à la couleur de la lumière de façon similaire à la souche CC9913, étudiée précédemment par Palenik (2001). Les mécanismes responsables du changement de pigmentation lors de l'AC de groupe IV étaient totalement inconnus et le but de nos expérimentations a été de donner les premières bases vers une compréhension des processus biochimiques permettant ce type de photoacclimatation. De plus, la détermination de la position phylogénétique des souches étudiées permet de comparer nos résultats avec ceux de Palenik (2001). La partie expérimentale de ce travail est en cours de finalisation, et il donnera lieu à un article scientifique dont Craig Everroad sera le premier auteur. Mon implication dans cette étude est majeure puisque j'ai réalisé l'acclimatation des cultures à différentes qualités spectrales de lumière, mené une partie importante des manipulations de biochimie ainsi que les arbres phylogénétiques préliminaires présentés ici. Je participerai activement à la rédaction du manuscrit. Sur mon initiative, ce sujet d'étude a par ailleurs fait l'objet d'un atelier de recherche de l'unité d'enseignement Océanographie du Master de Paris VI, au cours duquel j'ai participé activement à l'encadrement des étudiants.

## L'adaptation chromatique de groupe IV chez les *Synechococcus* marins

### Introduction

La grande majorité des oxyphotobactéries possèdent des antennes photosynthétiques extrinsèques aux membranes thylacoïdales composées de complexes de PBP hydrophiles : les PBS. Ces dernières lient des phycobilines qui confèrent à ces organismes la capacité d'absorber les longueurs d'ondes que la chl *a* et les caroténoïdes absorbent peu. Certaines souches telles que *Fremyella diplosiphon* et *Synechocystis* sp. PCC 6714 sont connues pour moduler la composition en chromophores de leur antenne photosynthétique en fonction des radiations présentes dans leur environnement lumineux par un phénomène nommé adaptation chromatique (AC ; Tandeau de Marsac 1977, Grossman et al. 2001). Les oxyphotobactéries de groupe I ne sont pas capables d'adapter leur PBS à la qualité de la lumière sous laquelle elles poussent et ce type regroupe la majorité des souches de cyanobactéries connues (Tandeau de Marsac 1977, 1983). Le groupe II rassemble des bactéries possédant de la PE et capables d'en augmenter la proportion en réponse à la lumière verte. Chez les oxyphotobactéries telle que *Fremyella diplosiphon* pratiquant l'AC de groupe III (dite AC complémentaire ou CCA en anglais, Tandeau de Marsac, 1977), la PE est synthétisée en réponse à la lumière verte, et la PC à la lumière rouge. Ces phénomènes d'AC permettent ainsi d'optimiser la capture de l'énergie lumineuse en fonction de la qualité spectrale de l'environnement lumineux ambiant. Palenik (2001) a décrit, principalement chez la souche marine *Synechococcus* sp. CC9311, un mode particulier d'AC dit de groupe IV (B. Palenik, comm. Pers.). Il consiste en une modulation du rapport PUB:PEB en lumière bleue, blanche et verte. En lumière bleue, la quantité relative de PUB (abs 495 nm) est importante alors qu'en lumière blanche ou verte, il y a plus de PEB (abs 545 nm) que de PUB dans les cellules. Par ailleurs, d'après une étude basée sur les séquences du gène *rpoC*, il semblerait que certaines de ces souches soient phylogénétiquement très proches et regroupées au sein d'un même clade (Palenik, 2001). Ce phénomène, s'il s'avérait être courant chez les populations naturelles de *Synechococcus* marins, pourrait avoir une importance écologique en contribuant à l'adaptabilité des cellules aux changements des propriétés optiques de l'eau de

Plusieurs hypothèses son envisageables pour expliquer les mécanismes permettant ce type d'AC :

- Les variations constatées du rapport PUB:PEB pourraient trouver leur origine dans une variation du rapport PEI:PEII, ces deux PE présentant généralement des rapports de ces phycobilines très différents (Ong & Glazer 1991, Six et al. 2005). Si cette hypothèse est valide, le nombre d'hexamères de PEII serait simplement réduit (voire absents des PBS) et les bras seraient alors plus courts en lumière verte ou blanche.
- Une autre possibilité est qu'une autre PE présentant des propriétés optiques similaires à une PEI (donc riche en PEB) soit synthétisée en réponse à la lumière verte/blanche et remplace la PEII riche en PUB présente en lumière bleue.
- Enfin, une dernière hypothèse repose sur des réactions d'isomérisation des bilines. Une ou plusieurs isomérases seraient capables de transformer la PEB en PUB *in situ* sur les PE.

Dans ce travail, nous avons étudié deux souches de *Synechococcus* marins, M11.1 et M16.17, capables d'adaptation chromatique de groupe IV. Nous avons cherché à comprendre les mécanismes induisant les variations des propriétés optiques des PBS de ces souches.

## **Matériel & Méthodes**

*Synechococcus* spp. M11.1, M21.B3 et M16.17 ont été isolés en février 2004 dans le Golfe de Mexico (27°42' N ; 91°18' W) à 275 m de profondeur. Ces souches ont été cultivées à 22 °C en milieu PCR-S11 (Rippka et al. 2000) enrichi en nitrate de sodium (5 mM). Une intensité lumineuse de 10  $\mu\text{mol photons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  était fournie par des tubes fluorescents Sylvania daylight 58W/154. Pour les éclairages en lumière bleue et verte, les cultures ont été recouvertes de rhodoïdes bleus ou verts (LEE filters, Moonlight blue et Primary green) présentant des maxima de transmittance à 450 nm et 525 nm, respectivement. Les cultures ont été acclimatées à ces environnements lumineux pendant un mois avant de commencer les analyses.

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence *in vivo* à température ambiante ont été enregistrés comme décrit par (Six et al. 2004) et les mesures de pigments hydrophobes ont été réalisées par HPLC suivant la procédure décrite au chapitre V. Les manipulations comprenant notamment la purification de complexes de PE par électrophorèse en focalisation isoélectrique native, la purification des PBS intacts et leur caractérisation ont été menées suivant les protocoles décrits par Six et al. (2005 ; chapitre II).

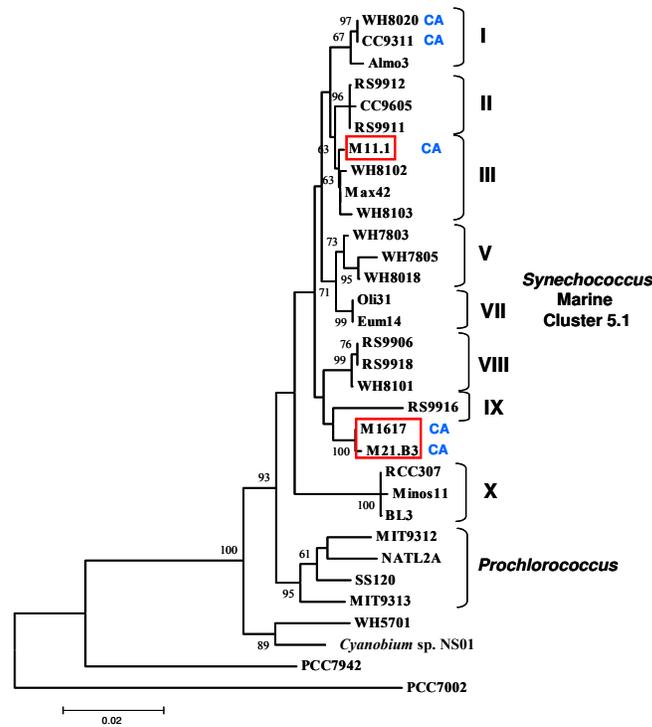
Les séquences partielles (870 paires de base) de l'ARN 16S des deux souches étudiées ainsi que d'une autre souche, M21.B3, ont été obtenues par Craig Everroad (University of

Oregon, USA) et intégrées à un alignement de séquences fait par Fuller et al. (2003) et cordialement fourni par le laboratoire de Dave Scanlan (Warwick university, UK). Afin d'offrir des résultats comparables, l'arbre phylogénétique a été construit similairement aux critères de Fuller et al., (2003).

## **Résultats**

### *Position phylogénétique des souches étudiées*

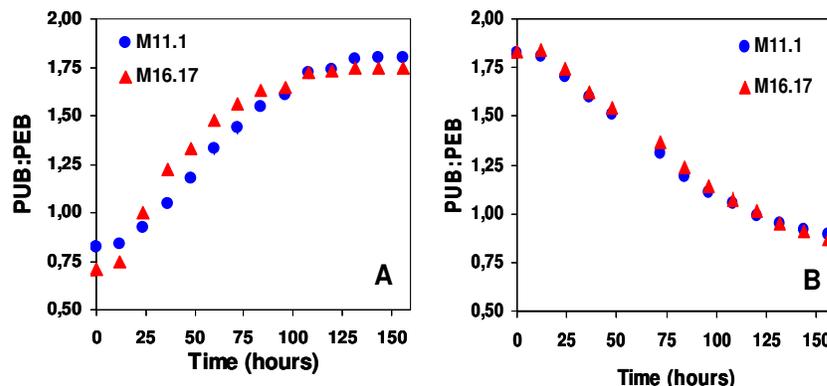
La construction d'un arbre phylogénétique à partir de séquences partielles du gène de l'ARN 16S des deux souches M11.1 et M16.17 (Figure 72) nous a permis de constater que *Synechococcus* sp. M11.1 appartient à un clade différent de *Synechococcus* spp. M16.17 et M21B3. *Synechococcus* sp. M11.1 semble appartenir au même clade que WH8102 (Clade III). Palenik (2001) avait déjà noté que la souche WH8113, appartenant au clade III, était capable de CA de groupe IV (cette souche, dont le 16S n'a pas encore été séquencé complètement, n'a pu être représentée dans l'arbre, Figure 76). Les souches M16.17 et M21B3 semblent phylogénétiquement proches l'une de l'autre et semblent former un sous-groupe du clade IX, voire peut être un nouveau clade. La position des trois souches est conservée lorsqu'on utilise la méthode de parcimonie. Ces résultats nous ont conduit à ne retenir que les souches M11.1 et M16.17 pour la suite des analyses.



**Figure 72 :** Arbre phylogénétique des séquences partielles d'ARN 16S avec détail sur le cluster 5.1. La méthode utilisée est celle du Neighbour Joining avec correction de Kantor-Jukes. Les séquences partielles de *Synechococcus* spp. M11.1 et M21B3 et M16.17 (rouge) ont été ajoutées à l'alignement initial. M21.B3 est une souche issue du même prélèvement que M16.17 et aussi capable d'adaptation chromatique. NCA : souche ne pratiquant pas l'AC.

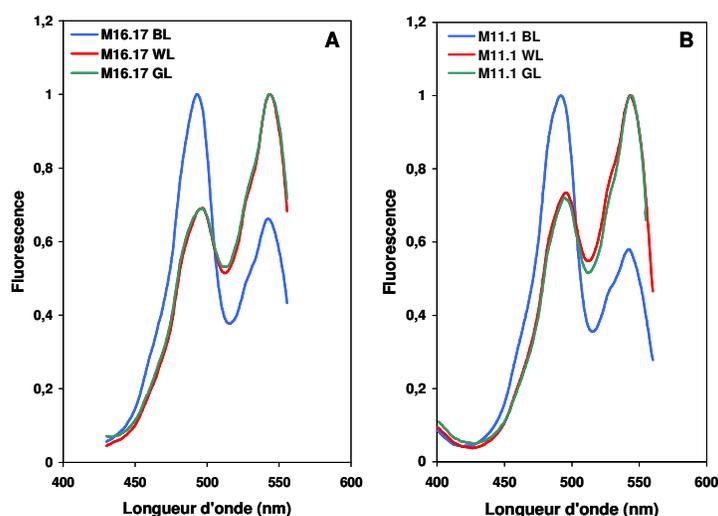
*Mesures in vivo*

Lorsque les souches de *Synechococcus* spp. M11.1 et M16.17 sont cultivées en lumière blanche, puis transférées en lumière bleue et *vice versa*, le rapport PUB:PEB commence à varier significativement après 24 heures (Figure 73). Les cultures, maintenues en phase exponentielle par dilutions successives, se sont adaptées à leur nouvel environnement lumineux en environ dix jours, les rapports évoluant de façon similaire pour les deux souches.



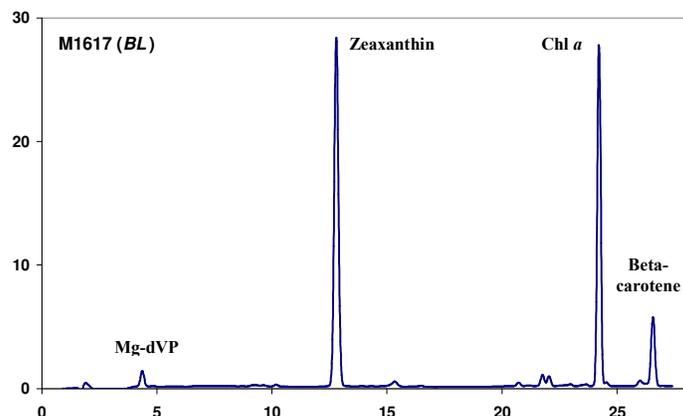
**Figure 73** : Evolution du rapport PUB :PEB chez *Synechococcus* spp. M11.1 et M16.17 lors d'un transfert de lumière blanche à bleue (A) et bleue à blanche (B).

Les spectres d'excitation de fluorescence (Figure 74) présentent deux maxima principaux à 495 (PUB) et 543 nm (PEB) sur lesquels sont basés les calculs de rapport PUB:PEB. Un épaulement vers 535 nm est observable. En lumière blanche ou verte, M16.17 et M11.1 présentent un rapport de 0,7 et 0,8, alors qu'en lumière bleue les valeurs atteignent 1,7 et 1,8, respectivement. Les cultures présentent en effet des couleurs différentes selon la qualité spectrale de la lumière de culture. En lumière blanche et verte, elles sont rouge-roses alors qu'elles sont orange-brunes en lumière bleue.



**Figure 74** : Spectres d'excitation de fluorescence *in vivo* de *Synechococcus* spp. M16.17 (A) et M11.1 (B) adaptés en lumière bleue, blanche et verte.

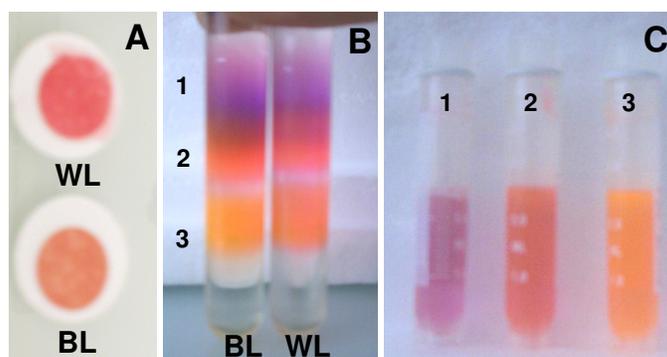
L'analyse des pigments hydrophobes par HPLC a révélé que les deux souches possèdent la même composition pigmentaire membranaire avec une petite quantité de Mg-DVP  $a_5$  (Figure 75). Ce dérivé chlorophyllien n'avait jamais été observé précédemment chez une cyanobactérie à PBS. Toutefois, nous l'avons retrouvé chez plusieurs autres souches de *Synechococcus* marins (C. Six, non publié). Les rapports de pigments à la chl  $a$  n'ont pas varié quelle que soit la couleur de la lumière ambiante.



**Figure 75** : Chromatogramme typique de *Synechococcus* spp. M16.17 ou M11.1, en lumière bleue, blanche ou verte.

#### *Etude des antennes photosynthétiques*

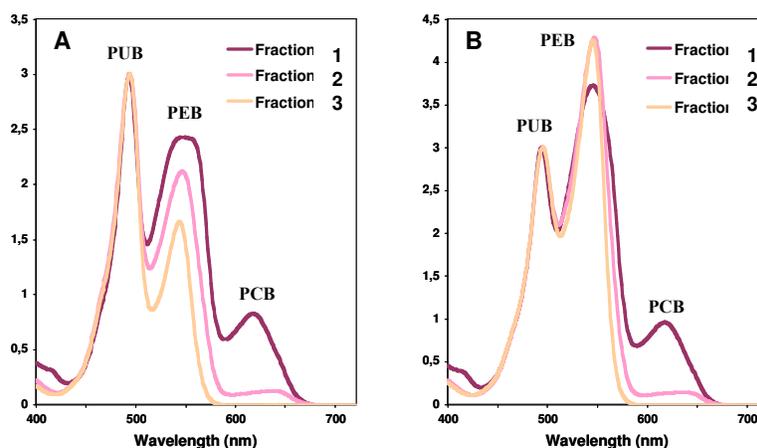
Les fractions solubles des deux souches en lumière blanche et bleue ont été dissociées sur gradient de viscosité. Les deux souches ont des caractéristiques similaires. Trois bandes distinctes, vivement colorées et très fluorescentes, ont été obtenues pour les quatre échantillons avec, de façon invariable, une fraction violette dans la partie 5-9% (Figure 76). Une seconde bande, rose pour les souches en lumière blanche et orange pour les souches en lumière bleue, et dont une partie chevauche la bande violette, est présente entre 8 et 13% du gradient. Enfin, le bas des gradients (15-20%) est occupé par une fraction elle aussi rose pour les souches cultivées en lumière blanche et orange pour celles en lumière bleue.



**Figure 76** : filtrats de cellules de *Synechococcus* sp. M16.17 (A) cultivé en lumière blanche (BL) et bleue (WL), dissociation de la fraction soluble sur gradient de viscosité (B) en trois fractions colorées du gradient (C).

Les propriétés d'absorption des différentes fractions colorées des gradients de viscosité ont été étudiées (Figure 77). Les spectres ont révélé que les fractions violettes (1) sont

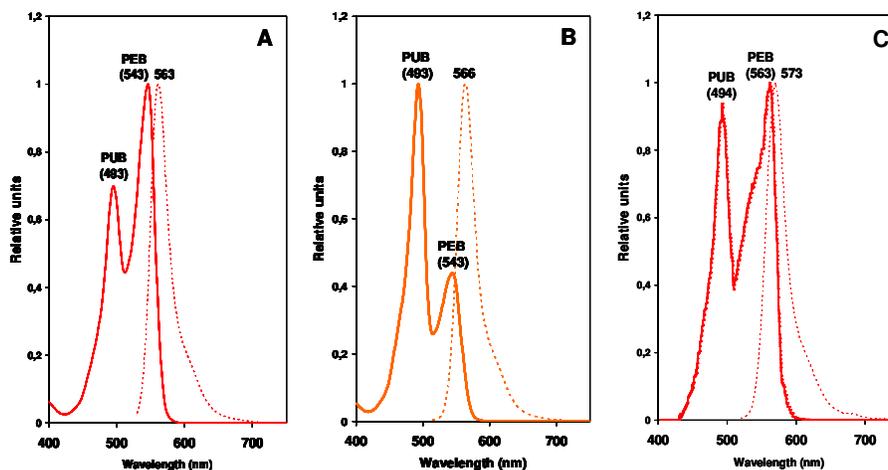
relativement riches en PCB, suggérant un enrichissement en PC et AP. Elles présentent aussi un double pic de PEB, le second étant probablement lié à la présence d'une PC de type R-PC (Six et al. 2005 ; chapitre II). Le maximum à 495 nm indique la présence de PUB et donc de PE. L'analyse de ces fractions par focalisation isoélectrique native montre la prédominance d'une bande violette et d'une bande bleue correspondant respectivement à la PC et à l'AP. La couleur violette suggère que la PC est de type R-PC. Une bande rose se trouve aussi en quantité relativement importante. Ses propriétés optiques sont présentées en Figure 78C. Ce complexe de PE présente un rapport PUB:PEB de 0,7 et un maximum d'émission de fluorescence à 573 nm.



**Figure 77** : Spectres d'absorption des fractions colorées des gradients de viscosité de *Synechococcus* sp. M16.17 cultivé en lumière bleue (A) et blanche (B), normalisés au maximum de PUB. Des résultats similaires ont été obtenus pour *Synechococcus* sp. M11.1.

En lumière bleue, la fraction intermédiaire (2) est riche en PE comme le montre la faible absorption vers 630 nm (PCB ; Figure 77A). Elle contient trois complexes de PE : un rose et deux oranges. Les complexes oranges sont optiquement identiques entre eux et présentent un rapport PUB:PEB de 2,3 (absorption) et un maximum d'émission de fluorescence à 566 nm (Figure 78A). Le complexe rose présente les mêmes propriétés optiques que celui des fractions violettes supérieures (Figure 78C). Les complexes orange correspondent vraisemblablement à une PEII riche en PUB, et le complexe rose à une PEI (plus riche en PEB). La fraction inférieure est dépourvue de PCB et ne contient donc que de la PE. En lumière bleue, l'analyse en focalisation isoélectrique native montre la prédominance de deux complexes orange migrant de la même façon que les complexes orange de la fraction intermédiaire, et présentant les mêmes propriétés optiques. Cette fraction contient donc vraisemblablement des complexes de PEII quasi-purs.

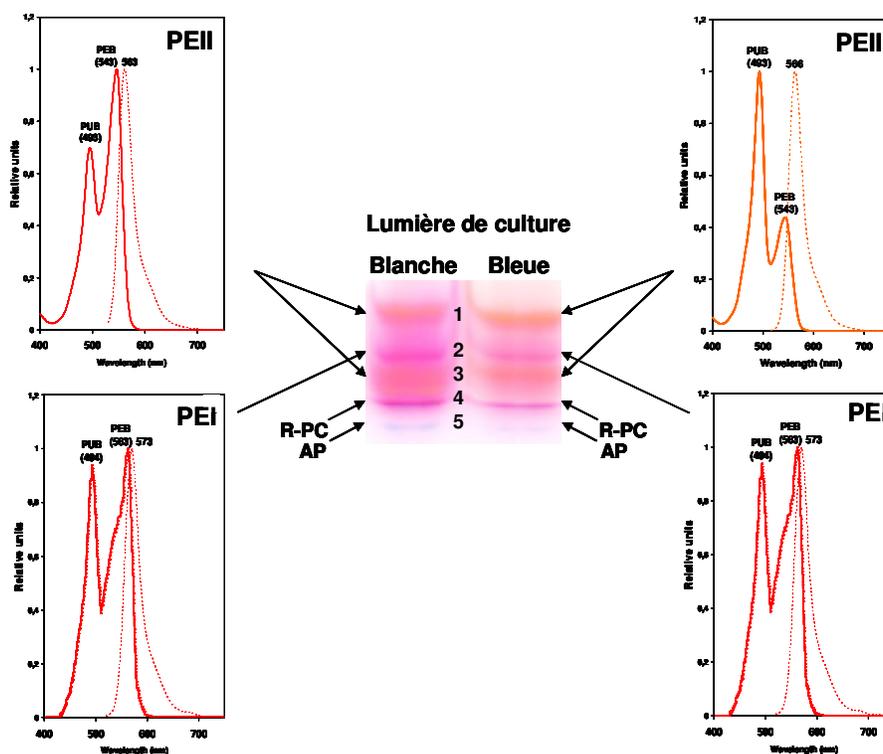
Ces observations sont tout à fait analogues aux résultats obtenus sur les PBP isolés de *Synechococcus* sp. WH8102 (Six et al., 2005 ; Chapitre II).



**Figure 78** : Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence des complexes majoritaires de PE chez *Synechococcus* sp. M16.17 cultivé en lumière blanche (A) et bleue (B), et de la PE mineure insensible à la couleur de la lumière (C). Les mêmes complexes ont été isolés chez M11.1.

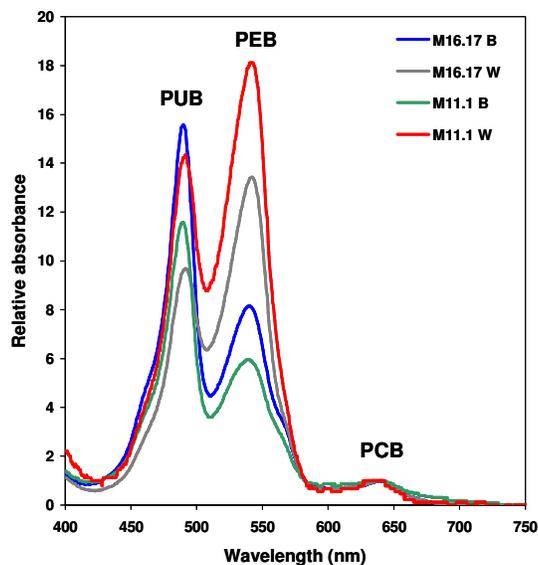
En lumière blanche, la fraction intermédiaire contient aussi trois complexes de PE. Ils ont tous une couleur rose et présentent tous un rapport PUB:PEB de 0,7 (Figure 78). Deux d'entre eux migrent de la même façon que les complexes orange de l'échantillon de lumière bleue et présentent un maximum d'émission de fluorescence à 563 nm. Le troisième complexe rose de PE présente un maximum d'émission de fluorescence à 573 nm et correspond ainsi à celui déjà observé dans les fractions violettes et la fraction intermédiaire des échantillons de lumière bleue. La fraction inférieure du gradient de viscosité des échantillons de lumière blanche contient uniquement les deux complexes roses fluorescents à 563 nm.

Ainsi, la principale différence entre échantillons issus des cultures en lumière blanche et bleue est le changement des propriétés optiques des complexes de PE majeurs. Ceci est plus clairement visualisable sur des gels en focalisation isoélectrique native sur lesquels ont été chargées les fractions solubles totales (non dissociées ; Figure 79). On voit deux bandes de PE (bandes 1 et 3) ayant des propriétés d'absorption identiques : roses en lumière blanche (PUB:PEB = 0,8 ; fluo max à 563 nm) et oranges en lumière bleue (PUB:PEB = 2,3 ; fluo max à 566 nm). Une bande rose (bande 2 ; PUB:PEB = 0,9 ; fluo max à 573 nm), migrant indépendamment des deux complexes précédents, est toujours présente quelle que soit la qualité de la lumière. De même, l'AP (bande 5) et la PC (bande 4) sont invariables.



**Figure 79** : Gel comparatif en focalisation isoélectrique native de la fraction soluble de *Synechococcus* sp. M16.17 cultivé en lumière blanche et bleue, avec un rappel des propriétés optiques des différents complexes de PE présents.

Les PBS de chaque échantillon ont été purifiés sur gradient de saccharose. Les complexes de lumière bleue et blanche ont migré à la même position chez les deux souches, suggérant que la taille des PBS n'est pas modifiée par la qualité de la lumière. Leurs spectres d'absorption sont similaires aux spectres d'excitation de fluorescence *in vivo* et confirment que les PBS contiennent plus de PUB en lumière bleue et plus de PEB en lumière blanche. Par ailleurs, les spectres d'absorption des deux échantillons de lumière bleue sont très similaires à ceux de la souche WH8102, avec un épaulement typique à 565 nm (Figure 80 ; Six et al. 2005, chapitre II). En lumière blanche, les PBS des deux souches ont des propriétés d'absorption identiques à celles de la souche WH8020 (Ong & Glazer 1991).



**Figure 80** : Spectres d'absorption des PBS intacts de *Synechococcus* spp. M11.1 et M16.17 cultivés en lumière blanche et bleue. Les maxima sont exprimés en nm.

Les premières analyses SDS-PAGE ont révélé chez les deux souches la présence d'un linker d'environ 60 kDa probablement homologue du linker MpeD décrit chez WH8102, ainsi que deux autres linkers chromophorylés (PUB), probablement MpeE et MpeC (JC Thomas, comm. pers.). Elles suggèrent par ailleurs qu'il n'y a aucune variation dans la composition en linkers  $L_R$  entre les échantillons issus de culture en lumière bleue et blanche. D'autres analyses sont nécessaires afin de préciser la taille de la  $L_{CM}$ .

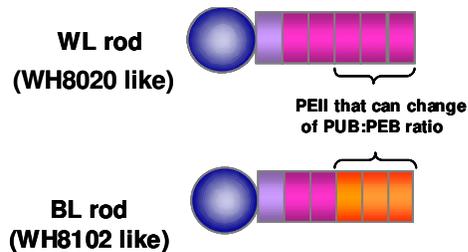
## Discussion

Les mesures réalisées *in vivo* ont montré que *Synechococcus* spp. M16.17 et M1.1 réagissent de façon similaire à la souche CC9311 étudiée par Palenik (2001). Les données présentées chez CC9311 sont cependant ambiguës car il est reporté que le rapport PUB:PEB de cette souche peut varier entre 0,66-0,71 et 0,96-1,8. Or, la cinétique présentée par Palenik (2001) correspondant à un transfert des cultures de CC9311 d'une lumière bleue à blanche montre une variation de 0,97 à 0,71 seulement en 200 heures (soit 8,3 jours). Nos résultats montrent que *Synechococcus* spp. M11.1 et M16.17 sont capables de faire varier leur rapport PUB:PEB d'un facteur 2,5 en huit jours. Ainsi, les souches que nous avons étudiées seraient capables d'une acclimatation plus efficace et/ou rapide que CC9311. Par ailleurs, les analyses phylogénétiques montrent que les souches capables d'ACC de type IV sont dispersées dans le cluster 5.1, confirmant les résultats de Palenik (2001). La souche M11.1 pourrait être proche de WH8113 qui appartient au même groupe

(d'après un arbre basé sur des séquences du gène *rpoC1*). De façon intéressante, les souches M16.17 et M21B3 sont les premières souches capables d'ACC de type IV appartenant au (ou proche du) clade IX. Des analyses phylogénétiques plus fines (en cours) devraient permettre de déterminer si elles forment ou non un nouveau clade. En tout cas, il semble clair que cette capacité de s'acclimater à la qualité spectrale de la lumière soit apparue plusieurs fois au cours de l'évolution du cluster 5.1. Des analyses génétiques seraient nécessaires pour savoir si le résultat de transfert latéraux de gènes au sein de ce cluster.

Nos résultats ont mis en évidence cinq types de complexes de PBP dans les PBS de *Synechococcus* spp. M16.17 et M11.1. La partie proximale des antennes est constituée d'un cœur probablement trimérique d'AP avec une  $L_{CM}$  d'une centaine de kDa pour M11.1 et d'un peu plus pour M16.17. Ceci suggère une organisation du cœur des PBS différente entre les deux souches. Les complexes d'AP isolés par focalisation isoélectrique native présentent un maximum d'excitation à 651 nm et un maximum d'émission de fluorescence à 662 nm (non montré). La bande de PC visualisée sur gel a une couleur clairement violette. De plus les propriétés spectroscopiques de cette bande ainsi que celles des produits de dissociation de la fraction soluble suggèrent que la PC est de type R-PC et porte ainsi une ou deux molécules de PEB. Puisque les bilines concernées par l'ACC de type IV sont la PEB et la PUB, nous avons porté notre attention sur les complexes de PE. L'un d'entre eux, présent dans les fractions supérieures des gradients de viscosité, est visualisable sur gel sous la forme d'une bande rose quelque soit la couleur de la lumière. Ses propriétés optiques sont identiques aux PEI isolées chez les souches WH8103 (Ong et Glazer, 1991) et WH8102 (Six et al., 2005 ; chapitre II), avec un épaulement caractéristique au niveau du pic d'absorption de PEB et un maximum d'émission de fluorescence à 573 nm. Les deux autres types optiques de PE présents fluorescent tous deux vers 565 nm et sont vraisemblablement des complexes de type PEII. Ils sont différenciés selon la couleur de la lumière. Ainsi, en lumière bleue, ils présentent un rapport PUB:PEB de 2,3 alors qu'en lumière blanche, ce rapport est de 0,75. Ces PEII sont optiquement identiques à celles isolées chez les souches WH8103 et WH8102 d'une part (Ong & Glazer, 1991 ; Six et al., 2005 ; chapitre II), et WH8020 d'autre part (Ong & Glazer, 1991). La différence entre les PBS de lumière blanche et bleue consiste donc uniquement en un changement des propriétés d'absorption des complexes de PEII. Par analogie aux PEII connues chez les *Synechococcus* marins, il est probable qu'en lumière bleue, les sous-unités de PEII de *Synechococcus* spp. M11.1 et M16.17 lient 3 PUB et 2 PEB alors qu'en lumière blanche, ils portent 2 PUB et 3 PEB (Ong & Glazer, 1991). La PEB accepteuse, probablement placée en  $\beta$ -82, présente une conformation différente selon les propriétés d'absorption de la PEII car celle-ci présente un maximum d'émission de

fluorescence différent en lumière bleue et blanche (3-4 nm de différence). Ces deux conformations permettent toutes deux un transfert d'énergie à la PEI.



**Figure X** : Modèle de composition des bras des PBS de *Synechococcus* spp. M11.1 et M16.17 en lumière blanche et bleue.

Deux hypothèses de mécanisme global sont envisageables. Tout d'abord, un système de lyase(s)-isomérase(s), activé différenciellement selon la qualité spectrale de la lumière, pourrait agir directement sur les chromophores à l'intérieur même des PBS. Cependant, les propriétés de transfert du PBS sont rendues possibles par un agencement des PBP et une conformation des phycobilines très précis. L'action d'une isomérase *in situ* impliquerait un désassemblage temporaire des complexes, ce qui semble peu vraisemblable. De plus, on sait que l'action des lyases-isomérases décrites à ce jour est irréversible (Storf et al. 2001). L'autre hypothèse, plus vraisemblable, envisage une synthèse *de novo* de PBS ayant des propriétés d'absorption adaptées à la qualité de la lumière ambiante. Une lyase simple, fixant aux PEs des molécules de PEB, serait activée en lumière blanche, tandis qu'une lyase-isomérase fixant une molécule de PEB puis l'isomérisant en PUB serait préférentiellement activée en lumière bleue. Il est possible qu'une seule enzyme soit capable de gérer ces réactions, peut-être selon son état de phosphorylation. Ainsi, un contrôle par la qualité de la lumière de l'activation de l'activité isomérase permettrait la synthèse de molécules de PEs aux propriétés optiques les plus adéquates. Ces PBS néosynthétisés, mieux adaptés aux nouvelles conditions de lumière, viendraient ensuite progressivement remplacer les PBS existants au cours des générations successives (avec un temps de génération d'un peu moins d'un jour dans nos conditions de culture, il semble qu'au moins 8-10 générations semblent nécessaires pour renouveler l'intégralité du pool de PBS des cellules).

Par homologie avec les cyanobactéries d'eau douce capables d'ACC, comme *Fremyella diplosiphon*, il est également possible que deux sets différents de gènes *mpeBA* soient présents dans le génome des souches marines étudiées ici. La transcription de l'un ou l'autre de ces deux sets serait activée selon la qualité de la lumière ambiante ; mais une chromophorylation différente d'un

même apo-hétérodimère  $\alpha\beta$  est aussi envisageable (il n'y aurait alors qu'un seul set de gènes *mpeBA*). Dans ces deux derniers cas, on peut penser que l'un ou l'autre de deux sets de linkers de PEII soient également synthétisés en fonction de la lumière ambiante. Nos analyses de la variation de la composition en polypeptides de liaison tendent à réfuter cette hypothèse. Par ailleurs, le phénomène d'ACC implique qu'un photorécepteur perçoive le signal de changement de qualité de la lumière ambiante, et qu'il transduise ce signal à une enzyme, par exemple par l'intermédiaire d'un phospho-relais, tel qu'il en existe chez *Fremyella diplosiphon* (voir introduction).

D'un point de vue écologique, la capacité pour des cellules de *Synechococcus* d'adapter les propriétés optiques de leur PBS apparaît être un avantage incontestable pour répondre rapidement aux variations de la « couleur » des eaux marines. Deux gradients environnementaux peuvent être considérés : vertical (eaux de surface–eaux profondes) et horizontal (côte–large). En effet, en profondeur, les radiations bleues sont prédominantes, la lumière verte pénétrant moins profond dans la colonne d'eau. Ainsi, les *Synechococcus* marins capables d'ACC pourraient s'adapter aux radiations présentes selon qu'ils se trouvent en surface ou en profondeur. Ceci semble particulièrement utile dans les zones où les eaux sont très mélangées comme, par exemple, les zones d'upwelling. Il est assez étonnant que les souches M11.1 et M16.17 aient été isolées à 275 m de profondeur, et l'on peut imaginer que c'est le résultat d'un brassage vertical récent qui les aurait entraînées à une telle profondeur. En effet, l'intensité infinitésimale de lumière ambiante est incompatible avec la croissance et à la photosynthèse de telles cellules. D'autre part, les eaux du grand large (type I) laissent pénétrer les radiations bleues en abondance alors que les eaux de type II charrient des particules et des substances jaunes qui confèrent à l'eau une « couleur » plus verte, ces caractéristiques pouvant varier de façon saisonnière. Les *Synechococcus* marins capables d'ACC pourraient ainsi s'adapter spatialement et temporellement aux variations des qualités spectrales de l'eau de mer. Plusieurs études ont montré que le rapport PUB:PEB des populations de *Synechococcus* marins varient en accord la couleur de l'eau (Olson et al., 1988, 1990 ; Lantoine & Neveux 1997 ; Wood et al. 1998, 1999 ; Sherry & Wood 2001, Campbell & Iturriaga, 1988). Cela se traduit notamment par la présence de deux populations de *Synechococcus* en cytométrie en flux. Nos analyses cytométriques montrent que la fluorescence orange de *Synechococcus* spp. M11.1 et M16.17 varie selon la lumière et que ces cellules peuvent donc être détectées *in situ* dans l'une ou l'autre des populations cytométriques. Il a souvent été considéré que les *Synechococcus* marins possèdent des rapports de phycobilines fixes, et que les variations du rapport PUB:PEB *in situ* correspondent à des populations présentant diverses proportions de cellules à rapport PUB:PEB différent et fixe. Toutefois, si l'abondance des cellules capables d'AC type IV dans les milieux naturels s'avérait abondante, ces considérations seraient à revoir. La diversité génétique de ces

clones semble importante (Palenik, 2001, cette étude) et leur abondance dans la colonne d'eau n'a jamais été estimée.

## **CHAPITRE IV**

# **PHOTODOMMAGES ET PHOTOPROTECTION CHEZ LES *SYNECHOCOCCUS* MARINS**

## CHAPITRE IV : Photodommages et photoprotection chez les *Synechococcus marins*.

### Contexte de l'étude

Ce chapitre expose et discute des données non publiées relatives aux photodommages et aux caroténo-protéines chez les *Synechococcus marins*. La première partie concerne les dommages subis par les PBS durant une exposition à d'importantes doses d'UV chez *Synechococcus sp.* WH8102. Ce travail a été initié en 2004 au cours de l'atelier de travail « Physiologie et génomique des cyanobactéries marines : mécanismes impliqués dans la photoacclimatation » organisé dans le cadre du DEA d'Océanologie Biologique de Paris VI par Jean-Claude Thomas et moi-même.

La seconde partie décrit la purification d'une caroténo-protéine de *Synechococcus sp.* WH8102 suivie d'une analyse génomique et phylogénétique de ces protéines chez diverses cyanobactéries.

### Les dommages aux PBS sous stress UV chez *Synechococcus sp.* WH8102

#### Introduction

Les radiations UV sont très énergétiques et peuvent créer des dysfonctionnements et des photodestructions majeures dans toute la cellule, que ce soit au niveau des acides nucléiques, des lipides membranaires ou des protéines. L'appareil photosynthétique et, en particulier, les antennes photosynthétiques sont parmi les premières structures endommagées au cours d'une exposition brutale à ces radiations. Chez les cyanobactéries à PBS, ce phénomène est notamment amplifié du fait que les PBP présentent une absorption significative dans la région UV du spectre. Quelques études de l'effet des UV sur les PBS ont été décrites dans la littérature chez un petit nombre d'oxyphotobactéries d'eau douce. La plupart des résultats obtenus mettent en évidence des phénomènes de dégradation des composants des PBS (voir introduction).

Les effets des UV sur les cyanobactéries marines du genre *Synechococcus* et leurs antennes photosynthétiques sont en revanche très peu documentés. Les particularités (notamment la présence de deux PE) et la complexité des PBS des *Synechococcus marins* en font des modèles d'étude intéressants pour un travail sur les photodommages créés par les UV. Il est en effet possible de suivre l'évolution de paramètres spectroscopiques comme l'absorption et l'émission de fluorescence *in vivo* qui sont caractéristiques de ces organismes. Le modèle structural du bras de PBS proposé par Six et al. (2005 ; Chapitre II) chez la souche WH8102 nous a servi de base à

l'interprétation des effets des UV sur ce type d'antennes photosynthétiques. Nous exposons ici une étude sur l'impact d'importantes doses d'UVA et B sur les PBS de *Synechococcus* sp. WH8102.

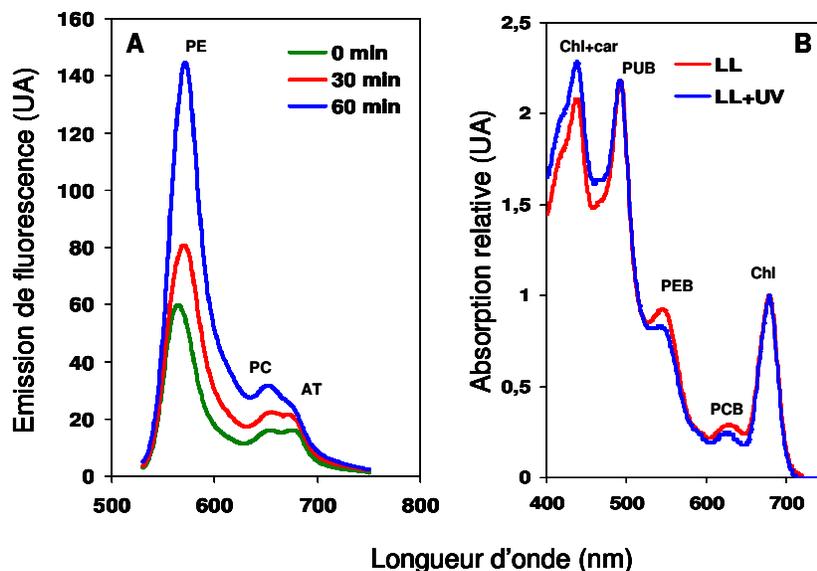
### **Matériel & Méthodes**

Une culture de 8 L de *Synechococcus* sp. WH8102 ayant poussé à 20 °C sous faible lumière ( $10 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) a été divisée en deux sous-cultures. L'une d'entre elles a été utilisée comme témoin et l'autre a été transférée dans un flacon de quartz et placée sous faible lumière visible à laquelle ont été ajoutés  $2.5 \text{ W.m}^{-2}$  d'UVA et  $0.25 \text{ W.m}^{-2}$  d'UVB, pendant 1 h. L'expérience a été réalisée deux fois et a donné des résultats très similaires. Les spectres *in vivo* d'absorption et d'émission de fluorescence ont été enregistrés comme décrit par Six et al. (2004 ; chapitre I). Les analyses pigmentaires furent réalisées par HPLC comme décrit par Six et al. (soumis ; Chapitre V). Enfin, les PBS des cultures témoins et stressées par les UV ont été purifiés et analysés par la procédure décrite par Six et al. (2005 ; chapitre II).

### **Résultats**

#### *Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence*

Les spectres d'absorption enregistrés *in vivo* sur des aliquots de culture témoin et des aliquots de culture ayant subi 1 h d'UV ont présenté de légères variations (Figure 80B). Plusieurs maxima ont diminué en réponse aux UV, principalement les pics relatifs aux PBP et à la chl *a*, mettant en évidence de légères dégradations de ces pigments.



**Figure 80** : Spectres d'émission de fluorescence *in vivo* (exc 495 nm) au cours du stress UV (gauche) et d'absorption *in vivo* normalisés au pic de chl dans le rouge, avant et après stress UV (droite).

L'analyse des spectres d'émission de fluorescence enregistrés *in vivo* au cours de l'exposition aux UV a révélé une augmentation importante de la fluorescence entre  $T_0$  et  $T_{1h}$  (Figure 80A). Le rapport  $F_{569} : F_{650}$  ( $F_{PE} : F_{PC}$ ) a augmenté de 3,3 à 4,5 après 1 h d'exposition et un déplacement du maximum d'émission à 566 à 572 nm (correspondant à une augmentation du rapport PEI : PEII) a été observé. Les maxima à 650 et 680 nm ont augmenté de 67 et 23% après 1 h d'exposition. Après 3 h, la fluorescence globale était sensiblement plus faible par rapport au début de l'expérience (spectre non représenté) : le maximum d'émission des PE avait diminué à environ 40 unités de fluorescence et les pics correspondant à la PC ( $F_{650}$ ) et aux accepteurs terminaux ( $F_{680}$ ) étaient devenus quasiment indiscernables. Ceci montre qu'il n'y avait plus de transfert d'énergie entre la PE et la PC et suggère d'importantes dégradations des PBP, au moins de la PE.

Les spectres d'absorption *in vivo* montrent peu de différences entre la culture témoin et la culture stressée. Les maxima des phycobilines sont légèrement inférieurs après l'exposition aux UV. L'absorption relative un peu plus importante dans le bleu après le stress est certainement due à une augmentation de l'absorption relative des caroténoïdes. Cette dernière observation trahit donc une légère dégradation de chl.

#### *Analyses pigmentaires et immunoblot*

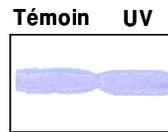
Les analyses pigmentaires par HPLC ont révélé peu de variations des quantités de

pigments membranaires majeurs, après 1 h d'exposition aux rayonnements UV. Les valeurs à T<sub>0</sub> correspondent à celles présentées par Six et al. (2004). Les rapports molaires à la chl *a* de la zéaxanthine et du β-carotène étaient légèrement plus faibles après le stress UV (Tableau 6). La quantité de chl *a* a diminué d'environ 5% après l'exposition aux UV.

**Tableau 6** : Rapports pigmentaires à la chl *a* des pigments membranaires majeurs avant et après 1 h d'exposition aux UV, chez *Synechococcus* sp. WH8102.

	<b>Zéaxanthine : Chl <i>a</i></b> <b>Mol : Mol</b>	<b>β-carotène : Chl <i>a</i></b> <b>Mol : Mol</b>
0 h	0.09	0.034
1 h	0.13	0.035

Les réactions immunologiques à l'aide d'un anticorps reconnaissant indistinctement les deux PE mettent en évidence l'absence de dégradations significatives de ces PBP après 1 h de stress UV (Figure 81).



**Figure 81** : Réactions immunologiques contre les PE de *Synechococcus* sp. WH8102 avant et après stress UV.

*Purification et analyse SDS-PAGE des phycobilisomes intacts*

Après purification des PBS, les gradients de viscosité de la culture témoin et de la culture ayant été exposée aux UV ont présenté des profils clairement différents (Figure 82). Dans le gradient de saccharose correspondant à la culture témoin, une bande rose a été observée au fond du tube (0,75M), comme classiquement obtenu lors d'une purification de PBS (fraction A). Le gradient de la culture exposée aux UV présente deux bandes distinctes : l'une rose dans le milieu du tube (0,37-0,50M ; fraction B) et une orangée plus fluorescente dans le haut du tube (0,25M ; fraction C).

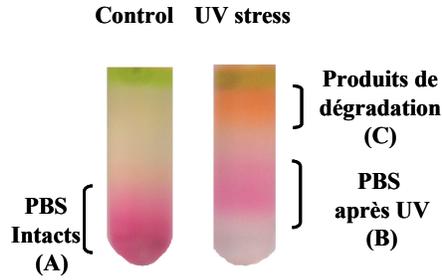


Figure 82 : Gradient de viscosité obtenu après purification des PBS de *Synechococcus* sp. WH8102.

Les spectres d'absorption typiques des PBS de *Synechococcus* sp. WH8102 cultivé en faible lumière sont décrits dans le chapitre II (Six et al., 2005). Les propriétés d'absorption des PBS normalisées au maximum d'absorption de la PCB ont quelque peu varié durant l'exposition des cultures aux UV (Figure 83A). Le maximum d'absorption de la PUB et de la PEB est affectée avec une diminution d'environ 15%. Les PBS de *Synechococcus* sp. WH8102 présentent au moins deux maxima à environ 545 et 565 nm correspondant probablement à deux types de PEB : celles liées par les PE et la R-PCII, respectivement. Après le stress UV, le maximum de PEB correspondant à la PE a été le plus affecté.

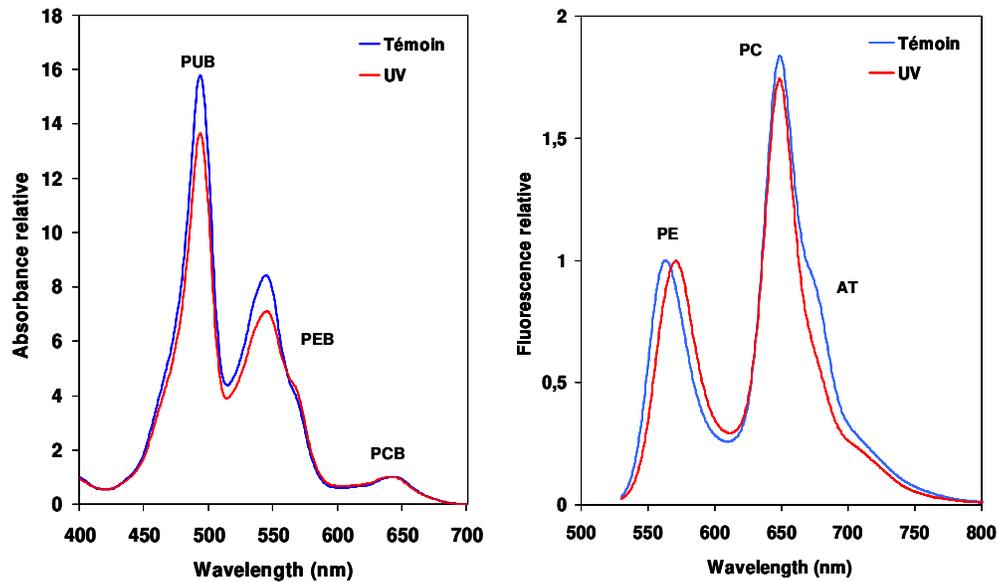
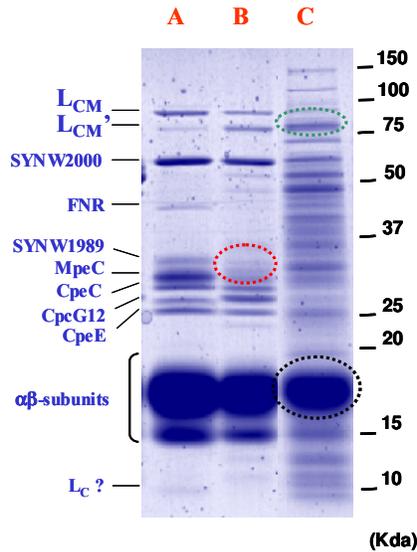


Figure 83 : Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence (exc 495 nm) des PBS de *Synechococcus* sp. WH8102 avant et après exposition d'une culture au UV.

Les propriétés d'émission de fluorescence à température ambiante des PBS isolés de *Synechococcus* sp. WH8102 ont montré des différences significatives après exposition aux UV (Figure 83). Le pic d'émission des PE s'est déplacé de 8 nm vers le rouge, de façon similaire à ce qui a été observé *in vivo* (Figure 83). De plus, l'analyse des spectres normalisés au maximum d'émission des PE a montré que le couplage des PBP est beaucoup moins bon dans le cas des lots traités aux UV puisque l'accepteur terminal des PBS fluorescait beaucoup moins.

L'analyse SDS-PAGE des fractions colorées issues des gradients de viscosité est présentée en figure 84. La ligne A est le profil peptidique de la culture témoin (Six et al., 2005). La fraction B (exposée aux UV) présente plusieurs différences notables. La forme protéolysée de la L<sub>CM</sub> est plus abondante et les bandes correspondant aux linkers de PEII (MpeC et MpeE) sont beaucoup moins marquées dans cette fraction que chez le témoin.



**Figure 84** : Profil SDS-PAGE de PBS de *Synechococcus* sp. WH8102 : Culture témoin (A), Culture ayant subi un stress UV fraction inférieure (B) et supérieure (C).

La ligne C présente le profil polypeptidique de la bande orange fluorescente de la culture exposée aux UV. Celle-ci ayant été collectée dans le haut du gradient de viscosité, de nombreuses protéines contaminantes sont présentes dans cette fraction, compliquant un peu l'interprétation. Des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de PBP sont clairement visibles entre 15 et 20 kDa. De plus, une bande semblant correspondre à la L<sub>CM</sub>'<sub>2</sub>, la forme protéolysée du linker cœur-membrane, est présente à 85 kDa en quantité significative.

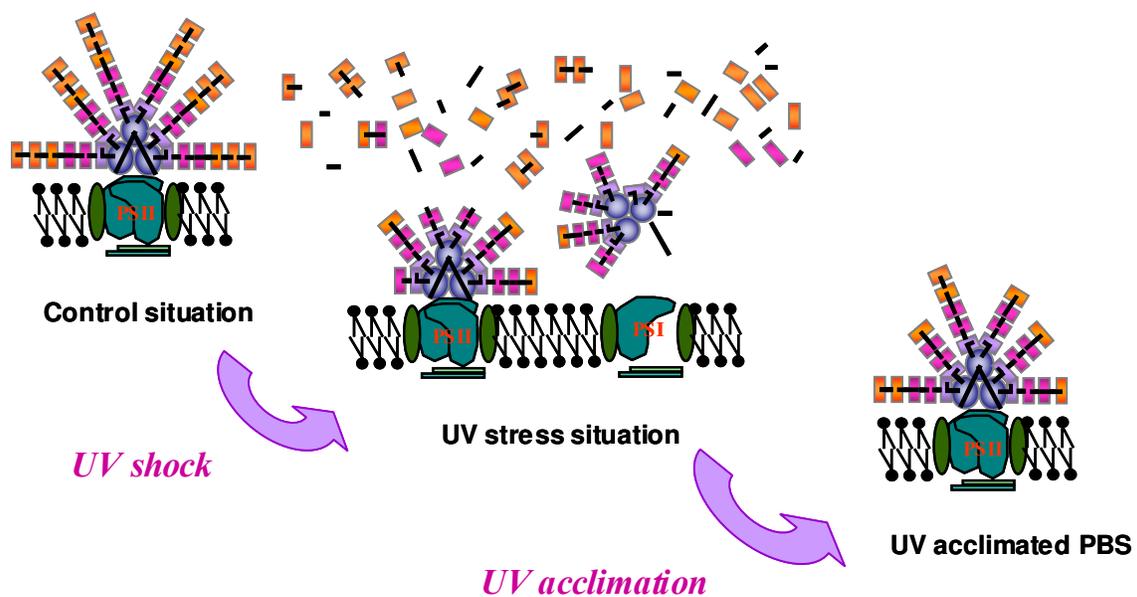
## **Discussion**

La plupart des études concernant l'effet des UV sur les antennes photosynthétiques des cyanobactéries ont rapporté des dégradations de pigments plus ou moins importantes (voir introduction). Les spectres d'absorption et les analyses pigmentaires montrent que les conditions de stress UV mises en œuvre dans notre expérience n'ont pas conduit à de telles dégradations. En effet, seules de faibles diminutions des quantités de chl *a* et de caroténoïdes ont été observées suite à l'exposition aux UV, et ceci est confirmé par les faibles variations des propriétés d'absorption *in vivo*. De même, les PBP ne semblent pas avoir été considérablement dégradées puisque les maxima relatifs d'absorption *in vivo* à 495 (PUB), 545 (PEB) et 640 nm (PCB) ont peu varié entre la culture témoin et celle exposée aux UV. Des dégradations plus sévères ont probablement eu lieu après 3 h d'exposition comme le suggère la forte diminution de fluorescence *in vivo*. Toutefois, l'évolution des spectres d'émission de fluorescence des cellules *in vivo* durant 1 h et ceux des PBS isolés montrent sans équivoque que ces derniers ont subi des modifications significatives. Nos conditions de stress sont donc idéales pour étudier le phénomène de photodégradation spécifiquement induit sur les PBS au cours d'une exposition soudaine aux UV.

Les spectres de fluorescence *in vivo* mettent en évidence de profonds changements au sein des complexes. L'augmentation majoritaire de la fluorescence de la PE ( $F_{570}$ ) et le déplacement du maximum vers le rouge suggèrent qu'une partie du pool de ces PBP n'était plus connectée aux PBS. L'augmentation générale de la fluorescence suggère par ailleurs qu'une proportion des PBS se déconnecte des centres réactionnels au cours de l'exposition aux UV. Les modifications de la structure des complexes antennaires ont pu être analysées après purification sur gradient de viscosité. Les spectres d'absorption des PBS, normalisés au maximum de PCB, montrent que les PBS sont moins riches en PUB et en PEB après exposition aux UV, suggérant une diminution de la quantité relative de PE. Les profils de gradient de viscosité mettent en évidence le fait que les PBS ont été brisés en deux parties principales : le complexe principal migrant à 0,37-0,50 M de saccharose et une partie légère retrouvée en haut du tube. L'analyse des profils polypeptidiques SDS-PAGE des fractions B et C permettent de donner des éléments de compréhension du processus de photodégradation des PBS. Dans la fraction B, la faible quantité de linkers MpeC ( $L_R^{28.3 \text{ PEII}}$ ) et MpeE ( $L_R^{32.8 \text{ PEII}}$ ), qui sont les plus distaux dans le modèle structural (chapitre II ; Six et al., 2005), indique que la partie distale des bras (PEII) n'est quasiment plus associée aux complexes antennaires. Le profil peptidique de la fraction C montre en effet que celle-ci contient des PBP (bandes à 15-19 kDa) et sa couleur orange fluorescente confirme qu'il s'agit en majorité de PEII. Enfin, la  $L_{CM}$ , l'accepteur terminal des PBS, semble particulièrement sensible aux UV. Sa

forme protéolysée (85 kDa) est plus abondante dans les PBS traités aux UV et il semble qu'on en retrouve une certaine quantité dans le haut du gradient. Ce linker assurant l'ancrage des PBS sur les thylacoïdes (Sidler 1994), ceci concorde avec la déconnection de complexes entiers de la membrane thylacoïdale suggéré par les spectres de fluorescence *in vivo*. Ces dommages peuvent être le résultat de l'activité de protéases (il existe un homologue de NblB dans le génome, une protéine que l'on pense impliquée dans des phénomènes de dégradation des PBS chez les souches d'eau douce) et/ou de photodestructions directement induites par les rayonnements UV.

L'ensemble de ces observations permet de dresser un scénario possible des photodommages encourus par les PBS lors d'une exposition brutale aux UV (Figure 85).



**Figure 85 :** Scénario des photodommages encourus par les PBS lors d'une exposition brutale aux UV, et modèle de PBS acclimaté a une faible dose d'UV chez *Synechococcus* sp. WH8102.

Dans un tel modèle, la partie distale des complexes est particulièrement affectée par les UV : les hexamères de PEII soutenus par les linkers MpeC et MpeE sont rapidement déconnectés de la partie principale des PBS. De plus, le linker  $L_{CM}$ , sensible aux UV est protéolysé voire dissocié du cœur des PBS, provoquant leur déconnection de la membrane photosynthétique et/ou la dissociation totale de la structure. Par ailleurs, des données non présentées ici nous ont permis de constater que des cellules acclimatées à  $100 \mu\text{mol photons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  et  $1.2 \text{ W.m}^{-2}$  UVA et  $0.12 \text{ W.m}^{-2}$  UVB présentent des caractéristiques optiques de cellules acclimatées à une forte intensité de lumière visible (environ  $600 \mu\text{mol photons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , si l'on se réfère au chapitre I ; Six et al., 2004). Notamment, les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence des cellules

acclimatées à une lumière moyenne enrichie en UV étaient presque identiques à ceux d'une culture acclimatée à forte lumière visible. Il est donc probable que le PBS ait une structure similaire dans les deux conditions de lumière et c'est ce qui est représenté sur la troisième partie de la figure 85.

## **Les caroténo-protéines cyanobactériennes**

### **Introduction**

Les caroténoïdes sont des pigments extrêmement ubiquistes que l'on rencontre dans presque tout le règne vivant, les végétaux, les animaux et les microorganismes, chez qui ils sont la plupart du temps insérés au sein de membranes et autres environnements hydrophobes. Les caroténoïdes ont en effet une nature très hydrophobe, car ils sont constitués d'un assemblage de résidus isoprènes dont les extrémités sont cyclisées. Il existe deux types de caroténoïdes : les carotènes, qui sont non oxygénés, et les xanthophylles qui portent des atomes d'oxygène, par exemple sous forme de groupements hydroxy et époxy. Leur structure et notamment la configuration des doubles liaisons font que les caroténoïdes absorbent dans la région bleu-verte du spectre visible.

Chez les organismes photosynthétiques, les caroténoïdes sont des composants essentiels de l'appareil photosynthétique dans lequel ils peuvent jouer un rôle de pigment accessoire et/ou de photoprotection. Dans ce dernier cas, ces molécules peuvent être impliquées dans des mécanismes de dissipation d'énergie sous forme de chaleur tels que le cycle des xanthophylles, et/ou sont capables de désexciter des triplets de chl ainsi que de réagir avec des espèces activées de l'oxygène. Ils effectuent ainsi une action de prévention du burst oxydatif et de détoxification de la cellule.

Chez les oxyphotobactéries, il existe des protéines particulières liant uniquement des xanthophylles et trouvées la plupart du temps dans l'enveloppe cellulaire. Seuls Masamoto et al. (1987) ont rapporté la présence d'une telle protéine dans les membranes thylacoïdales de *Synechococcus* sp. PCC 7942. De nombreuses cyanobactéries d'eau douce semblent posséder de telles protéines (voir par exemple Holt & Krogman, 1981 ; Resh & Gibson, 1983 ; Bullerjahn & Sherman, 1986 ; Masamoto et al., 1987 ; Diversé-Pierluissi & Krogman, 1987 ; Engle et al. 1991) ; Reddy et al., 1993 ; Wu & Krogman, 1999). Certaines de ces protéines ont été décrites comme étant hydrophobes, mais la plupart d'entre elles (et les mieux caractérisées) sont hydrophiles. Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, le produit du gène *slr1963* codant pour une protéine hydrophile de 35 kDa liant la 3'-hydroxyéchinénone. Une caroténo-protéine similaire à celle de *Synechocystis*

sp. PCC 6803 a été isolée chez *Arthrospira maxima*, cristallisée et bien caractérisée par le groupe de C. Kerfeld (voir introduction ; Kerfeld et al., 1997 ; Kerfeld et al., 2003 ; Kerfeld, 2004a, b). Chez les cyanobactéries marines, aucune de ces caroténo-protéines n'a été purifiée et la physiologie fonctionnelle des caroténoïdes est très mal connue. Toutefois, dans le génome de *Synechococcus* sp. WH8102, le gène SYNW1367 présente une homologie de séquence avec le gène codant pour la caroténo-protéine d'*Arthrospira maxima* (Kerfeld et al., 2003 ; Kerfeld, 2004a, b). Le travail suivant décrit la purification et la caractérisation de la caroténo-protéine hydrophile de *Synechococcus* sp. WH8102, suivi d'une étude génomique et phylogénétique des séquences de ces protéines chez les cyanobactéries marines.

## **Matériel & Méthodes**

### *Purification*

Huit litres de culture de *Synechococcus* sp. WH8102 cultivé à 700  $\mu\text{mol photons. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ont été centrifugés et le culot a été resuspendu dans 10 mL de tampon HEPES pH 7.5 (10mM HEPES, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM KCl, 1 mM EDTA) contenant un cocktail d'antiprotéases composé de 1 mM de benzamidine, 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl et 1 mM d'acide  $\epsilon$ -amino-n-caproïque (Sigma-Aldrich). La suspension a été ensuite homogénéisée et passée deux fois dans une presse de French à 4 °C, afin de briser les cellules. Après centrifugation, la suspension de membrane a été déposée sur 2 mL de tampon HEPES contenant 65% de saccharose, et ultracentrifugée 45 min à 130,000 x g à 4 °C (ultracentrifugeuse XL-70, rotor SW41 Ti, Beckman). La bande sombre de thylacoïdes se trouvant à l'interface du saccharose a ensuite été collectée et suspendue dans 12 mL de tampon HEPES. Les thylacoïdes ont été culottés par ultracentrifugation pendant 1 h à 130,000 x g à 4 °C et resuspendus dans 2 mL de tampon HEPES contenant 17% de glycérol. Les membranes toujours maintenues à l'obscurité à froid, ont été plongées dans l'azote liquide et conservées à -80 °C jusqu'à analyse. Les thylacoïdes ont été ensuite solubilisés par l'ajout de 4 % de dodécyl-maltoside (Sigma) pendant 1 h 30 à 4 °C et sous forte agitation. Après une courte centrifugation, les membranes solubilisées sont déposées sur un gradient continu de saccharose 0-30% dans du tampon HEPES contenant 0,5% de dodécyl-maltoside et ultracentrifugées pendant 15 heures à 130,000 x g à 4 °C. Les bandes colorées ont ensuite été collectées et caractérisées par leur spectre d'absorption, puis concentrées sur membrane de maille 30 kDa (Centricon, Millipore).

La fraction orange (voir résultats) a été ensuite caractérisée par SDS-PAGE, puis dialysée contre du tampon HEPES et passée au travers d'une colonne de chromatographie DEAE (Hitrap, Amersham Biosciences). Un gradient d'élution de chlorure de sodium et de dodécyl-

maltoside (jusque 1M NaCl, 0.1% dodécyl-maltoside) a été appliqué et le spectre d'absorption de la fraction purifiée a alors été enregistré.

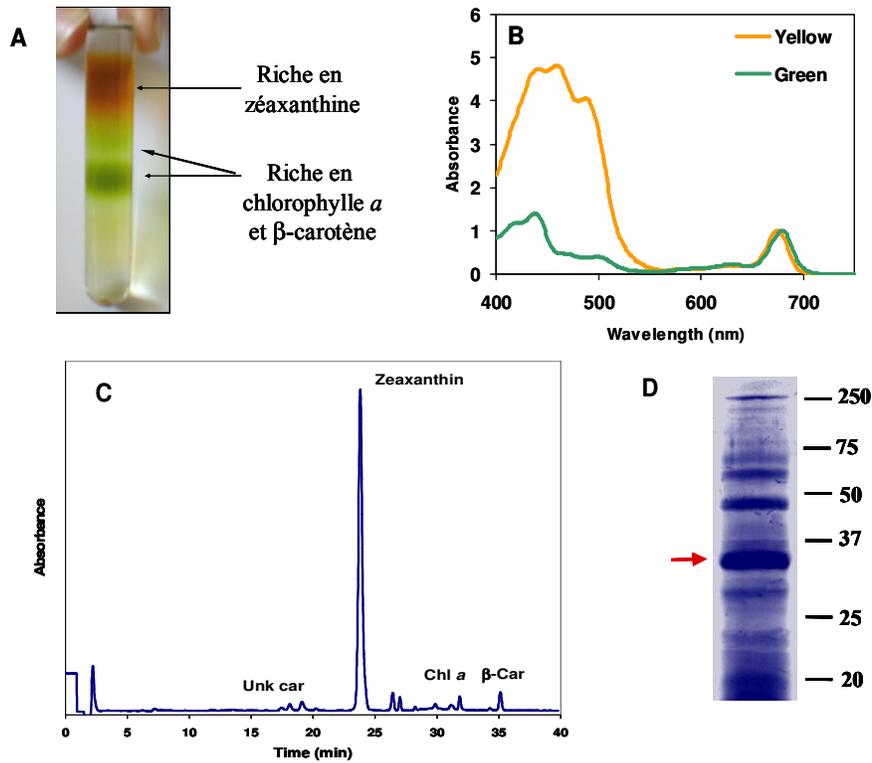
*Analyse génomique et phylogénétique*

Les séquences protéiques ont été obtenues par recherche de similarité (Blast) dans les banques de données de protéines ou des génomes en cours d'assemblage ou d'annotation. L'environnement génomique des gènes de caroténo-protéine a été déduit et étudié de façon similaire. Après alignement à l'aide des logiciels Bioedit et ClustalW, les séquences ont été réduites à la même longueur et leur phylogénie analysée à l'aide du logiciel MEGA2.

**Résultats**

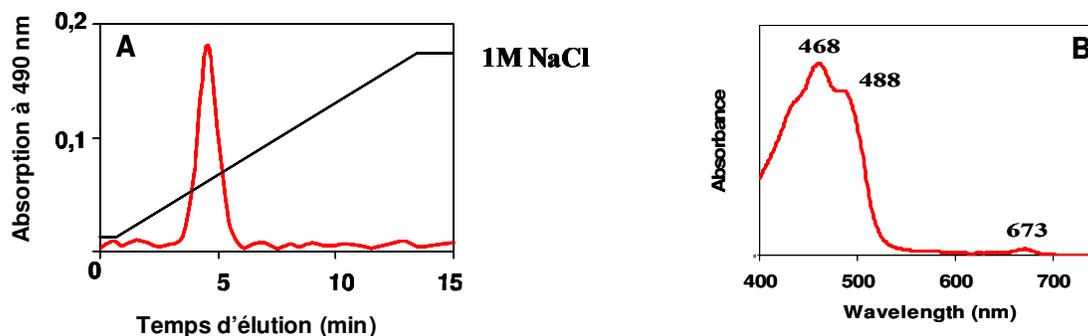
*La caroténoprotéine de *Synechococcus* sp. WH8102*

La dissociation des thylacoïdes sur gradient de viscosité a conduit à la séparation de trois bandes colorées, une jaune-orangée dans le haut du gradient (5-10%) et deux vertes dans la zone des 18-20% (Figure 86A). Les propriétés d'absorption de ces fractions suggèrent que la fraction supérieure est riche en caroténoïdes (Figure 86B). Les deux fractions vertes présentent des spectres d'absorption identiques avec une forme caractéristique de l'absorption de la chl. Ces résultats sont similaires à ceux décrits par Masamoto et al. (1987). Les analyses pigmentaires par HPLC ont confirmé ces observations et ont révélé que la fraction supérieure contenait la majeure partie de la zéaxanthine des thylacoïdes et les fractions vertes, de la chl *a* et du  $\beta$ -carotène. Ces résultats suggèrent que ces dernières sont enrichies en CR.



**Figure 86** : Gradient de viscosité suivant la dissociation des thylacoïdes de *Synechococcus* sp. WH 8102 cultivé à  $700 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (A) et spectres d'absorption des fractions orange et vertes (B). Chromatogramme (C) et profil SDS-PAGE (D) de la fraction supérieure jaune du gradient de viscosité.

La fraction orange passe à travers une membrane de maille 100 kDa, mais est retenue par une maille de 30 kDa, il est possible de la concentrer cette fraction. Ceci suggère qu'il existe dans cette fraction une protéine liant la zéaxanthine dont la masse moléculaire théorique est comprise entre 30 et 100 kDa. L'analyse des polypeptides présents dans la fraction orange par SDS-PAGE montre qu'elle contient un ensemble de protéines dont la plus abondante migre à environ 35 kDa. Une seconde bande abondante est observable à environ 47 kDa. L'identification de ces deux bandes par spectroscopie de masse est encore en cours.



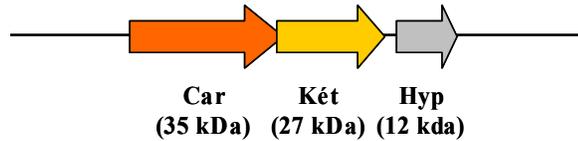
**Figure 87** : Elution de la fraction orange sur colonne DEAE (absorption à 490 nm ; Gauche) et spectre d'absorption de la fraction purifiée (Droite).

Afin d'essayer d'obtenir une fraction orange ne contenant plus du tout de chl *a*, la fraction supérieure du gradient de viscosité a été chargée sur une colonne de chromatographie DEAE et éluee avec un gradient croissant de chlorure de sodium et de dodécyl-maltoside. Un pic d'élution faible (abs 490 nm) a été observé après quelques minutes (Figure 87A), mais la majeure partie de la fraction orange a élué avec le reste de l'échantillon. Le comportement de l'échantillon est tout à fait comparable aux résultats décrits par Masamoto et al. (1987). Le spectre d'absorption (Figure 87B) et d'émission de fluorescence (exc 435 nm ; non représenté) de la fraction purifiée suggère l'absence totale de chl *a*. Le spectre d'absorption montre une forme générale typique de caroténoïde (proche de la zéaxanthine pure) avec trois maxima à 468 et 488 nm dans le bleu, ainsi qu'un pic mineur dans le rouge à 673 nm.

#### *Génomique et phylogénie*

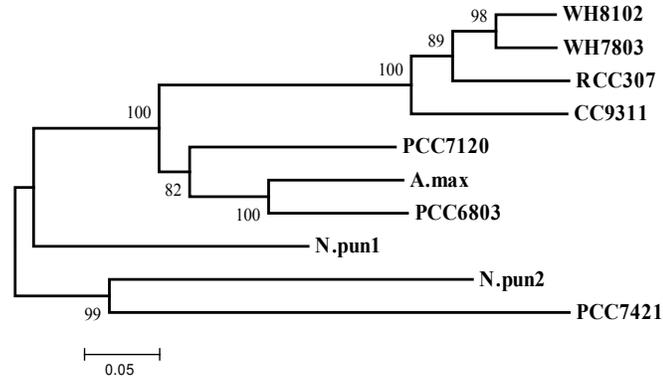
Des gènes présentant des homologies de séquence avec la caroténo-protéine de *Synechococcus* sp. WH8102 sont présents dans la plupart des génomes de cyanobactéries actuellement disponibles, à l'exception notable des *Prochlorococcus*. Chez toutes les souches marines de *Synechococcus* spp. récemment séquencées (WH8102, WH7803, RCC307 et CC9311), le gène de la caroténo-protéine est extrêmement bien conservé et code pour une protéine de 35 kDa avec un point isoélectrique de 4,6. Il précède deux gènes dont la position est aussi conservée dans les quatre génomes disponibles : une  $\beta$ -carotène kétolase putative d'environ 244 acides aminés et un gène codant pour un petit polypeptide putatif de 65 acides aminés, dont la fonction est inconnue (Figure 88). Alors que les séquences de ce dernier sont assez bien conservées chez les quatre souches de *Synechococcus* marins, celle de la kétolase putative est plus variable. Chez CC9311, une partie de son extrémité N-terminale semble absente, mais il faut prendre cette observation avec

précaution car la séquence du génome de cette souche n'était pas tout à fait finalisée au moment de l'analyse. Les analyses par Blast chez *Trichodesmium erythraeum* ne mettent en évidence aucun de ces gènes. Chez *Crocospaera watsonii*, par contre, une séquence proche d'une partie de la caroténo-protéine est présente.



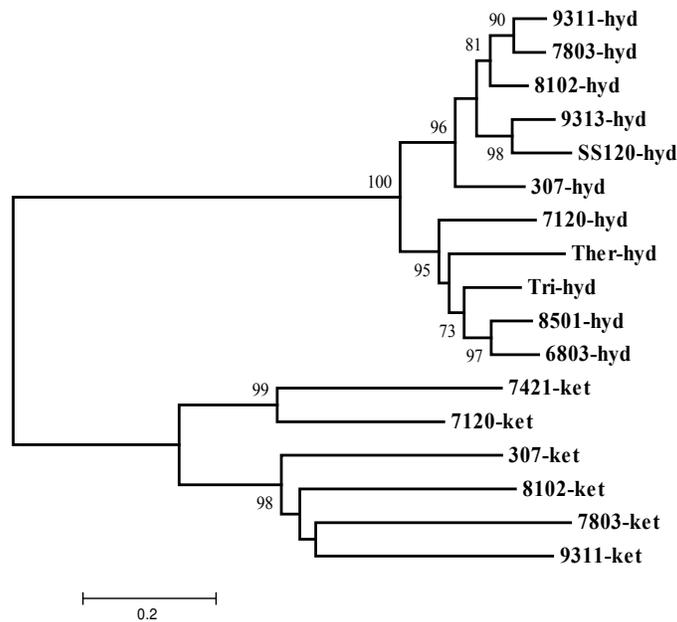
**Figure 88** : Structure de la région génomique conservée incluant le gène putatif de caroténo-protéine chez *Synechococcus* spp. WH8102, WH7803, RCC307 et CC9311. Car : caroténo-protéine, két : kétolase putative, gène hypothétique conservé.

Chez les souches d'eau douce, l'environnement génomique autour du ou des gène(s) de caroténo-protéine est beaucoup plus variable. Ce(s) gènes sont en général isolé(s) dans le génome, sans autres gènes relatifs à la physiologie des caroténoïdes ni de gène hypothétique conservé à proximité. Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, il existe néanmoins un gène hypothétique de petite taille présentant un certain degré de similarité avec celui présent chez les *Synechococcus* marins en aval du gène de caroténo-protéine, mais sa taille est différente et sa séquence assez divergente. On trouve parfois plusieurs gènes de caroténo-protéines chez un même organisme et des fragments homologues au domaine N-terminal ou C-terminal de la protéine des *Synechococcus* marins. L'analyse phylogénétique des séquences de caroténo-protéines les moins éloignées est présentée en figure 89 sous la forme d'un arbre en Neighbour-joining. Seules les séquences présentant plus de 50% de similarité de séquence ont été incluses dans l'alignement. Cette analyse met en évidence que les caroténo-protéines des *Synechococcus* marins forment un groupe bien séparé des séquences d'eau douce, avec une valeur de bootstrap hautement significative. Les séquences de caroténo-protéines d'eau douce sont plus variables. Les protéines hydrophiles d'*Arthrospira maxima*, *Anabaena* sp. PCC 7120 et *Synechocystis* sp. PCC 6803 semblent similaires et proviennent probablement d'une même protéine ancestrale. Les caroténo-protéines d'autres organismes d'eau douce tels que *Nostoc punctiforme*, *Gloeobacter violaceus*, *Synechococcus* sp. PCC 7942 sont plus divergentes.



**Figure 89** : Arbre phylogénétique des séquences peptidiques de caroténo-protéines cyanobactériennes (Neighbour-joining avec valeurs de bootstrap).

Des gènes de kétolase sont présents chez *Anabaena* sp. PCC 7120 et *Gloeobacter violaceus*. L'analyse des séquences des kétolases (putatives ou non) et des  $\beta$ -carotène hydroxylases (CrtR) montre que ces deux enzymes forment des groupes distincts. Les kétolases putatives des *Synechococcus* marins se groupent clairement avec les kétolases plus typiques et semblent former un sous-groupe distinct. Les séquences de CrtR sont divisées en deux groupes distincts : celui des *Synechococcus* marins et des *Prochlorococcus* spp. d'une part, un groupe formé par les souches de cyanobactéries d'eau douce (*Synechocystis*, sp PCC 6803, etc...) et les cyanobactéries marines *Trichodesmium erythareum* et *Crocospaera Watsonii*, d'autre part.



**Figure 90** : Arbre phylogénétique des séquences peptidiques des  $\beta$ -carotène kétolases et hydroxylases (CrtR) cyanobactériennes (Neibourg-joining avec valeurs de bootstrap).

Par ailleurs, toutes ces kétolases présentent de 2 à 4 hélices transmembranaires prédites (par TMHMM ; Krogh et al., 2001) et des programmes de prédiction de localisation subcellulaire chez les bactéries Gram négative (CELLO, PSORTb) localisent ces enzymes putatives dans la membrane cytoplasmique.

## Discussion

La présence de protéines thylacoïdales liant spécifiquement des xanthophylles n'a été rapportée qu'une seule fois, chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Masamoto et al., 1987). La pureté de la fraction thylacoïdale que nous avons isolée chez *Synechococcus* sp. WH8102 n'a pas été testée, mais l'abondance de la zéaxanthine dans cette fraction suggère qu'une quantité relativement importante de ce pigment est présente dans les membranes photosynthétiques. Par ailleurs, la membrane externe de cette cyanobactérie marine a été analysée par Brahamsha (1996) et il ne semble pas y avoir de caroténo-protéine parmi les polypeptides majeurs ins er es dans cette membrane. Nos propres analyses de la membrane externe de *Synechococcus* sp. WH8102 vont dans le sens de ces observations (non montré). Il est néanmoins envisageable que la membrane plasmique contienne aussi des caroténo-protéines mais nos tentatives d'isolement de l'enveloppe cellulaire dans son intégralité ont malheureusement  echou e.

Nos résultats montrent que les caractéristiques de la caroténo-protéine de *Synechococcus* sp. WH8102 sont comparables à celle isolée par Masamoto et al. (1987) dans les thylacoïdes de *Synechococcus* sp. PCC 7942, tant par sa localisation dans les thylacoïdes et que par ses propriétés d'absorption quasiment identiques. Par manque de temps, nous n'avons pas pu confirmer, par spectrométrie de masse, la nature de la caroténo-protéine isolée de WH8102. Cependant, la découverte dans le génome de cette souche d'une seule séquence candidate possible de caroténo-protéine (SYNW1367) nous laisse à penser qu'il s'agit là de la protéine en question. Toutefois, si cette hypothèse se confirme, il faut remarquer que cette séquence diverge considérablement de la caroténo-protéine de PCC 7942 et leur points isoélectriques théoriques sont également très différents : 4,6 pour WH8102 et 8,5 pour PCC 7942. Ainsi, en dépit de propriétés d'absorption identiques, ces protéines seraient de nature différente. Chez *Synechococcus* sp. PCC 7942, il a été mis en évidence que les membranes cytoplasmiques contiennent aussi une quantité significative de xanthophylles liées à une protéine. Il existerait donc deux pools cellulaires de caroténo-

protéines chez cette souche, l'un situé dans les thylacoïdes et l'autre dans la membrane cytoplasmique, qui sont d'ailleurs tout deux surexprimés en conditions de forte lumière. Toutefois, le fait que ces deux pools soient constitués de la même caroténo-protéine n'est pas certain puisque plusieurs types de caroténo-protéines apparemment distincts ont été isolés à plusieurs reprises chez cet organisme. L'un d'entre eux pourrait être un transporteur (Reddy et al., 1993). Dans ce contexte, il faut noter qu'il existe deux gènes homologues aux caroténo-protéines chez *Nostoc punctiforme* et *Gloeobacter violaceus* PCC 7421.

Chez les quatre génomes de *Synechococcus* marins disponibles, un seul gène de ce type est présent et les deux gènes qui suivent sont bien conservés et très proches sur le génome (il y a même un chevauchement probable entre la fin de SYNW1367 et le début du gène putatif de kétolase qui suit chez WH8102), suggérant qu'il existe une relation fonctionnelle entre ces trois gènes qui semblent organisés en opéron. La présence d'une kétolase putative est cependant surprenante car, à ce jour, n'ont n'avons pas détecté de kéto-caroténoïdes par HPLC dans les cellules de *Synechococcus* marins et ce, quelque soit les conditions de lumière (faible/forte, avec ou sans UV ; chapitre III). Si ce gène est actif, il code peut-être pour une enzyme qui synthétise un caroténoïde mineur, ou alors possède une autre fonction.

Les mécanismes physiologiques associés aux caroténo-protéines restent mal compris. Dans les thylacoïdes, ces protéines pourraient facilement interagir avec les composants de l'appareil photosynthétique et participer à un phénomène de dissipation d'énergie lumineuse excédentaire sous forme de chaleur. Dans l'enveloppe cellulaire, ces protéines pourraient agir comme écran protecteur. Dans les deux cas, le fonctionnement biophysique des complexes xanthophylle-protéine demeure inconnu. La surexpression de ces protéines en condition de forte lumière chez beaucoup de souches d'eau douce suggère fortement un rôle de photoprotection. Il semble cependant que les cyanobactéries marines ont mis au point des mécanismes de protection particuliers car il a été rapporté à plusieurs reprises que la concentration cellulaire en zéaxanthine de ces organismes reste constante avec la lumière (Moore et al., 1995 ; Kana et al., 1988 ; Chapitre I, Six et al. 2004), contrairement aux souches d'eau douce. Il est donc possible que les caroténo-protéines soient « activées » en conditions de forte lumière, sans que leur concentration ait besoin de varier. Comme nous l'avons déjà évoqué pour la zéaxanthine (Chapitre I, Six et al. 2004), il est aussi possible que le pool global de caroténo-protéines reste à peu près constant, mais comme la surface des thylacoïdes diminue à forte lumière, leur concentration relative pourrait *de facto* augmenter dans ce compartiment.

En fait, la question de la localisation des différentes caroténo-protéines est troublante. En effet, les études ont montré qu'il existe des protéines hydrophiles assez facilement purifiables car

présentes dans les extraits aqueux, et d'autres (comme celle de *Synechococcus* sp. WH8102) qui ont été isolées à partir d'extraits membranaires. Ces deux types de protéines auraient donc des localisations cellulaires différentes (cytosolique ou membranaire). Certains auteurs ont proposé qu'il doit exister un transport des caroténoïdes vers l'enveloppe cellulaire depuis les thylacoïdes car la synthèse de ces pigments a lieu dans ces dernières membranes. Les conclusions de l'analyse des cristaux de la caroténo-protéine d'*Arthrospira maxima* peuvent aller dans ce sens (Kerfeld et al., 2003 ; Kerfeld, 2004a, b). Les caroténo-protéines des *Synechococcus* marins, tout comme celles de type *Arthrospira maxima* ne présentent pas de motifs typiques d'hélices transmembranaires mais possèdent un domaine de type NTF2 qui chez les eucaryotes est un facteur de transport nucléaire. Il est donc possible que ces protéines soient capables de changer de conformation, leur permettant de modifier leur taux d'hydrophobie et d'ainsi être capables soit de se trouver dans le cytosol soit en relation plus ou moins étroite avec une membrane, mais ceci reste très spéculatif. Si *Synechococcus* sp. WH8102 ne possède qu'une seule caroténo-protéine, la mise au point d'un protocole de purification de la membrane plasmique permettrait de savoir si le produit du gène SYNW1367 s'y trouve ou non inséré. Si c'est le cas, il est probable que cette protéine peut adopter des conformations hydrophiles et hydrophobes et ainsi transporter des caroténoïdes des thylacoïdes jusqu'à la membrane plasmique.

## CHAPITRE V

### LES ANTENNES PHOTOSYNTHETIQUES DES MAMELLIALES : LE CAS *D'OSTREOCOCCUS TAURI*

## CHAPITRE V : Les antennes photosynthétiques des Mamiellales : le cas d'*Ostreococcus tauri*

### Contexte de l'étude

Grâce à la disponibilité récente du génome de la Prasinophyceae *Ostreococcus tauri* (Derelle et al., soumis), les gènes codant pour les protéines de la famille des Lhc (« light-harvesting complexes ») présents chez cette petite algue verte primitive ont pu être tous identifiés. Appuyée d'évidences biochimiques, l'analyse de la phylogénie des séquences nous a permis de rétablir certaines idées fausses qui s'étaient propagées dans la littérature concernant les LHC des Mamiellales (voir par exemple Schmidt et al., 1993). Ma contribution à ce travail a principalement consisté à obtenir les données biochimiques tandis que Francisco Rodriguez s'est chargé des analyses HPLC de pigments. L'analyse phylogénétique des Lhc a été réalisée par A.Z. Worden (Rosenstiel University, Miami, USA), en visite dans notre laboratoire de septembre 2003 à juin 2004. Mon implication dans l'écriture du manuscrit a été majeure. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article soumis à *Molecular Biology and Evolution*.

### Traduction du résumé

La position basale des Mamiellales (Prasinophyceae) dans la lignée verte fait de ces organismes un groupe clé dans l'étude des premières étapes de l'évolution des complexes collecteurs de lumière à chl a/b. La séquence entière du génome d'*Ostreococcus* nous a permis d'appréhender pour la première fois la diversité des antennes photosynthétiques dans un organisme de ce groupe d'algue verte. Comme chez *Mantionella squamata*, une partie des gènes *lhc* d'*Ostreococcus tauri* codent pour l'antenne caractéristique des Prasinophyceae que nous appelons ici Lhcp. Ces complexes qui lient de la chl a et b, un dérivé chlorophyllien (Mg-divinyl phaeoporphyrine  $a_5$ ), ainsi que des caroténoïdes particuliers, semble porter plus de 60% de la chl totale dans nos condition de culture. Par ailleurs, en contradiction avec la littérature actuelle basée sur une série d'études de *Mantoniella squamata*, nous avons trouvé qu'*Ostreococcus tauri* possède un certain nombre d'autres gènes *lhc*, dont 5 *lhca* codant pour une antenne de photosystème I. En utilisant un anticorps dirigé contre le polypeptide Lhca2, nous avons mis en évidence que les protéines de type Lhca sont pas seulement présents chez *Ostreococcus tauri*, mais aussi chez d'autre Mamiellales dont *Mantoniella squamata*. Le fait que ces Prasinophyceae possèdent des complexes LHCI mais pas de LHCII de type plantes ou algues vertes va dans le sens de l'hypothèse proposant que les LHCII ont une origine plus récente que les LHCI. La présence de gènes

codant pour des protéines de type CP-26, placés à la base du clade des LHCII pourrait être un indice de l'origine de la famille des LHCII qui a évolué séparément chez les plantes et les algues vertes. L'antenne majeure des Prasinophyceae Lhcp est apparue indépendamment des LHCII, peut-être à la suite de duplication des gènes *lhca*.

# New insights into the nature and phylogeny of prasinophyte antenna proteins: *Ostreococcus tauri*, a case study

Christophe Six<sup>a\*</sup>, Alexandra Z. Worden<sup>b\*</sup>, Francisco Rodriguez<sup>a</sup>,  
Hervé Moreau<sup>c</sup> & Frédéric Partensky<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Station Biologique, UMR 7127 CNRS-INSU-UPMC, BP74, 29682 Roscoff cedex, France

<sup>b</sup>Rosenstiel School of Marine & Atmospheric Science, University of Miami, 4600 Rickenbacker Causeway  
Miami, FL 33149-1098 USA

<sup>c</sup>Laboratoire Arago, UMR 7628 CNRS-INSU-UPMC, BP44, 66651 Banyuls sur mer cedex, France.

## Abstract

The basal position of Mamiellales (Prasinophyceae) in the green lineage makes it a key group to understand the early steps of the evolution of chlorophyll *a/b*-binding light-harvesting complexes (LHCs). The complete sequencing of the *Ostreococcus tauri* has allowed us for the first time to apprehend the whole diversity of LHC proteins in one representative species of the Mamiellales order. Like *Mantoniella squamata*, *O. tauri* possesses a number of genes encoding a prasinophyte-specific type of LHCs that we propose to designate “Lhcp”. These complexes, which bind chl *a*, *b*, a chlorophyll *c*-like pigment (Mg-divinyl phaeoporphyrin *a*<sub>5</sub>) and a number of unusual carotenoids, appear to be predominant in the cell, binding more than 60% of total chlorophyll. They are retrieved to some extent in both reaction center I- (RCI-) and RCII-enriched fractions. However, in sharp contrast with previous literature mainly based on *M. squamata*, we found that *O. tauri* also possesses a variety of other LHC types, including a number of LHCI proteins (5 *Lhca* genes are present in *O. tauri*). Using an antibody against plant Lhca2, we unambiguously show that LHCI complexes are found not only in *O. tauri*, in which there are specifically associated to RCI, but also in a variety of other Mamiellales, including *M. squamata*. The finding that these prasinophytes do contain LHCI complexes, but lack plant-like or other green alga-like LHCII, is consistent with the hypothesis that the LHCII have a more recent origin than have LHCI protein superfamily. The discovery of CP26-like proteins in *O. tauri*, which are placed at the base of the LHCII clade in phylogenetic trees, however provides some hints about the possible origin of the LHCII protein family which has evolved separately in plants and green algae. Still, the major LHC of prasinophytes (Lhcp) has apparently arisen independently from this family, possibly by divergence of a LHCI gene precursor.

## Introduction

Photosynthetic organisms use light-harvesting antennae to collect and transfer solar energy to photosystem (PS) reaction centers (RC) where it is transformed into life supporting chemical energy. The most common antenna systems found in oxyphototrophic eukaryotes are complexes consisting of proteins binding chlorophyll (chl) and carotenoid molecules. These pigments are bound at specific sites along three membrane-spanning helices (MSHs) and one short amphipathic helix (Kuhlbrandt et al., 1994). The first and third MSHs of light-harvesting complexes (LHCs) show a high level of similarity to one another and display a two-fold symmetry, whereas their second MSH has a distinct sequence and is more variable among members of the LHC family (Green and Kuhlbrandt, 1995). Despite being located in the thylakoid membranes, all LHC proteins are encoded by nuclear genes, in contrast to RCI and RCII proteins as well as the PSII core antenna polypeptides (CP43 and CP47) which are chloroplast-encoded (Elrad and Grossman, 2004; Green et al., 1991).

In higher plants, the major antenna complexes have been shown to be associated either specifically with photosystem I (PSI) or predominantly with PSII and have been termed LHCI and LHCII, respectively. Seminal work resolving the atomic structure of the LHCII of pea (Kuhlbrandt et al., 1994) has led to a comprehensive understanding of the overall organization of this antennae population. LHCII is composed of a permanent inner PSII antenna, in the form of

---

\* Both first authors contributed equally to the work.

three probably monomeric minor LHCII proteins, CP29/26/24 encoded by *lhcb4-6* genes, and of a peripheral and potentially mobile trimeric major LHCII, encoded by *Lhcb1-3* genes, (Jansson, 1999). *Lhcb4* and *Lhcb6* are only distantly related to the major LHCII genes, sharing higher similarity with LHCI genes (Durnford et al., 2003). The structural organization of LHCI proteins around the PSI core is less well understood and genes encoding this subpopulation are far more divergent than LHCII genes. Overall, LHCI is composed of dimers of Lhca proteins, which fall into four primary subtypes, LHCI type I and IV (LHCI-730) encoded by *Lhca1/4* and LHCI type II and III (LHCI-680) encoded by *Lhca2/3* (Green and Durnford, 1996; Jansson, 1999).

In the case of green algae, LHCs have also been partially characterized in several species, such as *Scenedesmus obliquus*, *Dunaliella tertiolecta* and *D. salina* and most comprehensively in *Chlamydomonas reinhardtii* (for review see e.g. Durnford et al., 2003; Elrad and Grossman, 2004; Larkum and Howe, 1997; Nield et al., 2004). In *C. reinhardtii*, genome analysis (Elrad and Grossman, 2004) revealed nine genes encoding major LHCII polypeptides (*Lhcbm1-6/8-9/11*), two genes encoding the minor light-harvesting polypeptides of PSII (*Lhcb4/5*) and nine LHCI genes (*Lhca1-9*), a composition largely confirmed by biochemical and proteomic approaches (Stauber et al., 2003; Takahashi et al., 2004; Tokutsu et al., 2004). In *C. reinhardtii*, as well as other Chlorophyta, none of the individual *Lhcbm* (LHCII major) polypeptides can be clearly ascribed to any of the different LHCII subtypes conserved amongst higher plants (*Lhcb1-3*; Durnford et al., 2003; Elrad and Grossman, 2004; Teramoto et al., 2001). In contrast, some LHCI proteins (types I and III, respectively) are highly conserved between green algae and higher plants while others (types II and IV) are less so (Tokutsu et al., 2004). This suggests that gene multiplication and divergence among the major LHCII subtypes and possibly also among LHCI types II and IV have occurred independently for green algae and vascular plants, after the separation of these lineages (Elrad and Grossman, 2004; Teramoto et al., 2001; Tokutsu et al., 2004).

The Prasinophyceae constitute a particularly interesting algal class, holding a basal position in the evolution of the extant green lineage (Fawley et al., 2000; Guillou et al., 2004). Ecologically, prasinophytes belonging to the order Mamiellales are widespread and often abundant marine phytoplankton, playing an important role in oceanic biogeochemical cycling and primary production (Diez et al., 2001; Guillou et al., 2004; Not et al., 2004; Worden et al., 2004). Mamiellales, including *Mantoniella squamata*, *Micromonas pusilla*, *Bathycoccus prasinos* and *Ostreococcus tauri*, display a complex pigment composition relative to other green algae, including carotenoids from the uriolide and prasinoxanthin series (Egeland et al., 1997) and a chl *c*-like pigment, Mg 2,4 divinyl-phaeoporphyrin *a*<sub>3</sub> monomethyl ester (MgDVP; Jeffrey and Vesk, 1997). To date, only *M. squamata* has been studied in detail with respect to pigment-protein complexes (Fawley et al., 1986; Jiao and Fawley, 1994; Rhiel et al., 1993; Schmitt et al., 1993). These studies indicated the presence of a single, unique LHC type in *M. squamata*, associated to both PSI and PSII. These findings have stimulated much thought regarding LHC evolution and the ancient primary endosymbiosis event (e.g. Durnford et al., 1999; Paulsen, 1995; Tokutsu et al., 2004).

Here, we use a combination of genomic, phylogenetic and biochemical approaches to characterize the LHCs of *Ostreococcus tauri*, a widespread unicellular marine prasinophyte which is also the smallest free-living eukaryote (ca. 1  $\mu$ m diameter) known to date (Courties et al., 1998. Chrétiennot-Dinet, 1995; Courties et al., 1994). From an evolutionary perspective, based on its phylogenetic position (Guillou et al., 2004), genome compaction (12.65 Mb total genome size; Derelle et al., 2002), Derelle and coll. unpublished) as well as its widespread environmental distribution, *Ostreococcus* is a fascinating case study organism. Our work brings new insight to the current view of prasinophyte LHC structure and function, and should help elucidating evolutionary processes that have led to such a diversified LHC gene family within the green lineage.

## Materials and Methods

### *Strains and culture conditions*

*O. tauri* strain RCC745 (a.k.a. OTH95), *M. squamata* strain RCC417 (a.k.a. CCMP480), *Bathycoccus prasinos* strain RCC113 (a.k.a. CCMP1898) and *Micromonas pusilla* strain RCC114 (a.k.a. CCMP490) were grown in K medium (Keller et al., 1987). All strains were grown in 10 L polycarbonate carboys at 20°C under 10  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  constant blue-green light, provided by fluorescent bulbs (Daylight, Sylvania) covered by blue-green filters (LEE Filters, Panavision). Frozen spinach (*Spinacia oleracea*) was used as control.

### *Spectrometric measurements*

*In vivo* absorption spectra were recorded on cell suspensions using a double wavelength spectrophotometer (Aminco Chance DW2) equipped with an integrating sphere, and 77 K fluorescence spectra on glass fiber filters (GF/F, Whatman) within a spectrofluorometer (Hitachi F4500) with 2.5 nm/5 nm excitation/emission slit widths.

### *Pigment analyses*

Analytical and semi-preparative pigment separations were performed using Waters Symmetry C<sub>8</sub> columns (150 x 4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$  particle size and 150 x 7.8 mm, 7  $\mu\text{m}$  particle size, respectively) according to published procedures (Zapata et al., 2000), optimized as follows. The mobile phase A was methanol:acetonitrile:aqueous pyridine solution (0.1 M pyridine ; 45:35:20 v/v/v) and the mobile phase B was acetonitrile:methanol:acetone (60:20:20 v/v/v). Solvent gradient (time, % B): 0 min, 0 %; 5 min, 4 %; 18 min, 30%; 21 min, 30%; 26 min, 95 %; 36 min, 95 %; 38 min, 0 %. Flow rate was 1 and 3 ml min<sup>-1</sup> for analytical and semi-preparative separations, respectively. Cultures and protein extracts were filtered onto 25 mm diameter GF/F filters, immediately frozen and stored at -20° C until further analysis. Frozen filters were thawed in 1 ml of 95% methanol and re-filtered through 25 mm diameter GF/F filters to remove cell and filter debris. 200  $\mu\text{l}$  of the pigment extracts were mixed with 40  $\mu\text{l}$  milli-Q water to avoid peak distortion (Zapata and Garrido, 1991) and immediately injected into a Hewlett-Packard HPLC 1100 Series System equipped with a quaternary pump and diode array detector. All sample preparations were made under subdued light. Chlorophylls and carotenoids were detected by absorbance at 440 nm and identified by diode array spectroscopy (wavelength range: 350-750 nm; 1 nm spectral resolution). Pigments were identified, and quantified, using standard curves that employed known concentrations of both commercial standards (Sigma-Aldrich) and standards derived from macroalgae and phytoplankton cultures by preparative HPLC (Repeta and Bjørnland, 1997), applying previously compiled extinction coefficients (Jeffrey et al., 1997).

### *Thylakoid extraction*

Thylakoids were obtained using a modification of the protocol described by (Schmitt et al., 1993). Cells were harvested by centrifugation, washed and resuspended in 10 mL HEPES buffer pH 7.5 (10 mM HEPES, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 1 mM EDTA) containing a protease inhibitor cocktail composed of 1 mM benzamidin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluorure and 1 mM  $\epsilon$ -amino-n-caproic acid (Sigma-Aldrich). This suspension was passed through a French pressure cell twice, at 20,000 psi and 4°C. All subsequent steps were carried out under dim light at 4°C. Unbroken cells and debris were pelleted by centrifugation, the supernatant removed and loaded onto 2 mL HEPES buffer containing 60% sucrose (m/v). After centrifugation at 130,000 x g for 1 h in a SW41Ti rotor (Beckman), the dark band floating at the sucrose interface was collected carefully and resuspended in 12 mL of HEPES buffer, supplemented with protease inhibitors. Subsequently, this suspension was centrifuged 2 h at 150,000 x g, the supernatant was discarded and the pellet resuspended in 2 mL HEPES buffer containing 15% glycerol and protease inhibitors.

### *Thylakoid dissociation and LHC purification*

The thylakoid suspension was solubilized with n-dodecyl  $\beta$ -d-maltoside (ddm; Sigma-Aldrich) with a ddm:chl ratio of 60:1. Solubilization was made in dark for 2 h at 4°C with strong vortexing. After centrifugation at 6,000 x g for 5 min, the supernatant was loaded onto a 10 mL continuous sucrose gradient (5-50%) in HEPES buffer containing 0.5% ddm (m/v) and protease inhibitors. The gradient was then ultracentrifuged 15 h at 130,000 x g, the colored bands were collected and their pigment content analyzed by HPLC.

To further purify the LHC polypeptides, aliquots of sucrose gradient fractions were loaded onto a 7% acrylamide non-denaturing IEF gel with no stacking gel and containing ampholyte carriers pH 4-6.5 (Amersham Biosciences) and 0.5% ddm. The electrophoresis system was a mini-Protean II where internal glass plates were replaced by alumina plates (Hofer) in order to facilitate heat dissipation. The cathode tank was filled with 20 mM NaOH 0.5% ddm and the anode tank contained 20 mM orthophosphoric acid. The complexes were allowed to focus at 4°C in steps increasing by 50 V every 10 min up to 400 V, then 1 h at 500V. The resulting bands were excised and crushed in HEPES buffer containing 0.5% ddm and a protease inhibitor cocktail (see above) using an electric grinder. Acrylamide remnants were discarded by 15 min centrifugation at 20,000 x g and the supernatant characterized at room temperature by fluorescence, absorption and its pigment content.

### *Immunoreactions*

Aliquots containing an equal chl concentration of either sucrose gradient fractions from *O. tauri* or thylakoids extracted from spinach and the four Mamiellales species (see above) were precipitated by 10% TCA and 0.5 M  $\beta$ -mercaptoethanol, then resuspended in 4% SDS Laemmli denaturation buffer and loaded on 15% acrylamide SDS-PAGE minigel (Biorad). After about 1.5 h electrophoretic run, proteins were transferred overnight onto a nitrocellulose membrane in a Laemmli Tris-glycine buffer pH 8.3 containing 10% methanol and 0.5% acetic acid, at 0.5 mA per gel cm<sup>2</sup>. The membrane were then colored with Ponceau red, saturated during 1 h with 50% (m/v) milk TTBS buffer (0.1% Tween, 20 mM NaCl, 500 mM Tris) and incubated in 0.5% milk TTBS containing rabbit primary antibodies directed against either *M. squamata* LHC (courtesy of E. Rhiel, Philipps-Universität, Marburg, Germany) or Lhca2 (AgriSera) polypeptides. For characterization of sucrose gradient fractions, antibodies directed against PsaA and PsbA polypeptides, kindly provided by P.R Chitnis (Iowa State University of Sciences & Technologies, Ames, USA) and B. Green (University of British Columbia, Vancouver, Canada) were also used. After rinsing with 0.5% milk TTBS, a secondary anti-rabbit antibody coupled to a horseradish

peroxidase (Biorad) was applied for 2 h. The chromogene reaction was allowed by addition of chloronaphthol and hydrogen peroxide in TBS buffer containing 10% methanol.

### *Genome sequencing*

Purified genomic DNA fragments broken by sonication and ranging from 1 kb to 5 kb were inserted into pBluescript II KS (Stratagene). Plasmidic DNA was extracted according to the TempliPhi method (Amersham) and inserts were sequenced on both strands using universal forward and reverse M13 primers and the ET DYEnamic terminator kit (Amersham). Data were analyzed and contigs were assembled using Phred-Phrap and Consed software packages (<http://www.genome.washington.edu>).

### *cDNA libraries*

Two cDNA libraries were also generated from different *O. tauri* cultures to improve the representation of the expressed sequences. One cDNA library was created in the Lambda-zap vector (Stratagene) and the second in the gateway system (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The average insert size was 1.5 Kbp. Sequences were obtained using forward and reverse primers and single reads were assembled in contigs using the Pred-Phrap software. The EST sequence database was subsequently screened using tblastn for each identified LHC proteins (see below).

### *Gene identification*

Lhc sequences from *O. tauri* were initially retrieved by systematically blasting (tblastn) the complete genome using Lhc sequences from a variety of other chl *b*-containing organisms. After completion of gene modeling and determination of intron/exon structure, the data bank of derived conceptual amino acid sequences was further screened via blastp searches to identify potentially missed genes. cDNAs were used to confirm derived amino acid sequences as well as intron/exon structure. N-terminal regions of the amino acid sequences were analyzed for putative transit peptides (TP) using ChloroP, TargetP and homology to known TP and mature polypeptides. All genes were hand curated and deposited in GenBank under accession numbers XX-YY (Table 2).

**Table 2** : LHC gene family members in *O. tauri*

<i>Gene designation</i>	<i>potential complex association</i>	<i>Exon Number</i>	<i>Gene model</i>	<i>GenBank number</i>	<i>Lowest e value (trEMBL)</i>
Lhca1	LHCI type I	2	Ot00g08740	XXX	<i>Lolium temulentum</i> Q40252 Type II LHCI [lhaB], 4e <sup>-63</sup> , 54% I, 66% +
Lhca2	LHCI type II	1	Ot09g00110	XXX	
Lhca3	LHCI	2	Ot17g00390	XXX	
Lhca4	LHCI type II	2	Ot02g04840	XXX	<i>Pisum sativum</i> Q41038 Type II chl a/b binding protein precursor [lhaB] 4e <sup>-59</sup> , 52% I, 66% +
Lhca5	LHCI type	2	Ot05g02520	XXX	
Lhcaq	LHCII ?		Ot13bg1720	XXX	<i>Oryza sativa</i> Q69TB3 putative chl a/b-binding protein, e <sup>-53</sup> , 46% I, 55% +
Lhcb4	CP29		Ot15g01770	XXX	
Lhcb4b*	CP29		Ot04g00350	XXX	Partial sequence
Lhcb5	CP26	2	Ot13ag01200	XXX	
LI818R		3	Ot05g00770	XXX	<i>Cyclotella cryptica</i> O65892 fucoxanthin cac-binding protein precursor 4e <sup>-40</sup> , 55% I, 65% +
Lhcp1	Prasinophyte LHC	1*	Ot07g00530	XXX	<i>M. squamata</i> Q40351 chl a/b/c binding protein [Lhc1*4], e <sup>-117</sup> , 87% I, 90% +
Lhcp2.1	Prasin. LHC	1*	Ot05g02940	XXX	
Lhcp2.2	Prasin. LHC	1*	Ot04g01360	XXX	
Lhcp2.3	Prasin. LHC	1*	Ot03g00880	XXX	
<b>Lhcp2.4</b>	Prasin. LHC	1*	Ot00g07920	XXX	TP missing

\*Often have intron in transit

*Protein alignments and phylogenetic analysis*

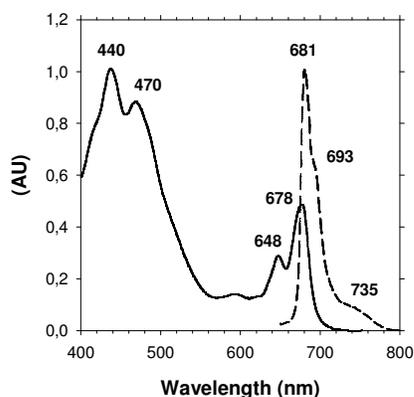
Amino acid alignments of the predicted mature regions of the proteins were generated using a combination of ClustalW (Thompson et al. 1994; on Biology Workbench, San Diego Supercomputer Center, <http://workbench.sdsc.edu/>) and manual editing using BioEdit. The alignment was composed of 76 polypeptide sequences, including all known major and minor LHCI and LHCII polypeptides from both *A. thaliana* and *C. reinhardtii*, as described by Jansson (1999) and Elrad and Grossman (2004), respectively. Also included were PsbS from *A. thaliana* (AF134131) and *Lycopersicon esculentum* (P54773), LI818R and Lhcq (*C. reinhardtii*; as in Elrad and Grossman, 2004). Representative sequences from *L. esculentum* (Cab9, CAA43590; Lhca1-3: P12360, P10708, P27522; CP24, P27524), *Volvox carterae* (Lhca, AAD55569; Lhca2, P10708), the red alga *Porphyridium cruentum* (Lhca1, U58679; Lhca2, U58680) and chl *a/c*-containing *Isochrysis galbana* (Fcp1, X77333), *Laminaria saccharina* (Fcp1, U73510), *Macrocystis pyrifera* (FcpA, Q40297), *Odontella sinensis* (Fcp1, X81054), and *Phaeodactylum tricorutum* (FcpD, S42133; FcpA, Q08584) were also incorporated. For *O. tauri*, two of the 15 identified LHC genes were excluded due to potential sequencing/assembly problems (see discussion) as were members of the CBR/ELIPs family. From this alignment, 141 amino acid positions, falling largely within the membrane spanning regions and immediately preceding regions, of the putative mature peptides were used for subsequent phylogenetic analysis, while non-homologous positions and regions of ambiguous alignment were omitted.

Phylogenetic analyses were conducted using parsimony, neighbor joining-distance and protein maximum likelihood approaches and the Phylip-3.62 package (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). For parsimony analysis (PROTPARS) sequence input order was randomized (10 jumbles). Distance matrices (PROTDIST) used the Dayhoff PAM matrix and randomized sequence input. Subsequent determination of tree topology used neighbor joining (NEIGHBOR) and randomly added distances. Maximum likelihood (PROML) used the PAM probability model, global rearrangements and randomized sequence input order (1 jumble). For all analyses, support for trees was obtained by bootstrapping 100 datasets (generated in SEQBOOT) and consensus trees were generated using CONSENSE.

## Results

### *In vivo measurements*

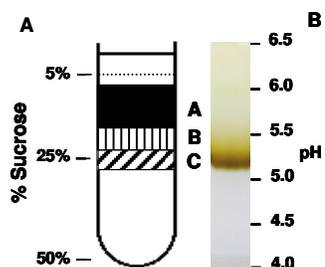
The *in vivo* absorption spectrum of whole *O. tauri* cells was typical of chl *a/b*-containing organisms, with blue-green maxima at 440 and 470 nm (chl and carotenoids), and red maxima at 678 and 648 nm from chls *a* and *b*, respectively (Fig. 1). The chl *b*:chl *a* ratio was estimated as 0.60. No clear contribution from the chl *c*-like pigment (Mg-DVP *a<sub>3</sub>*) could be identified in this spectrum. The 77 K fluorescence emission spectrum of whole cells with excitation at 440 nm presented a major peak at 681 nm, and only small shoulders at 693 and 735 nm.



**Figure 1 :** *In vivo* absorption and 77K fluorescence emission spectra of *O. tauri* cells. Numbers indicate the exact position of maxima in nm.

### *Thylakoid dissociation and LHC characterization*

Three major bands (Fig. 2A) were obtained after dodecyl maltoside (ddm) mediated dissociation of the thylakoid membranes on a 5-50% sucrose gradient. These bands were located in the upper section of the gradient, corresponding to 10-30% sucrose. The major fraction, containing the bulk of LHC (see below), was a dark brown band located at the uppermost region of the gradient (band A; Fig. 2A). This band harbored approximately 60% of the total chlorophyll. Bands B and C exhibited a light green and brown color and represented ca. 21% and 9% of the total chlorophyll, respectively.



**Figure 2 :** Isolation of pigment-protein complexes from dissociated thylakoids and purification of the major LHC. (A) Distribution of pigment-protein complexes in the sucrose density gradient (5 to 50%) obtained after ultracentrifugation for 15 hr at 130,000 x g ; B) IEF gel, showing the purified LHCs.

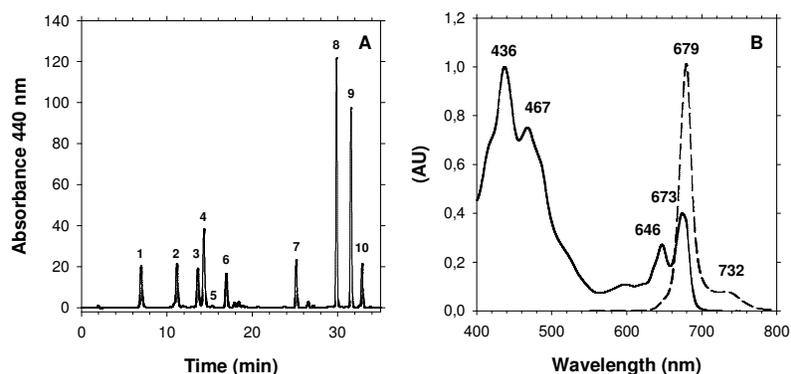
HPLC analysis of band A revealed that it contained the same array of pigments identified in the whole thylakoid fraction with a general enrichment of all accessory pigments but  $\beta$ -carotene (Table 1). In contrast, band B exhibited a low chl *b*:chl *a* ratio (ca. 0.332 vs. ca. 0.868 in thylakoids) and a significant enrichment in  $\beta$ -carotene (its ratio to chl *a* is ca. 0.051 vs. ca. 0.019 in thylakoids), suggesting the presence of RCs in this fraction. Band C had an intermediate chl *b*:chl *a* ratio (ca. 0.858) compared to bands A and B and, more generally, had a pigment composition very similar to that of thylakoids, indicating that band C was composed of a mixture of LHCs and RCs.

**Table 1:** Pigment ratios relative to chl *a* of *O. tauri* thylakoids, sucrose gradient fractions A through C and the IEF-purified LHCs. Mg-DVP :  $\beta$ -car :  $\beta$ - $\beta$ -carotene, DLU : Dihydrolutein, Mg-Div : Mg-Divinyl Phaeoporphyrin  $a_5$ , Mic

: Micromonal, Neo : Neoxanthin, Pra : Prasinoxanthin, Unk car : Unknown carotenoid., Uri : Uriolide, Vio : Violaxanthin,

	Chl <i>b</i>	Mg-DVP	Pra	Neo	Uri	DLu	Unk car	Mic	Vio	$\beta$ -car
<b>Thyl</b>	0.868±0.14	0.078±0.01	0.127±0.01	0.068±0.01	0.055±0.01	0.052±0.01	0.044±0.01	0.041±0.01	0.021±0.01	0.019±0.01
<b>A</b>	1.033±0.30	0.086±0.01	0.151±0.02	0.082±0.01	0.065±0.01	0.067±0.01	0.050±0.01	0.051±0.01	0.024±0.02	0.007±0.01
<b>B</b>	0.332±0.05	0.022±0.01	0.050±0.01	0.021±0.01	0.021±0.01	0.015±0.01	0.010±0.01	0.012±0.01	0.018±0.01	0.051±0.01
<b>C</b>	0.858±0.07	0.079±0.02	0.118±0.01	0.071±0.01	0.053±0.01	0.055±0.01	0.030±0.01	0.043±0.01	0.017±0.01	0.019±0.01
<b>LHC</b>	1.331±0.14	0.131±0.04	0.206±0.08	0.087±0.02	0.097±0.02	0.071±0.01	0.064±0.01	0.056±0.01	0.006±0.01	0.002±0.01

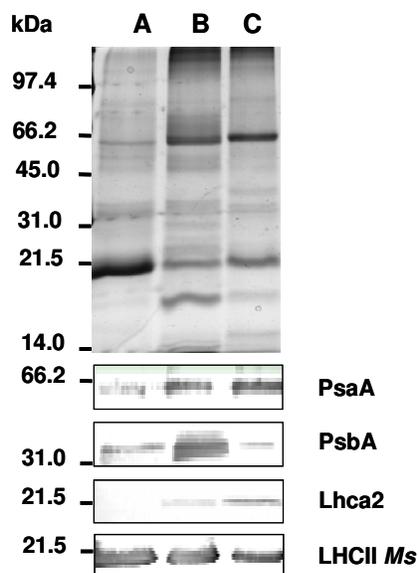
Further purification of LHCs from sucrose gradient bands A and C by IEF led to the isolation of a broad brown band focusing at pH 5.2 (Fig. 2B). The biochemical and biophysical properties of purified LHCs were identical for both samples. Compared to those in band A, purified complexes were impoverished in violaxanthin, but enriched in chl *b* and Mg-DVP *a*<sub>5</sub> (Fig. 3A and Table 1). The absorption spectrum of purified LHCs showed blue-shifted maxima compared to the *in vivo* spectrum and a higher chl *b*:chl *a* ratio (0.69; Fig. 3B). The fluorescence emission spectrum at room temperature exhibited a major peak at 679 nm and a shoulder at 732 nm.



**Figure 3** : HPLC pigment and spectrometric analyses of IEF-purified LHCs from *O. tauri* (A). Chromatogram with by order of elution : 1 : Mg-Divinyl Phaeoporphyrin *a*<sub>5</sub>; 2 : Uriolide ; 3 : Neoxanthin ; 4 : Prasinoxanthin ; 5 : Violaxanthin ; 6 : Micromonal ; 7 : Dihydrolutein ; 8 : chl *b* ; 9 : chl *a* ; 10 : Unknown carotenoid; 11 :  $\beta$ -carotene. (B) Absorption and room temperature fluorescence emission spectra of purified LHCs. Numbers indicate the exact position of maxima in nm.

#### SDS-PAGE and immunoblots analysis

SDS-PAGE analysis of sucrose gradient bands A, B and C revealed distinct protein patterns (Fig 4, upper part). The polypeptidic profile from band A confirmed its enrichment in LHC proteins, forming as a major band at 21 kDa. Band B contained few antenna proteins, but both fractions B and C exhibited prominent bands at about 65 kDa, corresponding to the PSI core proteins, PsaA and PsaB. This band was the strongest in fraction C, indicating a specific RCI enrichment.



**Figure 4** : SDS-PAGE of sucrose gradient fractions and immunoblots anti-PsaA, PsbA, Lhca2 and LHCII from *M. squamata* (*Ms*).

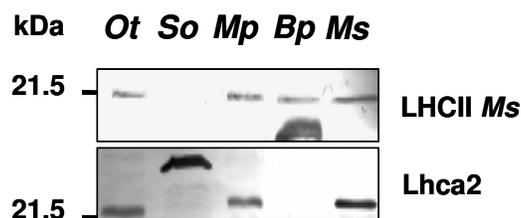
Immunoreactions with anti-PsaA and anti-PsbA antibodies provided some indication of the relative abundance of RCI and RCII in the different fractions (Fig. 4). Cross reaction between these antibodies and proteins from band A was weak, supporting the finding that this band contains few PS core proteins. In contrast, strong cross-reactions were observed with anti-PsbA for band B (at ca. 35 kDa) and with anti-PsaA for band C (at 65 kDa), confirming their relative enrichment in RCII and RCI, respectively.

An anti-Lhca2 directed antibody, raised against a synthetic polypeptide sequence matching a part of the Lhca2 from various plants as well as from *C. reinhardtii*, was also tested. This Lhca2 antibody recognized a protein at approximately 22 kDa in bands B and C (Fig. 4), whereas no cross reaction was observed with band A. The cross-reaction was the strongest with the RCI-enriched fraction (band C), suggesting a specific association between the identified proteins and PSI.

Finally, a polyclonal antibody that was raised against a purified LHC fraction from *M. squamata* (Rhiel et al., 1993) cross-reacted at ca. 20 kDa in all *O. tauri* fractions. As expected, the strongest cross-reaction was to the main LHC fraction (band A), but this antibody also reacted with bands B and C, suggesting the presence of the prasinophyte-specific LHC of *O. tauri* in both RCII and RCI-enriched fractions.

To assess general commonalities between antenna complexes of different members of the Mamiellales order, immunoreactions were conducted with whole thylakoid proteins from several species, using spinach as a negative control. Immunoreactions conducted with the anti-*M. squamata* LHC antibody confirmed the presence of a protein of ca. 22 kDa in all the species tested, specifically in *O. tauri*, *M. pusilla* and *B. prasinos* (Fig. 5). Surprisingly, the profile of *B. prasinos* thylakoids exhibited a second band at a relatively low apparent molecular weight (MW of ca. 17 kDa) showing a strong cross-reaction with the anti-*M. squamata* LHC antibody. As expected, no cross-reaction of this antibody was observed with spinach proteins. A clear cross reaction of the anti-Lhca2 antibody was observed with the Lhca2 proteins of both spinach, at ca. 24 kDa, and with polypeptides of significantly lower apparent molecular weight (ca. 22 kDa) in all prasinophyte strains tested but *B. prasinos* (Fig. 5). Although it was beyond the scope of this paper to characterize further the LHC proteins of the latter species, these immunological

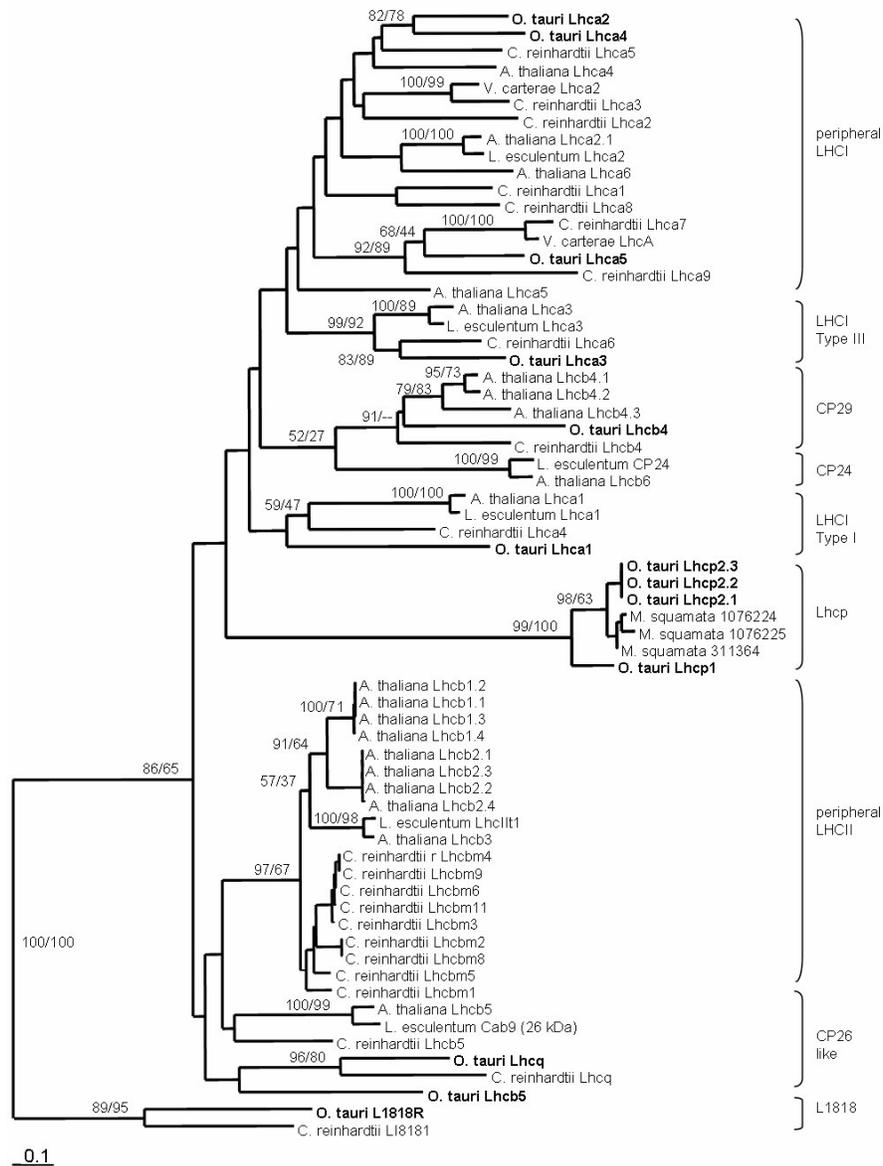
characterizations strongly suggest that they have a number of originalities with regard to other Mamiellales.



**Figure 5** : Immunoblots anti-Lhca2 and LHCII from *M. squamata* (*Ms*) performed on thylakoid membranes of *O. tauri* (*Ot*), *S. oleracea* (*So*), *M. pusilla* (*Mp*), *B. prasinos* (*Bp*) and *M. squamata*.

### Characterization of the LHC gene family in *O. tauri*

Analysis of the completely sequenced *O. tauri* genome (Derelle and coll., unpublished) revealed a total of 20 genes encoding precursor proteins of the Lhc superfamily. These genes possessed very few exons (Table 2), especially relative to *C. reinhardtii* (Elrad and Grossman, 2004). The identified genes primarily fall with three of the five main LHC subpopulations common to all other chl *a/b*-containing organisms (Table 2). Five genes encoded proteins clearly related to the major polypeptides of PSI (Lhca) and three encoded proteins related to the minor antenna polypeptides of PSII, CP26 (2 genes) and CP29 (one gene). The majority of these genes shared highest identity with plant sequences when blasted on TrEMBL (Table 2). No homologs of genes coding for the major polypeptides of PSII (*Lhcb1-3* gene types in vascular plants, *Lhcbm1-6/8/9/11* in *C. reinhardtii* ; Elrad and Grossman, 2004) nor of CP24 (*Lhcb6*) could be identified in the *O. tauri* genome, nor were *PsbS* homologs found. However, an apparently prasinophyte-specific LHC gene family herein termed *Lhcp* (p for prasinophyte; 5 genes) was present. The only other members of this family known so far were described in *Mantoniella squamata* and referred to as chlorophyll *a/b/c* LHCs (Rhiel and Morschel, 1993). Four of the *Lhcp* genes found in *O. tauri* were almost identical. Two other LHC genes, previously identified in *C. reinhardtii* but of still unknown function, LI818R (Savard et al., 1996) and *Lhcbq* (Elrad and Grossman, 2004), were each represented in single copy in *O. tauri*. Although not the focus of this study, the presence of five other distant members of the Lhc gene superfamily should be noted, which encode members of the carotene biosynthesis-related (CBR) or early light induced (ELIP) protein family. Such genes are thought to be involved in photoprotection processes and transiently expressed during shifts from low to high light in *C. reinhardtii* (for review see e.g. Montane and Kloppstech, 2000).



**Figure 6** : Phylogenetic tree of different LHCs of selected higher plants, green algae and *O. tauri* inferred by the Neighbor-joining method with distances computed using the PAM matrix; In this analysis *Phaeodactylum tricorutum FcpD* was used as an outgroup. Numbers on the internal branches show bootstrap values for 100 replicate trees obtained both with maximum likelihood and neighbor-joining methods.

Phylogenetic analyses allowed more complete assessment of the relatedness of chlorophyll *a/b* binding proteins subpopulations found in *O. tauri* to those of *A. thaliana*, representing higher plants and *C. reinhardtii*, representing other green algae (Fig. 6). For clarification purposes, it should be emphasized that 1) we have designated *C. reinhardtii* genes utilizing the nomenclature of Elrad and Grossman (2004), which differs from that of e.g., Tokutsu et al. (2004) the nomenclature used by Elrad and Grossman (2004) does not necessarily correspond with that adopted for higher plants (e.g. by Jansson, 1999). As in higher plants and green algae we found that the major LHCI polypeptides and CP26 (Lhcb5) were monophyletic (Fig. 6). Two *O. tauri* sequences fell at the base of this group, although bootstrap values were low for several nodes in this region. One of these two sequences appeared to be closest to Lhcq of *C. reinhardtii*, although lacking the divergence seen in the N-terminal region of putative mature *C.*

*reinhardtii* polypeptide (Elrad and Grossman, 2004). The other *O. tauri* sequence forms a single, bootstrap supported clade with Lhcb5 of higher plants and *C. reinhardtii* in analyses where Lhcq was omitted (not shown). However in the presented tree (including Lhcq), this branching pattern did not retain significant support (Fig. 6). Analyses omitting Lhcq also had increased bootstrap support for the major LHCII protein group (from 86% to 96% with NJ-distance methods). Bootstrap analysis strongly supported the exclusion of Lhcp, the prasinophyte-specific LHC proteins, from the major LHCII polypeptides found on all other members of the green lineage studied so far.

Consistent with previous studies (see e.g. Durnford et al., 1999), we found that CP29 (Lhcb4) and CP24 (Lhcb6) formed a supported group within LHCI proteins (Fig. 6). This included *O. tauri* Lhcb4 which branched with higher plant Lhcb4 sequences than *C. reinhardtii*. LHCI proteins were largely divergent making relationships difficult to resolve. However, significant support was found for a green algal LHCI Type III group which included both *C. reinhardtii* and *O. tauri* (Lhca3), distinct from, but closely related to that of the higher plants *A. thaliana* and *L. esculentum*. A second likely LHCI type involving both green algae and higher plants appears to be LHCI Type I. *O. tauri* Lhca1 formed a basal branch (unsupported) to the group and in all analyses clustered with the Lhca1 of *A. thaliana* and other higher plants and Lhca4 of *C. reinhardtii*. *O. tauri* Lhca5 fell within a green algal only Lhca group, which branched close to *A. thaliana* Lhca5. Two highly similar *O. tauri* sequences, here termed Lhca2 and Lhca4, branched with *A. thaliana* Lhca4 and *C. reinhardtii* Lhca5, although without significant support. Again, this grouping was consistent through multiple tree analyses regardless of the phylogenetic approach employed. Lastly, in trees constructed with fucoxanthin-chlorophyll proteins (FCP) sequences (not shown), LI818 consistently branched with Fcp1 of the Haptophyte *Isochrysis galbana*, forming a group neighbored by other FCP sequences.

Deduced structural elements of *O. tauri* LHC proteins were similar to plants and other green algae. This was true for the LHCI and LHCII-related protein sequences both with respect to transmembrane domains and known chlorophyll ligands, as originally illustrated for LHCII of *Pisum sativum* (Kuhlbrandt et al., 1994). In terms of the chl ligands, conservative substitutions (based on PAM and Blosum45 matrices) were observed in several *O. tauri* LHCs. In almost all cases, identical substitutions are found in LHCI or LHCII of other organisms, for example, *A. thaliana* and *C. reinhardtii*. At least Lhca1 was an exception, with a conservative substitution for the chl *b6* ligand (Asparagine for Histidine) not appearing to be present in other organisms. In Lhcp proteins of both *O. tauri* and *M. squamata* two substitutions were found: 1) at the chl *a2* site (Histidine for Asparagine), a conservative “substitution” primarily seen in minor polypeptides of LHCII (e.g. Lhcb4 and Lhcb6 of *A. thaliana* and *L. esculentum*, Lhcb4 of *C. reinhardtii*; Lhcb4 and Lhcq of *O. tauri*); and 2) at the chl *b6* site (Glutamic acid for Glutamine), a very common substitution.

Screening of expressed sequence tag (EST) libraries provided preliminary assessment of potential utilization of the encoded proteins, addressing the question: are these genes expressed? All of the identified genes were expressed, with the exception of some CBR/ELIP genes, for which no corresponding EST were found under the standard growth conditions used. Further studies on high light-stressed *O. tauri* cells are required to determine whether the latter genes are expressed.

## Discussion

### *Specific pigment composition of Mamiellales antenna proteins*

The pigment suite of *Ostreococcus tauri* is unique to the order Mamiellales (Latasa et al., 2004) which possesses more primitive characters than any other group of Chlorophyta

(Melkonian, 2001) and constitutes a well-defined monophyletic clade within the paraphyletic group of prasinophytes (clade II ; Fawley et al., 2000; Guillou et al., 2004).

Analysis of the pigment composition of *O. tauri* major LHC fraction (Fig. 3 and Table 1), which (as discussed below) is mainly constituted of prasinophyte-specific LHCs, shows that these complexes are significantly enriched in chl *b* and Mg-DVP *a*<sub>5</sub>. Thus, the latter chl *c*-like pigment, which was misidentified as a true chl *c* in early studies on *Micromonas* (Wilhelm et al., 1986) and *M. squamata* (Schmitt et al., 1993), has a clear role in light-harvesting. A similar function was also proposed for the Mg-DVP *a*<sub>5</sub> found in the green oxyphotobacteria *Prochloron* and *Prochlorococcus* (Helfrich et al., 1999; Partensky and Garczarek, 2003). This pigment is an intermediate of chl *a* biosynthesis and therefore originates from a different biochemical pathway than the chls *c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub> and/or *c*<sub>3</sub> found as the accessory chls in Haptophyta and brown macroalgae. Thus, the occurrence of this chl *c*-like pigment in prasinophytes has no real significance in terms of their phylogenetic relatedness to chl *c*-containing organisms. This conclusion is largely confirmed by the fact that the Lhcp proteins of *O. tauri* and *M. squamata* are much more related to LHC proteins from chl *b*-containing organisms than to chl *a/c* antenna proteins (Durnford et al., 1999; Green and Durnford, 1996); A.Z. Worden, unpublished data).

The semi-purified LHC fraction of *O. tauri* also was found to contain notable amounts of unusual carotenoids, namely micromonal, neoxanthin, prasinoxanthin, uriolide and an unknown carotenoid (Table 1). These pigments are probably linked through light-dependent inter-conversion processes, as shown by (Böhme et al., 2002) for the various carotenoids of *Mantoniella squamata*. These pigments must therefore be involved in either light-harvesting or photoprotection of the LHC-PSII and possibly LHC-PSI supercomplexes. The fact that violaxanthin, a carotenoid also involved in the xanthophyll cycle (Masojidek et al., 2004) was specifically lost during purification of fraction A (see Table 1) might indicate that it is more loosely bound to the LHC than are the other carotenoids. In contrast, for  $\beta$ -carotene, comparison of the pigment composition of the different fractions clearly indicates that it is specifically associated with PSII.

### *First evidence of LHCI complexes in a prasinophyte*

Based on biochemical, immunological and genomic analyses of *Ostreococcus tauri*, we demonstrate here for the first time the occurrence of Lhca proteins in a species belonging to the Mamiellales order (Prasinophyceae). This strongly contrasts with previous literature on *M. squamata* LHCs (see e.g. Schmitt et al., 1993 ; Rhiel et al., 1993) which claimed that this species (and by extension all prasinophytes) possessed only one type of chl *a/b* binding proteins, corresponding to the group of LHC proteins herein referred to as “Lhcp”. It appears that methodological limitations are likely responsible for overlooking other LHC subpopulations in *M. squamata*. For instance, (Schmitt et al., 1993) based their conclusion that there was a sole type of antenna complex associated to both photosystems in *M. squamata* upon observing that semi-purified PSII and PSI antenna fractions had similar biochemical and biophysical properties. This erroneous interpretation might be explained by the fact that Lhcp-chlorophyll *a/b* complexes are most likely the predominant LHC types in Mamiellales. Indeed, in *O. tauri*, Lhcp proteins seemingly constituted the bulk (if not the totality) of antenna proteins in fraction A (see Figs. 3 & 4), a fraction which alone gathered more than 60% of total chlorophyll. Furthermore, Lhcp proteins were retrieved at significant abundance in all fractions of the sucrose gradient, including the PSI-enriched fraction, as confirmed by immunological analyses with an anti-Lhcp antibody (Fig. 4, bottom). Whether this implies that Lhcp-chlorophyll complexes are bound to (and serve) both photosystems would require more refined analyses. Still, Lhca-like proteins are clearly also present in thylakoids and are found preferentially associated to the PSI-enriched fraction. This was unambiguously demonstrated here by immunological characterization of thylakoid proteins from this fraction with an anti-Lhca2 antibody. Based on genome derived data, cross-reaction

between this anti-Lhca2 synthetic peptide sequence (AADPDRPIWFPGS) and *O. tauri* Lhca proteins, appears likely to only be with the *Lhca2* gene product (AEGAERPWWYPGK). Cross reaction to proteins encoded by the other four *Lhca* genes is improbable due to lack of homology. We also tested another antibody to a synthetic peptide sequence from plant Lhca1 (also from AgriSera) but, for the same reason (weak homology), no cross reaction with any Lhca proteins from *O. tauri* was obtained (data not shown). The anti-Lhca2 antibody cross-reacted with several other Mamiellales as well, including *M. squamata* (Fig. 6). The absence of cross reaction with *Bathycoccus prasinus* thylakoid proteins is however notable and should foster further studies on the LHCs of this organism. Our data do not allow a clear evaluation of the relative importance of LHCI protein subpopulations in *O. tauri*. However, assuming that most LHCI proteins remained in the RCI-enriched fraction (like Lhca2), it can be reasonably assessed from the relatively weak intensity on SDS-PAGE of the ca. 22 kDa band in this fraction that LHCI proteins are much less abundant in thylakoids than are Lhcp proteins. This would explain in large part why LHCI proteins have been previously totally overlooked in *M. squamata*.

If it makes little doubt that Lhcp polypeptides constitute the major (if not the sole) peripheral PSII antenna in Mamiellales (and possibly prasinophytes at large), more studies are clearly needed to understand which of the Lhcp and the more classical LHCI (or a combination of those) constitute the major PSI antennae. The originality of the organization of LHCI complexes in *O. tauri* with regard to that in other green algae and higher plants (see e.g. Kargul et al., 2003) is pointed out by the quasi absence of PSI long wavelength emission at 77K (Fig. 1) compared to other Chlorophyta.

### *Phylogeny of the LHC protein family*

Complete analysis of *O. tauri* genome revealed a large diversity of genes belonging to the *Lhc* gene family (Table 2 and results section). The expression of all of these genes was confirmed by ESTs. Although these results do not provide evidence of protein synthesis, they do suggest that all of the identified LHC proteins are synthesized and utilized in the photosynthetic antennae of *O. tauri*. As mentioned above, this was confirmed by immunological approaches for Lhca2 and Lhcp proteins.

For phylogenetic analyses of the whole chl *a/b* binding LHC protein family, we analyzed only homologous positions of unambiguously aligned gene sequences, corresponding primarily to the membrane spanning regions and immediately preceding regions, of the putative mature peptides. Our results present similar tree topologies to other published reports using the same approach (e.g. Durnford, 2003; Durnford et al., 1999). However, it somehow differs from several recent analyses (Elrad and Grossman, 2004; Jansson, 1999; Tokutsu et al., 2004) focusing on smaller groups of sequences (generally within species) and utilizing the entire gene sequence, including non-homologous positions and transit peptides.

In the case of Lhcp proteins, determining the true associations with other known groups is complicated by the long branch effect (see Fig. 6). Still, these proteins are clearly outside the clade containing the major LHCII polypeptides of plants and green algae. As in previous studies, no relationship was resolved between *C. reinhardtii* Lhcbm polypeptides and three major Lhcb subfamilies of higher plants (Elrad and Grossman, 2004; Tokutsu et al., 2004). Instead, two well supported clades were identified, one with all the Lhcbm's of green algae and the other with all of the higher plant major LHCII polypeptides, pointing out independent evolution within these large LHCII protein families (Durnford, 2003). If no *O. tauri* sequence is found in this cluster, the finding in its genome of three genes encoding putative proteins clustering with the CP26/Lhcb family appears as a potential key discovery to understand the origin of the LHCII superfamily, given that plant and green algae probably derived from a prasinophyte ancestor. Indeed these three proteins apparently branch, together with CP26/Lhcb sequences from more evolved organisms, at the base of the LHCII clade. The hypothesis that the different LHCII families may

have derived from an ancestral CP26-like gene however needs to be confirmed by sequencing more members of the CP26/Lhcb4 family in order to improve the bootstrap values and better resolve its branching point with the LHCII superfamily.

*O. tauri* was also found to possess two genes clustering with previously identified Lhcb4 and Lhcb5 populations, indicating the potential production and use of CP29 and CP26 core antennae. Both proteins have been shown to be critical for the stability of LHCII-PSII supercomplexes in plants (Boekema et al., 1999; Yakushevskaya et al., 2003) and one can assume that they have a similar role in maintaining the integrity of Lhcb-PSII complexes in *O. tauri*. The latter shares with *C. reinhardtii* (and possibly all other green algae) the absence of CP24, a protein which is located closely to CP29 in *A. thaliana* PSII internal antenna (Yakushevskaya et al., 2003) and is thought to play a key role in the xanthophyll cycle (Pagano et al., 1998).

Five clearly distinct Lhca genes were retrieved in the *O. tauri* genome, again suggesting utilization of differentiated PSI antennae. Two of the predicted Lhca proteins clustered well with previously identified types I and III, while the three others were more distantly related to other Lhca types in *C. reinhardtii* or plants. Like *C. reinhardtii*, *O. tauri* has single copies of genes corresponding to LHCI Type I and III of higher plants. However, *C. reinhardtii* differs dramatically from *O. tauri* in those LHCI populations termed peripheral (Tokutsu et al., 2004) in having a multiplicity of such genes (7), while *O. tauri* later maintains just three. Each of these corresponds loosely to higher plant LHCI Type II and IV. Unlike the LHCI genes in *O. tauri*, those of *C. reinhardtii* are also particularly exon rich; an average of 1 versus 7 in *Lhca* genes of the two organisms, respectively. In this regard *O. tauri* seems more similar to higher plants. Lastly, in analyses where *Lhca* genes from the red alga *Porphyridium cruentum* were included (data not shown), all green algal and plant LHC genes except LI818 (grouping with FCP) were more closely related to one another than to those of the red alga, as recently shown for the complete LHC complement of *C. reinhardtii* (Tokutsu et al., 2004).

### *Structural characteristics of Lhcb proteins*

In addition to the overall phylogenetic placement of the LHCI and LHCII subpopulations, deduced structural elements appear to be similar to those in other members of the green lineage. For example, all substitutions for the putative chlorophyll ligands in these subpopulations were conservative, likely able to maintain the side arm function of individual ligands. Of note, is the conservative His substitution for Asp at chl *a2* in all Lhcb proteins. Although this “substitution” is not unique, since it is present in minor LHCII polypeptides of higher plants and *C. reinhardtii*, it is interesting from the view point that, for known bacteriochlorophyll proteins, all chl ligands are His. This situation has changed dramatically in the evolution of eukaryotic LHCs (in which substitutions for His are found at the majority of ligand sites). Thus Lhcb proteins may reflect a more ancestral state. Overall however other ligands in the Lhcb proteins were highly conserved with only one other deviation from LHCII ligands identified by (Kuhlbrandt et al., 1994), an extremely common, conservative substitution at chl *b6*. The overall high degree of conservation emphasizes the strong potential for the newly identified genes to encode proteins with similar function to known classical LHCs.

## **Conclusions and perspectives**

We demonstrate here that *O. tauri* contains differentiated subpopulations of LHC polypeptide encoding genes, although its prasinophyte-specific LHCs (Lhcb) probably constitute the large majority of those complexes in thylakoid membranes. Furthermore, we show here that several Mamiellales, including *M. squamata*, do contain classical LHCI protein(s) associated with PSI, in contrast to previous literature. Whether these conclusions can be extended to all prasinophytes would need further systematic screening for LHC diversity in various other

members of this paraphyletic class. For instance, the apparent absence of Lhca2-like proteins in *Bathycoccus prasinos*, though a member of the Mamiellales order, shows that a generalization might be inappropriate.

A considerable research effort is still needed to better elucidate the structure and function of *O. tauri* (and other Mamiellales) LHCs, especially with regard to the true nature and structure of its PSI peripheral antennae. A salient feature of the *O. tauri* system is the fact that LHC genes are single copy and appear to roughly correspond with higher plant groupings, with the exception of *Lhcf* with are present in 5 copies (including 4 almost identical), a state probably reflecting the high demand of the cell for these particular proteins. Finally, the complete genome sequence of *O. tauri* is close to publication. The sequenced genome provides a valuable foundation for comprehensive, integrative approaches to LHC polypeptides, their relationship with other components of the photosynthetic apparatus, their molecular evolution and potential role in the adaptation of these algae to their marine habitat.

## Acknowledgments

We thank Dr. D.G. Durnford for kindly providing LHC protein alignments (as in Durnford et al. 1999). We acknowledge R. Cooke, M. Delseni, J. Demaille, E. Derelle, S. Eychénié and C. Ferraz from the Génomole Languedoc-Roussillon for giving us access to yet unpublished genome data. We are also indebted to F. Y. Bouget, B. Khadaroo and C. Schwartz for cDNA libraries preparation, as well as to S. Rombauts and Yves van de Peer for providing us access to the *O. tauri* Annotation site. This work was supported by funding from the Région Bretagne (PHOSTREO) to FP and AZW; the Gordon and Betty Moore Foundation and NSF (MCB-0429359) to AZW; and conducted within the framework of the "Marine Genomics Europe" Network of Excellence (2004-2006). CS was supported by a doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche et des Nouvelles Technologies (France) and FR by a postdoctoral fellowship from Fundación Caixanova (Spain).

## References

- Anderson, L. K., and F. A. Eiserling, 1986, Asymmetrical core structure in phycobilisomes of the cyanobacterium *Synechocystis* 6701: J Mol Biol, v. 191, p. 441-51.
- Boekema, E. J., H. Van Roon, J. F. Van Breemen, and J. P. Dekker, 1999, Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes: Eur J Biochem, v. 266, p. 444-52.
- Bohme, K., C. Wilhelm, and R. Goss, 2002, Light regulation of carotenoid biosynthesis in the prasinophycean alga *Mantoniella squamata*: Photochemical and Photobiological Sciences, v. 1, p. 619-628.
- Chrétiennot-Dinet, M. J., C. Courties, A. Vaquer, J. Neveux, H. Claustre, J. Lautier, and M. C. Machado, 1995, A new marine picoeucaryote: *Ostreococcus tauri* gen et sp nov (Chlorophyta, Prasinophyceae): Phycologia, v. 34, p. 285-292.
- Courties, C., R. Perasso, M. J. Chretiennot-Dinet, M. Gouy, L. Guillou, and M. Troussellier, 1998, Phylogenetic analysis and genome size of *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta, Prasinophyceae): Journal of Phycology, v. 34, p. 844-849.
- Courties, C., A. Vaquer, M. Troussellier, J. Lautier, M.-J. Chrétiennot-Dinet, J. Neveux, C. Machado, and H. Claustre, 1994, Smallest eukaryotic organism: Nature, v. 370, p. 255.
- Derelle, E., C. Ferraz, P. Lagoda, S. Eychenie, R. Cooke, F. Regad, X. Sabau, C. Courties, M. Delseny, J. Demaille, A. Picard, and H. Moreau, 2002, DNA libraries for sequencing the genome of *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta, Prasinophyceae): The smallest free-living eukaryotic cell: Journal of Phycology, v. 38, p. 1150-1156.
- Diez, B., C. Pedros Alio, and R. Massana, 2001, Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing: Applied and Environmental Microbiology, v. 67, p. 2932-2941.
- Durnford, D. G., 2003, Structure and regulation of algal light-harvesting complex genes: Photosynthesis in Algae, v. VOL 14, p. 63-82.
- Durnford, D. G., J. A. Deane, S. Tan, G. I. McFadden, E. Gantt, and B. R. Green, 1999, A phylogenetic assessment of the eukaryotic light-harvesting antenna proteins, with implications for plastids evolution: Journal of Molecular Evolution, v. 48, p. 59-68.
- Durnford, D. G., J. A. Price, S. M. McKim, and M. L. Sarchfield, 2003, Light-harvesting complex gene expression is controlled by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms during photoacclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*: Physiologia Plantarum, v. 118, p. 193-205.

- Egeland, E. S., R. R. L. Guillard, and S. Liaaen-Jensen, 1997, Algal carotenoids .63. Carotenoids from Prasinophyceae .7. Additional carotenoid prototype representatives and a general chemosystematic evaluation of carotenoids in Prasinophyceae (Chlorophyta): *Phytochemistry*, v. 44, p. 1087-1097.
- Elrad, D., and A. R. Grossman, 2004, A genome's-eye view of the light-harvesting polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*: *Current Genetics*, v. 45, p. 61-75.
- Fawley, M. W., K. D. Stewart, and K. R. Mattox, 1986, The novel light-harvesting pigment-protein complex of *Mantoniella squamata* (Chlorophyta) : Phylogenetic implications: *Journal of Molecular Biology*, v. 23, p. 168-176.
- Fawley, M. W., Y. Yun, and M. Qin, 2000, Phylogenetic analyses of 18s rDNA sequences reveal a new coccooid lineage of the Prasinophyceae (Chlorophyta): *Journal of Phycology*, v. 36, p. 387-393.
- Green, B. R., and D. G. Durnford, 1996, The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis: Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v. 47, p. 685-714.
- Green, B. R., and W. Kühlbrandt, 1995, Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHCII: *Photosynthesis Research*, v. 44, p. 139-148.
- Green, B. R., E. Pichersky, and K. Kloppstech, 1991, Chlorophyll *a/b*-binding proteins: an extended family: *Trends in Biochemical Sciences*, v. 16, p. 181-186.
- Guillou, L., W. Eikrem, M. J. Chretiennot-Dinet, F. Le Gall, R. Massana, K. Romari, C. Pedros Alio, and D. Vaultot, 2004, Diversity of picoplanktonic prasinophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems: *Protist*, v. 155, p. 193-214.
- Helfrich, M., A. Ross, G. C. King, A. G. Turner, and A. W. Larkum, 1999, Identification of [8-vinyl]-protochlorophyllide *a* in phototrophic prokaryotes and algae: chemical and spectroscopic properties: *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1410, p. 262-72.
- Jansson, S., 1999, A guide to the *Lbc* genes and their relatives in *Arabidopsis*: *Trends in Plant Sciences*, v. 4, p. 236-240.
- Jeffrey, S. W., R. F. C. Mantoura, and S. W. Wright, 1997, *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Monographs on Oceanographic Methodology*: Paris, Unesco Publishing, 661 p.
- Jeffrey, S. W., and M. Vesik, 1997, Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures, in S. W. Jeffrey, Mantoura, R.F.C. & Wright, S.W., ed., *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*: Paris, UNESCO, p. 37-84.
- Jiao, S., and M. W. Fawley, 1994, A cDNA clone encoding a light-harvesting protein from *Mantoniella squamata*: *Plant Physiology* . p. 797-798.
- Kargul, J., J. Nield, and J. Barber, 2003, Three-dimensional reconstruction of a light-harvesting complex I-photosystem I (LHCI-PSI) supercomplex from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* - Insights into light harvesting for PSI: *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 16135-16141.
- Keller, M. D., R. C. Selvin, W. Claus, and R. R. L. Guillard, 1987, Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton: *Journal of Phycology*, v. 23, p. 633-638.
- Kühlbrandt, W., D. N. Wang, and Y. Fujiyoshi, 1994, Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography: *Nature*, v. 367, p. 614-21.
- Larkum, A. W. D., and C. J. Howe, 1997, Molecular aspects of light-harvesting processes in algae: *Advances in Botanical Research*, v. 27, p. 257-330.
- Latasa, M., R. Scharek, F. Le Gall, and L. Guillou, 2004, Pigment suites and taxonomic groups in Prasinophyceae: *Journal of Phycology*, v. 40, p. 1149-1155.
- Masojidek, J., J. Kopecky, M. Koblizek, and G. Torzillo, 2004, The xanthophyll cycle in green algae (Chlorophyta): Its role in the photosynthetic apparatus: *Plant Biology*, v. 6, p. 342-349.
- Melis, A., 1991, Dynamics of photosynthetic membrane composition and function: *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1058, p. 87-106.
- Melkonian, M., 2001, Systematics and evolution of the algae. I. Genomics meets phylogeny: *Progress in Botany* 62, v. 62, p. 340-382.
- Montane, M. H., and K. Kloppstech, 2000, The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLLIPs): was the harvesting of light their primary function?: *Gene*, v. 258, p. 1-8.
- Nield, J., K. Redding, and M. Hippler, 2004, Remodeling of light-harvesting protein complexes in *Chlamydomonas* in response to environmental changes: *Eukaryotic Cell*, v. 3, p. 1370-1380.
- Not, F., M. Latasa, D. Marie, T. Cariou, D. Vaultot, and N. Simon, 2004, A single species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), dominates the eukaryotic picoplankton in the western English channel: *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, p. 4064-4072.
- Pagano, A., G. Cinque, and R. Bassi, 1998, In vitro reconstitution of the recombinant photosystem II light-harvesting complex CP24 and its spectroscopic characterization: *J Biol Chem*, v. 273, p. 17154-65.
- Partensky, F., and L. Garczarek, 2003, The photosynthetic apparatus of chlorophyll *b*- and *d*-containing Oxychlorobacteria, in A. W. D. Larkum, ed., *Photosynthesis in Algae: Advances in Photosynthesis Series*, v. 14: Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Paulsen, H., 1995, Chlorophyll *a/b*-binding proteins: *Photochemistry and Photobiology*, v. 62, p. 367-382.

- Repeta, D. J., and T. Bjørnland**, 1997, Preparation of carotenoid standards, in S. W. Jeffrey, Mantoura, R.F.C. & Wright, S.W., ed., *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*: Paris, UNESCO, p. 239-260.
- Rhiel, E., W. Lange, and E. Morschel**, 1993, The unusual light-harvesting complex of *Mantoniella squamata*: supramolecular composition and assembly: *Biochim Biophys Acta*, v. 1143, p. 163-172.
- Rhiel, E., and E. Morschel**, 1993, The atypical chlorophyll *a/b/c* light-harvesting complex of *Mantoniella squamata*: molecular cloning and sequence analysis: *Mol Gen Genet*, v. 240, p. 403-13.
- Savard, F., C. Richard, and M. Guertin**, 1996, The *Chlamydomonas reinhardtii* LI818 gene represents a distant relative of the *cabI/II* genes that is regulated during the cell cycle and in response to illumination: *Plant Mol Biol*, v. 32, p. 461-73.
- Schmitt, A., A. Herold, C. Welte, A. Wild, and C. Wilhelm**, 1993, The light-harvesting system of the unicellular alga *Mantoniella squamata* (prasinophyceae): evidence for the lack of a photosystem I-specific antenna complex: *Photochemistry and Photobiology*, p. 132-138.
- Stauber, E. J., A. Fink, C. Markert, O. Kruse, U. Johannngmeier, and M. Hippler**, 2003, Proteomics of *Chlamydomonas reinhardtii* light-harvesting proteins: *Eukaryotic Cell*, v. 2, p. 978-994.
- Takahashi, Y., T. Yasui, E. J. Stauber, and M. Hippler**, 2004, Comparison of the subunit compositions of the PSI-LHCI supercomplex and the LHCI in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: *Biochemistry*, v. 43, p. 7816-7823.
- Teramoto, H., T. Ono, and J. Minagawa**, 2001, Identification of Lhcb gene family encoding the light-harvesting chlorophyll-a/b proteins of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*: *Plant and Cell Physiology*, v. 42, p. 849-856.
- Tokutsu, R., H. Teramoto, Y. Takahashi, T. A. Ono, and J. Minagawa**, 2004, The light-harvesting complex of photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*: Protein composition, gene structures and phylogenetic implications: *Plant and Cell Physiology*, v. 45, p. 138-145.
- Wilhelm, C., I. Lenartz-Weiler, I. Wiedemann, and A. Wild**, 1986, The light-harvesting system of *Micromonas* spec., Butcher (Prasinophyceae): The combination of three different chlorophyll species in one single chlorophyll-protein complex: *Phycologia*, v. 25, p. 304-312.
- Worden, A. Z., J. K. Nolan, and B. Palenik**, 2004, Assessing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton: The importance of the eukaryotic component: *Limnology and Oceanography*, v. 49, p. 168-179.
- Yakushevskaya, A. E., W. Keegstra, E. J. Boekema, J. P. Dekker, J. Andersson, S. Jansson, A. V. Ruban, and P. Horton**, 2003, The structure of photosystem II in *Arabidopsis*: Localization of the CP26 and CP29 antenna complexes: *Biochemistry*, v. 42, p. 608-613.
- Zapata, M., and J. L. Garrido**, 1991, Influence of injection conditions in reversed phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids: *Chromatographia*, v. 31, p. 589-594.
- Zapata, M., F. Rodriguez, and J. L. Garrido**, 2000, Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C-8 column and pyridine-containing mobile phases: *Marine Ecology Progress Series*, v. 195, p. 29-45.

**CONCLUSION GENERALE**

**& PERSPECTIVES**

## ***CONCLUSION & PERSPECTIVES***

Les premiers sujets d'étude des cyanobactériologistes ont été les organismes d'eau douce. Leur culture est assez aisée et donne des densités cellulaires élevées. Leurs capacités d'adaptation aux environnements de laboratoire ont favorisé une compréhension progressive de la physiologie de plusieurs souches devenues des modèles d'études, tels que *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Nostoc* spp. et *Anabaena* spp.. Les études de physiologie des oxyphotobactéries marines sont en revanche moins fréquentes et cette thèse contribue à combler ce retard.

Au cours de ce travail, la réponse à la lumière des cyanobactéries marines du genre *Synechococcus* a été abordée sous plusieurs angles : l'acclimatation à long terme à l'intensité lumineuse (chapitres I et II), à la qualité spectrale de la lumière (chapitre III) et les photodommages lors d'une exposition aux UV (chapitre IV). Dans le premier chapitre, nous avons montré que la souche WH8102 est capable de s'acclimater à de fortes intensités lumineuses en modifiant sa pigmentation et ses propriétés biophysiques. Nous avons complété cette étude en montrant dans le second chapitre que cet organisme voit la taille de ses PBS réduite lorsqu'il est acclimaté à une forte lumière. Il est à noter qu'au cours de ce travail de thèse, un grand nombre de souches de *Synechococcus* de clades variés aient pu être acclimatées à d'importantes irradiances : WH8102, WH8103, WH7803, RCC307 dans le chapitre I, mais aussi CC9605, RS9918, RS9916, RS9911, RS9912, WH8018, WH5701 (non montré). Ces observations tendent à confirmer l'hypothèse qu'il n'y aurait pas de clade spécifiquement adapté aux niches écologiques de surface ou de profondeur (Six et al. 2004), comme c'est le cas chez *Prochlorococcus* et *Ostreococcus* (Partensky et al. 1999a, b, Rodriguez et al. sous presse). Cela est aussi conforme au fait que les plus fortes abondances de *Synechococcus* marins sont mesurées dans le haut de la colonne d'eau (Premiers cent mètres ; Partensky et al. 1999a).

Les moyens que mettent en oeuvre ces organismes afin de gérer l'énergie lumineuse excédentaire sont encore mal compris. Aucune variation significative de la concentration cellulaire en zéaxanthine n'a été observée chez les oxyphotobactéries marines (Kana et al. 1988, Six et al. 2004, Moore et al. 1995), alors que ce pigment est induit en réponse aux fortes intensités lumineuses chez la plupart des souches d'eau douce (Masamoto et Furukawa 1997, Kerfeld 2004a, b). Si elle a vraiment un rôle de photoprotection chez les oxyphotobactéries marines, il semble que la zéaxanthine soit activée par un processus différent, peut-être par une délocalisation et/ou des phénomènes entraînant un changement de conformation des caroténo-protéines. La construction de mutants de *Synechococcus* marins déficients en gènes impliqués dans le métabolisme

des caroténoïdes (*ertR* et SYNW1367) est en cours de développement au laboratoire. L'étude de la photophysologie de tels mutants permettra de mieux cerner les mécanismes de photoprotection chez ces organismes.

D'autres spécificités des *Synechococcus* marins ont par ailleurs été remarquées. Ils possèdent une fluorescence chlorophyllienne *in vivo* étonnamment faible par rapport à celles mesurées classiquement chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942. Il en est de même pour la fluorescence chlorophyllienne variable. L'origine de ces différences demeure aujourd'hui inconnue, mais il est possible que ces caractéristiques reposent sur des différences fondamentales de la structure et du fonctionnement de l'appareil photosynthétique. Des études biophysiques de cette fluorescence, notamment à l'aide de fluorimètres PAM, ainsi que des études structurales des complexes présents permettraient d'appréhender la singularité de la régulation de la lumière chez les *Synechococcus* marins. Ceci permettra de mieux comprendre les mécanismes particuliers d'acclimatation à l'intensité lumineuse mis en place, comparativement à leurs cousins d'eau douce. De plus, certains gènes impliqués dans des mécanismes de régulation importants chez les souches d'eau douce, semblent absents chez les cyanobactéries marines. Par exemple, *nblA* et *isiA* (Baier et al. 2001, Baier et al. 2004, Parke et al. 1999) que l'on pense impliqués dans les phénomènes de résistance aux carences nutritionnelles ne sont pas présents dans le génome des souches séquencés à ce jour. Le gène *pmgA* dont le produit semble participer à la régulation de la stoechiométrie des photosystèmes est aussi absent (Hihara et al. 1998).

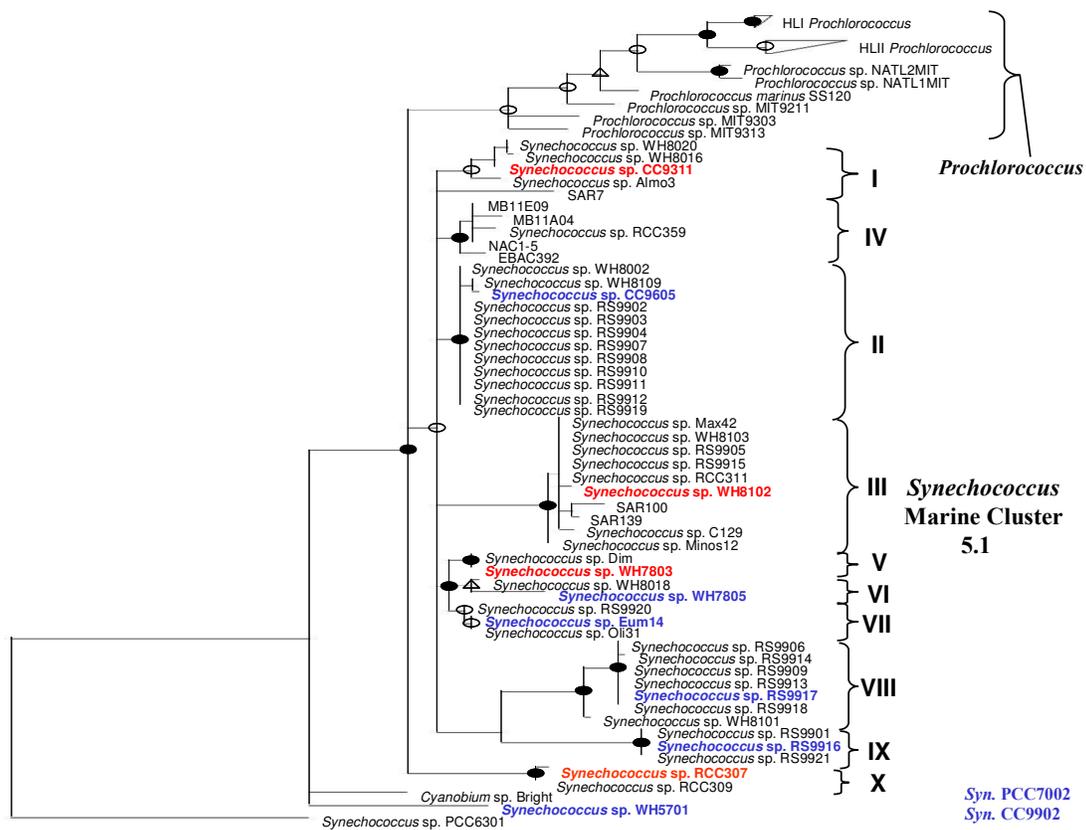
Nous avons décrit dans le chapitre II la structure particulière des bras de PBS de *Synechococcus* sp. WH8102. Cette étude est la première à montrer dans son ensemble la région génomique et les polypeptides présents chez ces PBS qui comptent parmi les plus complexes connus à ce jour. Nous avons ainsi découvert l'existence de linkers encore non décrits que nous proposons de nommer MpeD et MpeE. Nous avons par ailleurs retrouvé MpeD chez un certain nombre de souches marines à deux PE telles que WH8103, WH7803, WH8020, RCC307, BL3, M16.17 et M11.1. Un gène homologue est par ailleurs présent dans le génome de la souche CC9913. Il semble donc que ce linker joue un rôle important dans l'assemblage des PBS à deux PE. Il est absent chez la souche RS9918 dépourvue de PE (clade VIII). La région génomique principale du PBS de WH8102 est très structurée et cette organisation est bien conservée chez les souches WH7803 et RCC307. Notre étude a ainsi mis en évidence un certain nombre de gènes hypothétiques conservés dont les fonctions restent à déterminer. La caractérisation et la complémentation de mutants dans lesquels ces gènes sont inactivés permettront de déterminer leur fonction.

Dans le chapitre III, nous avons montré la façon dont les souches *Synechococcus* spp. M16.17 et M11.1 sont capables de moduler la composition de leur antenne photosynthétique afin d'optimiser la collecte de lumière d'une qualité spectrale donnée. Nous proposons que chez *Synechococcus* spp. M16.17 et M11.1, l'ACC de groupe IV repose sur l'isomérisation « facultative » de deux des chromophores des sous-unités de PEII. Après plusieurs dizaines d'années de recherche, une quantité considérable d'informations a été accumulée sur la cyanobactérie d'eau douce *Fremyella diplosiphon* qui pratique l'ACC de groupe III (voir introduction). La connaissance des gènes impliqués et de leur régulation ainsi que la construction de mutants présentant des anomalies dans l'ACC ont été fondamentales aux prémices de la compréhension de l'ACC de *Fremyella diplosiphon*. Ce sont précisément ces connaissances et ces outils techniques qui manquent encore aujourd'hui aux modèles marins, afin de mieux disséquer les mécanismes de l'ACC de groupe IV. Toutefois, l'annotation du génome complet de *Synechococcus* sp. CC9913 capable de ce type d'acclimatation va conduire à la connaissance de la structure de la région PBS de cette souche et peut-être révéler des différences majeures avec les souches marines de groupe I (incapables de s'adapter à la qualité de la lumière). Bien que les modalités de la ligation et de l'isomérisation de la PEB chez les organismes marins soient encore inconnues, il est probable qu'un système de lyase/isomérase spécifique existe. Le laboratoire a d'ailleurs entamé une collaboration avec l'équipe d'Hugo Scheer (Munich) dans le but d'identifier un ou plusieurs gène(s) de lyase/isomérase chez WH8102. Ce système serait photosensible chez les souches capables d'ACC de groupe IV. D'autre part, jusqu'à aujourd'hui, aucune protéine à rôle de photorécepteur n'a réellement été caractérisée chez les *Synechococcus* marins. Il semble cependant évident qu'il existe un système photorécepteur chez ces organismes, particulièrement chez les souches capables d'ACC. L'étude de la séquence du génome de CC9913, les approches de type puce à ADN, ainsi que la mutagenèse dirigée devraient permettre de mettre en évidence les réseaux de gènes impliqués dans l'acclimatation à la qualité de la lumière, de façon analogue à la recherche active qui est menée sur *Fremyella diplosiphon*. La surexpression des polypeptides impliqués permettrait également l'étude des probables phénomènes post-traductionnels tels que les phosphorylations et les interactions protéine-ADN.

Le chapitre IV décrit notamment l'impact de fortes doses d'UV sur les PBS de *Synechococcus* sp. WH8102 et nous avons montré que la partie distale des complexes et le linker ancre ( $L_{CM}$ ) sont particulièrement sensibles à ces radiations. L'étude de l'effet des UV sur les cyanobactéries marines est actuellement en cours au laboratoire et de nombreux travaux sont prévus. Des études d'expression génique par PCR quantitative et puces à ADN couplées à des mesures biochimiques et biophysiques (PAM fluorimétrie, spectrofluorimétrie) permettront de

caractériser l'effet de « chocs UV ». Ces mesures seront aussi conduites sur des cellules cultivées en lumière variable reproduisant le régime lumineux naturel, avec et sans UV. Ceci permettra de mettre en évidence les mécanismes physiologiques impliqués spécifiquement dans la réponse au stress UV, ainsi que l'étude de l'orchestration de l'expression des gènes en fonction du cycle jour/nuit. La mise en évidence de gènes d'intérêt (spécifiquement induits par les UV ou chez un groupe défini d'organismes) pourrait ensuite conduire à des études *in situ* afin d'étudier l'impact de ce facteur sur les populations naturelles de *Synechococcus*.

Plusieurs génomes de *Synechococcus* marins sont en cours de séquençage et une douzaine de séquences complètes seront d'ici peu disponibles, réparties dans chacun des dix clades du cluster 5.1 ainsi que dans d'autres clusters (Figure 91). La disponibilité de cette masse d'information va grandement faciliter les études de biologie moléculaire sur ces organismes ainsi que l'identification de gènes dont la fonction n'est pas encore connue.



**Figure 91** : Arbre phylogénétique du cluster 5.1 basé sur la séquence de l'ARN 16S (NJ), d'après Fuller et al. (2003). Rouge : souches disponibles ou en fin d'annotation. Bleu : souches en cours de séquençage. Les clones CC9902 et PCC 7002 et BL107 ne figurent pas dans cet arbre mais leur génome est également en cours de séquençage.

Il existe chez les souches du cluster 5.1 une diversité des propriétés optiques des PBS surprenante qui se retrouve entre les clades mais aussi à l'intérieur de la plupart des clades. Ainsi, ce cluster regroupe une majorité de souches à deux PE présentant des rapports PUB :PEB très variables (0,5 à 2), certaines souches qui ne possèdent qu'un seul type optique de PE (dépourvues de PUB) et d'autres chez qui la PE est absente. Les combinaisons de PBP et de bilines des bras des PBS sont donc extrêmement variées chez les *Synechococcus* marins et l'on peut au moins trouver les associations de PBP suivantes : C-PC seulement (RS9918), C-PC + C-PE (WH8018), R-PCIII+C-PE (WH7805 ; Sidler 1994), R-PCII+PEI+PEII (WH8102 ; C. Six données non publiées). L'étude des génomes de souches aux propriétés optiques distinctes permettra de mieux comprendre les bases génétiques et évolutives de la différenciation des propriétés des PBS chez ces organismes marins. Nous avons ainsi commencé l'analyse des PBS d'une série de souches de *Synechococcus* marins présentant des propriétés optiques différentes, en privilégiant les souches dont le génome sera disponible dans un futur proche. Ceci permettra par la suite de mettre en parallèle les données expérimentales et bioinformatiques. D'autre part, ces différences de propriétés optiques sont très probablement liées à la présence de niches lumineuses particulières dans les eaux marines, qui sont aussi probablement plus ou moins corrélés à d'autres facteurs environnementaux tels que la concentration en nutriments. L'étude comparée de tous ces génomes permettra d'expliquer la grande diversité phénotypique observée chez les *Synechococcus* marins, ainsi que de donner les premières bases vers la compréhension de la notion de différenciation écotypique chez ces organismes.

Le dernier chapitre est dévolu à l'étude du système antennaire de la Prasinophyceae *Ostreococcus tauri*. A la suite d'une série d'études de l'appareil photosynthétique de *Mantoniella squamata*, l'idée que les Prasinophyceae ne possédaient qu'une antenne particulière unique primitive s'est propagée dans la littérature (par exemple Schmitt et al. 1993, Rhiel et al. 1993, Rhiel & Morschel 1993). Nous avons clairement démontré qu'au moins trois représentants de l'ordre des Mamiellales (dont *Mantoniella squamata*) possèdent en réalité les deux grands types d'antennes observés chez les autres algues vertes. La présence d'une antenne majeure particulière, la très faible fluorescence du PSI et un cycle des xanthophylles peu actif (concomitant avec une extinction de fluorescence non photochimique qui peut être importante ; F. Rodriguez & C. Six, en préparation) laissent penser qu'*Ostreococcus tauri* est un modèle d'étude de la photosynthèse très intéressant. Des études de la structure des complexes formés par l'antenne principale et des propriétés de fluorescence chlorophyllienne de cultures acclimatées à différentes intensités lumineuses pourraient représenter une première voie de recherche vers la compréhension des processus photosynthétiques de cette algue verte particulière. Rodriguez et al. (sous presse) ont

mis en évidence la présence de phototypes distincts génétiquement définis, probablement adaptés aux niches de surface et de profondeur. Le séquençage du génome d'une souche de basse lumière est en cours et de façon similaire aux études menées sur *Prochlorococcus* (Partensky et al. 1999), les comparaisons intersouches tant au niveau expérimental que génomique vont certainement permettre d'expliquer certains aspects de la différenciation écotypique chez les picoeucaryotes marins photosynthétiques. La comparaison des systèmes antennaires entre souches de niche lumineuse sera notamment des plus intéressantes.

La suite des investigations dans ce champ de recherche pourrait consister en la caractérisation de tels phénomènes de différenciation chez d'autres genres de la classe des Prasinophyceae qui semble constituer un composant dominant de la fraction picophytoeucaryotique (Not et al., 2004 ; Worden et al., 2004). Le séquençage de deux génomes de *Micromonas* va bientôt débiter ; l'une des souches a été isolée dans les eaux côtières et l'autre dans une région océanique. Les études qui suivront permettront peut-être de déterminer certains des aspects de la différenciation écotypique milieu côtier *versus* milieu océanique chez les Prasinophyceae marines.

## REFERENCES

- Airth R, Blinks, LR (1956) A new phycoerythrin from *Porphyra naiadum*. Biol Bull III:321-327
- Allen JF (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. Biochimica et Biophysica Acta 1098:275-335
- Allen JF, Matthijs HCP (1997) Complementary adaptations, photosynthesis and phytochrome. Trends in Plant Science 2:41-43
- Allen KD, Staehelin LA (1994) Polypeptide composition, assembly, and phosphorylation patterns of the photosystem II antenna systems of *Chlamydomonas reinhardtii*. Planta 194:42-54
- Allen MM (1968) Photosynthetic membrane system in *Anacystis nidulans*. J Bacteriol 96:836-841
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389-3402
- Alvey RM, Karty JA, Roos E, Reilly JP, Kehoe DM (2003) Lesions in phycoerythrin chromophore biosynthesis in *Fremyella diplosiphon* reveal coordinated light regulation of apoprotein and pigment biosynthetic enzyme gene expression. Plant Cell 15:2448-2463
- Anderson JM (1986) Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes. Annual Review of Plant Physiology 37:93-136
- Anderson LK, Eiserling FA (1986) Asymmetrical core structure in phycobilisomes of the cyanobacterium *Synechocystis* 6701. J Mol Biol 191:441-451
- Anderson LK, Grossman AR (1990a) Genes for phycocyanin subunits in *Synechocystis* sp. strain PCC 6701 and assembly mutant UV16. J Bacteriol 172:1289-1296
- Anderson LK, Grossman AR (1990b) Structure and light-regulated expression of phycoerythrin genes in wild-type and phycobilisome assembly mutants of *Synechocystis* sp. strain PCC 6701. J Bacteriol 172:1297-1305
- Anderson LK, Rayner MC, Sweet RM, Eiserling FA (1983) Regulation of *Nostoc* sp. phycobilisome structure by light and temperature. J Bacteriol 155:1407-1416
- Apt KE, Collier JL, Grossman AR (1995) Evolution of the phycobiliproteins. J Mol Biol 248:79-96
- Apt KE, Metzner S, Grossman AR (2001) The gamma subunits of phycoerythrin from a red alga: Position in phycobilisomes and sequence characterization. Journal of Phycology 37:64-70
- Araoz R, Hader, D. P. (1997) Ultraviolet radiation induces both degradation and synthesis of phycobilisomes in *Nostoc* sp.: a spectroscopic and biochemical approach. FEMS Microbiology Ecology 23:301-313
- Araoz R, Shelton M, Lebert M, Hader DP (1998) Differential behaviour of two cyanobacterium species to UV radiation. Artificial UV radiation induces phycoerythrin synthesis. J Photochem Photobiol B 44:175-183
- Awramik SM (1992) The oldest records of photosynthesis. Photosynthesis Research 33:75-79
- Baier K, Lehmann H, Stephan DP, Lockau W (2004) *nblA* is essential for phycobilisome degradation in *Anabaena* sp strain PCC 7120 but not for development of functional heterocysts. Microbiology Sgm 150 Part 8:2739-2749
- Baier K, Nicklisch S, Grundner C, Reinecke J, Lockau W (2001) Expression of two *nblA*-homologous genes is required for phycobilisome degradation in nitrogen-starved *Synechocystis* sp PCC 6803. Fems Microbiology Letters 195:35-39
- Balabas BE, Montgomery BL, Ong LE, Kehoe DM (2003) CotB is essential for complete activation of green light-induced genes during complementary chromatic adaptation in *Fremyella diplosiphon*. Molecular Microbiology 50:781-793
- Barber J (1988) Similarities and differences between photosystem II and the purple bacteria reaction centers. In: Stevens SE, Bryant DA (eds) Light-energy transduction in photosynthesis: Higher plants and bacterial models. The American Society of Plant Physiologists, Rockville, p 178-196
- Barber J (2002) Photosystem II: a multisubunit membrane protein that oxidises water. Current Opinion in Structural Biology 12:523-530
- Barber J, Kühlbrandt W (1999) Photosystem II. Current Opinion in Structural Biology 9:469-475
- Barber J, Morris E, Buchel C (2000a) Revealing the structure of the photosystem II chlorophyll binding proteins, CP43 and CP47. Bba Bioenergetics 1459:239-247
- Barber J, Peltier G, Niyogi K, Foyer CH, Laisk A, Matthijs HCP (2000b) Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration - Discussion. Phil Trans Roy Soc London B 355:1453-1454
- Barlow RG, Alberte RS (1985) Photosynthetic characteristics of phycoerythrin-containing marine *Synechococcus* spp. Marine Biology 86:63-74
- Bassi R, Dainese P (1992) A supramolecular light-harvesting complex from chloroplast Photosystem II membranes. European Journal of Biochemistry 204:317-326
- Bassi R, Rigoni F, Giacometti GM (1990) Evaluation of the role of state transitions in determining the efficiency of light utilization for CO<sub>2</sub> assimilation in leaves. Photosynthesis Research 38:15-26
- Bassi R, Simpson D (1987) Chlorophyll protein complexes of Barley photosystem I. European Journal of Biochemistry 163:221-230

- Bassi R, Wollman FA (1991) The chlorophyll a/b-protein of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*: isolation, characterization and immunological cross-reactivity to higher-plant polypeptides. *Planta* 183:423-433
- Beale SI, Cornejo J (1984) Enzymatic heme oxygenase activity in soluble extracts of the unicellular red alga, *Cyanidium caldarium*. *Arch Biochem Biophys* 235:371-384
- Beale SI, Cornejo J (1991a) Biosynthesis of phycobilins. 3(Z)-phycoerythrobilin and 3(Z)-phycocyanobilin are intermediates in the formation of 3(E)-phycocyanobilin from biliverdin IX alpha. *J Biol Chem* 266:22333-22340
- Beale SI, Cornejo J (1991b) Biosynthesis of phycobilins. 15,16-Dihydrobiliverdin IX alpha is a partially reduced intermediate in the formation of phycobilins from biliverdin IX alpha. *J Biol Chem* 266:22341-22345
- Beale SI, Cornejo J (1991c) Biosynthesis of phycobilins. Ferredoxin-mediated reduction of biliverdin catalyzed by extracts of *Cyanidium caldarium*. *J Biol Chem* 266:22328-22332
- Beja O, Suzuki MT, Heidelberg JF, Nelson WC, Preston CM, Hamada T, Eisen JA, Fraser CM, DeLong EF (2002) Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* 415:630-633
- Belknap WR, Haselkorn R (1987) Cloning and light regulation of expression of the phycocyanin operon of the cyanobacterium *Anabaena*. *Embo J* 6:871-884
- Bennett A, Bogorad L (1971) Properties of subunits and aggregates of blue-green algal biliproteins. *Biochemistry* 10:3625-3634
- Bennett A, Bogorad L (1973) Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J Cell Biol* 58:419-435
- Bennetzen JL (2001) *Arabidopsis* arrives. *Nature Genetics* 27:3-5
- Berkelman TR, Lagarias JC (1986) Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 156:194-201
- Bernard C, Etienne AL, Thomas JC (1996) Synthesis and binding of phycoerythrin and its associated linkers to the phycobilisome in *Rhodella violacea* (Rhodophyta): Compared effects of high light and translation inhibitors. *Journal of Phycology* 32:265-271
- Betz M, Rueggsegger U, Esteban AM, Sidler WA, Zuber H (1993) Reconstitution of the core complex (alpha beta)<sub>3</sub>APCLC8.9 of the phycobilisome from *Mastigocladus laminosus* using the Lc8.9 linker polypeptide overexpressed in *Escherichia coli*. *Biol Chem Hoppe Seyler* 374:435-443
- Bhattacharya D, Weber K, An SS, Berning-Koch W (1998) Actin phylogeny identifies *Mesostigma viride* as a flagellate ancestor of the land plants. *J Mol Evol* 47:544-550
- Bhaya D, Dufresne A, Vault D, Grossman A (2002) Analysis of the *bli* gene family in marine and freshwater cyanobacteria. *Fems Microbiology Letters* 215:209-219
- Bibby TS, Mary I, Nield J, Partensky F, Barber J (2003a) Low-light-adapted *Prochlorococcus* species possess specific antennae for each photosystem. *Nature* 424:1051-1054
- Bibby TS, Nield J, Chen M, Larkum AW, Barber J (2003b) Structure of a photosystem II supercomplex isolated from *Prochloron didemni* retaining its chlorophyll a/b light-harvesting system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9050-9054
- Bibby TS, Nield J, Partensky F, Barber J (2001) Oxyphotobacteria - Antenna ring around photosystem I. *Nature* 413:590
- Bischof K, Hanelt D, Wiencke C (2000) Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions of marine macroalgae. *Planta* 211:555-562
- Bischof K, Krabs G, Wiencke C, Hanelt D (2002) Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophyll cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L. *Planta* 215:502-509
- Boekema EJ, Hifney A, Yakushevska AE, Piotrowski M, Keegstra W, Berry S, Michel KP, Pistorius EK, Kruijff J (2001) A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria. *Nature* 412:745-748
- Bohm GA, Pfeleiderer W, Boger P, Scherer S (1995) Structure of a novel oligosaccharide-mycosporine-amino acid ultraviolet A/B sunscreen pigment from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J Biol Chem* 270:8536-8539.
- Brahamsha B (1996a) An abundant cell-surface polypeptide is required for swimming by the non-flagellated marine cyanobacterium *Synechococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:6504-6509
- Brahamsha B (1996b) A genetic manipulation system for oceanic cyanobacteria of the genus *Synechococcus*. *Applied and Environmental Microbiology* 62:1747-1751
- Brettel K (1997) Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta* 1318:322-373
- Bricker TM (1990) The structure and function of CPa-1 and CPa-2 in photosystem II. *Photosynthesis Research* 24:1-13
- Bricker TM, Frankel LK (2002) The structure and function of CP47 and CP43 in Photosystem II. *Photosynthesis Research* 72:131-146

- Brown SB, Chabot AA, Enderby EA, North AC (1981) Orientation of oxygen in oxyhaemoproteins and its implications for haem catabolism. *Nature* 289:93-95
- Brown SB, Holroyd JA, Vernon DI (1984) Biosynthesis of phycobiliproteins. Incorporation of biliverdin into phycocyanin of the red alga *Cyanidium caldarium*. *Biochem J* 219:905-909
- Bryant DA (1986) The cyanobacterial photosynthetic apparatus: Comparison to those of higher plants and photosynthetic bacteria. In: Platt T, Li WKW (eds) *Photosynthetic picoplankton Can Bull Fish Aquat Sci*, Vol 214, p 423-500
- Bryant DA, Cohen-Bazire G (1981) Effects of chromatic illumination on cyanobacterial phycobilisomes. Evidence for the specific induction of a second pair of phycocyanin subunits in *Pseudanabaena* 7409 grown in red light. *Eur J Biochem* 119:415-424
- Bryant DA, Gugliemi, G., Tandeau de Marsac, N., Castets, A.-M., and Cohen-Bazire, G. (1979) The structure of cyanobacterial phycobilisomes: A model. *Arch. Microbiol.* 123,
- Bryant DA, Stürewalt VL, Glauser M, Frank G, Sidler W, Zuber H (1991) A small multigene family encodes the rod-core linker polypeptides of *Anabaena* sp. PCC 7120 phycobilisomes. *Gene* 107:91-99
- Bullerjahn GS, Sherman LA (1986a) Identification of a carotenoid-binding protein in the cytoplasmic membrane from the heterotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6714. *J Bacteriol* 167:396-399
- Bullerjahn GS, Sherman LA (1986b) Immunological characterization of photosystem II chlorophyll-binding proteins from the cyanobacterium, *Aphanocapsa* 6714. *J Bioenerg Biomembr* 18:285-293
- Bullock TL, Clarkson WD, Kent HM, Stewart M (1996) The 1.6 angstroms resolution crystal structure of nuclear transport factor 2 (NTF2). *J Mol Biol* 260:422-431
- Burnap RL, Troyan T, Sherman LA (1993) The highly abundant chlorophyll-protein complex of iron-deficient *Synechococcus* sp. PCC 7942 (CP43) is encoded by the *isiA* gene. *Plant Physiology* 103:893-902
- Butcher RW (1952) Contribution to our knowledge of the smaller marine algae. *Journal of Marine Biology Assoc. U. K.* 31:175-191
- Camm EL, Green BR (1989) The chlorophyll *a/b* complex, CP29, is associated with the photosystem-II reaction center core. *Biochimica et Biophysica Acta* 974:180-184
- Campbell D, Bruce D, Carpenter C, Gustafsson P, Oquist G (1996) Two forms of the photosystem II D1 protein alter energy dissipation and state transitions in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Photosynthesis Research* 47:131-144
- Campbell L, Iturriaga R (1988) Identification of *Synechococcus* spp. in the Sargasso Sea by immunofluorescence and fluorescence excitation spectroscopy performed on individual cells. *Limnology and Oceanography* 33:1196-1201
- Casey ES, Grossman A (1994) In vivo and in vitro characterization of the light-regulated *cpcB2A2* promoter of *Fremyella diplosiphon*. *J Bacteriol* 176:6362-6374
- Cavalier-Smith T (1981) Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems* 14:461-481
- Chen M, Bibby TS, Nield J, Larkum AW, Barber J (2005) Structure of a large photosystem II supercomplex from *Acaryochloris marina*. *FEBS Lett* 579:1306-1310
- Chen YB, Durnford DG, Koblizek M, Falkowski PG (2004) Plastid regulation of Lhcb1 transcription in the chlorophyte alga *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiology* 136:3737-3750
- Chiang GG, Schaefer MR, Grossman AR (1992) Complementation of a red-light-indifferent cyanobacterial mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9415-9419
- Chisholm SW (1992) Phytoplankton size. In: Falkowski PG, Woodhead AD (eds) *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea*. Plenum Press, New York, p 213-237
- Chisholm SW, Frankel SL, Goerick R, Olson RJ, Palenik B, Waterbury JB, West-Johnsrud L, Zettler ER (1992) *Prochlorococcus marinus* nov. gen. nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll *a* and *b*. *Archives of Microbiology* 157:297-300
- Chisholm SW, Olson RJ, Yentsch CM (1988) Flow cytometry in oceanography: status and prospects. *Eos* 69:562-572
- Chitnis PR, Xu Q, Chitnis VP, Nechushtai R (1995) Function and organization of photosystem I polypeptides. *Photosynthesis Research* 44:23-40
- Chrétiennot-Dinet MJ, Courties C, Vaquer A, Neveux J, Claustre H, Lautier J, Machado MC (1995) A new marine picoeucaryote: *Ostreococcus tauri* gen et sp nov (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Phycologia* 34:285-292
- Cianci M, Rizkallah PJ, Olczak A, Raftery J, Chayen NE, Zagalsky PF, Helliwell JR (2002) The molecular basis of the coloration mechanism in lobster shell: beta-crustacyanin at 3.2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9795-9800
- Clarke SM, Funk C, Hendry GS, Shand JA, Wydrzynski T, Eaton-Rye JJ (2002) Amino acid deletions in the cytosolic domains of the chlorophyll *a*-binding protein CP47 slow Q(A)-oxidation and/or prevent the assembly of photosystem II. *Plant Mol Biol* 50:563-572
- Cobley JG, Clark AC, Weerasurya S, Quesada FA, Xiao JY, Bandrapali N, D'Silva I, Thounaojam M, Oda JF, Sumiyoshi T, Chu MH (2002) CpeR is an activator required for expression of the phycoerythrin operon (*cpeBA*) in the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* and is encoded in the phycoerythrin linker-polypeptide operon (*cpeCDESTR*). *Molecular Microbiology* 44:1517-1531

- Cockell CS (2000) Ultraviolet radiation and the photobiology of earth's early oceans. *Origins Life Evol Biosphere* 30:467-499
- Cockell CS, Knowland J (1999) Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol Rev Camb Philos Soc* 74:311-345.
- Cole HA (1937) Experiments in the breeding of oysters in tanks with special reference to the food of the larva and spat. *Fish. Invest. Ser. 2*, 15 14
- Conley PB, Lemaux PG, Grossman A (1988) Molecular characterization and evolution of sequences encoding light-harvesting components in the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*. *J Mol Biol* 199:447-465
- Conley PB, Lemaux PG, Lomax TL, Grossman AR (1986) Genes encoding major light-harvesting polypeptides are clustered on the genome of the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:3924-3928
- Cornejo J, Beale SI (1988) Algal heme oxygenase from *Cyanidium caldarium*. Partial purification and fractionation into three required protein components. *J Biol Chem* 263:11915-11921
- Cornejo J, Beale, SI (1997) Phycobilin biosynthetic reactions in extracts of cyanobacteria. *Photosynthesis Research* 51:223-230
- Courties C, Vaquer A, Trousselier M, Lautier J, Chrétiennot-Dinet M-J, Neveux J, Machado C, Claustre H (1994) Smallest eukaryotic organism. *Nature* 370:255
- Cunningham A (1990) A low-cost, portable flow cytometer specifically designed for phytoplankton analysis. *Journal of Plankton Research* 12:149-160
- Cunningham FX, Dennenberg RJ, Jursinic PA, Gantt E (1990) Growth under red light enhances photosystem II relative to photosystem I and phycobilisomes in the red algae *Porphyridium cruentum*. *Plant Physiology* 93:888-895
- de Lorimier R, Bryant DA, Stevens SE, Jr. (1990a) Genetic analysis of a 9 kDa phycocyanin-associated linker polypeptide. *Biochim Biophys Acta* 1019:29-41
- de Lorimier R, Chen CC, Glazer AN (1992) Sequence comparison of two highly homologous phycoerythrins differing in bilin composition. *Plant Mol Biol* 20:353-356
- de Lorimier R, Guglielmi G, Bryant DA, Stevens SE, Jr. (1990b) Structure and mutation of a gene encoding a Mr 33,000 phycocyanin-associated linker polypeptide. *Arch Microbiol* 153:541-549
- de Lorimier R, Wilbanks SM, Glazer AN (1993) Genes of the R-phycocyanin II locus of marine *Synechococcus* spp., and comparison of protein-chromophore interactions in phycocyanins differing in bilin composition. *Plant Mol Biol* 21:225-237
- de Weerd FL, Palacios MA, Andrizhivetskaya EG, Dekker JP, Van Grondelle R (2002a) Identifying the lowest electronic states of the chlorophylls in the CP47 core antenna protein of photosystem II. *Biochemistry* 41:15224-15233
- de Weerd FL, van Stokkum IH, van Amerongen H, Dekker JP, van Grondelle R (2002b) Pathways for energy transfer in the core light-harvesting complexes CP43 and CP47 of photosystem II. *Biophys J* 82:1586-1597
- Deisenhofer J, Michel H (1989) The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *EMBO Journal* 8:2149-2170
- Delepaire P, Chua N-H (1981) Electrophoretic purification of chlorophyll *a/b*-protein complexes from *Chlamydomonas reinhardtii* and spinach and analysis of their polypeptide compositions. *Journal of Biological Chemistry* 256:9300-9307
- Diez B, Pedros Alio C, Marsh TL, Massana R (2001a) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2942-2951
- Diez B, Pedros Alio C, Massana R (2001b) Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2932-2941
- Diversé-Pierluissi M, Krogmann D (1988) A zeaxanthin protein from *Anacystis nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 933:372-377
- Dolganov N, Grossman AR (1999) A polypeptide with similarity to phycocyanin alpha-subunit phycocyanobilin lyase involved in degradation of phycobilisomes. *Journal of Bacteriology* 181:610-617
- Ducret A, Muller SA, Goldie KN, Hefti A, Sidler WA, Zuber H, Engel A (1998) Reconstitution, characterisation and mass analysis of the pentacylindrical allophycocyanin core complex from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Journal of Molecular Biology* 278:369-388
- Dunlap WCY, Y. (1995) Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B:105-114
- Durnford DG, Aebersold R, Green BR (1996) The fucoxanthin-chlorophyll proteins from a chromophyte alga are part of a large multigene family: Structural and evolutionary relationships to other light harvesting antennae. *Molecular & General Genetics* 253:377-386
- Durnford DG, Deane JA, Tan S, McFadden GI, Gantt E, Green BR (1999) A phylogenetic assessment of the eukaryotic light-harvesting antenna proteins, with implications for plastids evolution. *Journal of Molecular Evolution* 48:59-68

- Durnford DG, Price JA, McKim SM, Sarchfield ML (2003) Light-harvesting complex gene expression is controlled by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms during photoacclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiologia Plantarum* 118:193-205
- Egeland ES, Guillard RRL, LiaaenJensen S (1997) Algal carotenoids .63. Carotenoids from Prasinophyceae .7. Additional carotenoid prototype representatives and a general chemosystematic evaluation of carotenoids in Prasinophyceae (Chlorophyta). *Phytochemistry* 44:1087-1097
- Ehling-Schulz M, Scherer S (1999) UV protection in cyanobacteria. *Eur J Phycol* 34:329-338
- Eisenstark A (1989) Bacterial genes involved in response to near-ultraviolet radiation. *Adv Genet* 26:99-147
- Elrad D, Grossman AR (2004) A genome's-eye view of the light-harvesting polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Genetics* 45:61-75
- Enami I, Tohri A, Kamo M, Ohta H, Shen JR (1997) Identification of domains on the 43 kDa chlorophyll-carrying protein (CP43) that are shielded from tryptic attack by binding of the extrinsic 33 kDa protein with Photosystem II complex. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1320:17-26
- Engle JM, Burkhardt W, Sherman DM, Bullerjahn GS (1991) Purification and characterization of a surface-associated carotenoid-binding complex from the photosynthetic prokaryote, *Prochlorothrix hollandica*. *Archives of Microbiology* 155:453-458
- Esenbeck N (1836) Ueber einen blau-rothen Farbstoff, der sich bei der zersetzung von Oscillatorian bildet. *Liebigs Ann Chem* XVII:75-82
- Fairchild CD, Glazer AN (1994) Oligomeric structure, enzyme kinetics, and substrate specificity of the phycocyanin alpha subunit phycocyanobilin lyase. *J Biol Chem* 269:8686-8694
- Fairchild CD, Jones IK, Glazer AN (1991) Absence of glycosylation on cyanobacterial phycobilisome linker polypeptides and rhodophytan phycoerythrins. *J Bacteriol* 173:2985-2992
- Fairchild CD, Zhao J, Zhou J, Colson SE, Bryant DA, Glazer AN (1992) Phycocyanin alpha-subunit phycocyanobilin lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7017-7021
- Fawley MW, Stewart KD, Mattox KR (1986) The novel light-harvesting pigment-protein complex of *Mantoniella squamata* (Chlorophyta) : Phylogenetic implications. *Journal of Molecular Biology* 23:168-176
- Federspiel NA, Grossman AR (1990) Characterization of the light-regulated operon encoding the phycoerythrin-associated linker proteins from the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*. *J Bacteriol* 172:4072-4081
- Federspiel NA, Scott L (1992) Characterization of a light-regulated gene encoding a new phycoerythrin-associated linker protein from the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*. *J Bacteriol* 174:5994-5998
- Fernandez-Gonzalez B, Martinez-Ferez IM, Vioque A (1998) Characterization of two carotenoid gene promoters in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* 1443:343-351
- Frankel LK, Bricker TM (1995) Interaction of the 33-kDa extrinsic protein with the photosystem II: Identification of the domain on the 33-kDa protein that are shielded from the NHS-biotinylation by photosystem II. *Biochemistry* 34:7492-7497
- Friso G, Barbato R, Giacometti GM, Barber J (1994) Degradation of D2 protein due to UV-B irradiation of the reaction centre of photosystem II. *FEBS Lett* 339:217-221
- Fuglistaller P, Mimuro M, Suter F, Zuber H (1987) Allophycocyanin complexes of the phycobilisome from *Mastigocladus laminosus*. Influence of the linker polypeptide L8.9C on the spectral properties of the phycobiliprotein subunits. *Biol Chem Hoppe Seyler* 368:353-367
- Fujita Y (1997) A study on the dynamic features of photosystem stoichiometry: Accomplishments and problems for future studies. *Photosynthesis Research* 53:83-93
- Fujita Y, Ohki K, Murakami A (2001) Acclimation of photosynthetic light energy conversion to the light environments. *Algal Adaptation To Environmental Stresses*:135-171
- Fuller NJ, Marie D, Partensky F, Vaulot D, Post AF, Scanlan DJ (2003) Clade-specific 16S ribosomal DNA oligonucleotides reveal the predominance of a single marine *Synechococcus* clade throughout a stratified water column in the Red Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2430-2443
- Fyfe PK, Jones MR, Heathcote P (2002) Insights into the evolution of the antenna domains of Type-I and Type-II photosynthetic reaction centres through homology modelling. *Febs Letters* 530:117-123
- Gantt E (1981) Phycobilisomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32:327-347
- Gantt E, Conti SF (1965) The ultrastructure of *Porphyridium cruentum*. *J Cell Biol* 26:365-381
- Gantt E, Conti SF (1966a) Granules associated with the chloroplast lamellae of *porphyridium cruentum*. *Journal of Cell Biology* 29:423-434
- Gantt E, Conti SF (1966b) Phycobiliprotein localization in algae. *Brookhaven Symp Biol* 19:393-405
- Gantt E, Lipschultz CA (1974) Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*: pigment analysis. *Biochemistry* 13:2960-2966
- Garcia-Pichel F, Sherry ND, Castenholz RW (1992) Evidence for an ultraviolet sunscreen role of the extracellular pigment scytonemin in the terrestrial cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp. *Photochem Photobiol* 56:17-23
- Garcia-Pichel FaC, R.W. (1993) Occurrence of UVabsorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:163-169

- Garczarek L, Hess WR, Holtzendorff J, van der Staay GW, Partensky F (2000a) Multiplication of antenna genes as a major adaptation to low light in a marine prokaryote. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4098-4101.
- Garczarek L, Partensky F, Irlbacher H, Holtzendorff J, Babin M, Mary I, Thomas JC, Hess WR (2001) Differential expression of antenna and core genes in *Prochlorococcus* PCC 9511 (Oxyphotobacteria) grown under a modulated light-dark cycle. *Environmental Microbiology* 3:168-175
- Garczarek L, Poupon A, Partensky F (2000b) Is there a common ancestor for the eukaryotic antenna (LHC) and the core Chl *a* antenna protein superfamilies ? In: Guerrero R (ed) 10th international symposium on phototrophic prokaryotes, Barcelona, p 107
- Garczarek L, Poupon A, Partensky F (2003) Origin and evolution of transmembrane Chl-binding proteins: hydrophobic cluster analysis suggests a common one-helix ancestor for prokaryotic (Pcb) and eukaryotic (LHC) antenna protein superfamilies. *Fems Microbiology Letters* 222:59-68
- Garczarek L, van der Staay GWM, Thomas JC, Partensky F (1998) Isolation and characterization of photosystem I from two strains of the marine oxychlorobacterium *Prochlorococcus*. *Photosynthesis Research* 56:131-141
- Garnier F, Dubacq JP, Thomas JC (1994) Evidence for a Transient Association of New Proteins with the *Spirulina maxima* Phycobilisome in Relation to Light Intensity. *Plant Physiol* 106:747-754
- Geiss U, Vinnemeier J, Kunert A, Lindner I, Gemmer B, Lorenz M, Hagemann M, Schoor A (2001a) Detection of the *isiA* gene across cyanobacterial strains: Potential for probing iron deficiency. *Applied and Environmental Microbiology* 67:5247-5253
- Geiss U, Vinnemeier J, Schoor A, Hagemann M (2001b) The iron-regulated *isiA* gene of *Fischerella muscicola* strain PCC 73103 is linked to a likewise regulated gene encoding a Pcb-like chlorophyll-binding protein. *Fems Microbiology Letters* 197:123-129
- Giddings TH, Wasmann, C, Stachelin, L. A. (1983) Structure of the thylakoids and envelope membranes of the cyanelles *Cyanophora paradoxa*. *Plant Physiology* 71:409-419
- Gingrich JC, Williams RC, Glazer AN (1982) Rod substructure in cyanobacterial phycobilisomes: phycoerythrin assembly in *Synechocystis* 6701 phycobilisomes. *Journal of Cell Biology* 95:170-178
- Glauser M, Bryant DA, Frank G, Wehrli E, Rusconi SS, Sidler W, Zuber H (1992) Phycobilisome structure in the cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Anabaena* sp. PCC 7120. *Eur J Biochem* 205:907-915
- Glazer AN (1977) Structure and molecular organization of the photosynthetic accessory pigments of cyanobacteria and red algae. *Mol Cell Biochem* 18:125-140
- Glazer AN (1989) Light guides - Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *Journal of Biological Chemistry* 264:1-4
- Glazer AN, Bryant DA (1975) Allophycocyanin B (lambda<sub>max</sub> 671, 618 nm): a new cyanobacterial phycobiliprotein. *Arch Microbiol* 104:15-22
- Glazer AN, Lundell DJ, Yamanaka G, Williams RC (1983) The structure of a "simple" phycobilisome. *Ann Microbiol (Paris)* 134B:159-180
- Glazer AN, Williams RC, Yeh SW, Clark JH (1985) Kinetics of energy flow in the phycobilisome core. *Science* 230:1051-1053
- Golbeck JH (1987) Structure, function and organization of the photosystem I reaction center complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 895:167-204
- Golecki JR (1977) Studies on ultrastructure and composition of cell walls of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Arch Microbiol* 114:35-41
- Gomez-Lojero C, Perez-Gomez B, Shen G, Schluchter WM, Bryant DA (2003) Interaction of ferredoxin:NADP(+) oxidoreductase with phycobilisomes and phycobilisome substructures of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Biochemistry* 42:13800-13811
- Gottschalk L, Lottspeich F, Scheer H (1994) Reconstitution of an allophycocyanin trimer complex containing the C-terminal 21-23 kDa domain of the core-membrane linker polypeptide Lcm. *Z Naturforsch [C]* 49:331-336
- Green BR, Durnford DG (1996) The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:685-714
- Green BR, Pichersky E (1994) Hypothesis for the evolution of three-helix Chl *a/b* and Chl *a/c* light-harvesting antenna proteins from two-helix and four-helix ancestors. *Photosynthesis Research* 39:149-162
- Green BR, Salter AH (1996) Light regulation of nuclear-encoded thylakoid proteins. In: J. B, Salter H, Anderson B (eds) *Molecular genetics of photosynthesis*. Oxford University Press, Oxford
- Groniger A, Sinha RP, Klisch M, Hader DP (2000) Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae - a database. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology* 58:115-122
- Grossman AR, Bhaya D, Apt KE, Kehoe DM (1995) Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: diversity, control, and evolution. *Annu Rev Genet* 29:231-288
- Grossman AR, Bhaya D, He QF (2001) Tracking the light environment by cyanobacteria and the dynamic nature of light harvesting. *Journal of Biological Chemistry* 276:11449-11452
- Grossman AR, Schaefer MR, Chiang GG, Collier JL (1993) The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev* 57:725-749

- Guillou L, Chrétiennot-Dinet MJ, Medlin LK, Claustre H, Loiseaux de Goer S, Vault D (1999) *Bolidomonas*: A new genus with two species belonging to a new algal class, the Bolidophyceae (Heterokonta). *J Phycol* 35:368-381
- Guillou L, Eikrem W, Chrétiennot-Dinet MJ, Le Gall F, Massana R, Romari K, Pedros Alio C, Vault D (2004) Diversity of picoplanktonic prasinophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems. *Protist* 155:193-214
- Hansel A, Pattus F, Jurgens UJ, Tadros MH (1998) Cloning and characterization of the genes coding for two porins in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6301. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* 1399:31-39
- Harrer R, Bassi R, Testi MG, Schäfer C (1998) Nearest-neighbour analysis of a PSII complex from *Marchantia polymorpha* (liverwort) which contains reaction center and antenna proteins. *Journal of Biochemistry* 255:196-205
- He YY, Hader DP (2002a) Involvement of reactive oxygen species in the UV-B damage to the cyanobacterium *Anabaena* sp. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology* 66:73-80
- He YY, Hader DP (2002b) Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria. *Photochemical and Photobiological Sciences* 1:729-736
- He YY, Hader DP (2002c) UV-B-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp.: protective effects of ascorbic acid and N-acetyl-L-cysteine. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology* 66:115-124
- Heinze I, Pfundel E, Huhn M, Dau H (1997) Assembly of light harvesting complexes II (LHC-II) in the absence of lutein - A study on the alpha-carotenoid-free mutant C-2A<sup>1</sup>-34 of the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1320:188-194
- Hermesmeier D, Schuls R, Senger H (1994) Formation of light-harvesting complexes of photosystem II in *Scenedesmus*. II. Different patterns of light-regulation of *Lhc* gene expression in green and greening cells. *Planta* 193:406-412
- 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
- Hihara Y, Sonoike K, Ikeuchi M (1998) A novel gene, *pmgA*, specifically regulates photosystem stoichiometry in the cyanobacterium *Synechocystis* species PCC 6803 in response to high light. *Plant Physiology* 117:1205-1216
- Hill DR, Hladun SL, Scherer S, Potts M (1994) Water stress proteins of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) are secreted with UV-A/B-absorbing pigments and associate with 1,4-beta-D-xylanxylanohydrolase activity. *J Biol Chem* 269:7726-7734.
- Hirschberg J, Chamovitz D (1994) Carotenoids in cyanobacteria. In: Bryant DA (ed) *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p 559-579
- Hoiczky E, Baumeister W (1995) Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria. *J Bacteriol* 177:2387-2395
- Hoiczky E, Hansel A (2000) Cyanobacterial cell walls: News from an unusual prokaryotic envelope. *J Bacteriol* 182:1191-1199
- Holt TK, Krogmann DW (1981) A carotenoid-protein from cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 637:408-414
- Horton P, Ruban AV, Walters RG (1996) Regulation of Light Harvesting in Green Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:655-684
- Huang LX, McCluskey MP, Ni H, LaRossa RA (2002) Global gene expression profiles of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 in response to irradiation with UV-B and white light. *Journal of Bacteriology* 184:6845-6858
- Huber R (1989) A structural basis of light energy electron transfer in biology. *EMBO Journal* 8:2125-2147
- Hwang S, Herrin DL (1994) Control of *Lhc* gene transcription by the circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Molecular Biology* 26:557-569
- Ishikawa Y, Yamamoto Y, Otsubo M, Theg SM, Tamura N (2002) Chemical modification of amine groups on PSII protein(s) retards photoassembly of the photosynthetic water-oxidizing complex. *Biochemistry* 41:1972-1980
- Isono T, Katoh T (1987) Subparticles of *Anabaena* phycobilisomes. II. Molecular assembly of allophycocyanin cores in reference to "anchor" protein. *Arch Biochem Biophys* 256:317-324
- Jansson S (1994) The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1184:1-19
- Jansson S (1999a) A guide to the *Lhc* genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Sciences* 4:236-240
- Jansson S (1999b) A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 4:236-240.
- Jansson S, Pichersky E, Bassi R, Green B, Ikeuchi M, Melis A, Simpson DJ, Spangfort M, Staehelin A, Thornber JP (1992) A nomenclature for the genes encoding the Chlorophyll *a/b*-binding proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 10:242-253
- Jeffrey SW (1980) Algal pigment system. In: Falkowski PG (ed) *Primary productivity in the sea*. Plenum, p 33-58

- Jeffrey SW, Mantoura RFC (1996) Development of pigment methods for oceanography: SCOR-supported working group and objectives. In: Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (eds) *Phytoplankton pigments in oceanography*. United Nations Educational, Paris, p 17-178
- Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (1997) *Phytoplankton Pigments in Oceanography*, Vol. Unesco Publishing, Paris
- Jeffrey SW, Wright SW, Zapata M (1999) Recent advances in HPLC pigment analysis of phytoplankton. *Mar Freshwater Res* 50:879-896
- Jha IB, Kolli BK, Sah JF, Garab G, Mohanty P (2000) Low dose UV-B induced modification of chromophore conformation and its interaction with microenvironment in cyanobacterial phycobilisomes. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 37:486-490
- Jiao S, Fawley MW (1994) A cDNA clone encoding a light-harvesting protein from *Mantoniella squamata*. *Plant Physiology* 79:779-798
- Johnson PW, Sieburth JM (1979) Chroococcoid cyanobacteria in the sea: a ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnology and Oceanography* 24:928-935
- Johnson PW, Sieburth JM (1982) *In-situ* morphology and occurrence of eucaryotic phototrophs of bacterial size in the picoplankton of estuarine and oceanic waters. *Journal of Phycology* 18:318-327
- Jung LJ, Chan CF, Glazer AN (1995) Candidate genes for the phycoerythrocyanin alpha subunit lyase. Biochemical analysis of pecE and pecF interposon mutants. *J Biol Chem* 270:12877-12884
- Jürgens UJ (1990) Major outer membrane proteins of *Prochlorothrix hollandica* (Prochloraceae). *FEMS Microbiology Letters* 70:125-130
- Jurgens UJ, Drews G, Weckesser J (1983) Primary structure of the peptidoglycan from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6714. *J Bacteriol* 154:471-478
- Jurgens UJ, Weckesser J (1985) Carotenoid-containing outer membrane of *Synechocystis* sp. strain PCC 6714. *J Bacteriol* 164:384-389.
- Kahn K, Mazel D, Houmard J, Tandeau de Marsac N, Schaefer MR (1997) A role for cpeYZ in cyanobacterial phycoerythrin biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 179:998-1006
- Kahn K, Schaefer MR (1997) rpbA controls transcription of the constitutive phycocyanin gene set in *Fremyella diplosiphon*. *J Bacteriol* 179:7695-7704
- Kamiya N, Shen JR (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-angstrom resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:98-103
- Kana TM, Glibert PM (1987a) Effect of irradiances up to 2000  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  on marine *Synechococcus* WH7803 - I. Growth, pigmentation, and cell composition. *Deep-Sea Research* 34:479-485
- Kana TM, Glibert PM (1987b) Effect of irradiances up to 2000  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  on marine *Synechococcus* WH7803 - II. Photosynthetic responses mechanisms. *Deep-Sea Research* 34:497-516
- Kana TM, Glibert PM, Goericke R, Welschmeyer NA (1988) Zeaxanthin and beta-carotene in *Synechococcus* WH7803 respond differently to irradiance. *Limnology and Oceanography* 33:1623-1627
- Kargul J, Nield J, Barber J (2003) Three-dimensional reconstruction of a light-harvesting complex I-photosystem I (LHCI-PSI) supercomplex from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* - Insights into light harvesting for PSI. *Journal of Biological Chemistry* 278:16135-16141
- Kashino Y, Lauber WM, Carroll JA, Wang Q, Whitmarsh J, Satoh K, Pakrasi HB (2002) Proteomic analysis of a highly active photosystem II preparation from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveals the presence of novel polypeptides. *Biochemistry* 41:8004-8012
- Kehoe DM, Grossman AR (1996) Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* 273:1409-1412
- Kehoe DM, Grossman AR (1997) New classes of mutants in complementary chromatic adaptation provide evidence for a novel four-step phosphorelay system. *Journal of Bacteriology* 179:3914-3921
- Kerfeld CA (2004a) Structure and function of the water-soluble carotenoid-binding proteins of cyanobacteria. *Photosynthesis Research* 81 (3):215-225
- Kerfeld CA (2004b) Water-soluble carotenoid proteins of cyanobacteria. *Arch Biochem Biophys* 430:2-9
- Kerfeld CA, Sawaya MR, Bottin H, Tran KT, Sugiura M, Cascio D, Desbois A, Yeates TO, Kirilovsky D, Boussac A (2003a) Structural and EPR characterization of the soluble form of cytochrome c-550 and of the psbV2 gene product from the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. *Plant and Cell Physiology* 44:697-706
- Kerfeld CA, Sawaya MR, Brahmamdam V, Cascio D, Ho KK, Trevithick Sutton CC, Krogmann DW, Yeates TO (2003b) The crystal structure of a cyanobacterial water-soluble carotenoid binding protein. *Structure* 11:55-65
- Kerfeld CA, Wu YP, Chan C, Krogmann DW, Yeates TO (1997) Crystals of the carotenoid protein from *Arthrospira maxima* containing uniformly oriented pigment molecules. *Acta Crystallographica* 53:720-723
- Kerr JBM, C. T. (1993) Evidence for Large Upward Trends of Ultraviolet-B Radiation Linked to Ozone Depletion. *Science* 262:1032-1034

- Kipe-Nolt J, Edwards, SE, Jr., Bryant DA. (1982) Growth and chromatic adaptation of *Nostoc* sp. strain MAC and the pigment mutant R-MAC. *Plant Physiology* 70:1549-1553
- Klotz A, V., Glazer AN (1985) Characterization of the bilin attachment sites in R-phycoerythrin. *Journal of Biological Chemistry* 260:4856-4863
- Koblizek M, Komenda J, Masojidek J, Pechar L (2000) Cell aggregation of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*: Role of the electron transport chain. *J Phycol* 36:662-668
- Koller KP, Wehrmeyer W (1977) B-phycoerythrin from *Rhodella violacea*. *Archives of Microbiology* 104
- Krauss N (2003) Mechanisms for photosystems I and II. *Current Opinion in Chemical Biology* 7:540-550
- Krauss N, Hinrichs W, Witt I, Fromme P, Protzkow W (1993) 3-Dimensional structure of the system-I of the photosynthesis at 6 angstrom resolution. *Nature* 361:326-331
- Krauss N, Schubert WD, Klukas O, Fromme P, Witt HT, Saenger W (1996) Photosystem I at 4 Å resolution represents the first structural model of a joint photosynthetic reaction centre and core antenna. *Nature Structural Biology* 3:965-973
- Kuhlbrandt W, Wang DN, Fujiyoshi Y (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367:614-621.
- Kumar A, Tyagi MB, Jha PN (2004) Evidences showing ultraviolet-B radiation-induced damage of DNA in cyanobacteria and its detection by PCR assay. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318:1025-1030
- Kumar A, Tyagi MB, Singh N, Tyagi R, Jha PN, Sinha RP, Hader DP (2003) Role of white light in reversing UV-B-mediated effects in the N-2-fixing cyanobacterium *Anabaena* BT2. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology* 71:35-42
- Kursar TA, Alberte RS (1983) Photosynthetic unit organization in a red alga. *Plant Physiology* 72:409-414
- Kützing F (1843) *Phycologia generalis, oder Anatomie, Physiologie und Systemkunde der Tange*, Vol, Leipzig
- Kylin H (1910) Über phykoerythrin und phycocyan bei *Ceramium rubrum* (Huds.) Ag. *Hoppe-Seyler's Z Physiol chem* LXIX:169-239
- Kylin H (1912) Über die roten und blauen Farbstoffe der Algen. *Hoppe-Seyler's Z Physiol chem* LXXXVI:396-425
- La Roche J, van der Staay GW, Partensky F, Ducret A, Aebersold R, Li R, Golden SS, Hiller RG, Wrench PM, Larkum AW, Green BR (1996) Independent evolution of the prochlorophyte and green plant chlorophyll a/b light-harvesting proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15244-15248.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lagarde D, Beuf L, Vermaas W (2000) Increased production of zeaxanthin and other pigments by application of genetic engineering techniques to *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Appl Environ Microbiol* 66:64-72.
- Lagarde D, Vermaas W (1999) The zeaxanthin biosynthesis enzyme beta-carotene hydroxylase is involved in myxoxanthophyll synthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Letters* 454:247-251
- Lange W, Wilhelm, C, Wehrmeyer, W, Mörschel, E (1990) The supramolecular structure of photosystem II-phycoobilisome-complexes of *Porphyridium cruentum*. *Botanica Acta* 103:250-257
- Lantoine F, Neveux J (1997) Spatial and seasonal variations in abundance and spectral characteristics of phycoerythrins in the tropical northeastern Atlantic Ocean. *Deep - Sea Research I* 44:223-246
- Lao K, Glazer AN (1996) Ultraviolet-B photodestruction of a light-harvesting complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5258-5263
- Larkum AWD (2003) Light-harvesting systems in algae. *Photosynthesis in Algae* VOL 14:277-304
- Laudenbach DE, Straus NA (1988) Characterization of a cyanobacterial iron stress-induced gene similar to *psbC*. *J Bacteriol* 170:5018-5026
- Legendre L, Yentsch CM (1989) Overview of flow cytometry and image analysis in biological oceanography and limnology. *Cytometry* 10:501-510
- Lemberg R (1928) Die chromoproteide der rotalgen. I. *Liebigs Ann Chem* 461:46-89
- Lemberg R (1930) Chromoproteide der rotalgen. II. Spaltung mit pepsin un säuren. isolierung eines pyrollfarbstoffs. *Liebigs Ann Chem* 477:195-245
- Lemieux C, Otis C, Turmel M (2000) Ancestral chloroplast genome in *Mesostigma viride* reveals an early branch of green plant evolution. *Nature* 403:649-652
- Lichtlé C, Thomas, JC (1976) Etude structurale des thylacoïdes des algues à phycobiliprotéines, comparaison des résultats obtenus par fixation classique et cryodécapage. *Phycologia* 15:393-404
- Llewellyn CA, Mantoura RFC (1997) A UV absorbing compound in HPLC pigment chromatograms obtained from Icelandic Basin phytoplankton. *Marine Ecology - Progress Series* 158:283-287
- Lockhart PJ, Penny D, Hendy MD, Larkum ADW (1993) Is *Prochlorothrix hollandica* the best choice as a prokaryotic model for higher plant Chl a/b photosynthesis? *Photosynthesis Research* 37:61-68
- Lokstein H, Steglich C, Hess WR (1999) Light-harvesting antenna function of phycoerythrin in *Prochlorococcus marinus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1410:97-98
- Lomax TL, Conley PB, Schilling J, Grossman AR (1987) Isolation and characterization of light-regulated phycobilisome linker polypeptide genes and their transcription as a polycistronic mRNA. *J Bacteriol* 169:2675-2684

- MacColl R (1998) Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology* 124:311-334
- MacColl R, Berns DS, Koven NL (1971a) Effect of salts on C-phycoyanin. *Arch Biochem Biophys* 146:477-482
- MacColl R, Csatorday K, Berns DS, Traeger E (1980) Chromophore interactions in allophycocyanin. *Biochemistry* 19:2817-2820
- Maccoll R, Csatorday K, Berns DS, Traeger E (1981) The relationship of the Quaternary structure of allophycocyanin to its spectrum. *Arch Biochem Biophys* 208:42-48
- MacColl R, Lee JJ, Berns DS (1971b) Protein aggregation in C-phycoyanin. Studies at very low concentrations with the photoelectric scanner of the ultracentrifuge. *Biochem J* 122:421-426
- Machold O (1991) The structure of light-harvesting complex II as deduced from its polypeptide composition and stoichiometry I: Studies with *Vicia faba*. *Journal of Plant Physiology* 138:678-684
- Malkin R (1996) Photosystem I electron transfer reactions: components and kinetics. In: Ort DR, Yocum CF (eds) *Advances in photosynthesis: the light reactions*, Vol 4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p 313-332
- Marin B, Melkonian M (1999) Mesostigmatophyceae, a new class of streptophyte green algae revealed by SSU rRNA sequence comparisons. *Protist* 150:399-417
- Masamoto K, Furukawa K (1997) Accumulation of zeaxanthin in cells of the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 grown under high irradiance. *Journal of Plant Physiology* 151:257-261
- Masamoto K, Riethman H, Sherman B (1987) Isolation and characterization of a carotenoid-associated thylakoid protein from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Plant Physiology* 84:633-639
- Masuda T, Tanaka A, Melis A (2003) Chlorophyll antenna size adjustments by irradiance in *Dunaliella salina* involve coordinate regulation of chlorophyll a oxygenase (CAO) and Lhcb gene expression. *Plant Molecular Biology* 51:757-771
- Maxson P, Sauer K, Zhou JH, Bryant DA, Glazer AN (1989) Spectroscopic studies of cyanobacterial phycobilisomes lacking core polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 977:40-51
- Mazel D, Guglielmi G, Houmar J, Sidler W, Bryant DA, Tandeau de Marsac N (1986) Green light induces transcription of the phycoerythrin operon in the cyanobacterium *Calothrix* 7601. *Nucleic Acids Res* 14:8279-8290
- Mazel D, Houmar J, and Tandeau de Marsac, N. (1988) A multigene family in *Calothrix* sp. PCC 7601 encodes phycocyanin, the major component of the cyanobacterial light-harvesting antenna. *Mol. Gen. Genet.* 211:296-304
- Mazel D, Marliere P (1989) Adaptive eradication of methionine and cysteine from cyanobacterial light-harvesting proteins. *Nature* 341:245-248
- Michel H, Deseinhoffer J (1988) Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of the photosystem II. *Biochemistry* 27:1.7
- Mikheyskaya LV, Ovodova RG, Ovodov YS (1977) Isolation and characterization of lipopolysaccharides from cell walls of blue-green algae of the genus *Phormidium*. *J Bacteriol* 130:1-3
- Mimuro M, Fuglistaller, P., Rumeli, R., and Zuber, H. (1986a) Functional assignment of chromophores and energy transfer in C-phycoyanin isolated from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Biochim. Biophys. Acta* 848:155-166
- Mimuro M, Lipschultz, C. A., and Gantt, E. (1986b) Energy flow in the phycobilisomes of *Nostoc* sp. (Mac): Two independent terminal pigments. *Biochim. Biophys. Acta* 852:126-132
- Minagawa J, Han KC, Dohmae N, Takio K, Inoue Y (2001) Molecular characterization and gene expression of lhcb5 gene encoding CP26 in the light-harvesting complex II of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Molecular Biology* 46:277-287
- Miskiewicz E, Ivanov AG, Huner NPA (2002) Stoichiometry of the photosynthetic apparatus and phycobilisome structure of the cyanobacterium *Plectonema boryanum* UTEX 485 are regulated by both light and temperature. *Plant Physiology* 130:1414-1425
- Mitchell DL, Nairn RS (1989) The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol* 49:805-819
- Montecino V, Molina X, Martínez G, Olmedo MI, Retamal L, Hannach G, Orellana MV (2001) Ecophysiological strategies in response to UV-B radiation stress in cultures of temperate microalgae isolated from the Pacific coast of South America. *Revista Chilena De Historia Natural* 74:293-311
- Montgomery BL, Casey ES, Grossman AR, Kehoe DM (2004) Apla, a member of a new class of phycobiliproteins lacking a traditional role in photosynthetic light harvesting. *J Bacteriol* 186:7420-7428
- Moore LR, Goerick R, Chisholm SW (1995) Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Marine Ecology-Progress Series* 116:259-275
- Moore LR, Roca G, Chisholm SW (1998) Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* 393:464-467
- Mullineaux CW (1994) Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem 1 in a cyanobacterial mutant lacking photosystem 2. *Biochim. Biophys. Acta* 1184:71-77

- Murata N, Sato N, Omata T, Kuwabara T (1981) Separation and characterization of thylakoids and cell envelope of the blue-green alga (cyanobacterium) *Anacystis nidulans*. *Plant Cell Physiol* 22:855-866
- Murphy LS, Haugen EM (1985) The distribution and abundance of phototrophic ultraplankton in the North Atlantic. *Limnology and Oceanography* 30:47-58
- Nakajima Y, Tsuzuki M, Ueda R (2001) Improved productivity by reduction of the content of light-harvesting pigment in *Chlamydomonas perigranulata*. *Journal of Applied Phycology* 13:95-101
- Nayak L, Raval MK, Biswal B, Biswal UC (2002) Topology and photoprotective role of carotenoids in photosystem II of chloroplast: a hypothesis. *Photochemical and Photobiological Sciences*:629-631
- Nield J, Balsera M, De Las Rivas J, Barber J (2002) Three-dimensional electron cryo-microscopy study of the extrinsic domains of the oxygen-evolving complex of spinach: assignment of the PsbO protein. *J Biol Chem* 277:15006-15012
- Niyogi KK (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:333-359
- Niyogi KK, Bjorkman O, Grossman AR (1997) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:14162-14167
- Nomsawai P, Tandeau de Marsac N, Thomas J-C, Tanticharoen M, Cheevadhanarak S (1999) Light regulation of phycobilisome structure and gene expression in *Spirulina platensis* C1 (*Arthrospira* sp. PCC 9438). *Plant and Cell Physiology* 40:1194-1202
- Not F, Latasa M, Marie D, Cariou T, Vaultot D, Simon N (2004) A single species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), dominates the eukaryotic picoplankton in the western English channel. *Applied and Environmental Microbiology* 70:4064-4072
- Not F, Simon N, Biegala IC, Vaultot D (2002) Application of fluorescent in situ hybridization coupled with tyramide signal amplification (FISH-TSA) to assess eukaryotic picoplankton composition. *Aquatic Microbial Ecology* 28:157-166
- Noubir S, Luque I, de Alda J, Perewoska I, Tandeau de Marsac N, Copley JG, Houmard J (2002) Co-ordinated expression of phycobiliprotein operons in the chromatically adapting cyanobacterium *Calothrix* PCC 7601: a role for RcaD and RcaG. *Molecular Microbiology* 43:749-762
- Nugent JHA (1996) Oxygenic photosynthesis - Electron transfer in photosystem I and photosystem II. *European Journal of Biochemistry* 237:519-531
- O'Carra P, Killilea SD (1971) Subunit structures of C-phycocyanin and C-phycoerythrin. *Biochem Biophys Res Commun* 45:1192-1197
- Ohki K, Fujita, Y. (1992) Photoregulation of the phycobilisome structure during complementary chromatic adaptation in the marine cyanobacterium *Phormidium* sp. C86. *J. Phycol.* 28:803-808
- Olson RJ, Chisholm SW, Zettler ER, Armbrust EV (1988) Analysis of *Synechococcus* pigment types in the sea using single and dual beam flow cytometry. *Deep-Sea Research* 35:425-440
- Olson RJ, Zettler ER, Altabet MA, Dusenberry JA, Chisholm SW (1990a) Spatial and temporal distributions of prochlorophyte picoplankton in the North Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research* 37:1033-1051
- Olson RJ, Zettler ER, Armbrust EV, Chisholm SW (1990b) Pigment, size and distribution of *Synechococcus* in the North Atlantic and Pacific oceans. *Limnology and Oceanography* 35:45-58
- Omata T, Murata A (1983) isolation and characterization of the cytoplasmic membrane of the blue-green alga (cyanobacterium) *Anacystis nidulans*. *Plant Cell Physiol* 24:1101-1112
- Ong LJ, Glazer AN (1987) R-phycocyanin II, a new phycocyanin occurring in marine *Synechococcus* species. *Journal of Biological Chemistry* 262:6323-6327
- Ong LJ, Glazer AN (1991) Phycoerythrins of marine unicellular cyanobacteria. I. Bilin types and locations and energy transfer pathways in *Synechococcus* spp. phycoerythrins. *J Biol Chem* 266:9515-9527
- Ong LJ, Glazer AN, Waterbury JB (1984) An unusual phycoerythrin from a marine cyanobacterium. *Science* 224:80-83
- Packer L, Glazer, AN (1988) *Cyanobacteria*, Vol 167. Albelson JN, Simon MI, Berkeley, CA
- Pakrasi HB (1995) Genetic analysis of the form and function of the photosystem I and photosystem II. *Annual Review of Genetics* 29:755-776
- Palenik B (2001) Chromatic adaptation in marine *Synechococcus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 67:991-994
- Palenik B, Brahamsha B, Larimer FW, Land M, Hauser L, Chain P, Lamerdin J, Regala W, Allen EE, McCarren J, Paulsen I, Dufresne A, Partensky F, Webb EA, Waterbury J (2003) The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature* 424:1037-1042
- Palsson LO, Tjus SE, Andersson B, Gillbro T (1995) Ultrafast energy transfert dynamics resolved in isolated spinach light-harvesting complex I and the LHC I-730 subpopulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1230:1-9
- Pandey R, Chauhan S, Singhal GS (1997) UVB-induced photodamage to phycobilisomes of *Synechococcus* sp. PCC 7942. *J Photochem Photobiol B* 40:228-232
- Parke MW (1949) Studies on marine flagellates. I. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 28:255-286

- Partensky F, Blanchot J, Vault D (1999a) Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. In: Marine Cyanobacteria, Vol 19. Bulletin de l'Institut Oceanographique, Monaco, p 457-475
- Partensky F, Garczarek L (2003) The photosynthetic apparatus of chlorophyll *b*- and *d*-containing Oxychlorobacteria. In: Larkum AWD (ed) Photosynthesis in Algae, Vol 14. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Partensky F, Guillou L, Simon N, Vault D (1997) Recent advances in the use of molecular techniques to assess the genetic diversity of marine photosynthetic microorganisms. *Vie et Milieu* 4:367-374
- Partensky F, Hess WR, Vault D (1999b) *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:106-127
- Peak MJ, Peak JG (1986) DNA-to-protein crosslinks and backbone breaks caused by far- and near-ultraviolet, and visible light radiations in mammalian cells. *Basic Life Sci* 38:193-202
- Pechar L, Masojidek J (1995) Colonial forms of the cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* represent protection against PSII photo-inactivation. Fluorescence quenching analysis. *Arch. Hydrobiol.* 77:37-43
- Peter GF, Thorbner JP (1991) Biochemical composition and organization of higher plant photosystem-II light-harvesting pigment-protein. *The Journal of Biological Chemistry* 266:16745-16754
- Pickersky E, Subramaniam R, White MJ, Reid J, Aebersold R, Green BR (1991) Chlorophyll *a/b* binding CAB polypeptides of CP29, the internal chlorophyll *a/b* complex of photosystem II: characterization of the tomato gene encoding the 26 kDa (type I) polypeptides and evidence for a second CP29 polypeptide. *Molecular & General Genetics* 227:277-284
- Pierson BK, Olson JM (1989) Evolution of photosynthesis in anoxygenic photosynthesis prokaryotes. In: Cohen Y, Rosemberg E (eds) *Microbial mats: physiological ecology of benthic microbial communities*. Am Soc Microbiol, Washington, p 402-427
- Pineau B, Gerard Hirne C, Selve C (2001) Carotenoid binding to photosystems I and II of *Chlamydomonas reinhardtii* cells grown under weak light or exposed to intense light. *Plant Physiology and Biochemistry* 39:73-85
- Polivka T, Sundstrom V (2004) Ultrafast dynamics of carotenoid excited States-from solution to natural and artificial systems. *Chem Rev* 104:2021-2071
- Polle JE, Niyogi KK, Melis A (2001) Absence of lutein, violaxanthin and neoxanthin affects the functional chlorophyll antenna size of photosystem-II but not that of photosystem-I in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology* 42:482-491
- Portwich A, Garcia-Pichel F (2000) A novel prokaryotic UVB photoreceptor in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis PCC 6912*. *Photochem Photobiol* 71:493-498
- Proteau PJ, Gerwick WH, Garcia-Pichel F, Castenholz R (1993) The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. *Experientia* 49:825-829
- Quesada A, Vincent WF (1997) Strategies of adaptation by Antarctic cyanobacteria to ultraviolet radiation. *Eur J Phycol* 32:335-342
- Quesada A, Vincent WF, Lean DRS (1999) Community and pigment structure of Arctic cyanobacterial assemblages: the occurrence and distribution of UV-absorbing compounds. *Fems Microbiol Ecol* 28:315-323
- Rajagopal S, Jha IB, Murthy SDS, Mohanty P (1998) Ultraviolet-B effects on *Spirulina platensis* cells: Modification of chromophore-protein interaction and energy transfer characteristics of phycobilisomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 249:172-177
- Ral JP, Derelle E, Ferraz C, Wattedled F, Farinas B, Corellou F, Buleon A, Slomianny MC, Delvalle D, d'Hulst C, Rombauts S, Moreau H, Ball S (2004) Starch division and partitioning. A mechanism for granule propagation and maintenance in the picophytoplanktonic green alga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiol* 136:3333-3340
- Raps S, Kycia, JH, Ledbetter, MC, Siegelman, HW (1985) Light intensity adaptation and phycobilisome composition of *Mycrocystis aeruginosa*. *Plant Physiology* 79:983-987
- Reddy KJ, Bullerjahn GS, Sherman LA (1993) Characteristics of membrane-associated carotenoid-binding proteins in cyanobacteria and prochlorophytes. *Methods Enzymol* 214:390-401
- Redecker D, Wehrmeyer W, Reuter W (1993) Core substructure of the hemiellipsoidal phycobilisome from the red alga *Porphyridium cruentum*. *Eur J Cell Biol* 62:442-450
- Resch CM, Gibson J (1983) Isolation of the carotenoid-containing cell wall of three unicellular cyanobacteria. *J Bacteriol* 155:345-350.
- Reuter W, Nickel-Reuter, C (1993) Molecular assembly of the phycobilisome of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 18:51-66
- Reuter W, Wiegand G, Huber R, Than ME (1999) Structural analysis at 2.2 angstrom of orthorhombic crystals presents the asymmetry of the allophycocyanin-linker complex, AP center dot L-C(7.8), from phycobilisomes of *Mastigocladus laminosus*. *Proc Nat Acad Sci Usa* 96:1363-1368
- Reynolds C (1987) Cyanobacteria water-bloom. In: Callow P (ed) *Advances in Botanical Research*, Vol 3. Academic Press, London, p 67-143

- Rhee KH (2001) Photosystem II: The solid structural era. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 30:307-328
- Rhee KH, Morris EP, Barber J, Kühlbrandt W (1998) Three-dimensional structure of photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature* 396:283-286
- Rhiel E, Bryant DA (1993) Nucleotide sequence of the *psaE* gene of cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Plant Physiol* 101:701-702
- Rhiel E, Lange W, Morschel E (1993) The unusual light-harvesting complex of *Mantoniella squamata*: supramolecular composition and assembly. *Biochim Biophys Acta* 1143:163-172
- Rhiel E, Morschel E (1993) The atypical chlorophyll *a/b/c* light-harvesting complex of *Mantoniella squamata*: molecular cloning and sequence analysis. *Mol Gen Genet* 240:403-413
- Rippka R, Coursin T, Hess W, Lichtlé C, Scanlan DJ, Palinska KA, Iteman 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 *a<sub>2</sub>/b<sub>2</sub>*-containing cyanobacterium (Oxyphotobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:1833-1847
- Ritter S, Hiller RG, Wrench PM, Welte W, Diederichs K (1999) Crystal structure of a phycourobilin-containing phycoerythrin at 1.90-angstrom resolution. *J Struct Biol* 126:86-97
- Ritz M, Thomas JC, Spilar A, Etienne AL (2000) Kinetics of photoacclimation in response to a shift to high light of the red alga *Rhodella violacea* adapted to low irradiance. *Plant Physiol* 123:1415-1425
- Rozema J, Bjorn LO, Bornman JF, Gaberscik A, Hader DP, Trost T, Germ M, Klisch M, Groniger A, Sinha RP, Lebert M, He YY, Buffoni Hall R, de Bakker NVJ, van de Staaij J, Meijkamp BB (2002) The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems - an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology* 66:2-12
- Sah JF, Krishna KB, Srivastava H, Mohanty P (1998) Effects of ultraviolet-B radiation on phycobilisomes of *Synechococcus* PCC 7942: Alterations in conformation and energy transfer characteristics. *Biochemistry and Molecular Biology International* 44:245-257
- Salton MRJ (1994) The bacterial cell envelope--a historical perspective. In: J.-M. Ghuyssen aRH (ed) *Bacterial cell wall*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, p 1-22
- Samuel AD, Petersen JD, Reese TS (2001) Envelope structure of *Synechococcus* sp. WH8113, a nonflagellated swimming cyanobacterium. *BMC Microbiol* 1:4
- Sayre RT, von Wrobelboerner EA (1994) Molecular topology of the photosystem II chlorophyll alpha binding protein, CP43: topology of a thylakoid membrane protein. *Photosynthesis Research* 40:11-19
- Scheer H, Linsenmeier U, Krauss C (1977) Studies on plant bile pigments, II[1]. Chemical and photochemical oxygenation of a phytochrome Pr chromophore model pigment to purpurins. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 358:185-196
- Scheller HV, Naver H, Moller BL (1997) Molecular aspects of photosystem I. *Physiologia Plantarum* 100:842-851
- Schirmer T, Huber R, Schneider M, Bode W, Miller M, Hackert ML (1986) Crystal structure analysis and refinement at 2.5 Å of hexameric C-phycoerythrin from the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. The molecular model and its implications for light-harvesting. *J Mol Biol* 188:651-676
- Schluchter WM, Glazer AN (1997) Characterization of cyanobacterial biliverdin reductase. Conversion of biliverdin to bilirubin is important for normal phycobiliprotein biosynthesis. *J Biol Chem* 272:13562-13569
- Schmidt-Goff CM, Federspiel NA (1993) In vivo and in vitro footprinting of a light-regulated promoter in the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*. *J Bacteriol* 175:1806-1813
- Schmitt A, Frank G, James P, Staudenmann W, Zuber H, Wilhelm C (1994) Polypeptide sequence of the Chlorophyll *a/b/c*-binding protein of the Prasinophycean *Mantoniella squamata*. *Photosynthesis Research* 40:269-277
- Schmitt A, Herold A, Welte C, Wild A, Wilhelm C (1993) The light-harvesting system of the unicellular alga *Mantoniella squamata* (prasinophyceae): evidence for the lack of a photosystem I-specific antenna complex. *Photochemistry and Photobiology*:132-138.
- Schopf JW (1992) The oldest fossils and what they mean. In *major events in the history of life*, Vol. Jones and Bartlett publishers
- Schubert WD, Klukas O, Krauss N, Saenger W, Fromme P, Witt HT (1997) Photosystem I of *Synechococcus elongatus* at 4 angstrom resolution: comprehensive structure analysis. *Journal of Molecular Biology* 272:741-769
- Schubert WD, Klukas O, Saenger W, Witt HT, Fromme P, Krauss N (1998) A common ancestor for oxygenic and anoxygenic photosynthetic systems. A comparison based on the structural model of photosystem I. *Journal of Molecular Biology* 280:297-314
- Schyns G, Jia L, Coursin T, Tandeau de Marsac N, Houmard J (1998) Promoter recognition by a cyanobacterial RNA polymerase: in vitro studies with the *Calothrix* sp. PCC 7601 transcriptional factors RcaA and RcaD. *Plant Mol Biol* 36:649-659
- Seib LO, Kehoe DM (2002) A turquoise mutant genetically separates expression of genes encoding phycoerythrin and its associated linker peptides. *Journal of Bacteriology* 184:962-970
- Setif P (1992) Energy transfer and trapping in photosystem I. In: Barber J (ed) *The photosystems: structure, function and molecular biology*, topics in photosynthesis 11. Elsevier, Amsterdam, p 471-499

- Shapiro LP, Guillard RRL (1986) Physiology and ecology of the marine eukaryotic ultraplankton. In: Platt T, Li WK (eds) Photosynthetic picoplankton, p 371-389
- Sherry ND, Wood AM (2001) Phycoerythrin-containing picocyanobacteria in the Arabian Sea in February 1995: diel patterns, spatial variability, and growth rates. Deep Sea Research Part II Topical Studies in Oceanography 48:1263-1283
- Sidler W, Kumpf B, Rudiger W, Zuber H (1986) The complete amino-acid sequence of C-phycoerythrin from the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*. Biol Chem Hoppe Seyler 367:627-642
- Sidler WA (1994) Phycobilisome and phycobiliprotein structure. In: Bryant DA (ed) The Molecular Biology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p 139-216
- Sieburth JM (1978a) About bacterioplankton. In: Sournia A (ed) Phytoplankton manual. UNESCO, p 283-287
- Sieburth JM (1978b) Bacterioplankton : Nature, biomass, activity, and relationship to the protist plankton. J. Phycol. 14:31
- Sinha RP, Ambasht NK, Sinha JP, Klisch M, Hader DP (2003) UV-B-induced synthesis of mycosporine-like amino acids in three strains of *Nodularia* (cyanobacteria). Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology 71:51-58
- Sinha RP, Hader DP (1998) Effects of ultraviolet-B radiation in three rice field cyanobacteria. Journal of Plant Physiology 153:763-769
- Sinha RP, Klisch M, Groniger A, Hader DP (2001a) Responses of aquatic algae and cyanobacteria to solar UV-B. Plant Ecology 154:219,221-236
- Sinha RP, Klisch M, Helbling EW, Hader DP (2001b) Induction of mycosporine-like amino acids (MAAS) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation. Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology 60:129-135
- Six C, Thomas JC, Brahmsha B, Lemoine Y, Partensky F (2004) Photophysiology of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH8102, a new model organism. Aquatic Microbial Ecology 35:17-29
- Six C, Thomas J-C, Thion L, Lemoine Y, Zal F, Partensky F (2005) Two novel phycoerythrin-associated linker proteins in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain WH8102. Journal of Bacteriology 187
- Smith PJ, Peterson S, Masters VM, Wydrzynski T, Styring S, Krausz E, Pace RJ (2002) Magneto-optical measurements of the pigments in fully active photosystem II core complexes from plants. Biochemistry 41:1981-1989
- Smith RC, Prezlin BB, Baker KS, Bidigare RR, Boucher NP, Coley T, Karentz D, MacIntyre S, Matlick HA, Menzies D, Ondrusek M, Wan Z, Waters KJ (1992) Ozone depletion: Ultraviolet radiation and phytoplankton biology in antarctic waters. Science 255:952-959
- Sobczyk A, Bely A, Tandeau de Marsac N, Houmard J (1994) A phosphorylated DNA-binding protein is specific for the red-light signal during complementary chromatic adaptation in cyanobacteria. Mol Microbiol 13:875-885
- Sobczyk A, Schyns G, Tandeau de Marsac N, Houmard J (1993) Transduction of the light signal during complementary chromatic adaptation in the cyanobacterium *Calothrix* sp. PCC 7601: DNA-binding proteins and modulation by phosphorylation. EMBO Journal 12:997-1004
- Solov'ev AA, Makhneva ZK, Erokhin YU (2001) UV-Induced destruction of light-harvesting complexes from purple bacterium *Chromatium minutissimum*. Membr Cell Biol 14:463-474
- Stauber EJ, Fink A, Markert C, Kruse O, Johanningmeier U, Hippler M (2003) Proteomics of *Chlamydomonas reinhardtii* light-harvesting proteins. Eukaryotic Cell 2:978-994
- Steglich C, Mullineaux CW, Teuchner K, Hess WR, Lokstein H (2003a) Photophysical properties of *Prochlorococcus marinus* SS120 divinyl chlorophylls and phycoerythrin *in vitro* and *in vivo*. FEBS Letters 553:79-84
- Steglich C, Post AF, Hess WR (2003b) Analysis of natural populations of *Prochlorococcus* spp. in the northern Red Sea using phycoerythrin gene sequences. Environmental Microbiology in press
- Stewart DH, Brudvig GW (1998) Cytochrome b559 of photosystem II. Biochimica et Biophysica Acta 1367:63-87
- Storf M, Parbel A, Meyer M, Strohmann B, Scheer H, Deng MG, Zheng M, Zhou M, Zhao KH (2001) Chromophore attachment to biliproteins: Specificity of PecE/PecF, a lyase-isomerase for the photoactive 3(1)-Cys-alpha 84-phycoviolobilin chromophore of phycoerythrocyanin. Biochemistry 40:12444-12456
- Stowe Evans EL, Ford J, Kehoe DA (2004) Genomic DNA microarray analysis: Identification of new genes regulated by light color in the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*. Journal of Bacteriology 186:4338-4349
- Sukenik A, Bennett J, Falkowski PG (1988) Changes in the abundance of individual apoproteins of light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complexes of photosystem I and II with growth irradiance in the marine chlorophyte *Dunaliella tertiolecta*. Biochimica et Biophysica Acta 932:206-215
- Sukenik A, Bennett J, Mortain-Bertrand A, Falkowski PG (1990) Adaptation of the photosynthetic apparatus to irradiance in *Dunaliella tertiolecta* - A kinetic study. Plant Physiology 92:891-898
- Swanson RV, Ong LJ, Wilbanks SM, Glazer AN (1991) Phycoerythrins of marine unicellular cyanobacteria. II. Characterization of phycobiliproteins with unusually high phycourobilin. Journal of Biological Chemistry 266:9528-9534
- Sym SD, Pienaar RN (1993) The class Prasinophyceae. Progress in Phycological Research 9:281-376

- Takemoto J, Bogorad L (1975) Subunits of phycoerythrin from *Fremyella diplosiphon*: chemical and immunochemical characterization. *Biochemistry* 14:1211-1216
- Tanaka A, Melis A (1997) Irradiance-dependent changes in the size and composition of the chlorophyll *a/b* light-harvesting complex in the green alga *Dunaliella salina*. *Plant and Cell Physiology* 38:17-24
- Tandeau de Marsac N (1977) Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *J Bacteriol* 130:82-91
- Tandeau de Marsac N (1983) Phycobilisomes and complementary chromatic adaptation in cyanobacteria. *Bulletin de l'Institut Pasteur* 81:201-254
- 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 (1988) Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra. *Methods in Enzymology* 167:318-328
- Tandeau de Marsac NT (2003) Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations. *Photosynthesis Research* 76:197-205
- Taylor BL, Zhulin, I.B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:479-506
- Terauchi K, Montgomery BL, Grossman AR, Lagarias JC, Kehoe DM (2004) RcaE is a complementary chromatic adaptation photoreceptor required for green and red light responsiveness. *Mol Microbiol* 51:567-577
- Thomas JC, Passaquet C (1999) Characterization of a phycoerythrin without alpha-subunits from a unicellular red alga. *J Biol Chem* 274:2472-2482
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680
- Tilzer MM (1987) Light-dependence of photosynthesis and growth in cyanobacteria: implications for their dominance in eutrophic lakes. *New Zealand J. Mar. freshwat. Res.* 21:401-412
- Ting CS, Rocap G, King J, Chisholm SW (2002) Cyanobacterial photosynthesis in the oceans: the origins and significance of divergent light-harvesting strategies. *Trends Microbiol* 10:134-142
- Tokutsu R, Teramoto H, Takahashi Y, Ono TA, Minagawa J (2004) The light-harvesting complex of photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*: Protein composition, gene structures and phylogenetic implications. *Plant and Cell Physiology* 45:138-145
- Toledo G, Palenik B (2003) A *Synechococcus* serotype is found preferentially in surface marine waters. *Limnology and Oceanography* 48:1744-1755
- Toledo G, Palenik B, Brahamsha B (1999) Swimming marine *Synechococcus* strains with widely different photosynthetic pigment ratios form a monophyletic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5247-5251
- Tooley AJ, Glazer AN (2002) Biosynthesis of the cyanobacterial light-harvesting polypeptide phycoerythrocyanin holo-alpha subunit in a heterologous host. *Journal of Bacteriology* 184:4666-4671
- Tremolieres A, Dainese P, Bassi R (1994) Heterogenous lipid distribution among chlorophyll-binding proteins of photosystem II in maize mesophyll chloroplasts. *Eur J Biochem* 221:721-730
- Trinquet E, Maurin F, Preaudat M, Mathis G (2001) Allophycocyanin 1 as a near-infrared fluorescent tracer: Isolation, characterization, chemical modification, and use in a homogeneous fluorescence resonance energy transfer system. *Analytical Biochemistry* 296:232-244
- Turkina MV, Villarejo A, Vener AV (2004) The transit peptide of CP29 thylakoid protein in *Chlamydomonas reinhardtii* is not removed but undergoes acetylation and phosphorylation. *FEBS Lett* 564:104-108
- Turner S, Huang TC, Chaw SM (2001) Molecular phylogeny of nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 42:181-186
- Tyagi R, Srinivas G, Vyas D, Kumar A, Kumar HD (1992) Differential effect of ultraviolet-B radiation on certain metabolic processes in a chromatically adapting *Nostoc*. *Photochem Photobiol* 55:401-407
- Urbach E, Robertson DL, Chisholm SW (1992) Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature* 355:267-270
- van der Staay GWM, Moon-van der Staay SY, Garczarek L, Partensky F (1998) Characterization of the Photosystem I subunits PsaI and PsaL from two strains of the marine oxyphototrophic prokaryote *Prochlorococcus*. *Photosynthesis Research* 57:183-191
- Vass I, Turcsanyi E, Touloupakis E, Ghanotakis D, Petrouleas V (2002) The mechanism of UV-A radiation-induced inhibition of photosystem II electron transport studied by EPR and chlorophyll fluorescence. *Biochemistry* 41:10200-10208
- Vermaas WFJ, Williams JGK, Arntzen CJ (1987) Sequencing and modification of *psbB*, the gene encoding the CP-47 protein of the photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Molecular Biology* 8:317-326
- Vierling E, Alberte, RS (1980) *Plant Physiology* 50
- Vincent WF, Downes, M.T., Castenholz, R.W. and Howard-Williams, C. (1993) Community structure and pigment organisation of cyanobacteria-dominated microbial mats in Antarctica. *Eur. J. Phycol.* 28:213-221

- Wang J, Gosztola D, Ruffe SV, Hemann C, Seibert M, Wasielewski MR, Hille R, Gustafson TL, Sayre RT (2002) Functional asymmetry of photosystem II D1 and D2 peripheral chlorophyll mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:4091-4096
- Waterbury JB, Watson SW, Guillard RRL, Brand LE (1979) Widespread occurrence of a unicellular, marine planktonic, cyanobacterium. Nature, London 277:293-294
- Waterbury JB, Watson SW, Valois FW, Franks DG (1986) Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences 47:71-120
- Wehrmeyer W, Zimmermann, C, Ohki, K, Fujita, Y (1988) On a new type of cyanobacterial phycobilisome exemplified in *Phormidium persicinum*. Eur J Cell Biol 46:539-549
- Wendler J, John, W., Scheer, H., and Holzwarth, A. R. (1986) Energy transfer in trimeric C-phycocyanin studied by picosecond fluorescence kinetics. Photochem. Photobiol. 44
- Westermann M, Reuter, W, Schimek, C, Wehrmeyer, W (1993) Presence of both hemidiscoidal and hemiellipsoidal phycobilisomes in a *Phormidium* species (Cyanobacteria). Z Naturforsch [C] 48:28-34
- Westermann M, Wehrmeyer W (1995) A new type of complementary chromatic adaptation exemplified by *Phormidium* sp C86: Changes in the number of peripheral rods and in the stoichiometry of core complexes in phycobilisomes. Archives of Microbiology 164:132-141
- Wilbanks SM, de Lorimier R, Glazer AN (1991) Phycoerythrins of marine unicellular cyanobacteria. III. Sequence of a class II phycoerythrin. J Biol Chem 266:9535-9539
- Wilbanks SM, Glazer AN (1993a) Rod structure of a phycoerythrin II-containing phycobilisome. I. Organization and sequence of the gene cluster encoding the major phycobiliprotein rod components in the genome of marine *Synechococcus* sp. WH8020. J Biol Chem 268:1226-1235
- Wilbanks SM, Glazer AN (1993b) Rod structure of a phycoerythrin II-containing phycobilisome. II. Complete sequence and bilin attachment site of a phycoerythrin g subunit. J Biol Chem 268:1236-1241
- Williams RC, Gingrich JC, Glazer AN (1980) Cyanobacterial phycobilisomes. Particles from *Synechocystis* 6701 and two pigment mutants. J Cell Biol 85:558-566
- Wood AM, Lipsen M, Coble P (1999) Fluorescence-based characterization of phycoerythrin-containing cyanobacterial communities in the Arabian Sea during the Northeast and early Southwest Monsoon (1994-1995). Deep Sea Research II 46:1769-1790
- Wood AM, Phinney DA, Yentsch CS (1998) Water column transparency and the distribution of spectrally distinct forms of phycoerythrin-containing organisms. Marine Ecology - Progress Series 162:25-31
- Worden AZ, Nolan JK, Palenik B (2004) Assessing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton: The importance of the eukaryotic component. Limnology and Oceanography 49:168-179
- Wu YP, Krogmann DW (1997) The orange carotenoid protein of *Synechocystis* PCC 6803. Biochimica Biophysica Acta 1322:1-7.
- Yoshii Y, Takaichi S, Maoka T, Inouye I (2003) Photosynthetic pigment composition in the primitive green alga *Mesostigma viride* (Prasinophyceae): Phylogenetic and evolutionary implications. Journal of Phycology 39:570-576
- Yu MH, Glazer AN, Williams RC (1981) Cyanobacterial phycobilisomes. Phycocyanin assembly in the rod substructures of *Anabaena variabilis* phycobilisomes. J Biol Chem 256:13130-13136
- Yurkov VV & Beatty VT (1998) Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria. Microbiology and molecular biology 62 (3) : 695-724
- Zagalsky PF (2003) beta-Crustacyanin, the blue-purple carotenoprotein of lobster carapace: consideration of the bathochromic shift of the protein-bound astaxanthin. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 59:1529-1531
- Zhao KH, Deng MG, Zheng M, Zhou M, Parbel A, Storf M, Meyer M, Strohmann B, Scheer H (2000) Novel activity of a phycobiliprotein lyase: both the attachment of phycocyanobilin and the isomerization to phycoviolobin are catalyzed by the proteins PecE and PecF encoded by the phycoerythrocyanin operon. Febs Lett 469:9-13
- Zhao KH, Wu D, Wang L, Zhou M, Storf M, Bubenzer C, Strohmann B, Scheer H (2002) Characterization of phycoviolobin phycoerythrocyanin-alpha 84-cystein-lyase-(isomerizing) from *Mastigocladus laminosus*. European Journal of Biochemistry 269:4542-4550

**Les antennes photosynthétiques des organismes marins  
picophytoplanctoniques des genres *Ostreococcus* et *Synechococcus* :  
structure et photoacclimatation**

Les cyanobactéries du genre *Synechococcus* constituent un composant important des écosystèmes marins. Le premier chapitre de ce travail de thèse décrit les effets de l'intensité lumineuse sur une série de paramètres (C, N, pigmentation et propriétés optiques, *etc.*) de la souche WH8102 dont le génome a été récemment entièrement séquencé. Le second chapitre décrit la structure et la photoacclimatation des phycobilisomes (PBS) de cette souche, qui présentent deux linkers jamais décrits auparavant (MpeD et MpeE). Le troisième chapitre décrit l'adaptation chromatique de groupe IV chez les souches M16.17 et M11.1, un processus observé lorsque les cellules sont transférées d'une lumière blanche/verte à une lumière bleue et *vice versa*. Le quatrième chapitre présente une analyse des dommages aux PBS durant une exposition aux UV et une étude des caroténo-protéines cyanobactériennes. Enfin, le dernier chapitre décrit les complexes antennaires d'un autre organisme du picophytoplancton, le picoeucaryote *Ostreococcus tauri*.

**The photosynthetic antennae of the marine picoplankters  
*Ostreococcus* et *Synechococcus* :  
structure and photoacclimation**

Cyanobacteria of the *Synechococcus* genus constitute a major component of marine ecosystems. The first chapter describes the effect the growth irradiance over a number of characteristics (C, N and pigment contents, optical properties, *etc.*) of WH8102, whose genome was recently completely sequenced. The second chapter describes the structure and photoacclimation of the phycobilisomes (PBS) of this strain, with emphasis on two novel phycoerythrin-associated linker polypeptides (MpeD and MpeE). The third chapter describes the marine chromatic adaptation groupe IV in *Synechococcus* spp. M16.17 and M11.1, a process occurring when cells are transferred from blue and white light and *vice versa*. The fourth chapter presents an analysis of the PBS damage during exposure to UV radiations and a study on cyanobacterial caroteno-proteins. Finally, the last chapter studies the light-harvesting complexes of another marine picophytoplankter, the picoeucaryote *Ostreococcus tauri* (Prasinophyceae), providing some new insights into the evolution of this primitive green algal group.