Caractérisation du mécanisme de photo-protection impliquant l'orange carotenoid protein (OCP) chez les cyanobactéries

C. Boulay

▶ **To cite this version:**

C. Boulay. Caractérisation du mécanisme de photo-protection impliquant l'orange carotenoid protein (OCP) chez les cyanobactéries. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris XI, 2009. Français. NNT : . tel-00446901

HAL Id: tel-00446901
https://theses.hal.science/tel-00446901

Submitted on 13 Jan 2010

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.

Thèse de doctorat de l'Université Paris XI

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE

École Doctorale 145 « Sciences du végétal, du gène à l'écosystème »

Présentée par

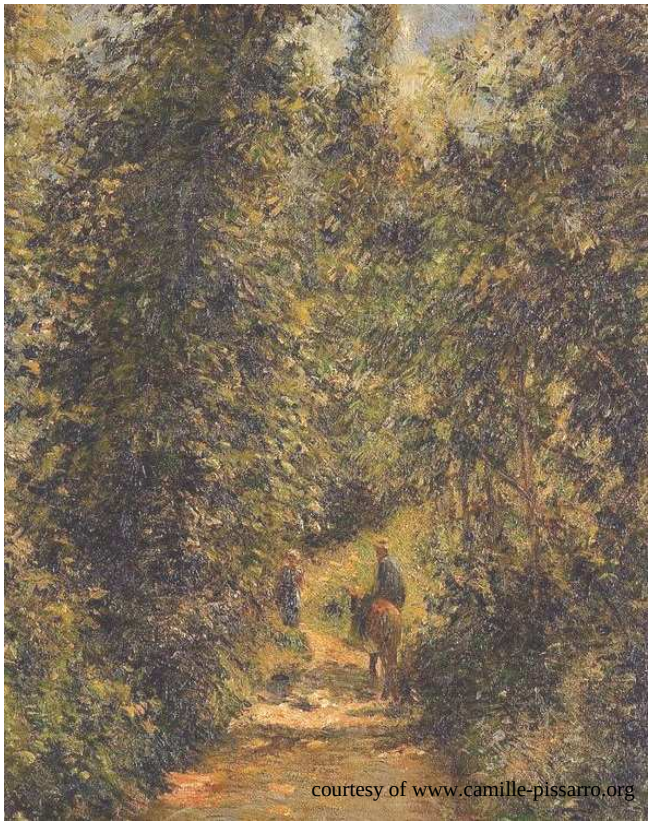
Clémence BOULAY

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris XI

Sujet :

CARACTÉRISATION DU MÉCANISME DE PHOTO-PROTECTION IMPLIQUANT L'ORANGE CAROTENOID PROTEIN (OCP) CHEZ LES CYANOBACTÉRIES

Soutenue le 30 septembre 2009


courtesy of www.camille-pissarro.org

Membres du jury :

M. Michel DRON *Président du jury*
Professeur, Université Paris XI

M. Roberto BASSI *Rapporteur*
Professeur 1ère classe, Université de Vérone

M. Frédéric PARTENSKY *Rapporteur*
DR2 CNRS, Station biologique de Roscoff

Mme Margaret AHMAD *Examinatrice*
DR2 CNRS, Université Pierre et Marie Curie

M. Giovanni FINAZZI *Examinateur*
DR2 CNRS , CEA Grenoble

Mme Diana KIRILOVSKY *Directrice de thèse*
DR2 CNRS, CEA Saclay

Remerciements

Je souhaite remercier Diana Kirilovsky pour avoir dirigé cette thèse sur l'OCP. Je lui adresse toute ma reconnaissance pour m'avoir guidée dans ce travail, pour sa grande disponibilité et ses critiques constructives. Née le même jour et la même année que ma mère biologique, elle a été une mère « scientifique » pour moi. Je la remercie aussi de m'avoir permis de participer à de nombreux congrès en France et à l'étranger, ainsi que de m'avoir encouragée à participer à des activités associatives avec MAIOT (Mouvement Associatif pour l'Information et l'Orientation des Thésards) et l'école doctorale (ED145) en parallèle à mon travail de thèse.

Je remercie M. Frédéric Partensky, Directeur de Recherche au CNRS à la station biologique de Roscoff, et M. Roberto Bassi, Professeur à l'université de Vérone, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Leur lecture minutieuse et critique du manuscrit m'a permis d'améliorer la version finale de ce mémoire et d'ouvrir des perspectives vers de nouvelles expériences. Ma gratitude va aussi à Mme Margaret Ahmad, Directrice de Recherche au CNRS à l'Université Paris VI, et à M. Giovanni Finazzi, Directeur de Recherche au CNRS au CEA de Grenoble, pour avoir suivi mon travail de thèse pendant ces trois années, pour leurs conseils et encouragements.

Je suis très reconnaissante aux personnes du laboratoire pour le soutien qu'elles m'ont apporté. Je pense particulièrement à Adjélé Wilson, je la remercie de son soutien et de son aide, et plus particulièrement de m'avoir initiée aux techniques du laboratoire,. J'adresse mes remerciements sincères à tous ceux de passage dans l'équipe Kirilovsky : Claire, Nando, Mohea, Leyla, Arezki et Sandrine pour leur bonne humeur et pour avoir supporté mon appropriation des adaptateurs et du matériel de western blot ! Merci particulièrement à Nando pour son accueil lors de ma visite à Séville avec Eiri. Je remercie également Ghada Ajlani pour les discussions et les conseils sur les cyanobactéries, ainsi que de m'avoir laissée utiliser le mutant CK. Je suis reconnaissante à Bernard Lagoutte et Leandro Tabares pour leurs conseils sur la purification des corps d'inclusion et à Wael Khazen pour m'avoir appris les bases de la qRT-PCR. Je remercie aussi Jean-Claude Thomas (de l'ENS de Paris) pour m'avoir généreusement donné des cellules d'*A. maxima* et *d'A. variabilis*. J'adresse aussi mes chaleureux remerciements aux personnels du bâtiment 532 et 528, en particulier Karine, Sandrine, Pascale et Isabelle pour leur bonne humeur quotidienne et les multiples services qu'ils m'ont rendu. Merci aussi aux « jeunes » pour l'ambiance et les « sorties de labo », je nomme : Julie, Naoko, Than, Lisa, Maria, Eiri, Christine, Tiago, Tatiana, Tiona, Anja, Amin et Pierre… Je suis également reconnaissante au club des coureurs du 532 pour m'avoir permis de faire du sport en visitant les environ du CEA : Than, Klaus, Gwenaëlle, Cédric et Bill…

Je tiens aussi à adresser mes remerciements aux personnes de l'école doctorale, à Michel Dron, Maryelle Fradin, Jacqui Shykoff et tous les membres du bureau des doctorants pour leur disponibilité, leur implication, leur bonne humeur et tous les bons moments autour d'un verre.

Un grand merci aussi à tous les « emmaiotés », en particulier Pietro, Béatrice, Satchin, Gaëlle, Stéphane, Julien, Benoît, Sascha, Arounie, Agnès et Yohan pour tous les bons moments passés avec MAIOT : les bars, les restau, les visites, le ski, les repas du mercredi, les réunions interminables et les débriefings à la colloc' !

Merci à mes colloc' préférées, Agnès et Eiri, pour leur soutien et les nombreuses soirées autour d'un thé au 19, chemin de la croix de Bures…

Enfin, ces lignes sont aussi l'occasion de remercier tous mes amis, en particulier Eloïse, mon copain Vincent, et ma famille, en particulier ma sœur et mes parents, pour leur soutien, leur présence à mes côtés durant ces trois années et pour avoir supporté mon associabilité pendant la rédaction de ce manuscrit…

Pour pouvoir, un jour, faire marcher le tracteur avec des petites bêtes…

Table des matières

Remerciements ..... **i**

Table des matières ..... **vii**

Abréviations **1**

Liste des figures **3**

Liste des tableaux **9**

Introduction **11**

1. Les cyanobactéries **15**

1.1 Description et intérêts des cyanobactéries 15

1.2 L'évolution a permis à une grande variété de cyanobactéries de s'adapter à tous les milieux, même extrêmes 17

1.3 Les systèmes de photo-réception et de transduction du signal chez les cyanobactéries 19

1.4 Les caroténoïdes chez les cyanobactéries 29

2. La photosynthèse : les réactions photochimiques **35**

2.1 La chaîne de transport des électrons : le photosystème II et le photosystème I 37

2.2 Le transport d'électrons cyclique 43

3. Les antennes collectrices d'énergie chez les plantes et les cyanobactéries **43**

3.1 Les antennes des plantes 45

3.2 D'autres protéines de la famille des Lhc sont retrouvées chez les cyanobactéries 49

3.3 Les antennes externes des cyanobactéries : les phycobilisomes 51

4. Les mécanismes liés à différentes quantités et qualités de lumière chez les plantes et les cyanobactéries **61**

4.1 Etude de la photosynthèse grâce à la fluorescence 63

4.2 La photoinhibition 65

4.3 Les transitions d'état : un phénomène de photo-adaptation 67

4.4 Le mécanisme de quenching non-photochimique qE : un mécanisme de photo-protection 71

5. État des lieux des connaissances sur l'OCP : description et fonction **81**

5.1 Description et caractéristiques de l'OCP 81

5.2 Avancées récentes sur le mécanisme de l'OCP : une molécule photo-active impliquée dans le mécanisme de photo-protection qE_{cya} 87

Objectif **91**

Matériels et Méthodes **93**

1. Construction des mutants **93**
1.1 Constructions pour surproduire la FRP dans *E.coli* 93
1.2 Construction de la souche Δ*slr*1964 chez *Synechocystis* 93
1.3 Constructions pour surproduire la FRP dans *Synechocystis* 107
1.4 Transformation des souches 109
1.5 Extraction de l'ADN génomique 111
2. Purification de l'ARN et RT-PCR **111**
2.1 Purification de l'ARN 111
2.2 Transcription réverse 113
3. Conditions de culture liquide des cyanobactéries **113**
3.1 Conditions normales 113
3.2 Conditions de carence en fer 115
4. Mesures d'absorbance **115**
4.1 Concentration en chlorophylle 115
4.2 Le ratio phycobiliprotéine/chlorophylle (PC/Chl) 117
5. Mesures de fluorescence **117**
5.1 Mesures du rendement de fluorescence avec un fluorimètre PAM 117
5.2 Mesure de fluorescence à 77°K, 10°C et température ambiante 121
6. Préparation de membranes (MB) et de membranes liées aux phycobilisomes (MP) **121**
6.1 Préparation des membranes (MB) 123
6.2 Préparation des membranes liées aux phycobilisomes (MP) 123
7. Purification des phycobilisomes (PBS) **125**
8. Purification de l'Orange Carotenoid Protein (OCP) surexprimée **125**
9. Purification de la Fluorescence Recovery Protein (FRP) surexprimée **127**
9.1 Purification de la FRP avec un StrepTag dans *E.coli* 127
9.2 Purification de la FRP avec un HisTag dans *E.coli* 127
9.3 Purification de la FRP avec un HisTag dans *Synechocystis* 131
10. Conditions pour la reconstitution et l'incubation des phycobilisomes en présence de l'OCP **133**
11. Western blot et immuno-déctection **135**
12. Co-immunoprécipitation **137**
13. Logiciel de graphique **137**

Chapitre I : Étude des rôles des protéines OCP et IsiA dans la dissipation d'énergie induite par la lumière sous carence en fer **139**

1. Caractérisation des changements induits par la carence en fer au niveau de l'appareil photosynthétique chez le sauvage, les mutants ΔIsiA et ΔOCP de *Synechocystis* 141
1.1 Diminution des pigments : phycobiliprotéines et chlorophylles 141
1.2 Diminution du PSI et du PSII 141
2. Étude du déclin de fluorescence (qE_{cya}) dans les cellules carencées du sauvage et du mutant ΔIsiA 149
3. Le déclin de fluorescence est-il dû à une baisse de l'émission des phycobilisomes ou de la chlorophylle ? 153
4. Études de souches mutantes délestées des phycobilisomes (PAL) et de l'OCP (ΔOCP) 155
5. Conclusion du chapitre I 159

Chapitre II : Études de la présence et de la fonction de l'Orange Carotenoid Protein dans les mécanismes de photo-protection chez les cyanobactéries 161

1. Recherche des gènes homologues à l'OCP chez les cyanobactéries 161
2. Induction du déclin de fluorescence (qE_{cya}) par une lumière bleue-verte dans les souches cyanobactériennes contenant l'OCP et dépourvues de l'OCP 167
2.1 Chez les cyanobactéries d'eau douce 167
2.2 Chez les cyanobactéries marines 169
3. Induction du déclin de fluorescence (qE_{cya}) par une lumière bleue-verte chez les cellules cyanobactériennes en conditions de carence en fer 171
4. Caractérisation des cellules carencées en fer : spectres d'absorbance et de fluorescence 175
4.1 Spectres d'absorbance 175
4.2 Spectres d'émission de fluorescence avec l'excitation de la chorophylle à 430nm. 177
4.3 Spectres d'émission de fluorescence avec l'excitation des phycobilisomes à 600nm 177
5. Étude de la photoinhibition des souches contenant l'OCP et dépourvues de l'OCP 179
6. Étude des transitions d'état en conditions de carence en fer 181
7. Conclusion du chapitre II 183

Discussion des chapitres I et II 187

1. Discussion sur l'implication d'IsiA et de l'OCP dans les mécanismes associés au déclin de fluorescence non photochimique en conditions normales et sous carence en fer 187

1.1 IsiA protège les cellules pendant la carence en fer mais elle ne participe pas au mécanisme qE_{cya} associé à l'OCP qui est augmenté pendant la carence 187
1.2 Les transitions d'état sont inhibées par la carence en fer 189
1.3 Les cyanobactéries ne contenant pas l'OCP sont plus sensibles à la photoinhibition 191
2. Reflexions sur le fonctionnement des mécanismes de photo-protection impliquant l'OCP et IsiA en rapport avec l'apparition des phycobilisomes déconnectés fonctionnellement chez les cyanobactéries 193
2.1 Les cyanobactéries qui ne contiennent pas l'OCP ni le mécanisme qE_{cya} qui lui est associé, dégradent rapidement leur contenu en phycobiliprotéines pour prévenir l'apparition de phycobilisomes déconnectés dangereux 193
2.2 IsiA pourrait participer à la dissipation de l'excès d'énergie provenant des phycobilisomes déconnectés fonctionnellement 195
3. Répartition du gène de l'OCP et évolution des cyanobactéries 197

Chapitre III : Étude des interactions OCP-phycobilisome chez *Synechocystis* 205

1. L'OCP peut-elle être co-isolée avec des phycobilisomes? 205
2. Incubations et reconstitutions des phycobilisomes en présence de l'OCP 207
3. Le déclin de fluorescence associé au mécanisme de photo-protection (qE_{cya}) peut-il être induit *in vitro* ? 211
4. La concentration forte en phosphate nécessaire au maintien des phycobilisomes entiers *in vitro* inhibe-t-elle le déclin de fluorescence? 215

Discussion du chapitre III 219

1. Les conditions expérimentales *in vitro* sont trop éloignées de celles *in vivo* pour permettre l'induction du mécanisme qE_{cya} dans les phycobilisomes isolés en présence de l'OCP 219
2. Perspectives concernant l'étude des interactions entre l'OCP et les phycobilisomes 223

Chapitre IV : Découverte d'un nouvel acteur impliqué dans le mécanisme de photo-protection qE_{cya} : la « Fluorescence Recovery Protein » (FRP) . 227

1. Le gène *slr*1964 est conservé en aval de celui de l'OCP (*slr*1963) chez les cyanobactéries 227
2. Les mutants du gène *slr1964* chez *Synechocystis* 231
2.1 Description de la construction des mutants 231
2.2 Phénotype des mutants de la FRP 235

3. Estimation de la quantité de FRP et d'OCP dans les mutants 239
4. Les gènes *slr*1963 et *slr*1964 sont-ils co-transcrits ? 245
5. Isolement de la FRP et étude de l'interaction entre la FRP et l'OCP chez *Synechocystis* 245
5.1 Localisation de la FRP 245
5.2 Isolement de la FRP chez *Synechocystis* et premières données sur l'interaction OCP-FRP 249
5.3 Etude de l'interaction OCP-FRP par co-immunoprécipitation 251
6. Conclusion du chapitre IV 253

Chapitre V : Purification et utilisations de la Fluorescence Recovery Protein (FRP) recombinante produite dans *E.coli* 255

1. Purification de la FRP recombinante dans *E.coli* 255
1.1 Constructions réalisées dans *E.coli* pour surproduire la FRP 255
1.2 Solubilisation et purification de la FRP surproduite sous forme de corps d'inclusion 257
2. Obtention d'anticorps anti-FRP 261
3. Vérification du repliement de la protéine FRP recombinante obtenue 265
4. Tests d'interaction de l'OCP avec la FRP recombinante *in vitro* 265
5. Conclusion du chapitre V 269

Discussion des chapitres IV et V 271

1. Le fait que les gènes *slr*1963 et *slr*1964 soient en continuité, l'existence de paralogues de *slr*1963 et l'étude de leur co-évolution peuvent apporter des informations sur leur(s) rôle(s) 271
2. Propositions sur le mécanisme de la FRP 277
2.1 Rôle de la FRP dans la récupération de fluorescence 277
2.2 Comparaison avec la fonction d'autres protéines « proches » 285
2.3 Un système de transduction du signal à deux composants chez les cyanobactéries ? 287
3. Régulation de l'expression de l'OCP et de la FRP 291

Conclusion générale et perspectives 295

Annexes 301

Bibliographie 311

Articles 337

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

APC : allophycocyanine

ARN : Acide RiboNucléique

ATCC : American Type Culture Collection

BLUF : sensor of Blue Light Using FAD

bp : base pair

CCY : Culture Collection Yerseke

c-di-GMP : bis-(3'-5')-cyclic dimeric Guanosine MonoPhosphate

chl : chlorophylle

DCMU : 3-(3,4-DiChlorophenyl)-1,1-diMethylUrea

DO : Densité Optique

EAL : domaine protéique contenant une séquence d'acide aminés EAL conservée et qui est impliqué dans la signalisation (hydrolyse du c-di-GMP)

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tetra acétique

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FMN : Flavine MonoNucléotide

GAF : domaine protéique (cGMP phosphodiesterase/adenyl cyclase/FhlA) impliqué dans la transduction du signal

GGDEF : domaine protéique contenant une séquence d'acide aminés GGDEF conservée et qui est impliqué dans la signalisation (synthèse du c-di-GMP)

HCl : acide chlorhydrique

HisTag : Tag avec 6 acides aminés histidines

IPTG : IsoPropyl-β-D-ThioGalacto-pyranoside

LHC : Light Harvesting Complex

LiDs : Lithium DodecylSulfate

LOV : domaine photo-actif Light, Oxygen, Voltage

MES : 2-MorpholinoEthaneSulfonic Acid

MB : membrane

MP : Membrane-Phycobilisome

NADP : Nicotinamide Adénosine Di-Phosphate

NPQ : Non Photochemical Quenching

OCP : Orange Carotenoid Protein

ORF : Open Reading Frame

P680 : donneur primaire du PSII

P700 : donneur primaire du PSI

PAM : Pulse Amplified Modulated fluorimètre

PAS : domaine protéique (Per/ARNT/Sim) impliqué dans la transduction du signal

PBS : phycobilisomes

PBS (pour un tampon) : Phosphate Buffered Saline

PC : phycocyanine

PCC : Pasteur Culture Collection

PCR : Polymerisation Chain Reaction

PE : phycoérythrine

PEB : phycoérythrobiline

PEC : phycoérythrocyanine

PMSF : PhenylMethylSulphonyl Fluoride

PSI : photosystème I

PSII : photosystème II

PUB : phycourobiline

PXB : phycobilivioline

PYP : Photoactive Yellow Protein

Q_A : quinone accepteur primaire d'électrons du PSII

Q_B : quinone accepteur secondaire d'électrons du PSII

qE_{cya} : mécanisme de photo-protection avec un quenching de fluorescence rapide chez les cyanobactéries

RCC : Roscoff Culture Collection

RCP : Red Carotenoid Protein

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerisation Chain Reaction

SDS : Sodium DodecylSulphate

SDS-PAGE : gel d'électrophorèse polyacrylamide en présence de SDS

StrepTag : peptide artificiel qui se lie dans le site de liaison de la streptavidine pour la biotine dont la séquence en acides aminés est WSHPQYK

TCA : acide TriChloroAcétique

Tris : Tris hydroxyméthyl methylamine

u.a. : unités arbitraires

UV : Ultra-Violet

WH : Woods Hole oceanography institute culture collection

WT : Wild Type (souche sauvage)

β-DM : β-Dodecyl Maltoside

Liste des figures

Figure I.1 : Photographies et schéma de cyanobactéries 12
Figure I.2 : Quelques cyanobactéries vues par microscopie électronique et microscopie optique 14
Figure I.3 : Arbre des cyanobactéries réalisé à partir de 32 espèces 16
Figure I.4 : Arbre phylogénique des cyanobactéries réalisé à partir de 24 génomes de cyanobactéries d'après Swingley *et al.* 2008 18
Figure I.5 : Résumé des structures tri-dimensionnelles des domaines protéiques photo-senseurs représentatifs et de leurs chromophores d'après Purcell *et al.* 2008 20
Figure I.6 : Exemple de la signalisation d'un photosenseur chez les cyanobactéries d'après Montgomery et al. 2007 22
Figure I.6bis : Synthèse de la zéaxanthine, de l'echinénone et de la 3'-hydroxyechinénone (3'-OH-échinénone) chez *Synechocystis*. 30
Figure I.6ter : Spectre d'absorption de l'hydroxyechinénone. 32
Figure I.7 : Localisation de la photosynthèse chez les plantes et les cyanobactéries 34
Figure I.8 : Schéma de l'architecture des complexes membranaires et des protéines solubles du thylacoïde d'après Nelson 2006 36
Figure I.9 : Schéma et structure du photosystème II (PSII) 38
Figure I.10 : Schéma et structure du photosystème I (PSI) 40
Figure I.11 :Le transfert cyclique des électrons chez les plantes d'après Shikanai 2007 42
Figure I.12 : Structure du complexe PSI vu du côté stromal de la membrane thylacoïdienne chez les plantes d'après Jensen *et al.* (2007) 44
Figure I.13 : Stucture du supercomplexe PSII-LHCII chez *Arabidopsis thaliana* 46
Figure I.14 : Structure d'un monomère du LHCIIb majeur du PSII avec ses cofacteurs à une résolution de 2.5Å d'après Schmid 2008 chez *Arabidopsis thaliana* 48
Figure I.15 : Supercomplexe IsiA-photosystème I d'après Bibby *et al.* (2001) 50
Figure I.16 : Structure des bilines et contenu en biline des phycobiliprotéines d'après Glazer 1989 52
Figure I.17 : Structure du phycobilisome de *Synechocystis* d'après Arteni *et al.* (2009). 56
Figure I.18 : Détails des thylacoïdes périphériques de la cyanobactérie filamenteuse *Oscillatoria splendida* 58
Figure I.19 : Modèle de la structure d'un trimère de phycocyanine avec ses phycocyanobilines donneurs et accepteurs d'énergie d'après Schirmer *et al.* (1986) et Brejc *et al.* (1995) .. 60
Figure I.20 : Les trois principales voies de désactivation de l'état excité de la chlorophylle .. 62
Figure I.21 : Schéma du mécanisme possible de qE dépendant de PsbS dans le PSII des plantes vertes inspiré de Betterle *et al.* (2009) 72

Figure I.22 : Cinétique et dépendance ΔpH du quenching qE chez les plantes proposées par le modèle de Horton *et al*. (2008) 74
Figure I.23 : Le mécanisme qE_{cya} induit par la lumière bleue implique les phycobilisomes d'après Wilson *et al*. (2006) 76
Figure I.24 : Le spectre d'action du mécanisme qE_{cya} correspond au spectre d'absorbance d'un caroténoïde chez *Synechocystis* d'après Rakhimberdieva *et al*. (2004) 77
Figure I.25 : Le mécanisme qE_{cya} induit par la lumière bleue implique l'Orange Carotenoid Protein (OCP) 78
Figure I.26 : Le mécanisme qE_{cya} n'est pas dépendant du ΔpH ni de l'état redox du pool de plastoquinones chez *Synechocystis* d'après Wilson *et al*. (2006) 79
Figure I.27 : La récupération de fluorescence du mécanisme qE_{cya} est ralentie par la rigidité de la membrane du thylacoïde d'après Kirilovsky 2007 80
Figure I.28 : Structure de l'OCP chez *Arthrospira maxima* d'après Kerfeld *et al*. (2003) 82
Figure I.29 : La localisation de l'OCP d'après Wilson *et al*. (2006) 84
Figure I.30 : L'OCP isolée répond à la lumière bleue : photo-conversion et reconversion à l'obscurité d'après Wilson *et al*. (2008) 85
Figure I.31 : Changements dans le caroténoïde et la protéine sous illumination d'après Wilson *et al*. (2008) 86
Figure I.32 : La forme rouge est la forme active essentielle à la formation du déclin de fluorescence dans le mécansime qE_{cya} d'après Kirilovsky 2009 (Wilson *et al.* 2008a; Punginelli *et al.* 2009) 88
Figure I.33 : Modèle du mécanisme de l'OCP dans qE_{cya} 90
Figure MM.1 : Constructions réalisées pour surproduire la FRP dans *E.coli* 100
Figure MM.2 : Construction du plasmide pCB7 qui permet la surexpression de la FRP N-terminal Strep-taggée dans *E.coli* 101
Figure MM.3 : Construction du plasmide qui permet la surexpression de la FRP N-terminal His taggée dans *E.coli* (pCB9) 102
Figure MM.4 : Constructions réalisées pour surproduire l'OCP et la FRP dans *Synechocystis* 103
Figure MM.5 : Construction du plasmide pCB12 qui, après transformation, permet la surexpression de l'OCP et de la FRP His taggée en N-terminal dans *Synechocystis* 104
Figure MM.6 : Constructions réalisées pour surproduire la FRP dans *Synechocystis* 105
Figure MM.7 : Construction du plasmide pCB19 qui, après transfromation, permet la surexpression de la FRP His taggée en N-terminale dans *Synechocystis* 106
Figure MM.8 : Vérification de la construction et de la ségrégation des mutants de la FRP dans *Synechocystis* 108
Figure MM.9 : gel agarose 1.5% d'ARN purifié 110

Figure MM.10 : Principe de montage du PAM et exemple de mesures du rendement de fluorescence du sauvage de *Synechocystis* 116
Figure CI.1 :Changements dans le spectre d'absorption et le contenu en chlorophylle induit par une carence en fer chez le sauvage, les mutants ΔOCP et ΔIsiA de *Synechocystis*. 140
Figure CI.2 : Changements dans le spectre d'émission de fluorescence à 77°K induits par une carence en fer chez le sauvage et le mutant ΔIsiA de *Synechocystis* 142
Figure CI.3 : Immunodétection d'IsiA dans des membranes isolées de cellules carencées et non carencées du sauvage et du mutant ΔIsiA de *Synechocystis* 143
Figure CI.4 : Spectres de fluorescence d'excitation et d'émission à 77°K des cellules du sauvage et du mutant ΔIsiA..... 144
Figure CI.5 : Spectres d'émission de fluorescence à 77°K des MP et des cellules du sauvage et du mutant ΔIsiA 146
Figure CI.6 : Mesures de qE_{cya} induit par la lumière bleue-verte dans les cellules carencées du sauvage et du mutant ΔIsiA de *Synechocystis*..... 148
Figure CI.7 : Le déclin de fluorescence induit par la lumière bleue-verte dans les cellules carencées du sauvage et du mutant ΔIsiA est réversible quand la synthèse protéique est inhibée 150
Figure CI.8 : Spectres de fluorescence à température ambiante des cellules adaptées à l'obscurité (trait plein) et après illumination (trait pointillé) 151
Figure CI.9 : Détection de l'OCP dans les cellules entières et dans les MP des cellules carencées et non-carencées du sauvage et des mutants..... 152
Figure CI.10 : Changements de fluorescence dans les cellules carencées en fer du mutant PAL 154
Figure CI.11 : Les cellules carencées en fer du mutant ΔOCP n'ont pas de quenching de fluorescence..... 156
Figure CI.12 : Présence d'IsiA dans les cellules du mutant ΔOCP carencées en fer..... 158
Figure CII.1: Détection de l'OCP par western blot et induction du déclin de fluorescence (qE_{cya}) par une lumière bleue-verte chez les cellules de *A. variabilis*, *A. maxima*, *S. elongatus* et *T. elongatus*..... 166
Figure CII.2: Détection de l'OCP par western blot et induction du déclin de fluorescence (qE_{cya}) par une lumière bleue-verte chez les cyanobactéries marines..... 168
Figure CII.3: Modifications du rendement de fluorescence induit par la lumière bleue-verte forte dans les cellules sous carence en fer de *A. maxima* (A), *S. elongatus* (B) et *T. elongatus* (C) 170
Figure CII.4 : Mesures du déclin de fluorescence (Fm') induit par la lumière bleue-verte chez les cellules de *A. maxima* cultivées en milieu normal et sous carence en fer 172
Figure CII.5 : Variations des propriétés d'absorption des cellules sous carence en fer de *A. maxima*, *S. elongatus* et *T. elongatus* 173

Figure CII.6 : Variations des spectres d'émission de fluorescence à 77°K (excitation à 430nm) induites par une carence en fer dans les cellules de *A. maxima* (A), *S. elongatus* (B) et *T. elongatus* (C) 174
Figure CII.7 : Variations des spectres d'émission de fluorescence à 77°K (excitation à 600nm) induites par une carence en fer dans les cellules de *A. maxima* (A), *S. elongatus* (B) et *T. elongatus* (C) 176
Figure CII.8 : Photoinhibition dans les cellules de *A. maxima*, *Synechocystis*, *S. elongatus* et *T. elongatus* 178
Figure CII.9 : Transitions d'état dans les cellules de *A. maxima* (A, B), *S. elongatus* (C, D) et *T. elongatus* (E, F) en présence (A,C,E) (+Fe) et en abscence de fer (B,D,F) (-Fe)..... 182
Figure D.1 : Modèle schématique du comportement des phycobilisomes déconnectés fonctionnellement sous carence en fer quand l'OCP est absente ou présente 192
Figure D.2 : Arbre phylogénique des paralogues de l'OCP (entière) et de l'OCP N-terminale d'après Kerfeld 2009 198
Figure CIII.1 : Purification des phycobilisomes entiers du sauvage et des cœurs de phycobilisomes du mutant CK de *Synechocystis* 206
Figure CIII.2 : Recherche de l'OCP par western blot dans les phycobilisomes purifiés 208
Figure CIII.3 : Schéma des expériences de reconstitution et d'incubation des phycobilisomes 209
Figure CIII.4 : Expériences de reconstitution et d'incubation de phycobilisomes entiers issus du sauvage de *Synechocystis* en présence de l'OCP 210
Figure CIII.5 : Expériences de reconstitution et d'incubation de cœurs de phycobilisomes issus du mutant CK de *Synechocystis* en présence de l'OCP..... 212
Figure CIII.6 : Spectres d'émission de fluorescence avec une excitation à 600nm des phycobilisomes incubés en présence de l'OCP..... 213
Figure CIII.7 : Cinétique de l'émission de fluorescence avec une excitation à 600nm des phycobilisomes entiers reconstitués en présence de l'OCP 214
Figure CIII.8 : Effet de concentrations croissantes de phosphate sur l'induction du déclin de fluorescence (qE_{cya}) par une lumière bleue-verte (A) et sur la variable de fluorescence Fv (B) dans les cellules du sauvage de *Synechocystis*..... 216
Figure CIV.1: Alignements de 18 séquences de la protéine prédite encodée par les gènes homologues à *slr*1964 chez les cyanobactéries réalisés avec Clustal W 230
Figure CIV.2: L'induction du quenching de fluorescence du mécanisme qE_{cya} a toujours lieu quand le gène *slr*1964 est inactivé 232
Figure CIV.3: La FRP est impliquée dans la récupération de la fluorescence aprés une forte illumination 233
Figure CIV.4: Mesures de la cinétique de récupération de la fluorescence aprés une forte illumination dans les mutants de la FRP chez *Synechocystis*..... 234

Figure CIV.5 : Estimation de la quantité de l'Orange Carotenoid Protein dans le sauvage et les mutants de la FRP chez *Synechocystis* 236
Figure CIV.6 : Estimation de la quantité de la Fluorescence Recovery Protein dans les mutants FRP chez *Synechocystis* 238
Figure CIV.7 : *slr*1963 et *slr*1964 sont co-transcrits quand ils sont placés sous le contrôle d'un promoteur fort chez *Synechocystis* 242
Figure CIV.8 : *slr*1963 et *slr*1964 peuvent aussi être transcrits indépendamment dans *Synechocystis* 243
Figure CIV.9 : La FRP n'est pas une protéine soluble chez *Synechocystis* 244
Figure CIV.10 : La FRP est une protéine attachée à la membrane chez *Synechocystis* 246
Figure CIV.11 : L'OCP co-purifie sur une colonne d'affinité HisTag avec la FRP marquée avec un HisTag chez *Synechocystis* 247
Figure CIV.12: Amélioration de la purification de la FRP marquée avec un HisTag chez *Synechocystis* 248
Figure CIV.13 : La FRP et l'OCP intéragissent chez *Synechocystis* 250
Figure CV.1: Purification de la FRP surproduite avec un StrepTag chez *E. coli* 256
Figure CV.2 : Suivi du lavage des corps d'inclusion de la FRP avec un HisTag chez *E. coli* 258
Figure CV.3 : Schéma du lavage des corps d'inclusion de la FRP avec un HisTag chez *E. coli* 259
Figure CV.4 : Tests de solubilisation de la FRP avec de l'urée et du LiDs 260
Figure CV.5 : Le LiDS permet la solubilisation de la FRP 262
Figure CV.6 : Vérification de la pureté de la FRP recombinante purifiée 263
Figure CV.7 : L'anticorps anti-FRP est spécifique à la partie N-terminale de la FRP contenant un HisTag 264
Figure CV.8 : Mesures de la fluorescence (Ex297nm) intrinsèque de la FRP recombinante dans son tampon et après ajout de différents détergents pour évaluer la qualité de son repliement 266
Figure CV.9 : Tests de l'influence de la FRP recombinante sur la cinétique de l'OCP *in vitro* 267
Figure D.3 : Modèle du rôle possible de la FRP 278
Figure D.4 : Résultat du blast de la séquence de la FRP 286
Figure D.5 : Alignement de la séquence de la FRP de *Synechocystis* avec la séquence concensus du domaine GGDEF des 11 protéines de *Vibrio cholerae* montrées sur la figure D.4 288

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés des phycobiliprotéines majeures des cyanobactéries d'après Bryant (Sidler 1994) 54
Tableau 2 : Souches cyanobactériennes utilisées 94
Tableau 3 : Plasmides utilisés 96
Tableau 4 : Oligopeptides utilisés 98
Tableau 5 : Présence du gène encodant l'OCP et ses paralogues plus courts dans les différentes souches cyanobactériennes (identité par rapport au gène de l'OCP de *Synechocystis*) 162
Tableau 6 : Diminution de la fluorescence variable (Fv) pendant une illumination avec de fortes intensités de lumière blanche 180
Tableau 7 : Présence du gène encodant Slr1964 dans les différentes souches cyanobactériennes et son identité par rapport à celui de *Synechocystis* 228

Introduction

L'effet de la lumière fascine aussi bien les artistes (voir reproduction en page de garde du « Path under the Trees », un tableau du peintre impressionniste Pissarro) que les scientifiques. Cet intérêt est d'autant plus justifié que la lumière, avec d'autres acteurs tels que l'eau, est à l'origine de la vie sur Terre. Celle-ci a été favorisée, il y a plusieurs milliards d'années, par l'apparition d'organismes capables d'utiliser l'énergie du soleil, l'eau et le CO_2, présents en grandes quantités dans l'atmosphère primitive, pour fabriquer des molécules carbonées et de l'O_2. Ces organismes étaient des cyanobactéries primitives : les premiers organismes photosynthétiques à photosynthèse oxygénique. Ces organismes ont évolué et de nos jours, en plus des cyanobactéries, les algues et les plantes réalisent la photosynthèse oxygénique sur Terre, enrichissant l'atmosphère d'oxygène et diminuant la concentration de CO_2.

L'Homme est apparu il y a 3 à 5 millions d'années et a commencé à s'intéresser à la photosynthèse dans l'antiquité avec Aristote (IVème siècle avant JC), celui-ci pensait que le sol fournissait aux plantes les éléments dont elles ont besoin. Au XVIIème siècle, Jan Baptist van Helmont a démontré qu'un saule prend 77kg en 5 ans et que 57g disparaissent du bac dans lequel il est planté pendant ce temps, réfutant ainsi cette première hypothèse. Ensuite au XVIIIème siècle, plusieurs scientifiques ont mis en évidence les notions de respiration et de production d'oxygène par les plantes et l'importance de la lumière dans ce phénomène. Au XIXème siècle, les grandes lignes du mécanisme sont comprises : la transformation de l'énergie lumineuse, la consommation d'eau et de CO_2, la production d'amidon et le rejet d'O_2. La chlorophylle est isolée en 1817 par deux chimistes français Pierre Joseph Pelletier et Joseph Bienaimé Caventou. L'explication plus détaillée du processus est établie au XXème siècle et la structure chimique de la chlorophylle est découverte. Robert Emerson a notamment montré que beaucoup de molécules de chlorophylle sont nécessaires pour émettre une molécule d'O_2 (Karp 2004) et les travaux de Robert Hill ont mis en évidence que la photosynthèse se présente comme une réaction d'oxydo-réduction.

De la fin du XIXème siècle à nos jours, les études sur la photosynthèse ont été approfondies (voir la suite de l'introduction). La photosynthèse a été caractérisée dans les différents organismes photosynthétiques : les plantes terrestres, les algues et les bactéries photosynthétiques dont les cyanobactéries font partie. L'évolution de ces organismes photosynthétiques les uns par rapport aux autres a été caractérisée. La composition en pigments collecteurs d'énergie (chlorophylles, caroténoïdes, phycobilines) qui constituent leurs antennes a été déterminante pour leur adaptation dans les écosystèmes. De plus, la lumière est nécessaire à la photosynthèse mais un excès crée un stress oxydant très dangereux pour les cellules. C'est pourquoi les organismes photosynthétiques ont développé plusieurs

A

B

C

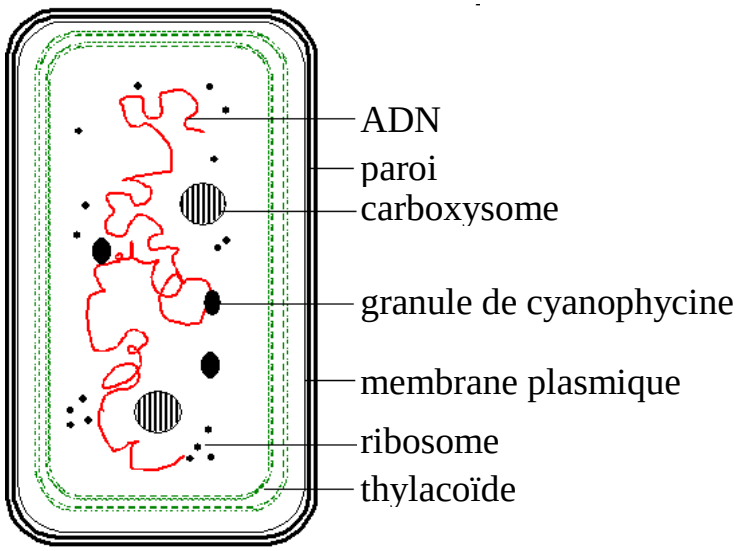


Figure I.1 : Photographies et schéma de cyanobactéries
En **A**, la photographie montre une formation de stromatolithes située à l'ouest de l'Australie dans le parc de Yalgroup (photographie de C. Eeckhout).
En **B**, la photographie montre un bloom de la forme *Microcyctis* dans le lac Horowhenua dans la région de Manawatu-Wanganui en Nouvelle-Zélande (source : horizon MW).
Un schéma de la structure d'une cyanobactérie est montré en **C** (auteur A. Gallien).

mécanismes de photo-protection où il y a une réorganisation des pigments collecteurs d'énergie.

La compréhension de la photosynthèse et des mécanismes de photo-protection qui lui sont associés sont d'un intérêt économique et écologique actuel majeur. En effet, les ressources énergétiques naturelles (pétrole, gaz) que l'Homme utilise, s'amenuisent et la pollution augmente. Il existe un besoin en nouvelles énergies en accord avec l'environnement. Les bioénergies, énergies produites à partir de matériels biologiques, font partie de la solution. La biomasse, produite grâce à la photosynthèse qui permet notamment l'absorption du CO_2, peut être transformée en bio-fioul. Les bio-fiouls dits de 1ère génération utilisent les récoltes agricoles avec des procédés conventionnels du type Fischer Tropsch où le matériel est transformé en molécules de base par chauffage, nettoyé chimiquement et reconstruit en bio-fiouls. Les bio-fiouls de 2nde génération sont en cours de développement et d'industrialisation, ils utilisent les bio-déchets de l'industrie et de l'agriculture avec des procédés plus élaborés. Les bio-fiouls de 3ème génération sont en cours de recherche et développement, ils utilisent des micro-organismes photosynthétiques (dont des algues et des cyanobactéries) qui peuvent être cultivés dans les eaux polluées et salées et produire 250 fois plus, en terme de ressource disponible, que les bio-fiouls de 1ère génération issus des cultures de soja.

Mon sujet de thèse s'inscrit dans le contexte économique et écologique décrit dans le paragraphe précédent et dans le contexte de recherche où les premières avancées des connaissances ont été décrites dans les premiers paragraphes. Pendant mon doctorat, j'ai participé à la caractérisation d'une molécule, qui contient un caroténoïde, nommée l'Orange Carotenoid Protein (OCP), et à l'étude du mécanisme de photo-protection dans lequel cette protéine est impliquée chez les cyanobactéries. Mon travail de thèse a permis d'apporter des connaissances sur la présence et la fonction du mécanisme de photo-protection impliquant l'OCP chez les cyanobactéries en général, ainsi que la découverte et la caractérisation d'une nouvelle protéine impliquée dans ce mécanisme qui interagit avec l'OCP.

La présentation de ce travail commence par la description des cyanobactéries et des photorécepteurs qui y sont présents. Puis je décris de la photosynthèse et les antennes collectrices d'énergie des organismes photosynthétiques car j'y ferai souvent référence. Comme ouverture à la présentation des résultats et à la discussion, je décris ensuite les mécanismes de photo-protection connus chez les plantes et les cyanobactéries en insistant sur la fluorescence, outil central pour mesurer ces mécanismes. Je présente également un état des lieux des connaissances sur l'Orange Carotenoid Protein (l'OCP) et le mécanisme de photo-protection associé chez la cyanobactérie *Synechocystis* PCC 6803 (nommée dès à présent *Synechocystis*).

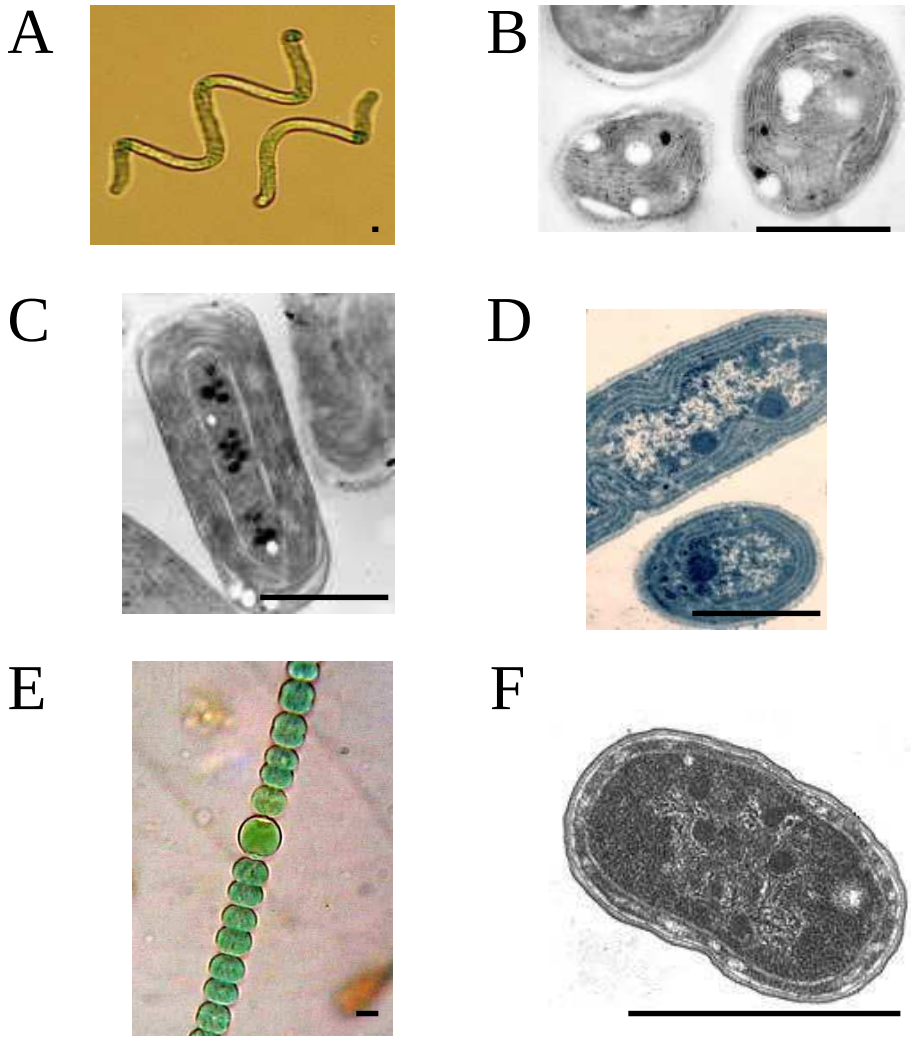


Figure I.2 : Quelques cyanobactéries vues par microscopie électronique et microscopie optique
En **A**, *Spirulina* (photographie de J. Simon)
En **B**, *Synechocystis* (source : Wilson *et al.* 2006)
En **C**, *Thermosynechococcus elongatus* (photographie de S. Tabata, Kazusa DNA Research Institute)
En **D**, *Synechococcus elongatus* (photographie de D. Sherman et L.A. Sherman),
En **E**, *Anabaena sperica* (photographie de Ralf Wagner),
En **F**, *Synechococcus* WH7803 (photographie de T.M. Kana et P.M. Glibert)
Le trait noir correspond à 1µmètre.

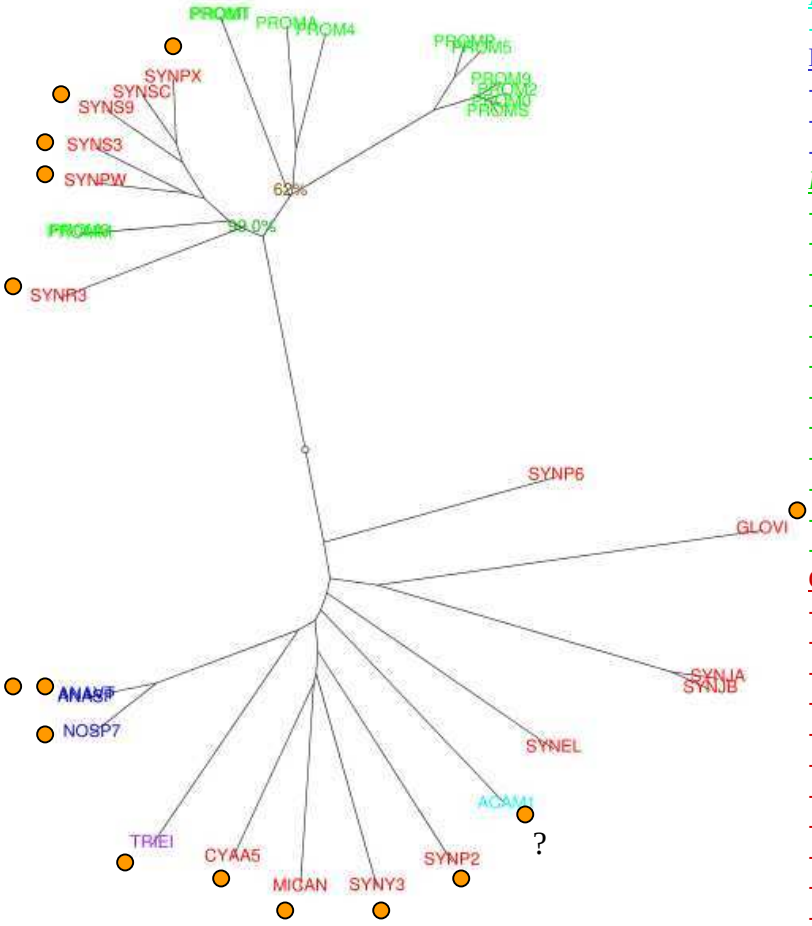
1. Les cyanobactéries

1.1 Description et intérêts des cyanobactéries

Les cyanobactéries, aussi appelées les cyanophycées (Cyanophyceae), sont une sous-classe de bactéries (procaryotes). Elles étaient autrefois appelées « algues bleues ». Elles réalisent la photosynthèse oxygénique et peuvent donc transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique en fixant le CO_2 et en libérant l'O_2. Elles sont apparues il y a plusieurs milliards d'années. Elles ont contribué à l'expansion de la vie sur Terre par leur production d'O_2 par photosynthèse, mais aussi par leur contribution aux premiers puits biologiques de carbone et à une désacidification des océans, lorsqu'elles se sont organisées en colonies fixées (stromatolithes) capables de produire du calcaire (figure I.1A). Les chloroplastes que l'on retrouve chez les eucaryotes photosynthétiques, comme les algues et les plantes sont issus très probablement de cyanobactéries endosymbiotiques. Cette théorie endosymbiotique est corroborée par diverses similitudes structurelles et génétiques.

Les cyanobactéries (gram négatives) sont des organismes procaryotes autotrophes ne présentant ni noyau véritable, ni plaste, ni reproduction sexuée, ni mitochondrie, ni réticulum endoplasmique, ni microtubule, ni centriole (figures I.1C et I.2). La composition de leur paroi est proche de certaines bactéries gram négatives. Chez ces organismes, les réserves sont accumulées sous forme de corps d'inclusion intracytoplasmiques et constituées d'un corps voisin du glycogène. Certaines cyanobactéries sont aussi capables de stocker l'azote dans des granules de cyanophycine. Les cyanobactéries possèdent plusieurs sortes de pigments : les phycobilines (ou bilines), la chlorophylle *a* et des caroténoïdes.

Les cyanobactéries sont utilisées en recherche pour caractériser la photosynthèse car leur appareil photosynthétique est semblable à celui des végétaux supérieurs et des algues (et non à celui des bactéries photosynthétiques). Les deux photosystèmes, I et II (voir plus loin dans l'introduction pour plus de détails) y sont présents. L'avantage d'utiliser des cyanobactéries pour étudier la photosynthèse est que leur croissance est plus rapide que les plantes et que la biologie moléculaire sur ces organismes est plus facile. *Synechocystis* et *Synechococcus elongatus* sont les principaux modèles d'étude, leur capacité de transformation a été découverte avant celle des chloroplastes. Et les mutants de ces cyanobactéries transformées sont hétérotrophes, c'est à dire qu'ils peuvent vivre sans faire de photosynthèse en acceptant une source de carbone extérieure.



Oscillatoriales :
- TRIEI : *Trichodesmium erythraeum* IM5101

Acaryochloris :
- ACAM1 : *Acaryochloris marina* MBIC11017

Nostocales :
- NOSP7 : *Nostoc punctiforme* ATCC29133
- ANAV : *Anabaena variabilis* ATCC29413
- ANASP : *Anabaena* sp. PCC7120

Prochlorococcus :
- PROM3 : *Prochlorococcus* sp. MIT9303
- PROMM : *Prochlorococcus* sp. MIT9313
- PROM1 : *Prochlorococcus* NATL1A
- PROMT : *Prochlorococcus* NATL2A
- PROMA : *Prochlorococcus* SS120
- PROM4 : *Prochlorococcus* MIT9211
- PROMP : *Prochlorococcus* MED4
- PROM5 : *Prochlorococcus* MIT9515
- PROM9 : *Prochlorococcus* MIT9312
- PROM2 : *Prochlorococcus* MIT9215
- PROM0 : *Prochlorococcus* MIT9301
- PROMS : *Prochlorococcus* AS9601

Chroococcales :
- SYNR3 : *Synechococcus* sp. RCC307
- SYNPW : *Synechococcus* sp. WH7803
- SYNS3 : *Synechococcus* sp. CC9311
- SYNS9 : *Synechococcus* sp. CC9902
- SYNSC : *Synechococcus* sp. CC9605
- SYNPX : *Synechococcus* sp. WH8102
- SYNP6 : *Synechococcus* sp. PCC6301
- GLOVI : *Gloeobacter violaceous*
- SYNJA : *Synechococcus* sp. A
- SYNJB : *Synechococcus* sp. B'
- SYNEL : *Synechococcus* sp. PCC7942
- SYNP2 : *Synechococcus* sp. PCC7002
- SYNY3 : *Synechocystis* sp. PCC6803
- MICAN : *Microcystis aeroginosa* NIES-843
- CYAA5 : *Cyanothece* sp. ATCC51142

Figure I.3 : Arbre des cyanobactéries réalisé à partir de 32 espèces
5 groupes différents sont représentés en couleurs.
Cette figure a été réalisée à partir d'un arbre publié sur le site Internet du CBRG (Computational Biochemistry Research Group) de l'ETH (Eldgenössische Technische Hochschule) de Zürich. Les distances ont été déterminées par la distance PAM moyenne (en anglais : Parsimony AMino-acid distance) entre chaque pair d'espèce. L'arrangement optimal des groupes OMA (Orthologs Matrix Project*) à partir desquels les distances moyennes sont calculées est basé sur le « dimenssionless fitting index ». C'est une mesure normalisée qui optimise la représentation des distances estimées dans l'arbre. Le rond orange indique les souches qui contiennent un gène homologue à celui de l'OCP. Le point d'interogation à côté d'*Acaryochloris marina* indique que la similarité de son homologue d'OCP est très faible par rapport aux autres.
* : les OMA sont une comparaison croisée massive des génomes complets qui permet d'identifier les gènes orthologues.

1.2 L’évolution a permis à une grande variété de cyanobactéries de s’adapter à tous les milieux, même extrêmes

En raison du polymorphisme des cyanobactéries, les anciennes classifications ont donné naissance à de très nombreux genres et espèces superflus. Seule la classification morphologique de Rippka (Rippka *et al.* 1979) est fondée sur des caractères morphologiques stables observables en culture. La taxonomie phylogénétique se heurte à un manque de séquences et le tome 1 du Manuel de Bergey (Garrity *et al.* 2001) présente un traitement taxonomique d'attente dans lequel les cyanobactéries constituent un phylum d'une seule classe ; les taxons classiques sont remplacés par des sous-sections et des sous-groupes, et les genres sont remplacés par des formes. Une 60^{aine} de formes est actuellement reconnue, elles se répartissent en cinq sous-sections (basées sur le type de reproduction, voir annexes A5 et A6). La reproduction se fait par division végétative et par spores, soit unicellulaires (coccospores), soit sous forme de filaments de cyanobactéries (trichomes = hormogonies) ce qui constitue les deux sections : coccogonophycidées (formes solitaires ou coloniales) et hormogonophycidées (formes coloniales filamenteuses) dans lesquelles les 5 sous-sections sont réparties (voir les annexes A5 et A6 pour plus de détails sur la classification). Les formes les plus connues sont décrites dans les arbres phylogéniques dans les figures I.3 et I.4. Les groupes de la figure I.3 ne sont pas au même niveau taxonomique, les Oscillatoriales, les Nostocales et les Chroococcales sont 3 des 5 sous-sections citées précédemment, les *Prochlorococcus* sont un groupe qui ne contient pas de phycobilisomes et la forme *Acaryochloris* est dans les « inclassables » pour le moment.

Le grand polymorphisme des cyanobactéries peut s’expliquer par le fait qu’elles vivent presque partout, y compris dans des conditions extrêmes, des glaces polaires aux sables des déserts. Elles survivent dans des lacs très chauds et/ou acides des cratères volcaniques comme dans les sources chaudes, par exemple, les espèces *Thermosynechococcus elongatus*, *Synechococcus* sp. A et B’. Elles croissent tant en eau douce que salée, sous forme planctonique (vivant dans la masse d'eau), ou sous forme benthique (fixées à un substrat immergé). Les cyanobactéries sont aussi présentes dans les eaux stagnantes riches en matière organique, par exemple certaines espèces des formes *Cyanothece* et *Lyngbya* dans les rizières. Certaines sont retrouvées sur des roches humides, par exemple, la forme *Gloeobacter*. Elles peuvent également vivre en symbiose, par exemple en tant que constituants algaux des lichens (gonidies) associés avec un champignon, ou en tant que symbiotes dans les ascidies (animaux marins) comme pour certains *Prochlorococcus* et *Acaryochloris marina*. Pendant mon doctorat, j’ai travaillé avec les espèces d’eau douce *Synechocystis*, *Synechococcus elongatus* PCC7942, *Thermosynechococcus elongatus*, *Arthrospira maxima* et *Anabaena*

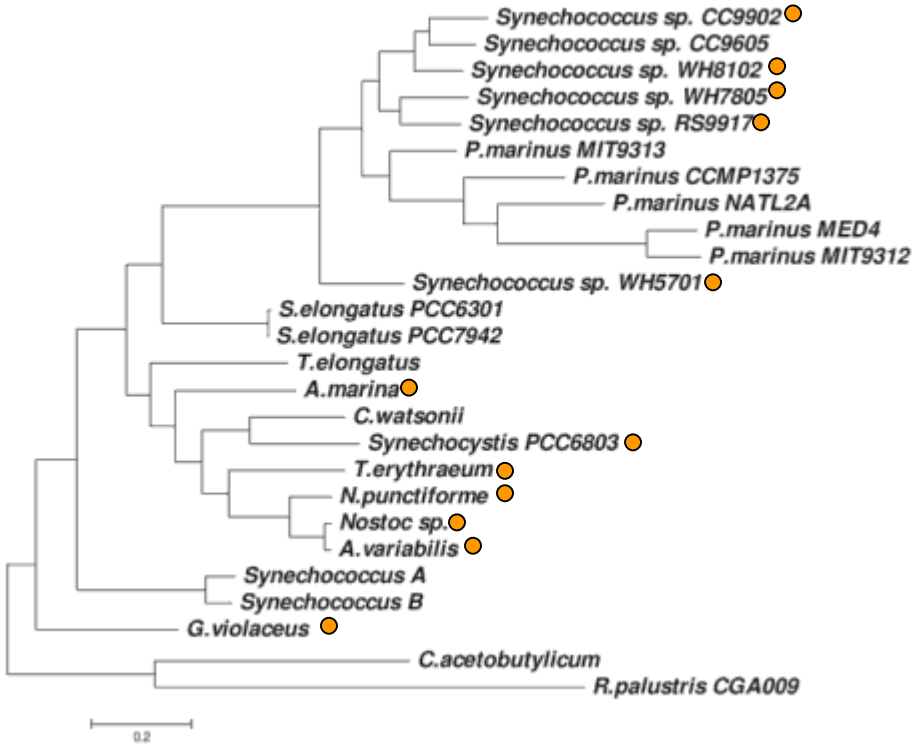


Figure I.4 : Arbre phylogénique des cyanobactéries réalisé à partir de 24 génomes de cyanobactéries d'après Swingley *et al.* 2008

Arbre résultant de l'analyse de 131 912 charactères basée sur la concaténation de 340 familles de protéines. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions d'amino-acide par site.
Le rond orange indique les souches qui contiennent un gène homologue à celui de l'OCP.

variabilis et les cyanobactéries marines *Synechococcus* sp. RS9917, *Synechococcus* sp.WH8018, *Synechococcus* sp. RCC307 et *Synechococcus* sp. WH8018.

Les cyanobactéries ont dû adopter plusieurs stratégies de survie pour s'adapter dans les différents milieux. Certaines survivent en anaérobiose en réalisant la photosynthèse à partir du sulfure d'hydrogène au lieu de l'eau dans les lacs hypersalins. D'autres cyanobactéries, qui vivent en colonies cohérentes, fixent l'azote via des cellules spécialisées dites hétérocystes qui fonctionnent indépendamment des autres cellules en anaérobiose (par exemple, chez les Nostocales). Certaines cyanobactéries sont mobiles (souvent chez les Nostocales) et/ou peuvent produire des akinètes (cellules résistant à la déshydratation grâce à des parois épaissies). La forme *Microcystis* a la capacité d'emmagasiner le phosphore qui est l'élément nutritif limitant dans les cours d'eau. Certaines cyanobactéries (comme les Nostocales) possèdent aussi un mécanisme de positionnement dans l'eau par l'intermédiaire de vésicules gazeuses. Elles sont donc en mesure de s'adapter aux conditions lumineuses variables en fonction de la période du jour. Certaines formes adaptent leur composition pigmentaire pour pouvoir utiliser des photons des longueurs d'ondes différentes, ce phénomène est nommé adaptation chromatique (pour revue : Samsonoff et MacColl 2001). Cette originalité est déterminée par les pigments des bras des phycobilisomes (voir plus loin dans l'introduction pour les détails sur les phycobilisomes), cette diversité des pigments dans les phycobilisomes a permis à la forme *Synechococcus* d'être présente dans la plupart des niches écologiques marines (Six *et al.* 2007; Dufresne *et al.* 2008). La présence de chlorophylles autres que la chlorophylle *a* et de certains caroténoïdes a aussi permis à d'autres formes de s'adapter dans ces différentes niches, par exemple, les formes *Acaryochloris* et *Prochlorococcus*. En effet, *Acaryochloris* contient de la chlorophylle *d* (Kühl *et al.* 2005). Et *Prochlorococcus*, la forme qui contient les plus petits organismes photosynthétiques connus et qui sont aussi les plus abondants dans les océans, n'a pas de phycobilisomes (ou seulement sous formes vestigiales dans certaines espèces) et contient de la chlorophylle *b* (Rocap *et al.* 2003).

1.3 Les systèmes de photo-réception et de transduction du signal chez les cyanobactéries

Tous les organismes photosynthétiques possèdent la capacité de ressentir finement et de répondre aux changements de leur environnement. Ainsi, les organismes photosynthétiques contiennent une gamme de protéines (incluant les protéines photosynthétiques et les protéines photo-senseurs) qui leur permet de détecter la lumière et d'y répondre. Les protéines photosynthétiques seront largement décrites dans les parties 2 et 3 suivantes. Ici, je ferai une courte présentation des photo-senseurs connus chez les cyanobactéries car nous nous sommes

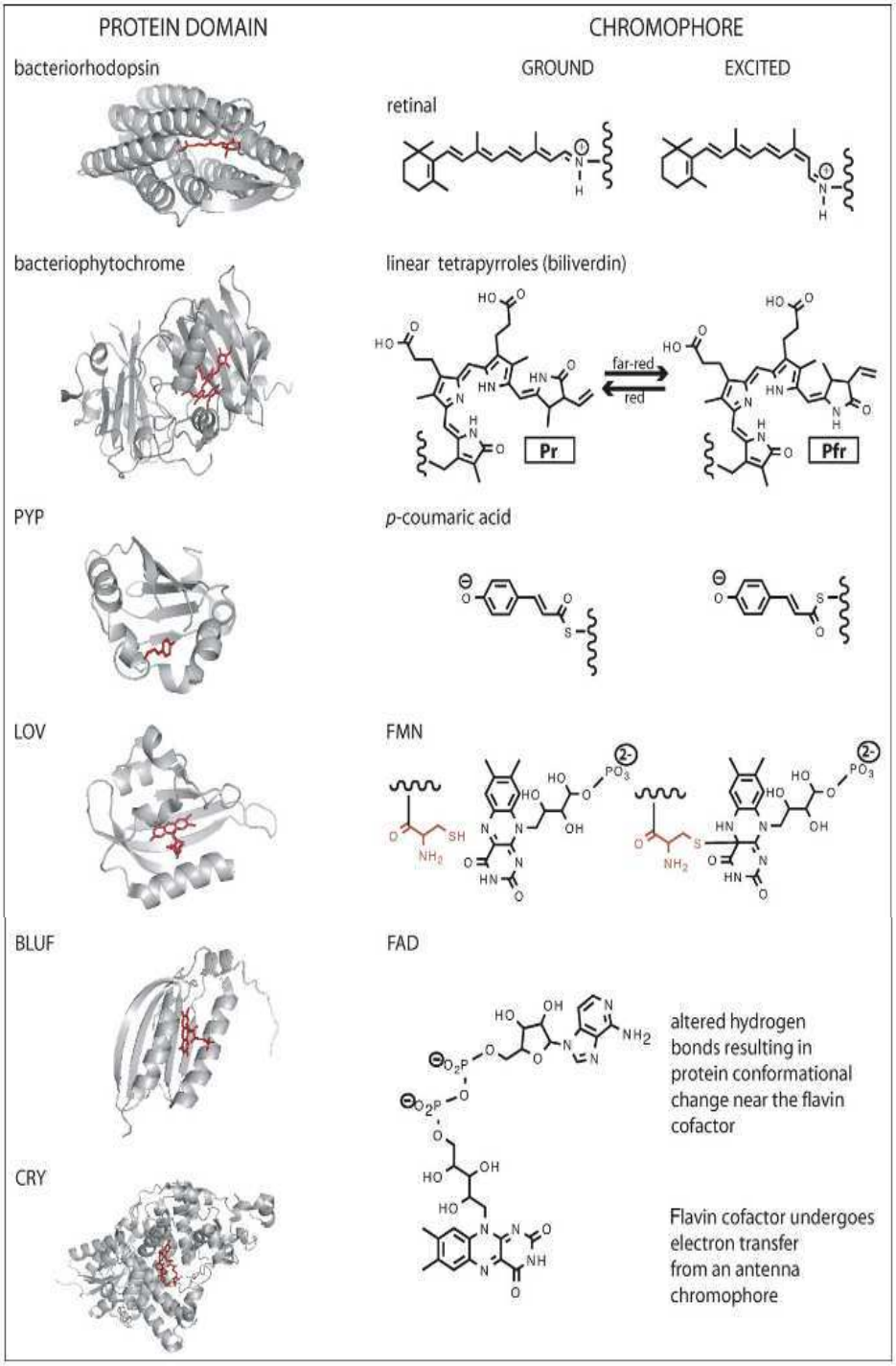


Figure I.5 : Résumé des structures tri-dimensionnelles des domaines protéiques photo-senseurs représentatifs et de leurs chromophores d'après Purcell *et al.* 2008

Les chromophores sont en rouge. Les structures des protéines ne sont pas à la même échelle. Les transitions structurelles induites par la lumière et la formation des liaisons covalentes dans les chromophores sous photo-excitation sont décrites, les mouvements des électrons ne sont pas décrits. Le résidu cystéine conservé, qui forme la liaison covalente avec le carbone 4a de l'anneau de la flavine est coloré en rouge pour le chromophore LOV-FMN. La famille des cryptochromes-DASH (photorecepteurs à la lumière bleue) (Brudler *et al*. 2003) est décrite . Jusqu'à maintenant, aucun rôle dans la régulation n'a été décrit chez les procaryotes pour cette famille. Les numéros ID de la base de données des protéines (PDB) pour les structures montrées sont : bacteriorhodopsin-1c3w; bacteriophytochrome-2o9c; PYP-2phy; LOV-1g28; BLUF-1yrx; cryptochrome-1np7. Se reporter au texte pour plus de détails.

intéressés à ces molécules dans le but de trouver des indices quant au(x) rôle(s) de l'OCP et des autres protéines impliquées dans son mécanisme (voir la partie 5.2 de cette introduction).
Les cyanobactéries possèdent des photorécepteurs phytochromes-like, des cyanobactériochromes, des cryptochromes, des phototropines, des photorécepteurs BLUF (« Blue Light Using FAD » en anglais), des récepteurs aux UV et des Rhodopsines. Ces photorécepteurs cyanobactériens, qui sont décrits par type ci-après, sont des régulateurs de réponse et sont impliqués dans les voies de 2nd messager. Ils induisent des changements cellulaires, de croissance et de développement (pour revues : Braatsch et Klug 2004; Montgomery 2007; Purcell et Crosson 2008). Ils sont décrits à partir : 1) des organismes dans lesquels ils sont présents, 2) de leurs domaines « photo-senseurs » et 3) de leurs domaines de signalisation (« Output domains » en anglais) (figure I.5). Plusieurs domaines photo-senseurs contenant différents chromophores sont présents dans les différents photorécepteurs cyanobactériens : les domaines PAS, BLUF, GAF et LOV (voir les détails dans les paragraphes ci-dessous) (figure I.5). Ces domaines sont impliqués dans la perception des changements de la lumière, d'oxygène, de potentiel redox et dans la liaison de petits ligands. Leurs rôles exacts ne sont pas définis pour la plupart des récepteurs dans lesquels ils sont retrouvés. Les principaux domaines de signalisation retrouvés dans les différents photorécepteurs cyanobactériens sont les domaines histidine kinase, les domaines sérine/thréonine kinase et les domaines GGDEF et EAL (figure I.6) (voir les détails dans les paragraphes ci-dessous).

Les photorécepteurs phytochromes-like

Les phytochromes, molécules découvertes depuis une trentaine d'années, contrôlent l'expression des Lhc (« Light harvesting complexes ») encodés dans le noyau chez les plantes (Apel et Kloppstech 1978; Anandan *et al.* 1993). Beaucoup de protéines ont été identifiées comme « phytochrome-like » grâce à la recherche de séquences similaires à celles des phytochromes des plantes supérieures mais le rôle physiologique de la plupart est inconnu Un nombre limité de ces protéines, incluant RcaE (ensuite identifié comme cyanobactériochrome), PlpA et PixJ1 a été associé à un phénotype dépendant de la lumière *in vivo* (Kehoe et Grossman 1996; Wilde *et al.* 1997). Cependant, aucune de ces protéines n'a montré une photochimie dans le rouge/infra-rouge comme chez les phytochromes des plantes supérieures et les phytochromes canoniques des cyanobactéries Cph1 et Cph2 (Hughes *et al.* 1997; Yeh *et al.* 1997; Park *et al.* 2000). Cph1 et Cph2 ainsi que RcaE et PlpA attachent des bilines comme chromophores. Chez Cph1 et Cph2, le photo-cycle fait intervenir des dimères Pfr (phytochromes dans un état absorbant dans l'infra-rouge, λ_{max} = 730nm) et Pr (phytochromes dans un état absorbant dans le rouge, λ_{max} = 666nm) ; et les dimères Pfr sont plus stables que les dimères Pr (Strauss *et al.* 2005) (figure I.5).

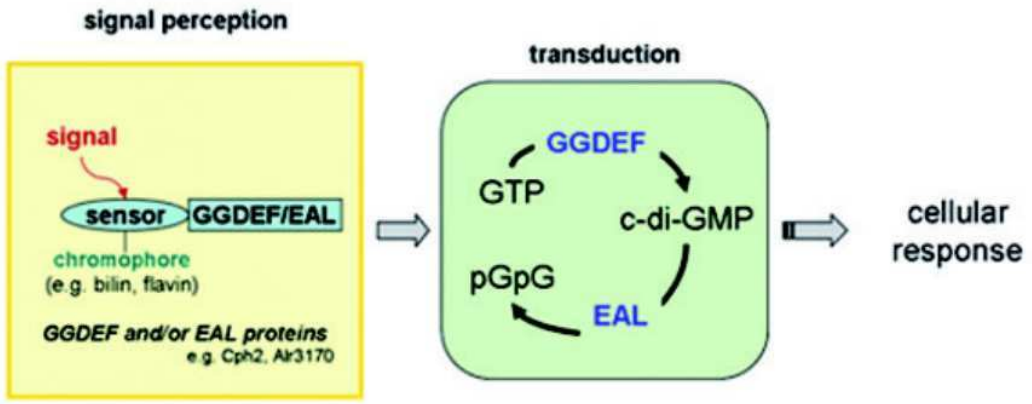


Figure I.6 : Exemple de la signalisation d'un photosenseur chez les cyanobactéries d'après Montgomery et al. 2007

Les cascades de signalisation photosensibles ont lieu en trois étapes : la perception du signal, la transduction et la réponse cellulaire. Les signaux lumineux sont perçus par des protéines qui lient des molécules-chromophores sensibles à la lumière. Ici, le cas des photo-senseurs qui utilisent les domaines GGDEF et EAL est décrit. Ces domaines participent au cycle du bis-(3'-5')-guanosine monophosphate cyclique dimérique (c-di-GMP). L'activité du GGDEF est de produire du c-di-GMP à partir du GTP (Guanosine Tri-Phosphate), alors que celle du EAL est la production du diguanylate pGpG (2'-deoxyguanylyl(5'-->3')-2'-deoxy-5'-guanylate) à partir de l'hydrolyse du ci-di-GMP. Cph2 (un phytochrome présent chez *Synechocystis*) et Alr3170 (une phototropine présente chez *Anabaena* sp. PCC 7120) sont le nom de deux photorécepteurs connus qui utilisent ces domaines. Les cibles du c-di-GMP dans les systèmes cyanobactériens sont encore sous investigations. Se repoter au texte pour plus de détails sur ces domaines GGDEF et EAL.

Les parties conservées retrouvées chez les phytochromes sont des domaines PAS (par exemple : Cph1) et/ou GAF (par exemple : Cph1, Cph2), qui attachent une biline comme chromophore et des domaines de signalisation de type kinase (par exemple : Cph1, RcaE) ou GGDEF/EAL (par exemple : Cph2) (pour revue : Montgomery 2007). Le rôle du domaine PAS (Per/ARNT/Sim) n'est pas défini dans la plupart des récepteurs où on le retrouve. Cependant un domaine PAS est impliqué dans le site d'attachement d'un chromophore pour au moins un photorécepteur bactérien, conduisant à la formation d'un photo-senseur de la lumière bleue (voir paragraphe suivant sur la PYP, (Baca *et al.* 1994)). Les domaines GAF (cGMP phosphodiesterase/adenyl cyclase/FhlA) sont similaires aux domaines PAS dans leur structure mais sont retrouvés dans les phosphodiestérases spécifiques au cGMP et dans les phytochromes (Aravind et Ponting 1997). Les domaines histidine kinase autophosphorylent les résidus histidines et transfèrent le phosphate d'un résidu aspartate sur un régulateur de réponse apparenté (pour revue : West et Stock 2001). Les sérines/thréonines kinases phosphorylent des résidus sérines et thréonines. Ces évènements de phosphorylation initient la cascade de signalisation. Les domaines GGDEF et EAL sont nommés ainsi d'après la conservation de certains de leurs acides aminés. Ils sont impliqués dans le cycle du bis-(3'-5')-guanosine monophosphate cyclique dimérique (c-di-GMP). Les domaines GGDEF participent à la synthèse et à la production du c-di-GMP et les domaines EAL à son hydrolyse. Un nombre significatif des protéines cytoplasmiques contenant un domaine PAS ou GAF contiennent aussi des domaines GGDEF et EAL (pour revue : Römling *et al.* 2005) (figure I.6).

La Photoactive Yellow Protein

La PYP (la « Photoactive Yellow Protein ») est un petit photorécepteur cytoplasmique (14kDa) découvert dans *Halorhodospira halophila* (une bactérie photosynthétique pourpre) qui est le prototype structural de la famille des domaines PAS (Taylor et Zhulin 1999 ; et pour revue : Cusanovich et Meyer 2003) (figure I.5). La PYP semble être conservée chez les bactéries photosynthétiques pourpres (Braatsch et Klug 2004). Elle a été étudiée comme modèle pour des propriétés fondamentales de la perception de la lumière dans les systèmes biologiques car elle est petite, soluble et photo-stable. La PYP absorbe la lumière bleue (λ_{max} = 446nm) et a un photo-cycle impliquant plusieurs intermédiaires. Le chromophore responsable de l'activation par la lumière de la PYP est un acide *p*-couramique lié de façon covalente à la protéine (Baca *et al.* 1994; Hoff *et al.* 1994). Le photo-cycle ressemble à celui des rhodopsines senseurs des archées (voir paragraphe sur les rhodopsines senseurs) incluant des étapes d'isomérisation *cis-trans*. Il existe un photorécepteur nommé Ppr (connu seulement chez la bactérie photosynthétique pourpre *Rhodocista centanaria*) qui combine un domaine PAS de type PYP avec un domaine dit de type phytochrome-like (GAF + Histidine kinase) (Jiang *et al.* 1999).

Les cyanobactériochromes

Les cyanobactériochromes sont un nouveau groupe de photorécepteurs apparentés aux phytochromes mais retrouvé uniquement chez les cyanobactéries (Yoshihara *et al.* 2004 ; et pour revue : Purcell et Crosson 2008). RcaE chez *Calothrix* PCC7601 (Kehoe et Grossman 1996) et CcaS chez *Synechocystis* (Kaytayama et Ikeuchi 2006) en font partie. Ils possèdent un domaine putatif de liaison au chromophore (une biline) de type GAF comme les phytochromes. Le cyanobactériochrome CcaS a un photo-cycle impliquant des étapes d'isomérisation *cis-trans*, qui contient une forme absorbant la lumière verte (Pg, λ_{max} = 535nm) et une forme absorbant la lumière rouge (Pr, λ_{max} = 672nm). Le phospho-transfert de CcaR, le régulateur de réponse associé à CcaS, est plus grand quand la forme Pg absorbant la lumière verte est présente (Hirose *et al.* 2008). Hirose *et al*. ont ainsi montré que CcaS est un récepteur de la lumière verte où CcaS phosphoryle CcaR (grâce à son domaine histidine kinase) qui induit l'expression d'un gène codant pour un peptide de liaison (cpcG2) de l'antenne des cyanobactéries.

Les cryptochromes

Les cryptochromes sont des récepteurs de la lumière bleue qui régulent une grande variété de réponses chez les bactéries, les plantes et les humains (pour revues : Lin et Shalitin 2003; Sancar 2003; Lin et Todo 2005). Ils ont d'abord été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (Ahmad et Cashmore 1993). Leur extrémité N-terminale partage une grande homologie de séquence avec l'enzyme ADN photolyase qui utilise la lumière bleue comme source d'énergie pour réparer les lésions de l'ADN (pour revues : Sancar 2003; Weber 2005). Cependant, les cryptochromes n'ont pas l'activité de réparation de l'ADN mais ils participent à beaucoup de réponses de croissance de la plante dépendantes de la lumière bleue (pour revues : Banerjee et Batschauer 2005; Li et Yang 2007). Les cryptochromes, comme les photolyases, contiennent deux chromophores : un folate et le chromophore catalytique FAD (figure I.5). Le photocycle des cryptochromes des plantes est différent de celui des photolyases dans lequel l'état totalement réduit de la flavine est catalytiquement actif. L'état signal des cryptochromes a lieu lors de la sémi-réduction de leur flavine à l'état de semi-quinone stable (Giovani *et al.* 2003; Zeugner *et al.* 2005; Banerjee *et al.* 2007; Bouly *et al.* 2007). Le chromophore flavine est oxydé à l'obscurité, la lumière bleue induit l'état de semi-quinone et la lumière verte induit la réduction totale de la flavine qui désactive le signal. La photo-réaction à la base de changements conformationels dans la protéine permet d'initier la signalisation (Partch *et al.* 2005; Kottke *et al.* 2006). Chez les cyanobactéries, des gènes candidats pour être des cryptochromes ont été identifiés chez *Synechocystis* et il a été rapporté qu'ils n'ont pas l'activité photolyase (Hitomi *et al.* 2000). Une étude plus récente a montré que les cryptochromes cyanobactériens (nommé DASH) se lient à l'ADN (Brudler *et al.* 2003).

Les phototropines

Les phototropines sont les photorécepteurs majoritaires pour le phototropisme des plantes. Ces protéines subissent une phosphorylation dépendante de la lumière bleue (pour revue : Christie 2007). Les phototropines des plantes possèdent deux domaines photo-actifs LOV (« Light, Oxygen, Voltage ») sur la partie N-terminale de la protéine et un domaine C-terminal avec une sérine/thréonine kinase. Les domaines LOV, contenant un domaine de liaison à la FMN, sont un sous-groupe de la grande famille des domaines PAS (Crosson *et al.* 2003 ; et pour revue : Taylor et Zhulin 1999). A l'obscurité, les domaines LOV lient la FMN de façon non-covalente (λ_{max} = 447nm). Sous irradiation avec une lumière bleue, le domaine induit un mode photochimique unique qui implique la formation d'une liaison covalente entre un résidu cystéine conservé et le carbone 4a de l'anneau de la flavine (Christie *et al.* 1999; Salomon *et al.* 2000; Swartz *et al.* 2001) (figure I.5). Un domaine LOV possible a été retrouvé chez *Synechocystis* (Fiedler *et al.* 2005). D'autres protéines contenant un domaine LOV ont été identifiées chez *Anabaena* PCC 7120 (Ohmori *et al.* 2001). Deux d'entre elles (All287 et All53170) contiennent des domaines LOV qui possèdent la cystéine conservée des domaines LOV photo-actifs et présentent un photocycle « photoprotine-like » avec une liaison à la FMN et une dépendance à la lumière bleue (Narikawa *et al.* 2006). Leur domaine de signalisation est soit un domaine GGDEF et un domaine EAL, soit un domaine GGDEF, un domaine GAF et un domaine histidine kinase (Narikawa *et al.* 2006).

Les photorécepteurs BLUF

Les photorécepteurs qui possèdent un domaine photo-senseur BLUF (pour « sensor of Blue Light Using FAD ») sont une autre classe de récepteurs à la lumière bleue. Ils sont retrouvés chez les protéobactéries, chez les cyanobactéries et dans un seul eucaryote unicellulaire flagellé (une euglène) (pour revue : Gomelsky et Klug 2002). Des protéines BLUF (PixD) ont été identifiées chez *Synechocystis*, *Synechococcus* PCC7002 et *Thermosynechococcus elongatus* (Fiedler *et al.* 2005; Okajima *et al.* 2005). Dans la plupart des photorécepteurs de type BLUF (nommé short BLUF), le seul domaine reconnu est le domaine BLUF qui attache un FAD de façon non-covalente (figure I.5). Ces domaines BLUF pourraient réguler des réponses en aval par l'intermédiaire d'interactions protéine-protéine. Et dans quelques photorécepteurs de type BLUF, des domaines GGDEF et EAL sont retrouvés à côté du domaine BLUF. Dans ces derniers, le taux de renouvellement du c-di-GMP pourrait être régulé par la lumière bleue (pour revue : Gomelsky et Klug 2002).

Les récepteurs aux UV

Plusieurs réponses comportementales dépendantes des UV-B ont été rapportées chez les cyanobactéries (Bebout et Garcia-Pichel 1995; Campbell *et al.* 1998a). L'existence d'un photorécepteur des UV-B a été rapportée chez la cyanobactérie *Chlorogloeopsis* PCC6912

(Portwich et Garcia-Pichel 2000). Ce photorécepteur est impliqué dans l'induction d'un composant absorbant les UV, l'acide aminé mycosporine_like (MAA). Une ptérine réduite pourrait être le chromophore de ce photorécepteur (Portwich et Garcia-Pichel 2000).

Les rhodopsines

Les rhodopsines sont présentes dans beaucoup d'organismes (bactéries, plantes, animaux). Les rhodopsines senseurs microbiennes forment une grande famille de protéines membranaires photo-actives qui régulent le transport des ions et la photo-réception chez les Archées, les eubactéries et les eucaryotes inférieurs (pour revue : Spudich 2006). Ces protéines ont sept α-hélices transmembranaires et un chromophore rétinal lié de façon covalente à un résidu lysine sur l'hélice C-terminale G via la protonation d'une base de Schiff (figure I.5). Le photo-cycle des rhodopsines implique des étapes d'isomérisation *cis-trans*. Une rhodopsine photo-senseur de la lumière verte (λ_{max} = 532nm) a été identifiée chez la cyanobactérie *Anabaena* PCC7120 (Jung *et al.* 2003). Le gène codant pour cette rhodopsine liée à la membrane (avec 7 α-hélices transmembranaires) se situe sur un opéron qui contient un autre gène codant pour une protéine soluble de 14kDa. La co-expression de cette protéine avec la rhodopsine accélère le photo-cycle de la rhodopsine. Ceci suggère un nouveau mécanisme incluant une interaction avec un partenaire cytoplasmique (Jung *et al.* 2003) car les autres rhodopsines senseurs microbiennes sont connues pour interagir avec des protéines transducteurs membranaires.

1.4 Les caroténoïdes chez les cyanobactéries

Les caroténoïdes retrouvés chez les cyanobactéries seront brièvement présentés dans cette partie car la protéine étudiée dans ce travail de thèse, l'OCP, se lie à un céto-caroténoïde nommé hydroxyéchinénone (voir la partie 5).

Les caroténoïdes sont généralement des composés isoprénoïdes hydrophobes qui sont synthétisés dans les membranes. La plupart s'accumule dans les complexes protéiques de la membrane photosynthétique, dans la membrane cellulaire et dans la paroi de la cellule. En plus du β-carotène et de la zéaxanthine (les caroténoïdes les plus répandus dans le règne végétal), les cyanobactéries contiennent des céto-caroténoïdes uniques tels que l'échinénone, l'hydroxyéchinénone et la canthaxanthine. Les caroténoïdes glycosylés (myxoxanthophylle) sont aussi très répandus chez les cyanobactéries (pour revue : Takaichi et Mochimaru 2007).

Chez *Synechocystis*, les principaux caroténoïdes accumulés sont le β-carotène, la myxoxanthophylle, la zéaxanthine, et l'echinénone (Bramley et Sandmann 1985). La zéaxanthine et l'échinénone sont dérivés du même précurseur, le β-carotène.

La β-carotène hydroxylase (codée par le gène *crt*R) et la β-carotène mono-cétolase (codée par

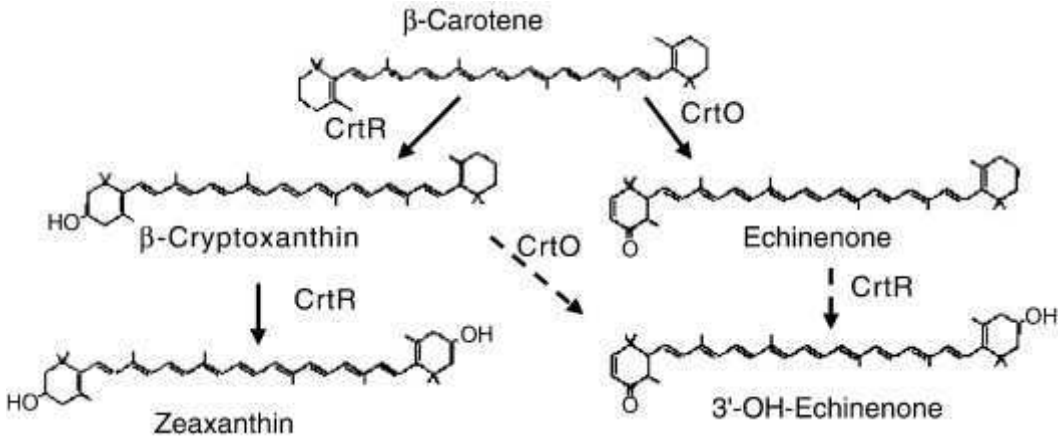


Figure I.6bis : Synthèse de la zéaxanthine, de l'echinénone et de la 3'-hydroxyechinénone (3'-OH-échinénone) chez *Synechocystis*.
Les flèches pointillées indiquent deux voies possibles pour la synthèse de l'hydroxyechinénone (Punginelli *et al.* 2009).

le gène *crt*O) catalysent respectivement la formation de la zéaxanthine et de l'echinénone (pour revues : Hirschberg 1994; Armstrong 1997; Takaichi et Mochimaru 2007). L'hydroxyechinénone peut être synthétisée soit à partir de la zéaxanthine (ou cryptoxanthine) par CrtO, soit à partir de l'echinénone par CrtR (Fernandez-Gonzalez *et al.* 1997; Takaichi et Mochimaru 2007) (figure I.6bis).

La forte absorption des caroténoïdes dans la région entre 350 et 550nm (lumière violette à verte, voir tableau 1) est due à la transition de l'état de base (S_0) au deuxième état excité (S_2). Pour des raisons de symétrie, l'état excité le plus bas (S_1), n'est pas accessible directement à partir de l'état S_0 car la transition S_0-S_1 est symétriquement interdite (pour revue : Polivka et Sundstrom 2004). Cependant, après avoir atteint l'état S_2, une molécule de caroténoïde excitée se relaxe à l'état S_1 dans une échelle de temps de l'ordre de la picoseconde (pour revue : Polivka et Sundstrom 2004).
Chez les organismes photosynthétiques, les caroténoïdes ont trois fonctions principales. (1) Ils servent de pigments de récoltes de la lumière pour la photosynthèse (light-harvesting), (2) ils protègent contre les dommages photo-oxydants (photoprotection) et (3) ils ont un rôle dans la stabilisation des complexes protéiques-pigments photosynthétiques (pour revue : Fraser *et al.* 2001).
(1) Il a d'abord été suggéré que le bas niveau de fluorescence des caroténoïdes était du à une conversion interne rapide de l'état S_2 à S_1 et que le transfert d'énergie avait principalement lieu à partir de l'état S_1 (car plus stable) (Koyama *et al.* 1996). Ensuite, en considérant les niveaux d'énergie des états d'excitation S_1 et S_2 des caroténoïdes et les deux états accepteurs de la bacteriochlorophylle (Q_x et Q_y), il a aussi été proposé que S_2 transfert son énergie à la transition Q_x de la bacteriochlorophylle et que S1 transfert à la transition Q_y (Desamero *et al.* 1998). Les états S_1 et S_2 sont donc reconnus comme des donneurs potentiels dans le transfert d'énergie caroténoïde-(bacterio)chlorophylle au niveau du processus de récolte de la lumière photosynthétique (pour revue : Polivka et Sundstrom 2004). Plus récemment, un nouvel état excité ($^1B_u^-$), situé entre les états S_1 et S_2, a été identifié et proposé pour être impliqué dans les processus de light-harvesting (Sashima *et al.* 1999). D'une façon générale les caroténoïdes doivent être localisé à une distance précise, contrôlée et bien orientée par rapport aux chlorophylles pour assurer un transfert efficace de l'énergie absorbée.
(2) Depuis 50ans, il est connu que des souches de bactéries photosynthétiques sans caroténoïdes sont plus sensibles à la lumière et à l'oxygène . Trop de lumière induit la formation de triplets de chlorophylle dans les antennes et les centres réactionnels. Ces chlorophylles peuvent réagir avec l'oxygène et former des singulets d'oxygène qui induisent un stress oxydant dans les cellules (voir partie 4.2). Pour quencher les triplets de chlorophylle efficacement, les caroténoïdes doivent être en contact intime avec celle-ci. Le niveau

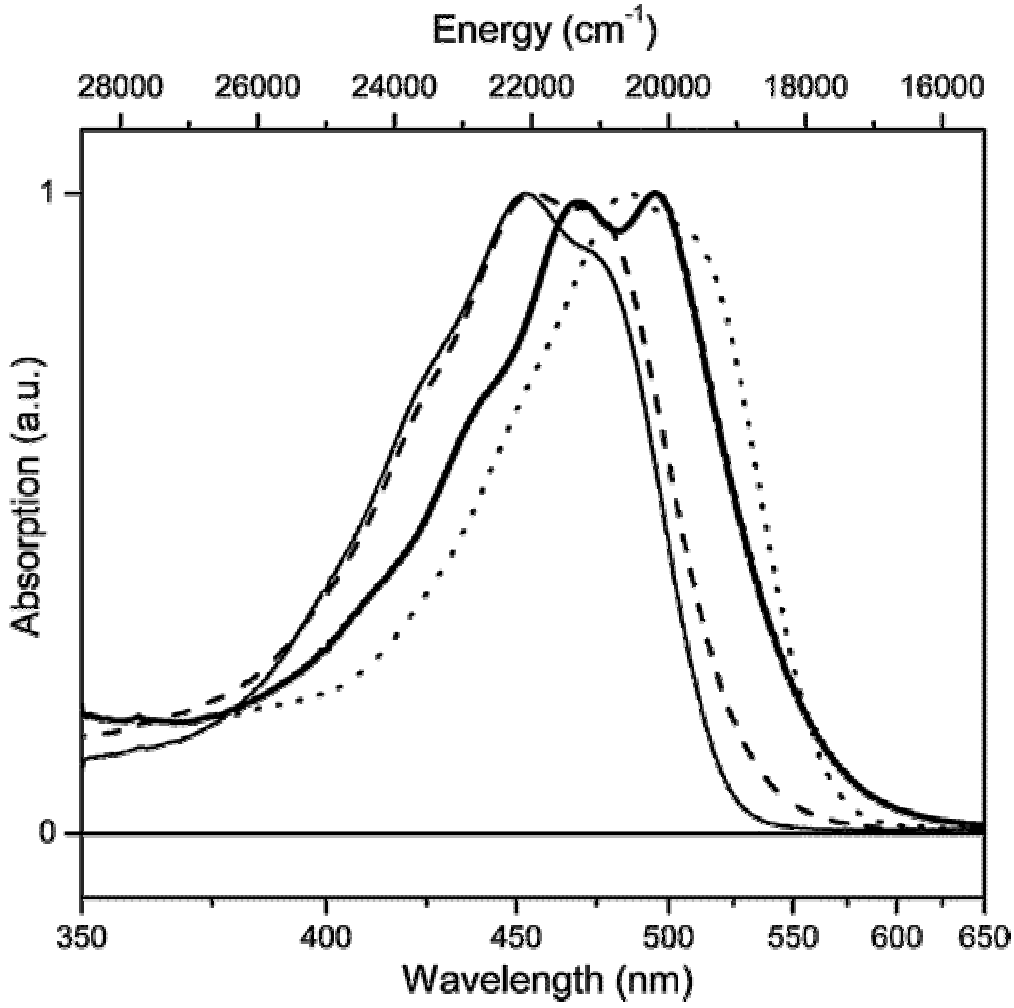


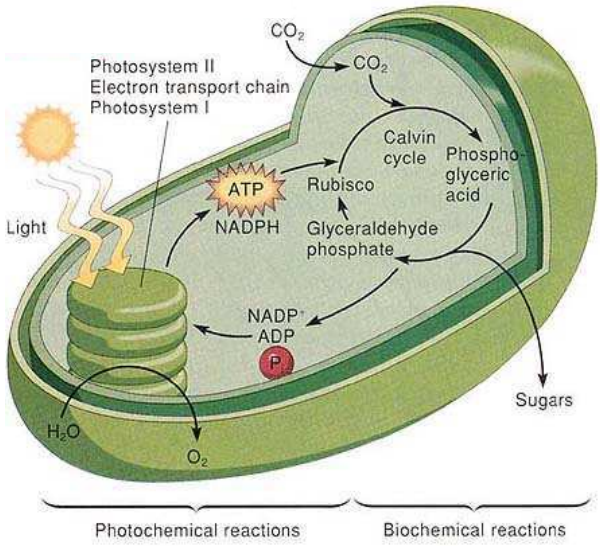
Figure I.6ter : Spectre d'absorption de l'hydroxyechinénone.
Spectre de l'hydroxyéchinénone dans de l'hexane (trait plein fin), dans du méthanol (trait hachuré), dans du carbone disulfure (trait pointillé) et d'une caroténo-protéine contenant l'hydroxyechinénone (OCP) (trait plein large). Tous les spectres d'absorption ont été normalisés (Polivka *et al.* 2005).

d'énergie des triplets des caroténoïdes est bas, de telle façon que les caroténoïdes avec plus de sept doubles liaisons conjuguées peuvent quencher (c'est à dire accepter l'énergie) les triplets de chlorophylle et les singulets d'oxygène. L'état triplet d'un caroténoïde étant trop bas pour générer un singulet d'oxygéne, il dissipe alors son énergie d'excitation sous forme de chaleur sans danger pour la cellule (Foote *et al.* 1970 ; et pour revue : Fraser *et al.* 2001).
Quand l'intensité de la lumière dépasse le niveau d'énergie que la photo-chimie peut utiliser, un mécanisme subtil permettant la régulation de l'excès d'énergie d'excitation se mets en place chez les plantes et les cyanobactéries. Les caroténoïdes semblent jouer plusieurs rôles dans ce mécanisme allostérique, à la fois au niveau de son contrôle et en étant les entités de quenching. D'une façon générale, ce mécanisme implique la formation d'un piégeage de l'énergie au niveau des antennes (pour la description des antennes, voir la partie 3). Le rôle des caroténoïdes dans la photo-protection chez les antennes des plantes et des cyanobactéries sera développé dans la partie 4.
(3) Enfin, grâce à leurs systèmes conjugués largement délocalisés, les caroténoïdes peuvent agir comme des « câbles moléculaires », et sont aussi connus pour renforcer le couplage entre les pigments tétrapyroles (les chlorophylles) à proximité (pour revue : Fraser *et al.* 2001).
Les propriétés des caroténoïdes en rapport avec l'activité de photosynthèse ont été décrites en détail ci-dessus. Les caroténoïdes ont aussi d'autres propriétés qui ne seront pas détaillées dans cemanuscrit et qui sont simplement listées ci-après :

- les caroténoïdes présents dans la membrane extérieure peuvent servir d'écran et quencher les singulets d'oxygène
- les caroténoïdes ont une action anti-oxydante générale (ils peuvent réagir avec les atomes et molécules avec des radicaux libres)
- les caroténoïdes ont un effet sur la structure et les propriétés (notamment la fluidité) de la membrane des cellules

De plus, comme c'est le cas dans le système étudié dans cette thèse, les protéines peuvent avoir de l'influence sur les caroténoïdes avec lesquels elles interagissent. Dans certains cas, elles peuvent fortement modifier les propriétés d'absorption de la lumière, et par la même occasion, la couleur et la photo-chimie du caroténoïde (figure I.6ter). Des études de structures de caroténo-protéines aux rayons X ont permis de proposer plusieurs mécanismes responsables des shifts du spectre d'un caroténoïde seul par rapport à quand il se trouve dans une caroténo-protéine. Par exemple, la co-planarité des anneaux et de la chaîne polyène des caroténoïdes peut s'étendre dans la protéine et optimiser la conjugaison du chromophore. La proximité des groupes « céto » de certains caroténoïdes avec des molécules d'eau et des histidine peut conduire à la formation de liaisons hydrogènes et avoir un effet de polarisation. Les caroténoïdes peuvent se trouver dans une poche plus ou moins hydrophobe de la protéine qui modifie leurs propriétés…etc. (Salares *et al.* 1979).

A



B

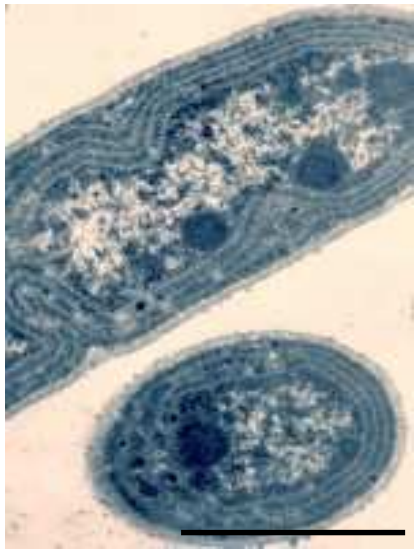


Figure I.7 : Localisation de la photosynthèse chez les plantes et les cyanobactéries
A montre le schéma d'un chloroplaste où se déroule la photosynthèse chez les plantes d'après Moore et Clark 1998 (Moore *et al.* 1998). ADP = adénosine di-phosphate, ATP = adénosine tri-phosphate, Pi = phosphate inorganique, NADP = nicotinamide adénosine di-phosphate.
B montre une photographie de microscopie électronique de *Synechococcus elongatus* (photographie de D. Sherman et L.A. Sherman). Les thylacoïdes, où se déroule la photosynthèse chez les cyanobactéries, sont organisés en couches périphériques au bord des cellules. Le trait noir correspond à 1µM.

2. La photosynthèse : les réactions photochimiques

On peut définir la photosynthèse comme étant « une série de processus dans lesquels l'énergie électromagnétique (photons) est convertie en énergie chimique utilisée pour la biosynthèse du matériel cellulaire » comme le propose Gest (Gest 2002). La photosynthèse oxygénique est le processus bioénergétique qui permet aux plantes, algues et cyanobactéries, de synthétiser leur matière organique en exploitant l'énergie solaire. C'est la fabrication de matière carbonée organique à partir d'eau et de carbone minéral (CO_2) en présence de lumière. Une conséquence importante est la libération de molécules de dioxygène (O_2). Certains micro-organismes photosynthétiques ne produisent pas d'O_2 et le CO_2 n'est pas l'unique source de carbone.

La photosynthèse comprend deux phases (figure I.7A) (Karp 2004) :

1. Tout d'abord, de l´énergie électromagnétique (les photons) est absorbée sous forme de lumière grâce à l´action de pigments (les chlorophylles, les phycobilines et les caroténoïdes). Ensuite l´énergie magnétique est transformée en énergie chimique. Cette phase est dite « phase claire » où les réactions photochimiques ont lieu.

2. L´énergie chimique est utilisée pour synthétiser des composés organiques riches en énergie qui permettent la croissance des êtres vivants grâce à l'anabolisme (synthèse organique) ainsi qu'un apport en énergie grâce au métabolisme. Cette phase est communément dite « phase sombre » à tort car elle est aussi dépendante de la lumière, il est plus rigoureux de la nommer « phase de fixation du carbone » ou encore « phase non-photochimique » où les réactions biochimiques ont lieu dans le cycle de Calvin.

Le processus de la photosynthèse, qui utilise l'énergie lumineuse pour fabriquer des sucres (des molécules carbonées comme le glucose $C_6H_{12}O_6$), est représenté par l'équation :
$6CO_2 + 6H_2O + \text{lumière} = C_6H_{12}O_6 + 6O_2$

1. Les réactions photochimiques de la « phase claire » peuvent se résumer ainsi :
$12H_2O + \text{lumière} = 6O_2 + \text{énergie chimique (24 hydrogènes)}$

Un ensemble de réactions, le long de la chaîne photosynthétique de transport des électrons, permet la production à la fois de pouvoir réducteur sous forme de $NAD(P)H,H^+$ et d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (correspondant à « l'énergie chimique » notée dans les équations décrites précédemment).

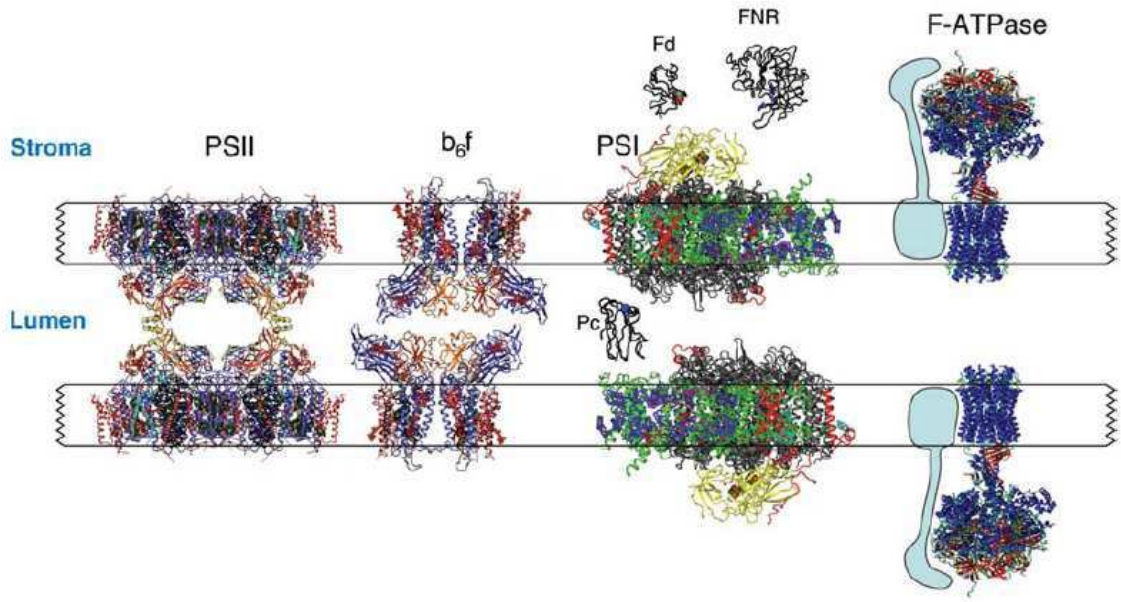


Figure I.8 : Schéma de l'architecture des complexes membranaires et des protéines solubles du thylacoïde d'après Nelson 2006

La figure montre le schéma des complexes membranaires et des protéines solubles basé sur des structures de haute résolution d'après Nelson 2006.

PSI et PSII, photosystèmes I et II; *b6f* = cytochromes *b6f* ; Fd = ferredoxine ; FNR = ferredoxine NADP oxidoreductase ; F-ATPase = adénosine tri-phosphate synthase; Pc = plastocyanine

2. Les réactions biochimiques du cycle de Calvin peuvent se résumer ainsi :
$6CO_2$ + énergie chimique (24 hydrogènes) = $C_6H_{12}O_6 + 6H_2O$

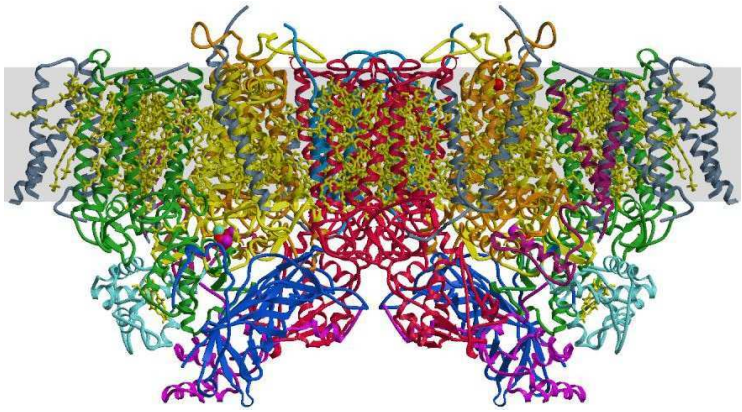
La deuxième phase de la photosynthèse aboutit à la synthèse de molécules carbonées à partir du CO_2 en réoxydant le NAD(P)H, H^+ et en hydrolysant l'ATP. Physiquement, toutes les réactions claires se produisent dans la membrane des thylacoïdes, alors que l'ensemble des réactions de synthèse des molécules carbonées ont lieu dans le stroma.
Dans cette thèse, nous nous intéressons plus particulièrement à la phase claire de la photosynthèse, c'est pourquoi je la décris en détail ci-dessous.

Chez les plantes, la photosynthèse se déroule dans un organite spécifique (figure I.7A) : le chloroplaste, qui présente de très riches structures membranaires, les thylacoïdes. Chez les cyanobactéries, il n'y a pas de chloroplaste, les thylacoïdes forment généralement plusieurs couches circulaires à la périphérie des cellules et il n'y a pas d'empilements de thylacoïdes (grana) comme dans les chloroplastes (figure I.7A, I.2B et D). L'ensemble formé par les antennes collectrices de lumière et le centre réactionnel est appelé «photosystème ». Les deux complexes dans lesquels la séparation des charges de la photosynthèse a lieu sont les photosystèmes I (PSI) et photosystème II (PSII) (figures I.8, I.9 et I.10). Chez les plantes et algues vertes, le PSI est localisé dans les lamelles du stroma des thylacoïdes alors que le PSII se trouve principalement dans les grana des thylacoïdes (pour revues : Allen et Forsberg 2001; Nelson et Yocum 2006).

2.1 La chaîne de transport des électrons : le photosystème II et le photosystème I

La lumière nous parvient sous forme de photons. Ces photons possèdent un potentiel énergétique différent selon leur longueur d'onde. Les pigments absorbent mieux certaines longueurs d'onde. Lorsqu'un pigment capte un photon correspondant à sa capacité d'absorption, un de ses électrons passe à l'état excité. Cette énergie peut être ré-émise sous forme de fluorescence ou être transmise de pigment en pigment soit de chlorophylle à caroténoïde où les caroténoïdes sont capables de dissiper cette énergie sous forme de chaleur, soit de chlorophylle à chlorophylle (vers les centres réactionnels). Ainsi les antennes collectrices d'énergie contenant les pigments (voir plus loin dans l'introduction pour la partie sur les antennes) fournissent l'énergie nécessaire aux centres réactionnels des photosystèmes. L'énergie qui converge vers les centres réactionnels sera capable d'induire une séparation des charges au niveau de la chlorophylle P680 dans le PSII et P700 dans le PSI.

A



B

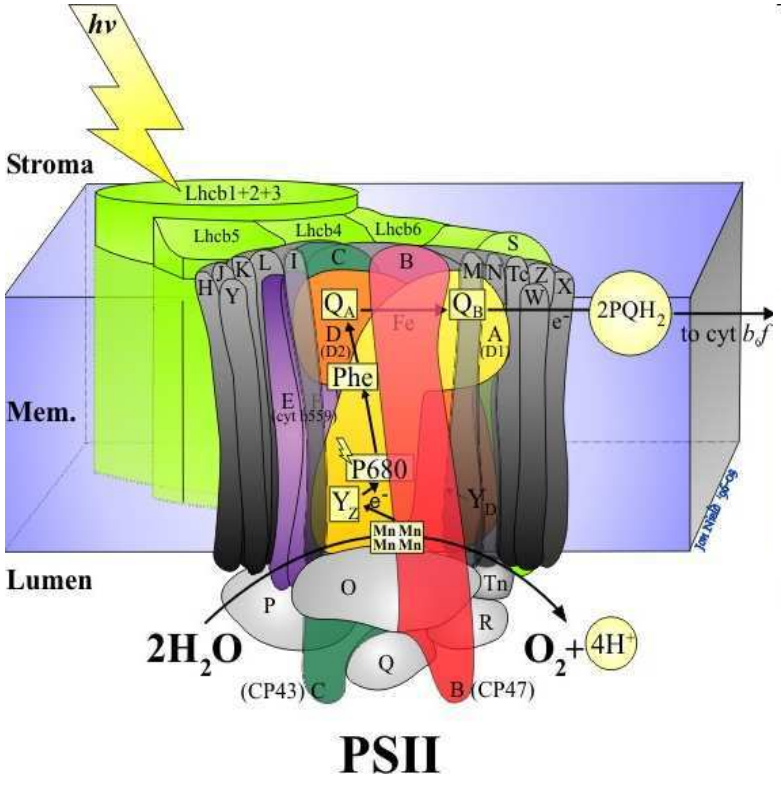


Figure I.9 : Schéma et structure du photosystème II (PSII)
La figure **A** montre la structure (résolution à 3Å) du PSII de *Thermosynechococcus elongatus* d'après Ferreira *et al.* 2004. La figure **B** montre le schéma du transport électronique dans le PSII d'une plante d'après le Dr. Jonathan Nield. e- = électron ; hυ = énergie lumineuse ; b_6f = cytochromes b_6f ; PQH_2 = plastoquinol ; Mem. = membrane ; Lhcb 1-6 sont les antennes externes du PSII ; CP43 (PsbC) et CP47 (PsbB) sont les antennes internes du PSII ; les protéines PsbA (D1), D (D2), E et F (cytochrome b_{559}),Y, H, J, K, L, I, M, N, Tc, S, Z, W, X, Tn, O, P, R et Q du PSII sont représentées ; H_2O, $[Mn]_4$, Y_Z, P680, Phe, Q_A et Q_B sont la chaîne de transport des électrons du PSII.

Le photosystème II (figure I.9*)* (pour revues : Nelson et Yocum 2006; Enami *et al.* 2008; Müh *et al.* 2008)

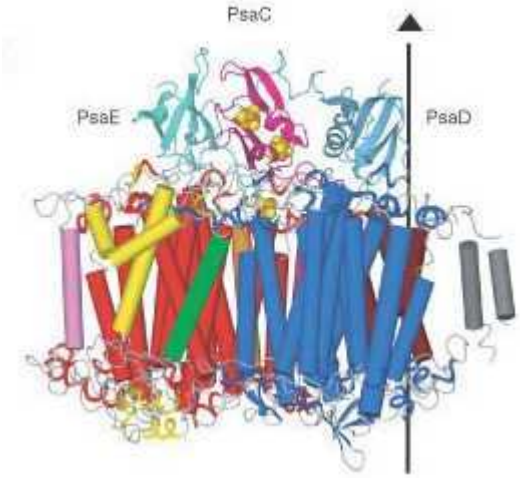
Le photosystème II (appelé ainsi parce qu'il a été découvert en second) est responsable de la libération d'oxygène dans l'atmosphère et, avec le complexe cytochrome b_6f, permet la formation du gradient de protons utilisé pour produire l'ATP (figure I.8).

La structure du cristal à environ 3Å du PSII a été résolue à partir de deux espèces de cyanobactéries thermophiles (Kamiya et Shen 2003; Ferreira *et al.* 2004; Loll *et al.* 2005) (figure I .9). Le PSII cyanobactérien (sans ses antennes externes, voir plus loin dans l'introduction la partie sur les antennes) contient 17 sous-unités protéiques trans-membranaires et trois protéines du côté du lumen. Les sous-unités trans-membranaires incluent les trois sous-unités du centre réactionnel : l'hétérodimère formé par PsbA (D1) et PsbD (D2), qui lie tous les cofacteurs nécessaires pour la séparation des charges et leur stabilisation, le cytochrome b_{559} formé par les sous-unités PsbE et PsbF, et les sous-unités liant de la chlorophylle PsbB (CP47) et PsbC (CP43) (les antennes internes, voir parties sur les antennes pour plus de détails) (figure I.9). Il y a aussi au moins 11 autres petites sous-unités avec un poids moléculaire inférieur à 10kDa nommées PsbH, PsbI, PsbJ, PsbK, PsbL, PsbM, PsbN, PsbTc, PsbX, PsbY et Ycf12 (Loll *et al.* 2005; Kashino *et al.* 2007; Shen *et al.* 2008) (figure I.9). Ces protéines trouvées dans le PSII sont des sous-unités qui ne sont pas directement impliquées dans la récupération de la lumière ni dans les réactions de transport des électrons mais plutôt nécessaires à l'assemblage et la stabilité du complexe. Les protéines extrinsèques PsbO, PsbV et PsbU sont nécessaires à la stabilité du complexe d'oxydation de l'eau et à l'activité de production d'O_2. Le PSII des plantes contient aussi PsbO (Burnap et Sherman 1991), mais le cytochrome c_{550} (PsbV) et PsbU sont remplacés par les sous-unités eucaryotes PsbP et PsbQ (Shen et Inoue 1993; Hankamer *et al.* 2001; Enami *et al.* 2003) (figure I.9).

La voie du transport des électrons au sein du PSII est la suivante : $H_2O \rightarrow [Mn_4CaCl] \rightarrow Y_Z/Y_Z^{\cdot} \rightarrow P680/P680^{+} \rightarrow Phe/Phe^{-} \rightarrow Q_A/Q_A^{-} \rightarrow Q_B/Q_B^{-}$ (pour revue : Diner et Rappaport 2002). PsbA (D1) et PsbD (D2) apportent les ligands pour les cofacteurs se trouvant sur la chaîne de transport des électrons du PSII, c'est à dire 6 chlorophylles *a*, 2 molécules de phéophytine (Phe), 2 plastoquinones, un fer non-hémique, les tyrosines redox actives (Y_Z et Y_D), 2 caroténoïdes et les ions inorganiques qui catalysent l'oxydation de l'eau. Le PSII utilise un cluster de 4 Mn, 1 Ca^{2+} et 1 Cl^{-} pour oxyder l'H_2O en O_2 (nommé OEC : « Oxygen-Evolving Complex »).Une double réduction et protonation de Q_B^{-} relâche Q_BH_2 au niveau de son site de liaison dans le PSII en échange d'une quinone oxydée.

Ensuite la plastoquinone réduite (ou plastoquinol), Q_BH_2, se dirige vers le complexe cytochrome b_6f (figure I.8). Elle libère ses protons dans le lumen et donne ses électrons au cytochrome b_6f. Le transport des électrons induit la création d'un gradient de pH (ΔpH) car

A



B

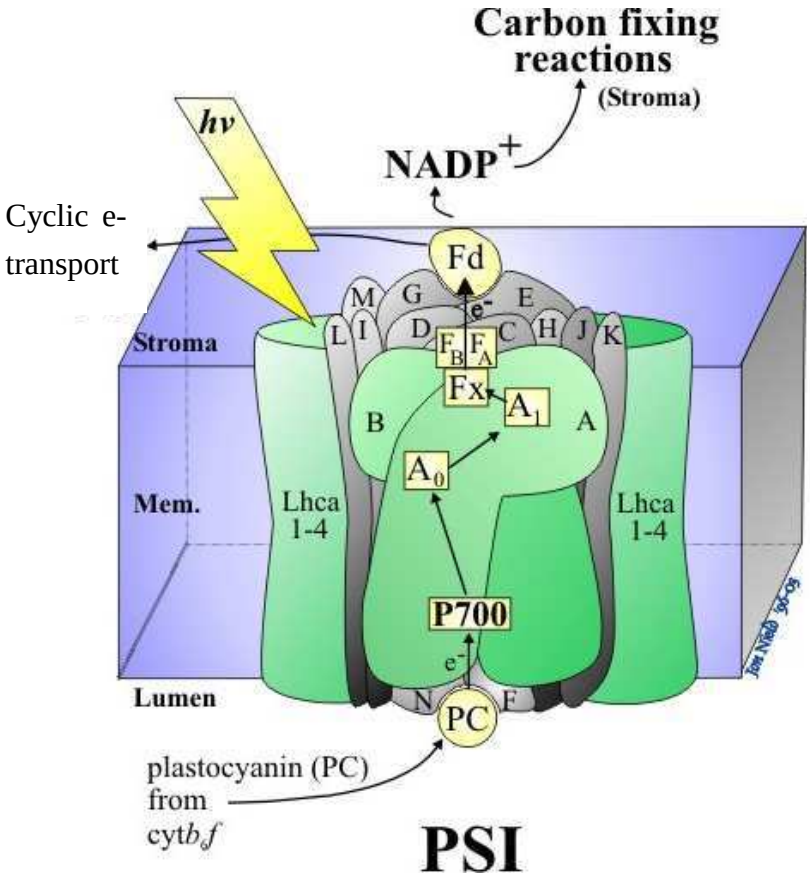


Figure I.10 : Schéma et structure du photosystème I (PSI)

La figure **A** montre la structure à 2.5Å du PSI de *Synechococcus elongatus* d'après Jordan *et al*. 2001. Code couleur : PsaA (bleu), Psab (rouge), PsaC (rose), PsaD (turquoise), PsaE (vert) et le cluster Fe_4S_4 (boules oranges et jaunes). La flèche représente l'axe de crystalographie (C3). La figure **B** montre le schéma du transport électronique dans le PSI d'une plante d'après le Dr. Jonathan Nield.

e- = électron ; hυ = énergie lumineuse ; b_6f = cytochromes b_6f ; NADP+ = nicotinamide adénosine di-phosphate ; Fd = ferredoxine ; Mem. = membrane, PC = plastocyanine; Lhca 1-4 sont les antennes externes du PSI ; les protéines psaA-N du PSI sont représentées ; P700, A_0, A_1, F_X, F_A et F_B sont la chaîne de transport des électrons du PSI.

les protons (H^+) relâchés dans le lumen le rendent plus acide que le stroma. La membrane est très peu perméable aux protons, ceux-ci ne peuvent la traverser que par le canal de l'ATP synthase. Les protons qui passent dans ce canal produisent alors l'énergie nécessaire à la production d'ATP par cette enzyme.

Le photosystème I (figure I.10) (pour revues : Nelson et Yocum 2006; Jensen *et al.* 2007) :

Le PSI est responsable de la libération de NAD(P)H dans le stroma. Le PSI est composé (1) du centre réactionnel (RC) qui contient les protéines issues des gènes *psa*A à *psa*L et *psa*N à *psa*P et (2) des antennes liées à des molécules de chlorophylle connues sous le nom de Lhca1 à 6, formant le LHCI chez les eucaryotes (pour revue : Nelson et Yocum 2006) (figure I.10).

En 2001, la structure du PSI (sans les antennes externes) a été résolue à 2.5Å chez *T. elongatus* (figure I.10) (Jordan *et al*. 2001). Le PSI contient 12 sous-unités (PsaA à PsaL) et 125 cofacteurs (96 chlorophylles, 22 caroténoïdes, 2 phylloquinones, $3Fe_4S_4$ et 4 lipides). Dans le cristal et *in vivo*, le PSI de *T. elongatus* est un trimère avec un diamètre de 210Å et une hauteur maximum de 90Å. Au contraire, le PSI des plantes est un monomère qui, d'après l'étude de cristaux avec une résolution de 4.4Å, contient au moins 19 sous-unités, d'environ 170 chlorophylles, 2 phylloquinones et 3 Fe_4S_4 (Ben-Shem *et al.* 2003).

Le centre réactionnel du PSI catalyse une oxydoréduction plastocyanine (PC) / Ferredoxine (Fd) induite par la lumière. La plastocyanine prend les électrons du cytochrome b_6f et les apporte au P700. Les composants intermédiaires du couple d'oxydoréduction (PC/Fd) sont la chaîne de transport des électrons du PSI (P700, A_0, A_1, F_X, F_A et F_B) qui sont respectivement un hétérodimère de chlorophylle *a*/*a'*, un monomère de chlorophylle *a*, une phylloquinone et un interpolypeptide (4Fe-4S) (figure I.10). La séparation de charge induite par la lumière oxyde le donneur d'électrons primaire P700 puis les électrons sont transmis vers les autres transporteurs (de A_0 à F_X) qui se trouvent tous sur PsaA et PsaB (donc en double). La présence de deux branches de cofacteurs symétriques a soulevé la question de savoir si l'une ou l'autre des branches était active dans le transport des électrons dans des conditions physiologiques particulières (Breton *et al.* 1999; Brettel et Leibl 2001; Dashdorj *et al.* 2005). Il semblerait que la branche sur PsaB soit celle qui transporte les électrons (Webber *et al.* 1996; Krabben *et al.* 2000). Ensuite les électrons passent par F_A et F_B qui sont des clusters 4Fe-4S liés à la sous-unité PsaC. Puis Fd, qui est une protéine soluble avec un cluster 2Fe-2S, accepte les électrons du cluster F_B sur le côté stromal du complexe du PSI. Et la Fd réduit le $NADP^+$ par l'intermédiaire de la FNR (« Ferredoxine NADP oxidoReductase »), celui-ci va ensuite être utilisé dans des voies biosynthétiques variées (figures I.8 et I.9).

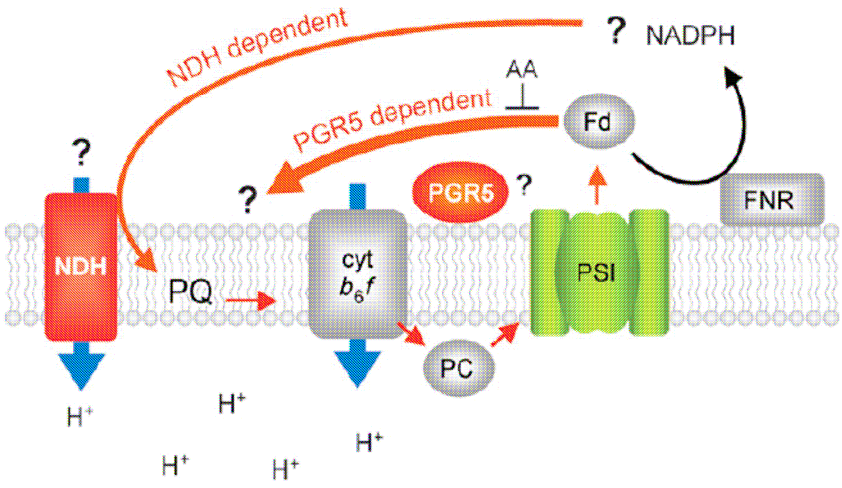


Figure I.11 :Le transfert cyclique des électrons chez les plantes d'après Shikanai 2007
Le schéma représente les deux voies de transport d'électrons cyclique (CET) autour du photosystème I (PSI). Chez les plantes, il existe deux voies partiellement redondantes. L'une des voies est minoritaire et dépendante de la NADH (Nicotinamide Adénosine Di-phosphate) dehydrogénase (NDH). L'autre est dépendante de la protéine PGR5, cette voie est inhibée par l'antimycine (AA) et implique une réduction ferredoxine (Fd) dépendante de la plastoquinone (PQ). Le donneur d'électrons du complexe NDH n'est pas encore connu. Le complexe NDH pourrait avoir une activité de pompe à protons. La route empruntée par les électrons de la voie PGR5 n'est pas connue ainsi que la localisation exacte de PGR5. Cyt b_6f = cytochromes b_6f ; FNR = ferredoxine NADP oxidoreductase ; PC = plastocyanine.
Chez les cyanobactéries, au moins quatres voies parrallèles de transfert cyclique des électrons existent, deux d'entre elles sont communes avec celles des plantes décrites ci-dessus (Yeremenko *et al.* 2005).

2.2 Le transport d'électrons cyclique

Le transport d'électrons cyclique intervient lorsque le taux de NAD(P)H devient trop élevé, car il faut plus d'ATP que de NAD(P)H dans les cellules pour un bon fonctionnement (pour revues : Bendall et Manasse 1995; Nelson et Yocum 2006; Shikanai 2007) (figure I.11). Le transport d'électrons cyclique est un mécanisme vital pour l'adaptation des plantes lors de changements d'environnement (Munekage *et al.* 2004). Il ne dépend pas des réactions chimiques du PSII (pour revue : Bendall et Manasse 1995). Les électrons sont recyclés à partir du NAD(P)H ou de la ferredoxine à travers la plastoquinone, ainsi le transfert cyclique des électrons peut générer un ΔpH sans accumulation de NAD(P)H (pour revue : Shikanai 2007) (figure I.11).

3. Les antennes collectrices d'énergie chez les plantes et les cyanobactéries

Pour augmenter leur absorption de la lumière, les organismes photosynthétiques ont développé différents systèmes d'antennes constitués de pigments et de complexes pigments-protéines. Les complexes d'antennes sont classés en 7 familles (Grenn *et al.* 2003). (1) Des complexes d'antennes dans les centres réactionnels (les antennes internes). Les antennes sont fusionnées avec les protéines qui portent les cofacteurs de la séparation des charges. Elles sont présentes dans le PSI des cyanobactéries et des plantes et algues supérieures, ainsi que dans le centre réactionnel de certaines bactéries vertes. Les antennes internes du PSII, PsbB (CP47) et PsbC (CP43), sont proches structurellement et ont une évolution commune avec les complexes d'antennes/centre réactionnel fusionnés du PSI. (2) Les antennes externes des plantes sont les LHCs (« Light-Harvesting Complexes »). Les LHCs, présents chez les algues et plantes supérieures, sont constitués de pigments (chlorophylles et caroténoïdes) attachés de façon non-covalente. Ils sont localisés à la périphérie des PSI et PSII et respectivement nommées LHCI et LHCII. Les protéines Lhc des plantes sont une famille de protéines avec 3 hélices trans-membranaires qui lient la chlorophylle *a*, la chlorophylle *b* (attachées par leur Mg^{2+} central de différentes façons), et certains caroténoïdes. C'est pourquoi, elles sont aussi connues sous le nom de protéine cab (« chlorophyll *a*/*b* binding »). (3) Les antennes externes des cyanobactéries et des algues rouges sont très différentes de celles des plantes, bien que les PSI et PSII des cyanobactéries contiennent les mêmes antennes internes. Les antennes externes des cyanobactéries ne sont pas transmembranaires comme les Lhc et sont liées de façon covalente à leurs pigments (des bilines). Elles sont connues sous le nom de phycobilisomes (PBS). Il existe aussi d'autres antennes nommées (4) complexes d'antennes des protéobactéries chez les bactéries pourpres, (5) protéines péridine-chlorophylle *a* chez les dinoflagellées, (6) chlorosomes et (7) protéines FMO (Fenne-Matthews-Olson) chez certaines

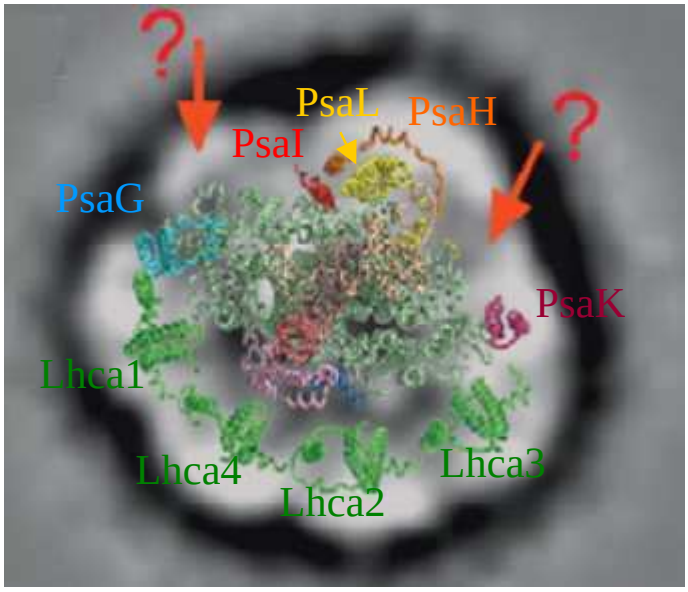


Figure I.12 : Structure du complexe PSI vu du côté stromal de la membrane thylacoïdienne chez les plantes d'après Jensen *et al.* (2007)
La figure montre une superposition d'une image du complexe du PSI obtenue par microscopie électronique à simple particule (donnée non publiée de S. Kereiche, R. Kouřil et E.J. Boekema) avec le modèle atomique du PSI chez le pois (Ben-shem *et al.* 2003). Les flèches rouges montrent les positions où une densité additionnelle suggère qu'il manque des sous-unités au modèle atomique. Les positions des sous-unités des 4 antennes périphériques Lhca1 à 4 et les petites sous-unités PsaG, H, I, K et L sont indiquées.

bactéries vertes (filamenteuses et sulfureuses). Ces derniers types d'antennes ont des structures, des organisations et compositions en pigments originales plus primitives, témoins de l'évolution différente des antennes des organismes photosynthétiques et ne seront pas décrits dans cette introduction (Grenn *et al.* 2003).

Je propose ci-dessous une description des antennes (externes et internes) des plantes supérieures et des antennes externes des cyanobactéries sachant que leurs antennes internes sont les mêmes que dans les plantes. Je décris aussi les protéines IsiA et HLIPs présentes chez les cyanobactéries qui apportent des éléments dans le questionnement sur l'évolution de ces organismes. Les protéines IsiA et HLIP (« High Light Inducible Protein ») sont des protéines dérivées de la famille des LHC et lient de la chlorophylle et des caroténoïdes . Leur expression est induite dans des conditions de stress particulières qui nous intéressent dans cette étude, respectivement, la carence en fer et les fortes intensités lumineuses.

3.1 Les antennes des plantes

Les antennes du PSI (pour revues : Nelson et Yocum 2006; Jensen *et al.* 2007; Schmid 2008) (figure I.12):

Chez les plantes, algues et cyanobactéries, les protéines PsaA et PsaB du PSI, en plus d'attacher les cofacteurs nécessaires pour la séparation des charges et leur stabilisation, attachent environ 100 chlorophylles et 20 molécules de β-carotène qui servent d'antenne interne (pour revues : Nelson et Yocum 2006; Jensen *et al.* 2007; Schmid 2008).

Les antennes périphériques (externes) du PSI des plantes, le LHCI, contiennent des chlorophylles *a* et *b*, et sont composées de Lhca1, 2, 3, 4, 5 et 6. Le poids moléculaire de Lhca1 à 6 varie entre 21.5 et 24.6 kDa (Haworth *et al.* 1983; Lam *et al.* 1984; Jansson 1999). Lhca1 et Lhca3 ont une grande affinité pour la chlorophylle *a*, elles contiennent environ 10 chlorophylles *a* et *b* (par apoprotéine) et 3 molécules de caroténoïdes (principalement de la lutéine, de la violaxanthine et du β-carotène) (Croce *et al.* 2002). Lhca2 et Lhca3 contiennent aussi environ 10 chlorophylles mais n'ont que 2 caroténoïdes (Castelletti *et al.* 2003). Il existe aussi deux autres Lhca protéines au niveau du PSI : Lhca5 et Lhca6 (Jansson 1999) qui sont actuellement moins caractérisées que les autres. Lhca6 est très proche de Lhca2. Et Lhca5 qui ne contient pas les « chlorophylles rouges » que l'on retrouve dans Lhca3 et Lhca4, s'accumule en assez faible quantité sauf sous certaines conditions comme un fort éclairement (Ganeteg *et al.* 2004; Storf *et al.* 2005).

Les antennes du PSII (pour revues : Nelson et Yocum 2006; Müh *et al.* 2008; Schmid 2008) (figure I.13 et I.14):

Les antennes internes PsbB (CP47, 56.3kDa) et PsbC (CP43, 51.8kDa) sont présentes chez les

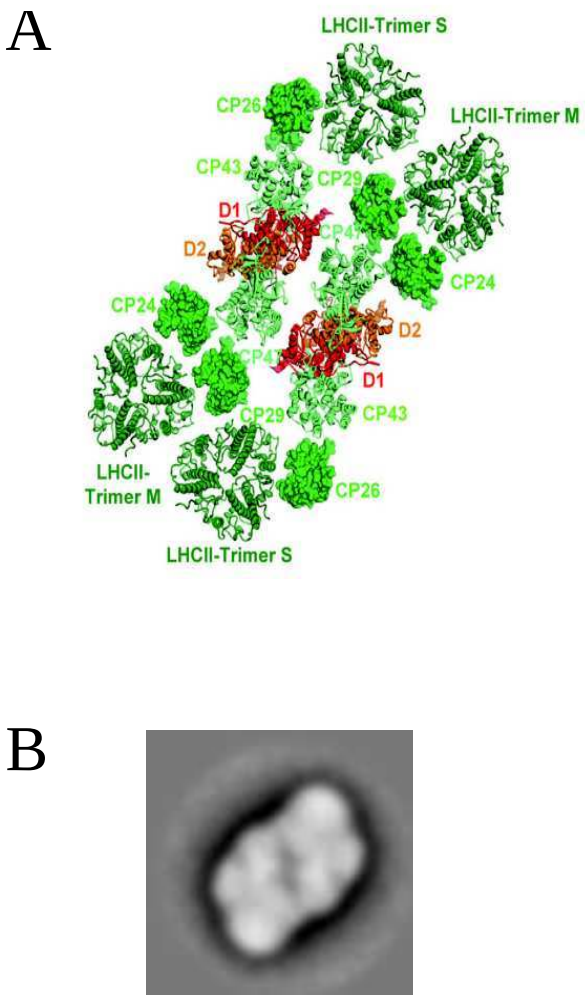


Figure I.13 : Stucture du supercomplexe PSII-LHCII chez *Arabidopsis thaliana*
A montre la structure du complexe PSII-LHCII d'après Schmid 2008, le PSII a été assemblé avec les modèles atomiques des protéines PsbA (D1), PsbD (D2), PsbC (CP43) et PsbB (CP47) issues de la structure du dimère du PSII cyanobactérien et le trimère du LHCII des plantes supérieures. LHCII-Trimer M et S correspondent respectivement aux trimères du LHCII modérément (« moderately » en anglais) et fortement (« strongly ») liés au LhcIIb mineures du PSII. Lhcb4 (CP29), Lhcb5 (CP26) et Lhcb6 (CP24) ont été positionnées par rapport aux antennes internes CP43 et CP47 d'après le modèle du PSII de Dekker *et al*. (2005). La diminution de la concentration en chlorophylles *b* vers le centre du PSII est représentée par la transition du vert clair au vert foncé.
B montre la structure du complexe PSII-LHCII obtenue en microscopie électronique à simple particule d'après Boekema 1999 (Kühl *et al*. 1999)**.**

plantes et les cyanobactéries. Elles ont 6 hélices trans-membranaires. Les antennes externes des cyanobactéries, nommées phycobilisomes, sont différentes de celles des plantes. Les phycobilisomes seront décrits dans la partie 3.3 de l'introduction. Les antennes externes du PSII des plantes sont des complexes membranaires formés par les protéines de la famille des Lhcb (Jansson *et al.* 1992). Elles attachent des chlorophylles et caroténoïdes de façon non-covalente. Les Lhcb ont 3 hélices trans-membranaires (figure I.14). Elles forment des hétérotrimères LHCIIb composés de Lhcb1 à 3 de 24.7, 24.9 et 24.3kDa, respectivement (Chitnis et Thornber 1988; Caffarri *et al.* 2005) ; et des monomères Lhcb4 (CP29, environ 27-28kDa (Machold et Meister 1979; Camm et Green 1980)), Lhcb5 (CP26, 26.1kDa (Bassi *et al.* 1987)) et Lhcb6 (CP24, 23.2kDa (Butler et Kuhlbrandt 1988)). Les LHCIIb (les Lhcb protéines majeures) s'associent avec les autres Lhcb protéines mineures (en monomère) et les protéines du centre réactionnel pour former des supercomplexes LHCII-PSII (Dekker et Boekema 2005) où les monomères (Lhcb4, Lhcb5 et Lhcb6) se situent entre les trimères LHCIIb et les centres réactionnels (Boekema *et al.* 1999). Ces supercomplexes ont des compositions variables en fonction de l'intensité et de la qualité de lumière (Rintamaki *et al.* 2000; Jackowski *et al.* 2003; Caffarri *et al.* 2005). Une « unité minimum » contient 2 centres réactionnels, 2 trimères LHCIIbs fortement liés (S-trimers) avec Lhcb4 et Lhcb5, 2 trimères LHCIIbs moins fortement liés (M-trimers) avec Lhcb6 (figure 1.13) (Boekema *et al.* 2000). Les études structurales ont confirmé que les LHCIIb contiennent 8 chlorophylles *a* et 6 chlorophylles *b*, ainsi que 4 caroténoïdes et 2 lipides (Liu *et al.* 2004; Standfuss et Kuhlbrandt 2004) (figure I.14). Le nombre et l'identité des caroténoïdes dans le LHCIIb est fixe, il y a une néoxanthine (site N), une violaxanthine (site V) et 2 lutéines (sites L1 et L2) (Liu *et al.* 2004). Les protéines Lhcb4, Lhcb5 et Lhcb6 lient moins de chlorophylle *a* et de caroténoïdes (Standfuss et Kuhlbrandt 2004). Elles contiennent 3 caroténoïdes : 2 lutéines, de la violaxanthine ou de la néoxanthine (à la place du β-carotène que l'on retrouve dans les Lhca du PSI) (Schmid *et al.* 2002; Standfuss et Kuhlbrandt 2004; Qin *et al.* 2006).

En se basant sur les modèles de structures, il semblerait y avoir deux voies de transfert de l'énergie vers le RC du PSII (pour revue : Schmid 2008):

(1) S-trimers du LHCIIb → Lhcb5 → PsbC → RC

(2) M-trimers du LHCIIb → Lhcb6 → PsbB → RC

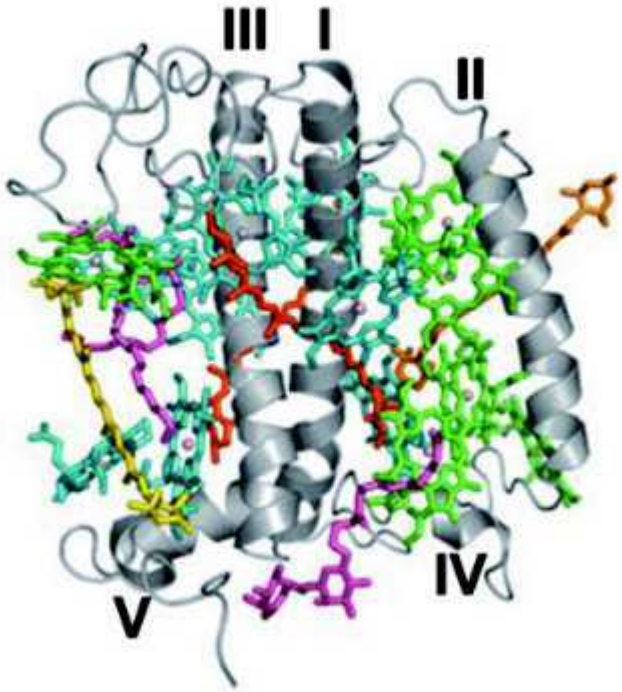


Figure I.14 : Structure d'un monomère du LHCIIb majeur du PSII avec ses cofacteurs à une résolution de 2.5Å d'après Schmid 2008 chez *Arabidopsis thaliana*

Les α-hélices (dont I, II et III transmembranaires) de la protéine sont numérotées de I à IV. Les molécules suivantes sont localisées d'après les données du groupe de Kühlbrandt (Standfuss *et al.* 2005). Les chorophylles *a* sont en turquoise et les chlorophylles *b* sont en vert. L'atome de magnésium au centre de l'hème des chlorophylles est en violet, les chaînes phytol sont omises pour plus de clarté. Les lutéines, la néoxanthine et la violaxanthine sont en rouge, orange et jaune, respectivement. Le dialactosyl diacyl glycerol (à gauche) et le phosphatidyl glycerol (en bas à droite) sont en magenta.

3.2 D'autres protéines de la famille des Lhc sont retrouvées chez les cyanobactéries

Les High Light Inducible Proteins (HLIPs)

Les HLIPs sont des polypeptides avec une seule hélice trans-membranaire qui lient des chlorophylles et qui ressemblent aux protéines LHCs. Les HLIPs semblent protéger les cellules en dissipant l'excès d'énergie absorbée sous forme de chaleur. Des mutants délestés de ces protéines sont plus sensibles aux conditions de forte illumination (He *et al.* 2001; Havaux *et al.* 2003). Les HLIPs sont synthétisées chez les cyanobactéries cultivées en conditions de forte illumination et d'autres stress (Dolganov *et al.* 1995; Funk et Vermaas 1999; He *et al.* 2001). Leur rôle exact est encore inconnu (Heddad et Adamska 2002; Havaux *et al.* 2003). Une HLIP-like a été retrouvée dans une plante chez *Arabidopsis Thaliana* (Jansson *et al.* 2000). Des protéines plus complexes, les ELIPs, contenant 3 hélices trans-membranaires (pour revue : Adamska 1997) semblent être des HLIPs évoluées présentes chez les plantes (pour revue Montané et Kloppstech 2000). Les ELIPs (« Early Light-Induced Proteins ») sont des candidats pour le transport des pigments vers les antennes car ces protéines sont proches et ont une affinité plus faible pour les chlorophylles et les caroténoïdes comparés aux autres protéines Lhc. Elles sont aussi plus exprimées en conditions d'assemblage du LHC (Heddad et Adamska 2002 ; et pour revue : Adamska 1997). La diversité fonctionnelle des LHCs et des ELIPs correspond à la transition des systèmes d'antennes extrinsèques (basées sur les phycobilisomes, voir plus bas dans l'introduction) et intrinsèques (basées sur les LHCs), supposée avoir eu lieu lors d'événements symbiotiques avec des cyanobactéries qui ont permis l'apparition des chloroplastes. Il a été proposé que la fonction originale des LHCs et des ELIPs n'était pas de collecter la lumière pour la transférer vers les centres réactionnels mais de dissiper l'excès d'énergie absorbée sous forme de chaleur ou de fluorescence (pour revue : Montané et Kloppstech 2000). Leur proposition est que ces protéines ont pour origine les HLIPs (contenant une hélice trans-membranaire et retrouvées chez les cyanobactéries), qui auraient ensuite acquis plusieurs hélices par différentes étapes de duplications de gène.

Les protéines CP43-like

Les protéines dites CP43-like ont 6 hélices trans-membranaires et peuvent lier de la chlorophylle (pour revues : Chen et Bibby 2005b; Murray *et al.* 2006). La protéine IsiA et les protéines Pcb en font partie. Les protéines Pcb sont le système de récolte de la lumière (« LHC »-like) externe du PSI et du PSII des prochlorophytes. Les prochlorophytes sont un groupe de cyanobactéries qui ne contient pas de phycobilisomes (ou seulement sous forme vestigiale (Rocap *et al.* 2003), mais qui contient de la chlorophylle *a* et *b* comme, par exemple, les *Prochlorococcus* (pour revues : Matthijs *et al.* 1994; Partensky *et al.* 1999). Il

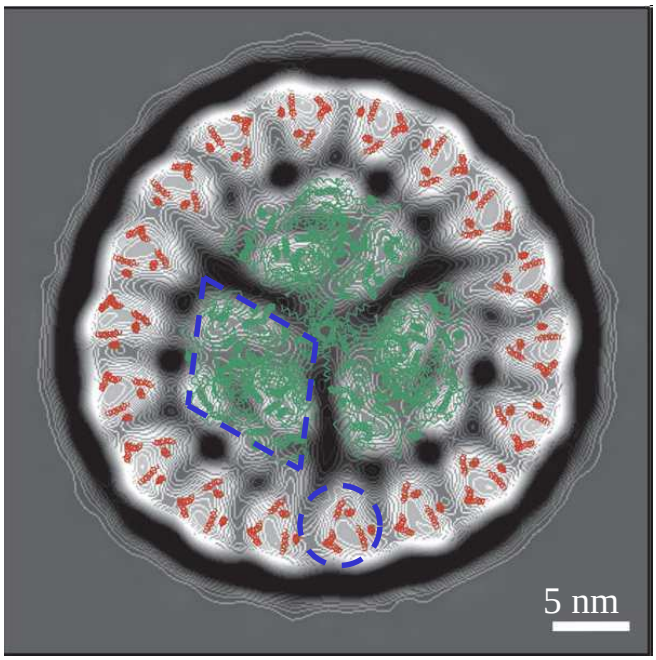


Figure I.15 : Supercomplexe IsiA-photosystème I d'après Bibby *et al.* (2001)
Pendant une carence en fer, les cyanobactéries produisent IsiA qui s'associe avec le PSI pour former une antenne de récolte de la lumière géante. Ce supercomplexe IsiA-PSI est typiquement composé d'un trimère de centres réactionnels du PSI encerclés par 18 sous-unités IsiA. Dans le modèle tridimentionnel représenté ici, les polypeptides du PSI sont en vert et ceux d'IsiA en rouge. Un monomère de PSI est montré par un losange bleu pointillé et un monomère de la protéine IsiA par un cercle bleu pointillé.

existe des cyanobactéries, qui contiennent à la fois des phycobiliprotéines et des protéines Pcb qui lient seulement de la chlorophylle *a* comme la forme *Fischerella* (Geiss *et al.* 2001). La forme *Acaryochloris marina* contient des protéines Pcb qui lient des chlorophylles *a* et *d* (Chen *et al.* 2002). Les antennes de ces cyanobactéries contenant des protéines Pcb ne seront pas davantage décrites dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux cyanobactéries à phycobilisomes car ceux-ci sont reliés au mécanisme de l'OCP.

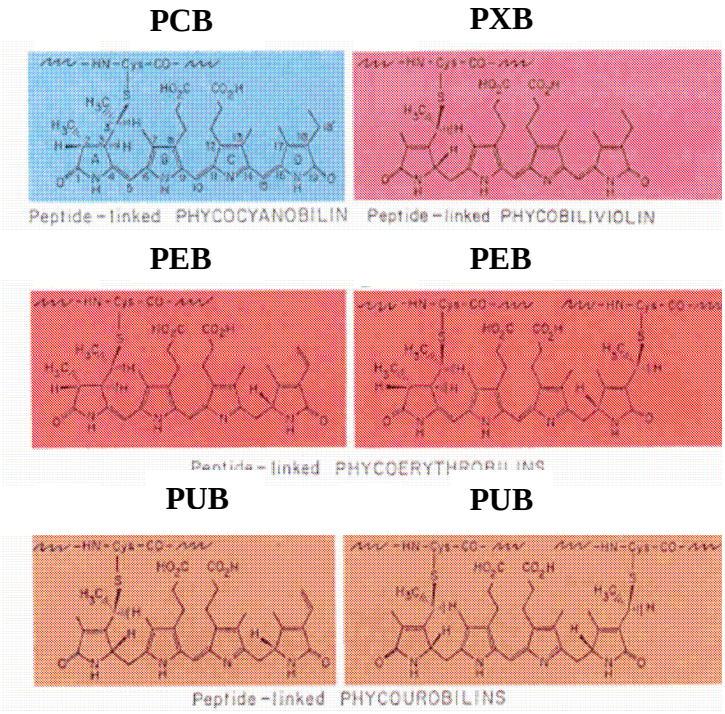
La protéine IsiA, aussi nommée CP43', est présente dans la plupart des cyanobactéries à phycobilisomes (Chen et Bibby 2005b). L'expression de la protéine IsiA est induite par une carence en fer (Laudenbach et Straus 1988; Burnap *et al.* 1993) et d'autres conditions de stress comme les stress salin, oxydant et lumineux (Jeanjean *et al.* 2003; Yousef *et al.* 2003; Havaux *et al.* 2005). IsiA encercle le centre réactionnel du PSI d'une couronne de 18 molécules IsiA (Bibby *et al.* 2001; Boekema *et al.* 2001) (figure I.15). Une plus grande quantité d'IsiA est liée au PSI pendant une carence en fer prolongée (Yeremenko *et al.* 2004). IsiA augmente l'absorption du PSI en agissant comme une antenne (LHC) supplémentaire efficace (Andrizhiyevskaya *et al.* 2002; Melkozernov *et al.* 2003). Des agrégats d'IsiA, formant des anneaux vides de multimères d'IsiA (sans PSI à l'intérieur), s'accumulent et sont très abondants lors d'une carence en fer prolongée (Yeremenko *et al.* 2004). Ces agrégats sont dans un état fortement quenché (très peu fluorescent) *in vitro* suggérant qu'ils sont responsables de la dissipation thermique de l'énergie absorbée (Ihalainen *et al.* 2005). Dans les cellules cultivées à forte illumination, la protéine IsiA est synthétisée pour protéger les cellules cyanobactériennes de la photo-destruction et il a été proposé qu'IsiA agit comme un quencher (Park *et al.* 1999; Sandström *et al.* 2001; Havaux *et al.* 2005) ; c'est à dire qu'elle convertit l'énergie absorbée en chaleur au lieu de la transmettre vers les centres photochimiques ou de la ré-émettre sous forme de fluorescence.

3.3 Les antennes externes des cyanobactéries : les phycobilisomes

Les revues sur les phycobilisomes utilisées pour cette partie sont Bryant *et al.* (1979); Glazer (1984); Zilinskas et Greenwald (1986); Glazer (1989); Tandeau de Marsac (2003) et Adir (2005).

Les antennes externes des cyanobactéries et des algues rouges diffèrent par rapport à celles de plantes. Elles sont nommées les phycobilisomes (PBS) et sont formées par des protéines solubles dans l'eau qui forment un complexe de 5-10 Mda (ce qui représente 40-50% des protéines totales de la cellule). Ces protéines n'ont pas d'hélices trans-membranaires et leurs pigments sont liés de façon covalente. Leur composition en pigment et leur organisation en complexe permet l'utilisation d'une large portion du spectre visible. Les organismes à

A



B

PROTEIN	TYPE OF BILIN PCB	PEB	PXB	PUB	BILINS/$(\alpha\beta)_3$
ALLOPHYCOCYANIN B	2				6
ALLOPHYCOCYANIN	2				6
C-PHYCOCYANIN	3				9
R-PHYCOCYANIN	2	1			9
PHYCOERYTHROCYANIN	2		1		9
C-PHYCOERYTHRIN		5			15
					BILINS/$(\alpha\beta)_6\gamma$
B-PHYCOERYTHRIN		32		2	34
R-PHYCOERYTHRIN		25		9	34

Figure I.16 : Structure des bilines et contenu en biline des phycobiliprotéines d'après Glazer 1989

La figure **A** représente la structure des bilines et la liaison biline-peptide dans les phycobiliprotéines. Les liaisons covalentes thioéther entre le chromophore et le résidu cystéinyl de la chaîne polypeptide se font, suivant le type de bilines, au niveau du noyau A, ou des noyaux A et D du tétrapyrrole.

La figure **B** représente la composition et le contenu en bilines des phycobiliprotéines. La couleur des colonnes est une approximation proche de celles des phycobiliprotéines en solution. Le nombre de bilines donné dans les colonnes colorées est par monomères αβ, sauf pour les phycoérythrines R et B où le nombre est par $(\alpha\beta)_6\gamma$. L'allophycocyanine B et l'allophycocyanine ont une biline par sous-unité alors que les phycocyanines C et R et la phycoérythrocyanine ont une biline sur la sous-unité α et deux bilines sur la sous-unité β. Les phycoérythrines C, B et R ont deux bilines sur la sous-unité α et trois bilines sur la sous-unité β. La sous-unité γ des phycoérythrines B et R porte quatre bilines.

phycobilisomes sont ainsi les organismes possédant la plus grande adaptation aux quantités et qualités de radiations incidentes.

Á l'exception des prochlorophytes (voir plus haut dans la partie 3.2), la plupart des cyanobactéries contiennent des phycobilisomes. Il existe deux classes structurales de phycobilisomes : les phycobilisomes hemi-ellipsoïdaux ou globulaires observés chez les algues rouges comme *Porphyridium cruentum* (Gantt et Conti 1966b) et les phycobilisomes hemi-discoïdaux largement distribués parmi les algues rouges et les cyanobactéries (Gantt *et al.* 1968; Lichtlé et Thomas 1976). Dans cette introduction, je décrirai la structure la plus observée (qui est celle des cyanobactéries sur lesquelles j'ai travaillé pour ce doctorat), c'est à dire la structure hemi-discoïdale.

Les bilines (figure I.16):

La couleur très variable des cyanobactéries est due, pour une petite contribution, à leur composition en chlorophylle *a* et en caroténoïdes, et pour une grande contribution, à leur composition en phycobiliprotéines. La couleur de ces phycobiliprotéines dépend de la nature des groupes prosthétiques tétrapyrroles qui leur sont attachés de façon covalente. La figure I.16 décrit la répartition des bilines dans les différentes phycobiliprotéines.

Les phycobiliprotéines

Les protéines « colorées » ou phycobiliprotéines qui contiennent les chromophores (les pigments = les bilines) représentent 85% de la masse totale des phycobilisomes. Les protéines « incolores » restantes sont des polypeptides de liaison (« linker » en anglais) correspondent à 15% de la masse totale du complexe (Tandeau de Marsac et Cohen-Bazire 1977). Les phycobiliprotéines sont constituées de deux chaînes polypeptidiques homologues, α et β, de respectivement environ 17 et 18kDa. Certaines (les phycoérythrines, voir plus loin) contiennent une sous-unité γ supplémentaire de 30kDa. Les phycobiliprotéines peuvent porter différents chromophores (PCB = phycocyanobiline, A_{max} ~ 620nm ; PEB = phycoérythrobiline, A_{max} ~ 550nm ; PXB = phycobilivioline, A_{max} ~ 570nm et PUB = phycourobiline, A_{max} ~ 495nm) (figure I.16). Les propriétés données par leur composition en chromophores, ainsi que la conformation et l'environnement des chromophores dans la protéine native, ont conduit à la classification des phycobiliprotéines en fonction de leur spectre d'absorption (tableau 1).

On distingue trois classes principales de phycobiliprotéines en fonction de leur longueur d'onde maximale :

- les phycoérythrines (PE ; A_{max} = 565nm)
- les phycocyanines (PC ; A_{max} = 620nm)
- les allophycocyanines (APC ; A_{max} = 650nm)

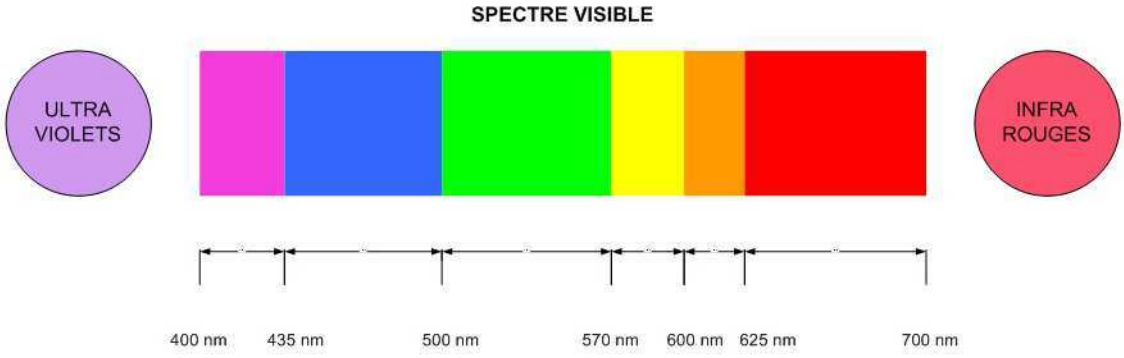
Tableau 1 : Propriétés des phycobiliprotéines majeures des cyanobactéries d'après Bryant (Sidler 1994)

Protéines	Chromophores[a]	Absorption[b] λmax (nm)	Emission λmax (nm)
Allophycocyanine (APC)	α : 1 PCB β : 1 PCB	650	660
Phycocyanine (PC)	α : 1 PCB β : 2 PCB	620	630-645
Phycoérythrocyanine (PEC)	α : 1 PXB β : 2 PCB	568, 590[c]	625
Phycoérythrine (PE)	α : 2 PEB β : 3 PEB	565	575-580

[a] Abréviations : PCB = phycocyanobiline, PEB = phycoérythrobiline, PXB = chromophore de type phycobilivioline

[b] Se reporter au spetre du visible ci-dessous pour les couleurs d'absorption

[c] Epaulement du spectre d'absorption



Les phycobiliprotéines constitutives des phycobilisomes sont l'APC et la PC. La PE est présente chez la plupart des algues rouges et dans beaucoup de cyanobactéries. Il existe un 4ème type de phycobiliprotéines, présent en grande quantité chez certaines cyanobactéries : la phycoérythrocyanine (PEC) (voir figure I.16 pour sa composition) (Tandeau de Marsac 1983). De plus, il existe des phycobiliprotéines mineures qui participent à l'optimisation du transfert de l'énergie lumineuse vers les centres réactionnels (pour revue : Glazer 1989). Il s'agit de l'allophycocyanine-B (nommée α^{B} ou $\alpha^{APC\text{-}B}$) (Glazer et Bryant 1975), de la sous-unité $\beta^{18.3}$ (Yamanaka *et al.* 1982), respectivement apparentées aux sous-unités α et β de l'allophycocyanine, et du polypeptide L_{CM} (Tandeau de Marsac et Cohen-Bazire 1977; Redlinger et Gantt 1981). Ce dernier est classé dans les polypeptides de liaison mais porte un chromophore de type PCB (Redlinger et Gantt 1981).

La structure des phycobilisomes (figure I.17) :

Les phycobiliprotéines sont organisées en une structure macromoléculaire nommée phycobilisome (Gantt et Conti 1966a). Gray et Gantt (Gray et Gantt 1975) ont été les premiers à isoler des phycobilisomes assez purs et intacts pour réaliser les premières études structurales détaillées des phycobilisomes par microscopie électronique. Tous les phycobilisomes ont un centre, dont le constituant majeur est l'allophycocyanine, et des bâtonnets périphériques ou projections radiaires, où les autres phycobiliprotéines sont localisées. Le centre et les différentes projections contiennent des polypeptides de liaison spécifiques (pour revue : Glazer 1984) (figure I.17).

Des trimères d'une même espèce de phycobiliprotéines constituent les unités de base du phycobilisome. L'état physiologique d'agrégation est soit ce trimère (dans le cœur), soit l'association de deux trimères en hexamère (dans les bras). Le niveau supérieur d'organisation est l'empilement des trimères ou des hexamères en cylindres.

Dans le type de phycobilisome le plus fréquent, le centre résulte de l'accolement de trois cylindres parallèles entre eux (c'est le cas dans *Synechocystis* (Elmorjani *et al.* 1986)). Certaines cyanobactéries possèdent un centre avec deux cylindres uniquement, par exemple *Synechococcus elongatus* PCC6301 et PCC7942 (pour revue : Glazer 1984). Les bras (les projections radiaires) rayonnent autour du centre. Les disques proches du centre sont toujours formés de phycocyanine (PC), alors que la phycoérythrine (PE) ou la phycoérythrocyanine (PEC) composent les disques les plus périphériques des bras. Les bras des cyanobactéries d'eau douce contiennent seulement de la PC, comme chez *Synechocystis* et *Synechococcus elongatus* PCC7942 (Elmorjani *et al.* 1986 ; et pour revue : Glazer 1989), et parfois de la PE ou de la PEC à leur extrémité (par exemple *Anabaena* sp. PCC7120). Les bras des cyanobactéries marines sont généralement riches en PE. Les espèces de la forme *Synechococcus* marine sont réparties dans tout l'environnement marin, la large diversité des

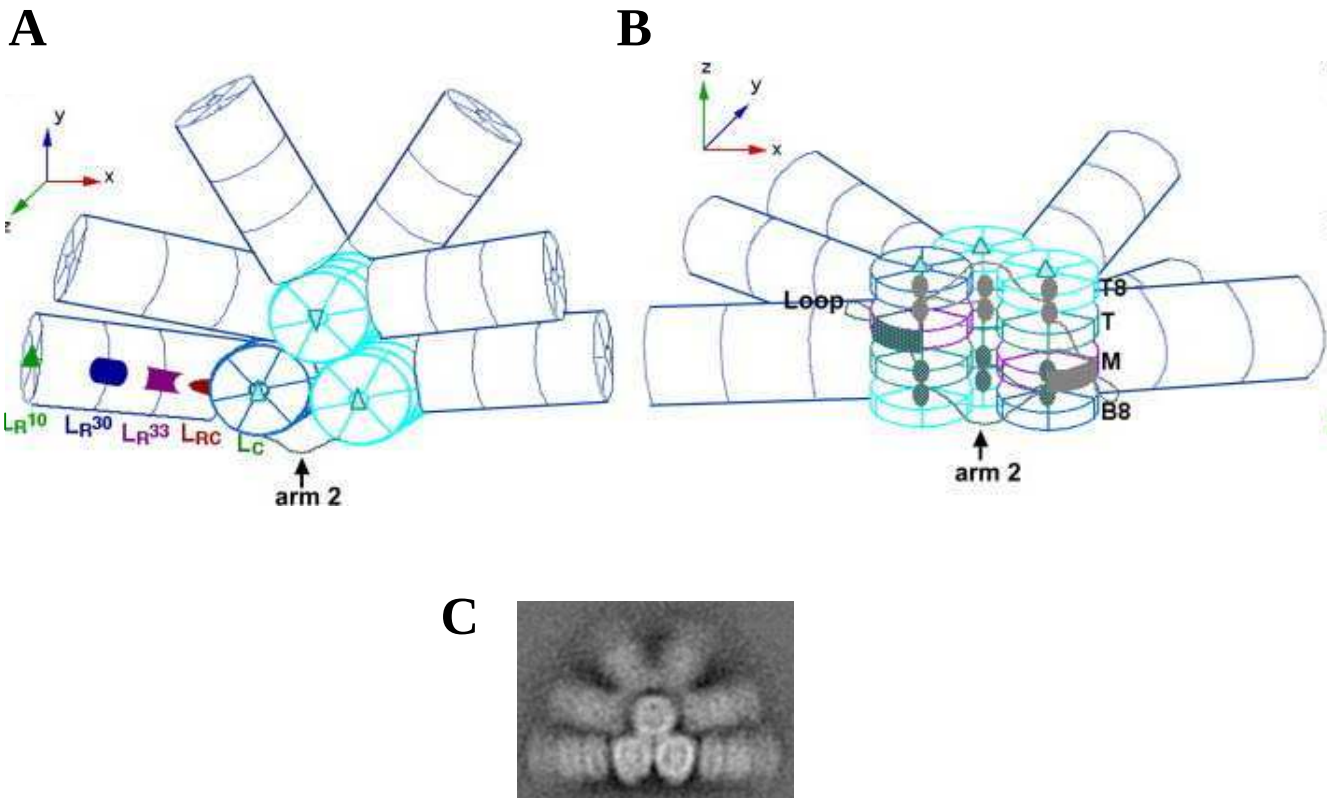


Figure I.17 : Structure du phycobilisome de *Synechocystis* d'après Arteni *et al.* (2009).
A et **B** montrent une représentation d'un phycobilisome hémi-discoïdal. **A** est une vue de côté et **B** est une vue de par en dessous (face du phycobilisome en contact avec la membrane du thylacoïde). L'architecture du phycobilisome présente un corps tri-cylindrique à partir duquel 6 bras rayonnent. Le cœur d'un phycobilisome est composé de 3 cylindres contenant chacun 4 trimères d'allophycocyanine. Les bras sont chacun composés de 3 hexamères de phycocyanine. Une coloration différente (bleu clair, bleu foncé et violet) est utilisée pour les sous-unités des 3 cylindres du cœur pour illustrer leur organisation structurelle. Les deux linkers qui relient le cœur des phycobilisomes à la membrane (L_{CM}) sont représentés avec leurs différents domaines : le domaine PB (formant une partie du disque M sur la figure), la boucle PB, arm2 et les Reps (les ellipses pleines). Les petits linkers du cœur et des bras des phycobilisomes L_C et L_R (respectivement) sont représentés à gauche sur un bras. **C** montre la moyenne de 684 projections d'une vue de côté de phycobilisomes entiers de *Synechocystis* au microscope électronique à simples particules (Arteni *et al.* 2009).

pigments de leurs phycobilisomes leur a permis de capter les longueurs d'onde de la lumière des différentes niches écologiques marines (Six *et al.* 2007). La plupart des formes *Synechococcus* marines, où le disque basal des bras est composé de PC, lie de la PCB et de la PEB à un ratio molaire 1:2 (Ong et Glazer 1987). Cependant, l'espèce *Synechococcus* WH7805 contient une PC originale qui lie de la PCB et de la PEB avec un ratio molaire 2 : 1 (Ong et Glazer 1988; Sidler 1994). En ce qui concerne le disque à l'extrémité des bras des phycobilisomes des *Synechococcus* marines contenant de la PE, il est composé de deux types de PE : PE-I et PE-II. La PE-I lie soit uniquement de la PEB, soit de la PEB et de la PUB. La PE-II lie toujours de la PEB et de la PUB (Ong et Glazer 1991; Six *et al.* 2005). De plus, certaines cyanobactéries, par exemple *Calothrix* sp. PCC7601 et PCC7504, régulent leur synthèse en phycobiliprotéines (notamment de phycoérythrine) en fonction de la longueur d'onde de l'éclairement pour optimiser leur absorption (adaptation chromatique) (Tandeau de Marsac 1977).

Les différents niveaux d'organisation du phycobilisome sont stabilisés par des polypeptides de liaison (les « linkers » en anglais). Ils sont désignés par la lettre L, suivie d'un exposant indiquant leur masse moléculaire et d'un indice indiquant leur localisation : « $_{C}$ » comme à la jonction du « core » = coeur des PBS, « $_{R}$ » comme à la jonction des « rod » = les bras des PBS, « $_{RC}$ » comme à la jonction « rod-core » et « $_{CM}$ » comme à la jonction cœur-membrane thylacoïdale (pour revue sur les peptides de liaison voir Liu *et al.* 2005) (figure I.17).

Des travaux étudient la répartition des gènes des polypeptides de liaison (Guan *et al.* 2007), des gènes des bras et du cœur des phycobilisomes (Six *et al.* 2007) grâce aux nombreux génomes cyanobactériens désormais disponibles. Il en ressort que la classification des cyanobactéries est toujours aussi difficile à cause de nombreux évènements de duplication, transfert et pertes de gènes qui ont été nécessaires aux cyanobactéries pour s'acclimater à leurs environnements notamment sous la pression sélective de la lumière.

La localisation des phycobilisomes (figure I.18) :

Les phycobilisomes forment des « granulations » à la surface des membranes thylacoïdales des cyanobactéries en accord avec leur fonction d'antenne collectrice d'énergie externe à la membrane photosynthétique. Ils sont souvent observés en rangées parallèles proches mais cette organisation pourrait être moins fréquente que ce qu'il est généralement admis (Gantt 1986; Vernotte 1990).

Une très bonne corrélation a été trouvée entre la distribution des phycobilisomes à la surface des membranes du thylacoïde et les complexes PSII dans les membranes (Neushul 1971; Lichtlé et Thomas 1976; Wollman 1979; Giddings *et al.* 1983; Staehelin 1986). L'hypothèse

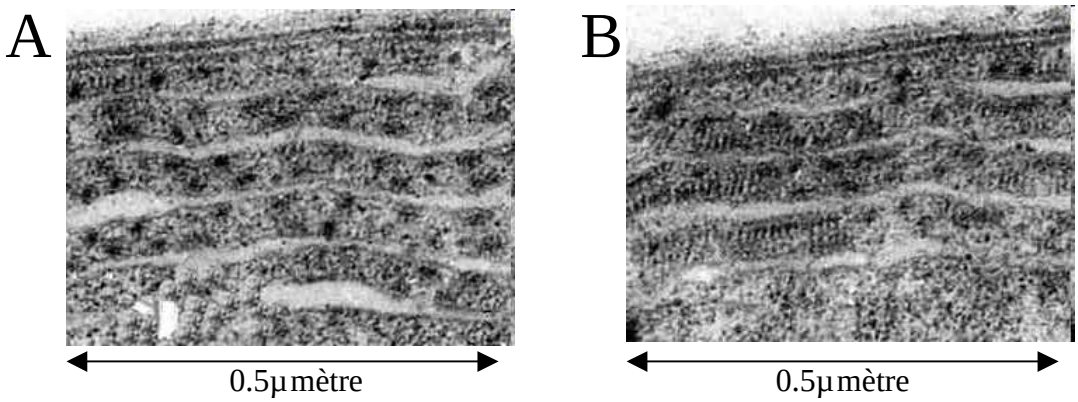


Figure I.18 : Détails des thylacoïdes périphériques de la cyanobactérie filamenteuse *Oscillatoria splendida*

Ces photographies (**A** et **B**) des thylacoïdes vus par miscroscopie électronique ont été prises par J-C Thomas.

Ces thylacoïdes sont isolés les uns par rapport aux autres. Ils portent à la surface de leurs membranes des phycobilisomes qui apparaissent sous forme de disques en coupe transversale (**A**) ou sous forme de baguettes en vue de profil (**B**).

de l'association structurale étroite entre les phycobilisomes et le PSII a été renforcée par le fait que les polypeptides du cœur du phycobilisome ont été retrouvés dans des préparations pures du PSII de cyanobactéries (Schatz et Witt 1984). D'autre part, des préparations PBS-PSII actives pour la production d'oxygène et le transfert d'énergie entre les deux complexes ont été isolées (Pakrasi et Sherman 1984). D'autres arguments ont été apportés par Kirilovsky *et al.* (Kirilovsky *et al.* 1983) qui ont démontré la réassociation de phycobilisomes isolés avec des préparations de thylacoïdes chez *Calothrix* PCC7601. Les préparations reconstituées étaient fonctionnelles pour le transfert d'énergie de la phycoérythrine à la chlorophylle centre du PSII et pour le transfert d'électrons du PSII. Kirilovsky et Ohad (Kirilovsky et Ohad 1986) ont ensuite montré l'assemblage fonctionnel de phycobilisomes avec des préparations PSII, mais pas avec des préparations PSI pour les cyanobactéries. Cependant, il a aussi été montré que les phycobilisomes peuvent transmettre de l'énergie au PSI (Mullineaux 1994).

Le transfert de l'énergie du sein du phycobilisome vers les photosystèmes

L'énergie lumineuse captée par les phycobiliprotéines est transférée à la chlorophylle *a* avec une efficacité proche de 99% d'après Glazer ((Glazer 1989). Les études des propriétés de fluorescence des phycobilisomes isolés ont démontré que les phycobiliprotéines constituent une chaîne de transfert de l'énergie comme décrit ci-dessous (pour revues : Glazer 1989; Sidler 1994; MacColl 2004) :

PE ou PEC → PC → APC → L_{CM} et/ou aux sous-unités $\alpha^{APC\text{-}B}$ et $\beta^{18.3}$

Les phycobilisomes collectent l'énergie très efficacement et présentent un maximum d'émission de fluorescence vers 680nm. La différence d'énergie entre les phycoérythrines et les phycocyanines entraîne un transfert d'énergie directionnel, tout comme l'environnement des chromophores au sein de ces phycobiliprotéines, les bilines donneuses étant à la périphérie et les bilines acceptrices vers le centre (Schirmer *et al.* 1986; Brejc *et al.* 1995 ; et pour revue : Glazer 1989) (figure I.19). L'influence des polypeptides de liaison contribue aussi au flux rapide directionnel. La structure et le transfert de l'énergie dans les cœurs des phycobilisomes ont été caractérisés plus récemment (pour revues : Sidler 1994; MacColl 1998; MacColl 2004). L'allophycocyanine se présente très majoritairement sous la forme de trimère $(\alpha^{APC}\beta^{APC})_3$ avec un maximum inhabituel d'absorption à 650nm et un épaulement à 620nm alors que le monomère a un maximum d'absorption à 615nm. Deux hypothèses sont encore débattues pour expliquer le maximum à 650nm portant sur le transfert de l'énergie au niveau des chromophores (pour revue : MacColl 2004). Dans la première, le maximum d'absorption est produit par un environnement protéique particulier pour trois des six

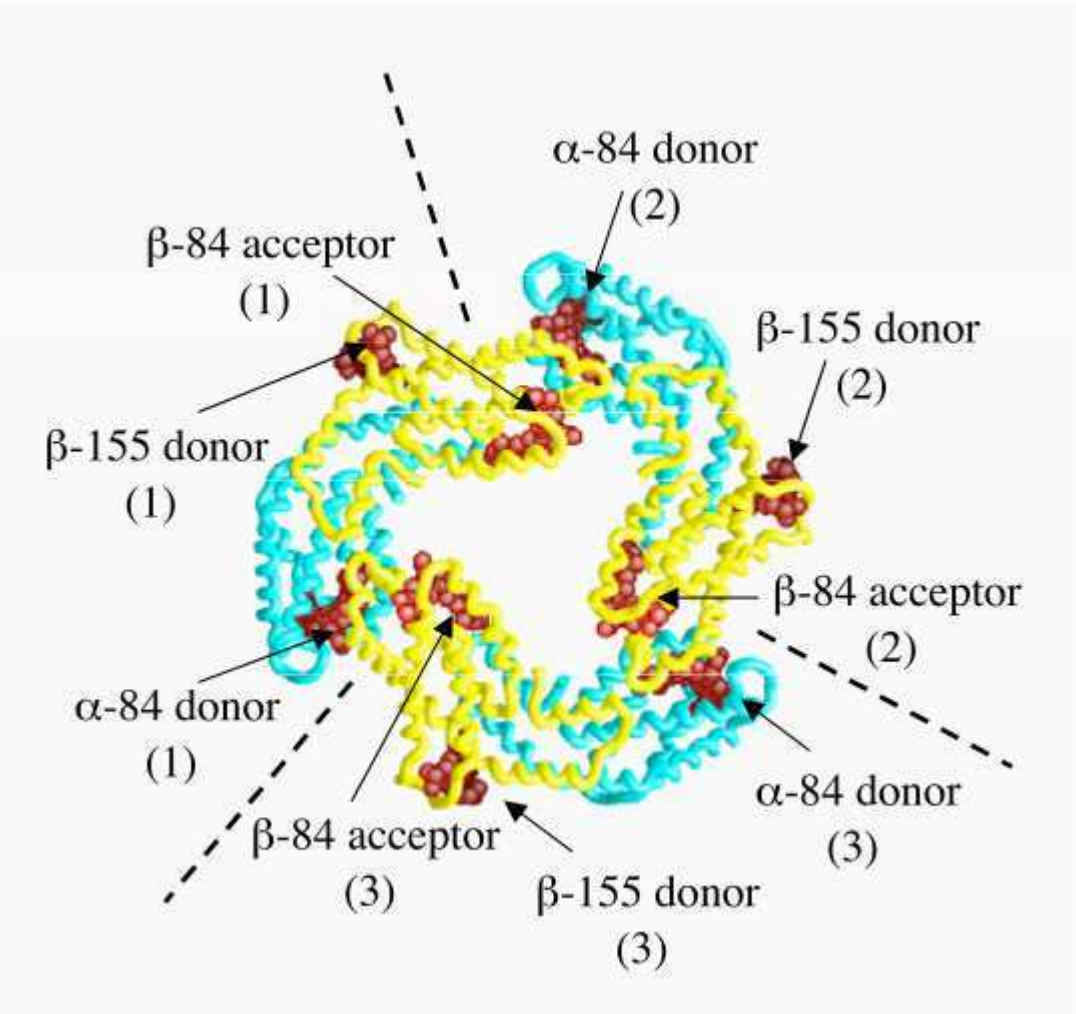


Figure I.19 : Modèle de la structure d'un trimère de phycocyanine avec ses phycocyanobilines donneurs et accepteurs d'énergie d'après Schirmer *et al.* (1986) et Brejc *et al.* (1995)

Les lignes pointillées indiquent les monomères et les flèches noires indiquent les chromophores (la sous-unité α de la phycocianine est en bleu, la sous-unité β est en jaune et les chromophores sont en rouge).

chromophores. Cet environnement cause le shift vers le rouge. Les 3 autres chromophores seraient dans un état plus excité et l'énergie serait transférée des chromophores à haute énergie vers ceux à basse énergie par transfert d'énergie de type Förster résonance selon le modèle donneur-accepteur (Murakami *et al.* 1981). Dans la deuxième théorie, il y a un fort couplage des excitons entre deux chromophores du trimère qui est proche de l'interface monomère-monomère (MacColl *et al.* 1980).

L'allophycocyanine transfère l'énergie à des sous-unités particulières, soit la sous-unité α^{APC-B}, soit la sous unité $\beta^{18.3}$, soit au peptide de liaison L_{CM} (figure I.17). Le L_{CM} et la sous-unité α^{APC-B} ont un seul chromophore avec une absorption plus vers le rouge, comparée aux autres allophycocyanines. Le L_{CM} est la plus grosse protéine des phycobilisomes et ses trois tailles possibles déterminent le type du cœur du phycobilisome : 70 à 75kDa, 92 à 99kDa et 115 à 128kDa pour les cœurs de 2, 3 et 5 cylindres, respectivement. La sous unité $\beta^{18.3}$ est moins caractérisée, son absorption est moins dans le rouge, comparée au L_{CM} et celle-ci pourrait servir d'intermédiaire entre les trimères d'allophycocyanine et le L_{CM} (Gindt *et al.* 1994). Le L_{CM} est un des accepteurs finaux des phycobilisomes, transférant environ 75% de l'énergie collectée par le phycobilisome à la chlorophylle *a* du PSII dans la membrane thylacoïdale (Redlinger et Gantt 1981). L'énergie des émetteurs terminaux est essentiellement transmise à la chlorophylle *a* du PSII (l'association des phycobilisomes a été mise en évidence sur le plan physique et fonctionnel, voir plus haut).

Les étapes individuelles du transfert d'énergie n'étant pas efficaces à 100%, une petite quantité de fluorescence, émanant des différents composés intermédiaires cités, peut être détectée (pour revue : Glazer 1989).

4. Les mécanismes liés à différentes quantités et qualités de lumière chez les plantes et les cyanobactéries

Dans la partie précédente, nous venons de voir que les antennes récoltent l'énergie pour les photosystèmes afin d'alimenter la photosynthèse en conditions d'éclairement normales (pour revue : Horton *et al.* 2008). En condition d'excès de lumière, trop d'énergie atteint les centres réactionnels et les chlorophylles sur-excitées contribuent à créer un stress oxydant nocif pour les cellules (Havaux et Niyogi 1999 et pour revue : Murata *et al.* 2007). L'excès de lumière qui atteint le centre réactionnel du PSII induit la formation de singulet d'oxygène, l'endommagement de la protéine D1 et du PSII ; ce phénomène est nommé photoinhibition (pour revues : Prasil *et al.* 1992; Aro *et al.* 1993; Murata *et al.* 2007; Vass et Aro 2007; Tyystjärvi 2008). Afin de limiter les dommages dus à l'excès lumineux, les cellules ont développé plusieurs stratégies. En plus du phénomène de photoinhibition, je décrirai deux mécanismes de photo-protection où (1) le transfert d'énergie des antennes vers les centres

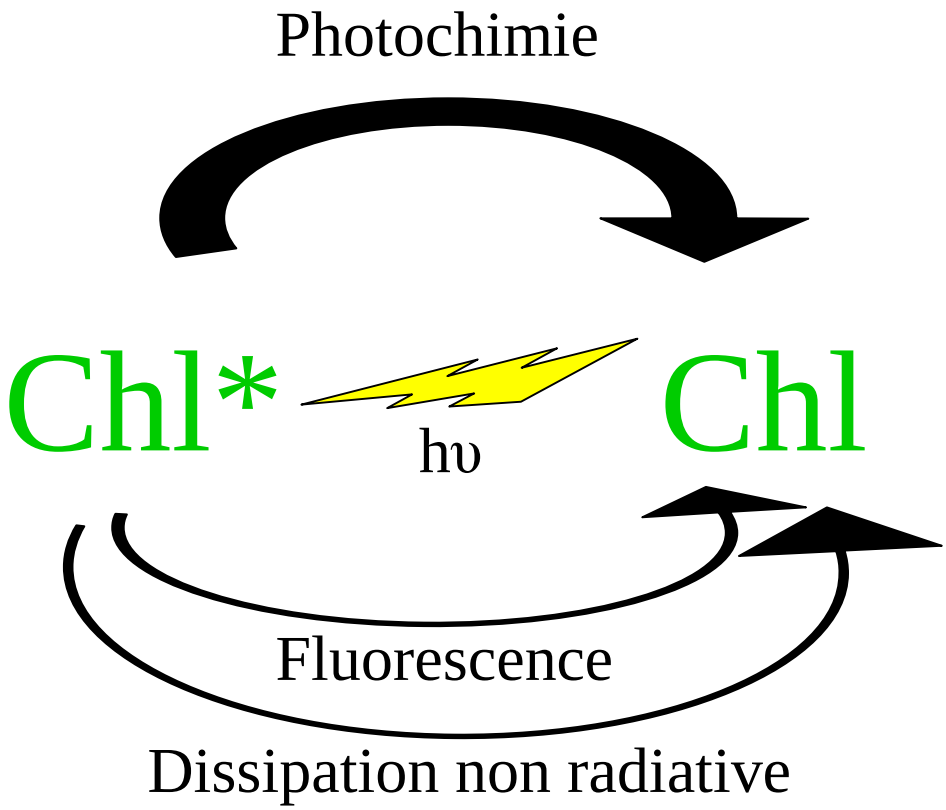


Figure I.20 : Les trois principales voies de désactivation de l'état excité de la chlorophylle
Chl = chlorophylle
hυ = énergie lumineuse

réactionnels est diminué sous une forte illumination ; ce mécanisme est différent dans les antennes LHC des plantes et les phycobilisomes des cyanobactéries ; et (2) où une ré-organisation de l'appareil photosynthétique a lieu en fonction de la qualité de l'éclairement (transitions d'état). Mais tout d'abord, je vais consacrer un paragraphe à l'étude de la photosynthèse grâce à la fluorescence car cet outil est indispensable aux mesures de ces mécanismes.

4.1 Etude de la photosynthèse grâce à la fluorescence

La fluorescence est un bon moyen d'étude des systèmes photosynthétiques car elle ne les endommage pas et reflète les évènements photochimiques. L'organisation fonctionnelle des pigments dans les plantes et les cyanobactéries conduit à un transfert efficace de l'énergie d'excitation. La fluorescence est émise essentiellement au niveau des dernières molécules de la voie de transfert de l'énergie d'excitation, à savoir les chlorophylles *a* chez les plantes, et les phycobilisomes et la chlorophylle *a* chez les cyanobactéries (pour revue : Krause et Weiss 1991). La durée de vie d'un exciton dure quelques nanosecondes. Il peut se désactiver de trois façons (1) par émission d'un photon de fluorescence, (2) par dissipation radiative (émission de chaleur) et (3) par photochimie (la voie la plus importante avec 90% de l'énergie absorbée) (figure I.20). La somme des trois voies de désactivation de l'énergie, photochimie + fluorescence + chaleur est constante selon le principe de conservation de l'énergie. Quand les excitons ne sont pas utilisés pour la photochimie, les deux autres voies prennent de l'importance. Cela se produit lorsque les centres réactionnels sont incapables de piéger un exciton, quand la chlorophylle est déjà « occupée » par un autre exciton ou quand son accepteur primaire est encore réduit. Les centres sont dits « fermés » : ils sont incapables de faire une nouvelle séparation de charges. Ainsi lorsque les centres sont fermés, le rendement de fluorescence augmente ; lorsque les centres sont ouverts, le rendement est minimal.
A température ambiante, la plupart de l'émission de fluorescence est due au PSII. Elle a un maximum à 685nm correspondant à une émission de la chlorophylle *a*. La contribution à la fluorescence du PSI se produit à 720nm, mais elle est normalement éteinte par le centre réactionnel (pour revue : Holzwarth 1986) sauf à très basse température (77°K). L'utilisation de la fluorescence chlorophyllienne pour l'étude du PSII est due au fait que son rendement dépend de l'état redox de l'accepteur quinonique Q_A (Duysens et Sweers 1963). Le rendement de fluorescence est bas (Fo) lorsque Q_A est oxydée (centres ouverts), tandis qu'il est maximal (Fm) lorsque Q_A est réduite (centres fermés). Fm' est la fluorescence maximale à la lumière (variable en fonction de l'intensité de celle-ci) et, Fm_d, la flurescence à l'obscurité. L'évolution de Fo à Fm est dénommée induction de la fluorescence et la différence Fm-Fo constitue la fluorescence variable (Fv) (figure MM.10).

La diminution de fluorescence liée à la photochimie est appelée « quenching » (ou déclin ou extinction) photochimique de fluorescence (pour revues : Krause et Weiss 1991; Campbell *et al.* 1998b; Maxwell et Johnson 2000). Le coefficient qui lui est associé, qP, représente la portion d'excitons capturés par les centres « ouverts » et convertis en énergie chimique par le PSII. Le rendement de fluorescence est aussi susceptible de diminuer sans que la photochimie soit modifiée. Plusieurs mécanismes contribuent à la production d'un tel quenching, dit non-photochimique (nommé NPQ « Non-Photochemical Quenching » ou qN). La détermination de ses composantes renseigne sur l'état fonctionnel de l'appareil photosynthétique, plus spécifiquement du PSII. Cependant, ce phénomène est complexe et les interprétations difficiles. Trois mécanismes majeurs contribuant à qN ont été identifiés (pour revues : Krause et Weiss 1991; Campbell *et al.* 1998b; Maxwell et Johnson 2000) :

$$qN = qI + qT + qE$$

avec

- qI : quenching de fluorescence attribué à la photoinhibition
- qT : quenching de fluorescence attribué aux transitions d'état
- qE (pour « Energy-dependent ») ou NPQ_f (« f » comme « fast) : quenching de fluorescence attribué au ΔpH chez les plantes et au mécanisme associé à l'OCP chez les cyanobactéries (voir plus loin dans l'introduction)

4.2 La photoinhibition

L'exposition des organismes photosynthétiques à une forte lumière inhibe l'activité du PSII, ce phénomène est nommé photoinhibition. Ces organismes sont capables de surmonter les effets toxiques de la lumière grâce à une réparation rapide et efficace du PSII. La dégradation et la synthèse enzymatique de la protéine D1, la protéine la plus endommagée sous fort éclairement, sont un point clé du mécanisme (pour revues : Aro *et al.* 1993; Murata *et al.* 2007; Vass et Aro 2007; Tyystjärvi 2008). L'intensité de la photoinhibition dépend de l'équilibre entre les dommages dus à la lumière et leur réparation. Pour analyser le mécanisme de la photoinhibition en détail, il est essentiel de déterminer le taux de dommage et le taux de réparation séparément. Pour séparer la mesure les dommages et de la réparation, des inhibiteurs de la synthèse protéique sont utilisés.

La photoinhibition est étudiée depuis plus de 50 ans (Kok 1956). Cependant, aucun consensus sur les mécanismes moléculaires n'a été atteint. Dans la théorie la plus acceptée

pour le mécanisme moléculaire de la photoinhibition, les dommages liés à l'excès de lumière sont provoqués par des espèces très réactives contenant de l'oxygène (ROS). Une réduction excessive de la chaîne de transport d'électrons et du PSII qui a lieu sous forte lumière, augmente la quantité des recombinaisons des charges, qui produit des triplets de chlorophylle qui peuvent réagir avec l'O_2 et former des singulets d'oxygène qui endommagent le photosystème (Vass *et al.* 1992; Keren *et al.* 1997). Les groupes de Tyystjärvi et Murata (pour revues : Murata *et al.* 2007) proposent un autre mécanisme, où les dommages sont initiés par les effets directs de la lumière sur l'OEC (« Oxygen-Evolving Complex »). Des études récentes ont démontré que les processus de réparation du PSII sont aussi sensibles au stress environnemental (pour revues : Murata *et al.* 2007; Tyystjärvi 2008) et le groupe de Murata a proposé que les ROS inhibent la réparation du PSII endommagé en supprimant la synthèse protéique *de novo* mais n'affectent pas l'endommagement du PSII.

4.3 Les transitions d'état : un phénomène de photo-adaptation

L'absorption de la lumière à certaines longueurs d'onde conduit à l'excitation déséquilibrée des deux photosystèmes. Chez les plantes et algues vertes, au-dessous de 670nm environ, le PSII absorbe plus de lumière que ne le fait le PSI. Aux plus grandes longueurs d'onde, l'absorption par le PSI devient prédominante. Cette situation est exagérée chez les cyanobactéries, le PSII recevant 80 à 90% des radiations de la région de 470 à 660nm, absorbées très préférentiellement par les phycobiliprotéines. Par contre, au delà de 660nm et en dessous de 450nm, le PSI capte plus de lumière que le PSII. Les transitions d'état sont utilisées par les organismes photosynthétiques pour s'adapter à court terme aux changements de qualité de lumière en redistribuant l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes pour améliorer leur rendement (pour revues sur les transitions d'état chez les plantes : Allen et Forsberg 2001; Kargul et Barber 2008 ; et chez les cyanobactéries : Mullineaux et Emlyn-Jones 2005). Bien que leurs complexes de récolte de la lumière soient différents, les plantes et algues vertes, ainsi que les cyanobactéries ont des transitions d'état.

Les transitions d'état chez les plantes et algues vertes

Les transitions d'état impliquent une association réversible d'un pool mobile de LHCIIb soit avec le PSII (« state 1 » = état 1) soit avec le PSI (« state 2 » = état 2) (Bennett 1977; Allen *et al.* 1981 ; et pour revues : Haldrup *et al.* 2001; Wollman 2001; Allen 2003). Quand l'excitation du PSII est favorisée, et sous des conditions de lumière faible, le pool mobile de LHCIIb est phosphorylé et se détache du PSII et s'attache au PSI (état 2). A l'inverse quand l'excitation du PSI est favorisée, et sous illumination forte, le LHCIIb est déphosphorylé et retourne s'accrocher au PSII (état 1). Le mouvement est gouverné par la protéine kinase STN7 du thylacoïde (Bellafiore *et al.* 2005). La réduction du pool de

plastoquinone et la liaison du plastoquinol au niveau du site Qo du cytochrome b_6f sont nécessaires pour induire la phosphorylation de LHCIIb (Rintamaki *et al.* 2000). Le fait que le LCHIIb phosphorylé s'attache au PSI est encore débattu (Zhang et Scheller 2004; Kargul *et al.* 2005). La phosphorylation de CP29 (Kargul *et al.* 2005) et de TSP9 (une nouvelle protéine située dans la membrane thylacoïdale) (Carlberg *et al.* 2003; Hansson *et al.* 2007) pourrait aussi jouer un rôle dans la distribution du LCHIIb entre le PSI et le PSII.

Le pool mobile de LHCIIb est moins important chez les plantes supérieures (15-20%) que chez les algues vertes (80%) (Delosme *et al.* 1996 et pour revue : Allen 1992), mais les transitions d'état fonctionnent de la même façon dans ces organismes contenant du LHCIIb (Vallon *et al.* 1991). Dans le contexte des algues vertes, il a été suggéré que les transitions d'état pouvaient jouer un rôle de protection contre la photoinhibition (Finazzi *et al.* 2001). Il a aussi été montré chez *Chlamydomonas* que la transition à l'état 2 induit plus de transfert d'électrons cyclique (Finazzi *et al.* 1999; Fleischmann *et al.* 1999; Finazzi *et al.* 2005 ; et pour revue : Wollman 2001) (voir plus haut dans l'introduction la partie 2.2). De plus, selon les conditions de culture chez *Chlamydomonas*, la plupart du quenching de fluorescence est dû soit aux transitions d'état (Finazzi *et al.* 2006), soit au quenching de fluorescence induit par un ΔpH (qE, voir partie 4.4) (Niyogi *et al.* 1997a; Niyogi *et al.* 1997b) quand la capacité de photosynthèse est inhibée. Les algues vertes, comme *Chlamydomonas*, semblent donc avoir évolué dans un environnement où la régulation de l'activité des deux photosystèmes était vitale (Finazzi *et al.* 2006).

Les transitions d'état chez les cyanobactéries

Comme chez les plantes, les transitions d'état chez les cyanobactéries semblent être déclenchées par quelque chose qui est en équilibre redox avec la plastoquinone (Mullineaux et Allen 1990). Cependant le mécanisme biochimique des transitions d'état est encore inconnu et aucun gène homologue à celui de la protéine STN7, la protéine kinase qui gouverne les transitions d'état chez les plantes, n'a été retrouvé chez les cyanobactéries.

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer les transitions d'état chez les cyanobactéries. L'un était basé sur l'idée de phycobilisomes mobiles qui changent leur association avec le PSI et le PSII (Allen et Holmes 1986). Parmi les articles des 15 dernières années qui étayent cette théorie, il y a Mullineaux *et al.* (1994) et Joshua *et al.* (2005). Joshua *et al*. (2005) ont proposé un modèle « d'équilibre dynamique » des transitions d'état dans lequel les phycobilisomes mobiles changent leur affinité pour le PSII et le PSI. L'autre mécanisme proposé est basé sur un « débordement » (théorie du « spillover » en anglais) de l'énergie provenant des chlorophylles *a* du PSII vers celles du PSI (Biggins et Bruce 1989; Bruce *et al.* 1989; Vernotte 1990; Rouag et Dominy 1994). Dans ce sens, van Thor *et al.* (1998) ont proposé que les transitions d'état changent la distribution de

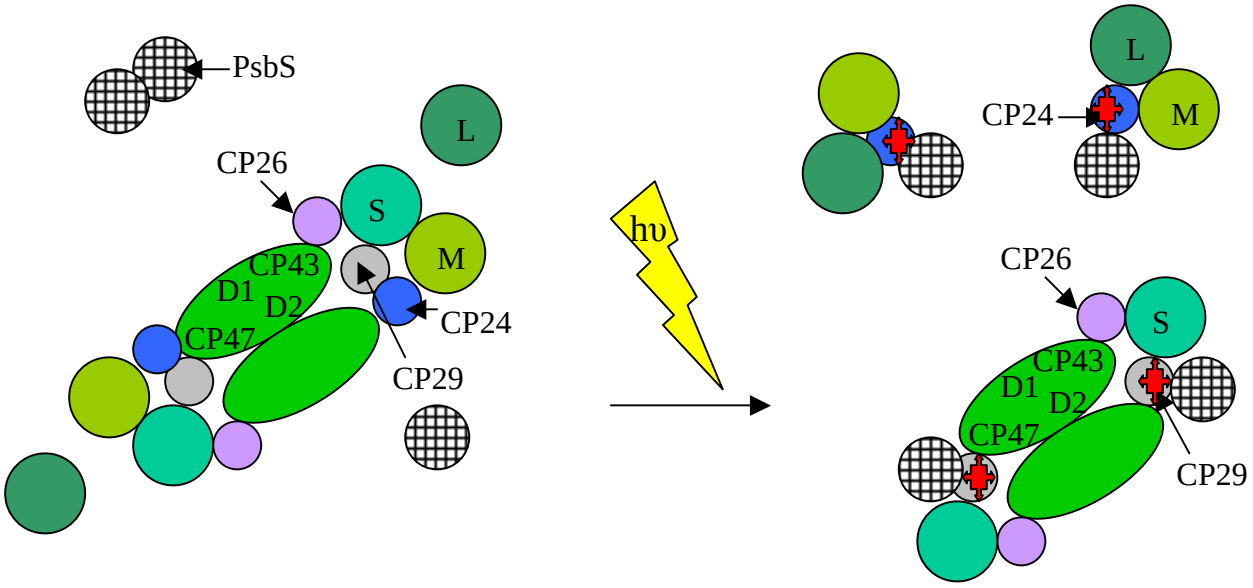
l'énergie absorbée par la chlorophylle. McConnel *et al.* (2002) ont proposé un modèle qui combine d'une part la régulation du transfert direct de l'énergie à partir du cœur des phycobilisomes vers le PSI et d'autre part la régulation du « débordement » de l'énergie d'excitation à partir de l'un des complexes du PSII, de CP47 ou du PSI.
La génération de mutants déficients en transitions d'état a conduit à l'identification d'un gène (*rpa*C, pour « Regulator of Phycobilisome Association C ») chez *Synechocystis* qui est indispensable pour que les cellules réalisent les transitions d'état (Emlyn-Jones *et al.* 1999). La protéine RpaC de 9kDa semble contenir 2 hélices α trans-membranaires et ne présente aucun motif structurel et fonctionnel connu. Ceci n'a donné aucun indice sur le mécanisme biochimique des transitions d'état chez les cyanobactéries. Hihara *et al.* (2001) ont montré que *rpa*C est préférentiellement exprimé à des intensités de lumière basse. *Rpa*C n'a pas d'homologue chez les plantes et semble être présente chez les écotypes de *Prochlococcus* adaptés aux basses intensités de lumière. Ces données, ainsi que l'étude du mutant *rpa*C$^-$ qui pousse moins bien à faible lumière (Emlyn-Jones *et al.* 1999) et la présence d'autres gènes nommés *rpa*A et *rpa*B chez *Synechocystis* dont les produits sont impliqués dans la régulation des transitions d'état (Ashby et Mullineaux 1999) indiquent que les transitions d'état chez les cyanobactéries sont physiologiquement importantes plutôt pour l'adaptation aux faibles intensités lumineuses.

4.4 Le mécanisme de quenching non-photochimique qE : un mécanisme de photo-protection

Quand la lumière est "trop" intense, un mécanisme de protection se met en place, évacuant l'excès d'énergie lumineuse sous forme de chaleur pour limiter la formation de triplets de chlorophylle (^{3}Chl*) et de singlets d'oxygène ($^1O_2$) qui causerait un stress oxydant destructeur. Sous une forte lumière, les LHCIIs et les phycobilisomes sont associés à la dissipation de l'excès d'énergie par un mécanisme de quenching de fluorescence non-photochimique rapide nommé qE. La transmission de l'énergie d'excitation vers les centres réactionnels est ainsi diminuée (pour revues sur ce mécanisme chez les plantes : Holt *et al.* 2004; Horton *et al.* 2008 ; et chez les cyanobactéries : Kirilovsky 2007; Bailey et Grossman 2008; Karapetyan 2008).

Chez les plantes

Chez les plantes et algues vertes, qE peut dé-exciter plus de 80% des ^{1}Chl* (Demmig-Adams *et al.* 1996; Bassi et Caffarri 2000; Li *et al.* 2000). Une forte lumière induit un bas pH (pH~5) dans le lumen du thylacoïde. Ce bas pH induit différents processus : la protéine PsbS est protonée, un quenching de fluorescence rapide qE a lieu, il y a un changement de l'absorbance à 535nm (ΔA_{535}) et le cycle des xanthophylles est activé (figure I.21 et I.22). Le



Complexe $C_2S_2M_2L_x$ en conditions de lumière basse

Complexe C_2S_2 + complexes CP24/M/L en conditions de lumière forte

Figure I.21 : Schéma du mécanisme possible de qE dépendant de PsbS dans le PSII des plantes vertes inspiré de Betterle *et al*. (2009)

A basse intensité de lumière, le supercomplexe est assemblé ($C_2S_2M_2L_x$) et l'antenne du PSII a sa taille maximale. A forte intensité de lumière, le complexe se dissocie. Il est proposé ici que le complexe C_2S_2 se sépare des complexes CP24/LHCII-M/LHCII-L qui migrent alors vers le grana ou la périphérie. Lors de la dissociation du supercomplexe sous forte lumière, des sites de quenching (en rouge) se forment dans l'antenne du PSII. Il est proposé ici que ces sites sont localisés au niveau de CP24 et CP29, et qu'ils sont formés grâce à l'intéraction de ces antennes monomériques avec PsbS. Les ellipses vertes contiennent le centre réactionnel et les antennes internes du PSII (CP43, CP47, D1 et D2). Les gros ronds verts sont les antennes externes constituées des trimères LHCII-S, LHCII-M et LHCII-L, fortement (S), moyennement (M) et faiblement (L) liées aux LHCIIb mineures, respectivement. CP24 (bleu), CP26 (violet) et CP29 (gris) sont les antennes externes monomériques. PsbS est représentée en blanc à carreau. hυ correspond à l'énergie lumineuse.

changement de l'absorbance à 535nm (ΔA_{535}) est relié à la zéaxanthine et à PsbS (Gilmore 1997; Aspinall-O'Dea *et al.* 2002). Dans le cycle des xanthophylles, la violaxanthine dé-époxidase (VDE) est activée et déclenche la conversion de la violaxanthine en zéaxanthine (Demmig-Adams 1990; Niyogi *et al.* 1997a). Une des hypothèses du mécanisme est que les changements dans la structure des protéines Lhc sont importants pour qE (Demmig-Adams et Adams 2006 et pour revues : Ruban *et al.* 2007; Horton *et al.* 2008). Ce phénomène serait déclenché par la protonation de la protéine PsbS (Li *et al.* 2000 ; et pour revue : Niyogi *et al.* 2005), qui irait interagir avec les LHCIIs du PSII et probablement induire un changement conformationnel (Bonente *et al.* 2008, et pour revue : Horton *et al.* 2008).

Le rôle exact de PsbS n'a pas encore été clarifié. PsbS est une protéine de 22kDa de la superfamille les LHC (pour revue : Niyogi *et al.* 2005). Le fait qu'elle lie des pigments est débattu ; Aspinall-O'Dea *et al*. (2002) ont montré que deux molécules de zéaxanthine sont liées par monomère de PsbS mais ces observations n'ont pas pu être confirmées par d'autres groupes. Récemment Betterle *et al.* (Betterle *et al.* 2009) ont proposé un modèle où, en conditions d'éclairement normales, l'antenne du PSII a une taille maximale ($C_2S_2M_2L_x$) qui se dissocie en deux complexes (C_2S_2 + CP24/M/L) sous forte lumière (figure I.21). CP24 et CP29 seraient alors accessibles à PsbS quand ces deux complexes sont formés et seraient le locus de qE responsable de la dissipation d'énergie *in vivo* (figure I.21). Horton *et al*. (2008) ont aussi proposé un modèle basé sur un « locus qE » constitué par le LHCII : les trimères LHCIIb, Lhcb4 (CP29), Lhcb5 (CP26) et Lhcb6 (CP24) (figure I.22). Dans ce modèle, PsbS facilite les changements conformationnels des LHCIIs. Ce modèle intègre les cycles des xanthophylles, la formation du ΔpH, la cinétique rapide (qE) et lente (qI) du quenching de fluorescence non-photochimique en proposant 4 états conformationnels du LHCII créés par la protonation et dé-epoxidation (figure I.22A). Ce modèle a des limites notamment dans l'explication de la partie lente de la relaxation après une forte illumination, nommée qI dans le modèle (figure I.22B). Ce terme associé, peut-être à tort, à de la photoinhibition est aussi corrélé avec l'accumulation de zéaxanthine (Demmig *et al.* 1987) et pourrait dépendre de la régulation du cycle des xanthophylles (pour revue : Jahns *et al.* 2009).

En ce qui concerne le locus de transfert de l'énergie qui sera ensuite dissipée sous forme de chaleur lors de qE, il y a deux théories. Selon la première théorie, les changements conformationnels des LHCIIs permettent un réarrangement réversible des pigments, le LHCII passe alors d'une conformation qui récolte la lumière à une conformation qui dissipe l'énergie, régulant ainsi la quantité d'énergie d'excitation transmise au centre réactionnel. Le changement de conformation des LHCIIs induit apparemment un rapprochement de la lutéine 1 vers des chlorophylles spécifiques (voir figure I.14 pour l'organisation des pigments dans un monomère du LHCIIb majeur). Ce rapprochement devrait changer le niveau d'énergie de ces pigments d'une façon qui permet de retransmettre l'énergie d'excitation des chlorophylles

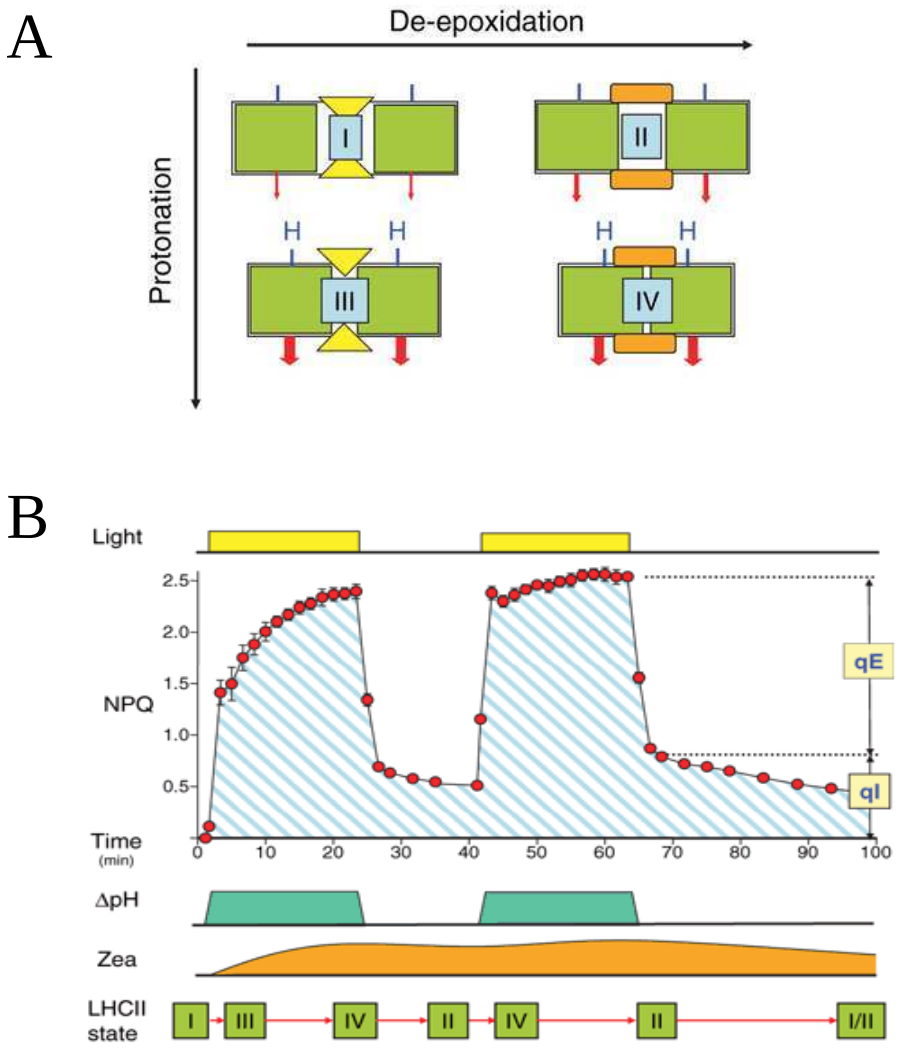


Figure I.22 : Cinétique et dépendance ΔpH du quenching qE chez les plantes proposées par le modèle de Horton *et al*. (2008)

A propose un modèle de qE avec quatre changements de la conformation allostérique. Les quatre états du LHCII (en vert) sont créés par la protonation/dé-epoxidation de la violaxanthine (en jaune) et de la zéaxanthine (en orange). Les flèches rouges indiquent l'intensité de la dissipation d'énergie.

B tente d'expliquer la cinétique de qE (aire bleue hachurée) pendant deux cycles de lumière (barres jaunes) et obscurité. Cette cinétique est en accord avec le modèle en 4 étapes de **A** et la dépendance au pH de la formation de qE selon le contenu de zeaxanthine. La formation du ΔpH (vert pâle), l'accumulation de zéaxanthine (orange) et les états prédits de l'antenne LCHII (vert) sont aussi montrés en fonction du temps.

vers la lutéine 1 avec un niveau d'énergie bas (en accord avec le modèle de Horton *et al*.) (Pascal *et al.* 2005; Ruban *et al.* 2007). Selon la deuxième théorie proposée, la modification de la conformation de la protéine Lhcb4 (CP29) est supposée changer la distance et/ou l'orientation d'une molécule de zéaxanthine dans le site L2 par rapport à une paire de chlorophylles, formant ainsi un trimère fortement couplé (Ahn *et al.* 2008). Ahn *et al.* 2008 suggèrent que le quenching non radiatif de l'énergie d'excitation (^{1}Chl*) se passe via des transferts d'énergie d'excitation des chlorophylles vers un hétérodimère chl-zea suivi d'une formation très rapide d'un cation Zea^+.

Ce sujet concernant les mécanismes de qE chez les plantes est encore très polémique et de nouvelles données relancent constamment les débats (pour cette année : (Avenson *et al.* 2009; Betterle *et al.* 2009; Johnson *et al.* 2009).

Chez les cyanobactéries

Ni le gène de l'enzyme clé associée au cycle des xanthophylles (la violaxanthine dé-epoxidase, VDE), ni celui de PsbS, ni les gènes des LHC ne sont retrouvés dans le génome des cyanobactéries. Et les diminutions de fluorescence apparentes du PSII observées chez les cyanobactéries ne sont pas sensibles au ΔpH. C'est pourquoi, jusqu'à récemment, il était supposé qu'il n'y avait pas de mécanisme qE équivalent à celui des plantes chez les cyanobactéries (pour revue : Campbell *et al.* 1998b). Dans les dix dernières années, l'existence de mécanismes de photo-protection impliquant une dissipation de l'énergie absorbée sous forme de chaleur a cependant été démontrée chez les cyanobactéries. Ces mécanismes de dissipation de l'énergie impliquent soit la protéine IsiA (Yeremenko *et al.* 2004; Ihalainen *et al.* 2005), soit les HLIPs (Havaux *et al.* 2003), soit les phycobilisomes (Rakhimberdieva *et al.* 2004; Scott *et al.* 2006; Wilson *et al.* 2006). Contrairement aux autres mécanismes, celui associé aux phycobilisomes est induit par un excès de lumière (blanche ou bleue-verte), il rappelle le mécanisme qE observé chez les plantes. Mon doctorat porte sur l'étude de ce mécanisme que je nommerai qE_{cya} dès à présent (pour revues : Kirilovsky 2007; Bailey et Grossman 2008; Karapetyan 2008).

Au commencement de mon doctorat, le mécanisme qE_{cya} avait été caractérisé chez *Synechocystis* (El Bissati *et al.* 2000; Rakhimberdieva *et al.* 2004; Scott *et al.* 2006; Wilson *et al.* 2006). El Bissati *et al*. (2000) ont été les premiers à démontrer chez une cyanobactérie l'existence d'un mécanisme de quenching de fluorescence qui n'est ni associé à la photoinhibition, ni aux transitions d'état. Ils ont montré que ce mécanisme est induit par la lumière bleue-verte chez *Synechocystis* et ont proposé que la diminution de fluorescence observée était associée à un mécanisme de photo-protection qui diminue le transfert d'énergie entre les phycobilisomes et le PSII (figure I.23). Rakhimberdieva *et al*. (2004) ont confirmé que qE_{cya} est associé aux phycobilisomes. De plus, ils ont remarqué que le spectre d'action du mécanisme de qE_{cya} correspond au spectre d'absorbance d'un

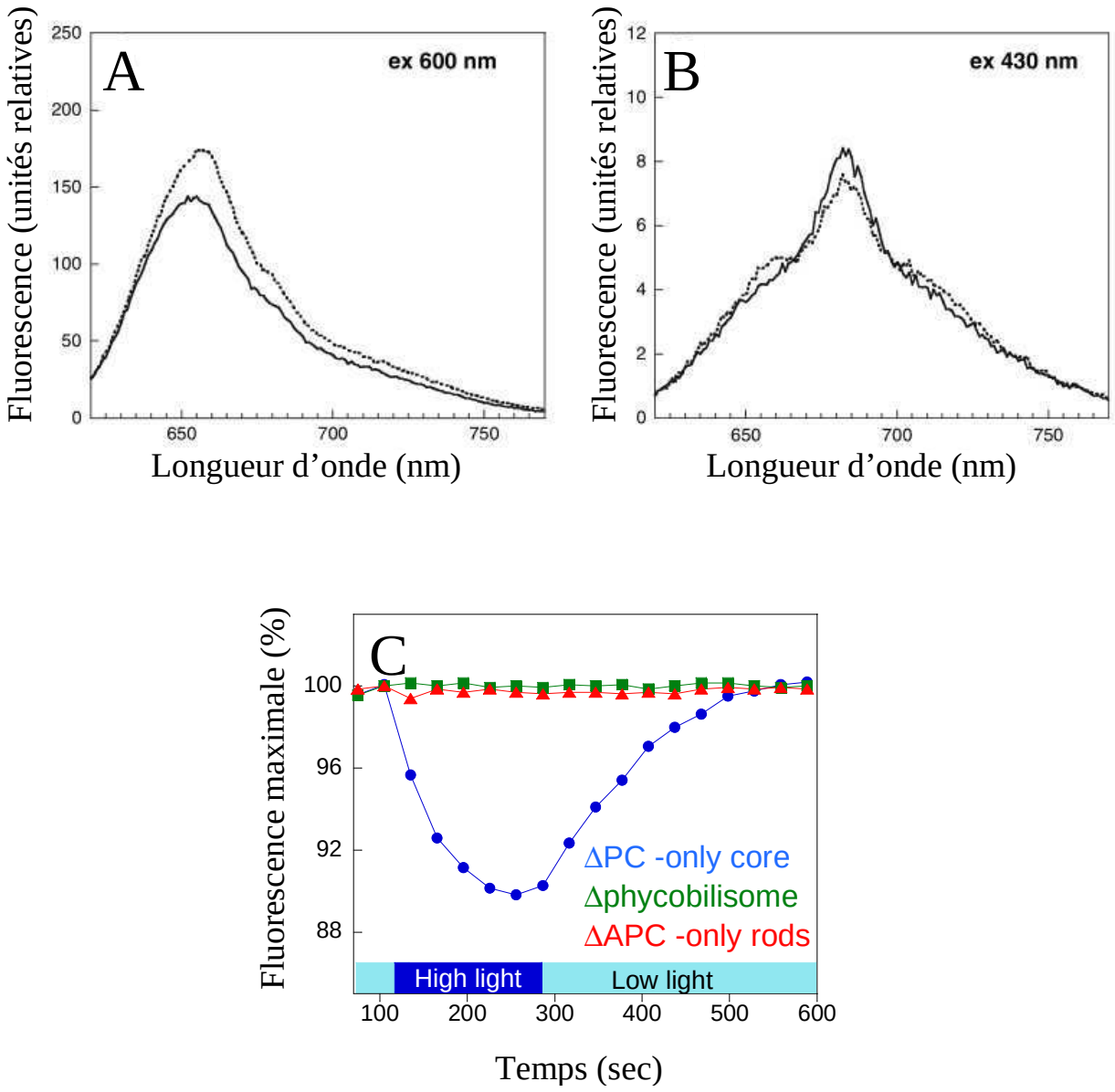


Figure I.23 : Le mécanisme qE_{cya} induit par la lumière bleue implique les phycobilisomes d'après Wilson *et al*. (2006)

A et **B** montrent les spectres de fluorescence à température ambiante de cellules du sauvage de *Synechocystis* adaptées à l'obscurité (trait pointillé) et après 5 minutes d'illumination avec une forte lumière bleue-verte (trait plein). L'excitation des phycobilisomes a été réalisée à 600nm **(A)** et celle de la chlorophylle à 430nm **(B).** Ces données indiquent que le quenching de fluorescence du mécanisme qEcya a lieu au niveau des phycobilisomes et non de la chlorophylle. **C** montre les mesures du rendement de fluorescence (avec un fluorimètre PAM) de cellules d'un mutant sans phycocyanine (ronds bleus), d'un mutant sans allophycocyanine (triangles oranges) et d'un mutant sans phycobilisomes (carrés verts) de *Synechocystis*. Les cellules ont été adaptées à l'obscurité, puis illuminées successivement avec une lumière bleue-verte de basse intensité (de 400 à 500nm, 80 µmol photon.m^{-2}.s^{-1}) et de forte intensité (740 µmol photon.m^{-2}.s^{-1}). Au moins les cœurs des phycobilisomes sont nécessaires pour réaliser qE_{cya}.

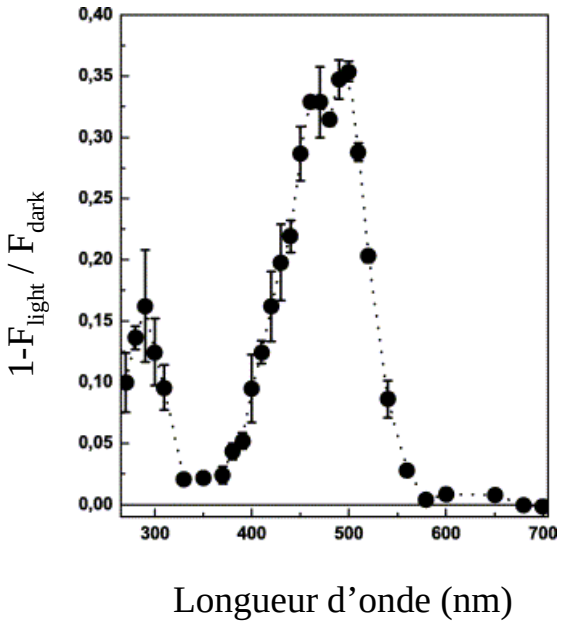


Figure I.24 : Le spectre d'action du mécanisme qE_{cya} correspond au spectre d'absorbance d'un caroténoïde chez *Synechocystis* d'après Rakhimberdieva *et al*. (2004)
La figure montre le spectre d'action du quenching de fluorescence de cellules mutantes *psbDI/C/DII-*. Ces cellules n'ont pas de PSII car les deux copies du gène de la protéine D2 y sont absentes. Les valeurs montrées sont une moyenne de 3-5 mesures, les barres d'erreur montrent l'écart type.

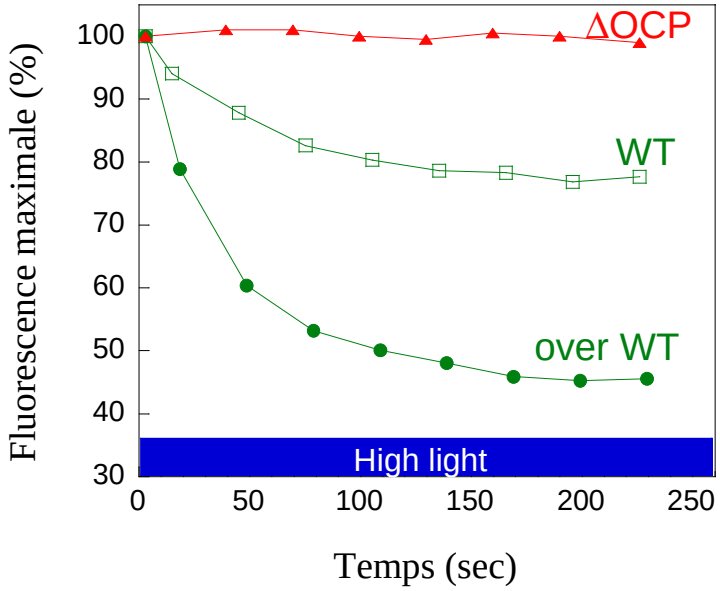


Figure I.25 : Le mécanisme qE_{cya} induit par la lumière bleue implique l'Orange Carotenoid Protein (OCP)

La figure montre les mesures du rendement de fluorescence avec un fluorimètre PAM de cellules du sauvage (WT) (carrés vides verts), d'un mutant surexprimant l'OCP (ronds pleins verts) et d'un mutant ΔOCP (triangles pleins oranges) de *Synechocystis* (Wilson *et al*. 2006 et Wilson *et al*. 2008). Les cellules ont été adaptées à une lumière bleue-verte de basse intensité (de 400 à 500nm, 80 µmol photon.m^{-2}.s^{-1}), puis illuminées avec une lumière de forte intensité (740 µmol photon.m^{-2}.s^{-1}). qE_{cya} n'est pas observé dans le mutant ΔOCP.

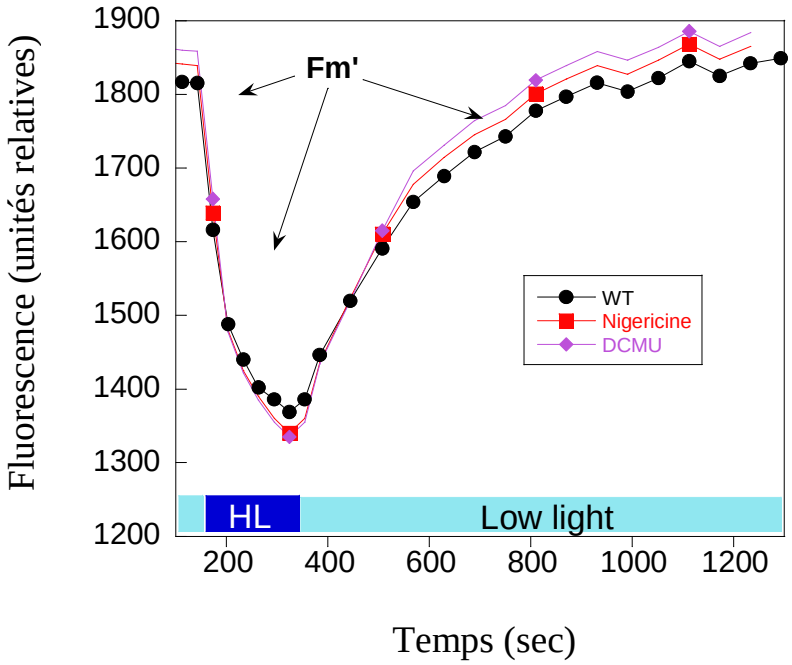


Figure I.26 : Le mécanisme qE_{cya} n'est pas dépendant du ΔpH ni de l'état redox du pool de plastoquinones chez *Synechocystis* d'après Wilson *et al*. (2006)

Le rendement de fluorescence a été mesuré avec un fluorimètre PAM. Les cellules du sauvage de *Synechocystis* ont préalablement été adaptées à une basse intensité de lumière bleue-verte (état de haute fluorescence) en présence de DCMU (losanges violets), de nigéricine (carrés rouges), et sans addition (ronds noirs). Ces cellules ont été illuminées pendant 200 secondes avec une forte lumière bleue-verte (740 µmol photon.m^{-2}.s^{-1}) pour induire l'état quenché et, ensuite, ré-illuminées avec une lumière bleue-verte faible (80 µmol photon.m^{-2}.s^{-1}) pour permettre la récupération de la fluorescence. Le DCMU inhibe le transfert d'énergie entre Q_A et Q_B du centre réactionnel du PSII et la nigéricine inhibe la formation d'un gradient de pH.

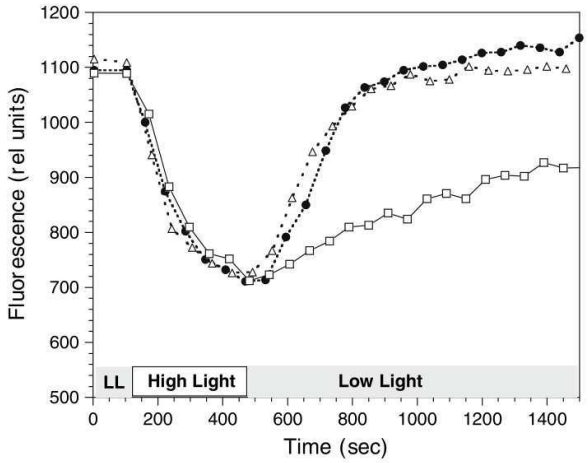


Figure I.27 : La récupération de fluorescence du mécanisme qE_{cya} est ralentie par la rigidité de la membrane du thylacoïde d'après Kirilovsky 2007

Les cellules du mutant *desA⁻/desD⁻* de *Synechocystis* (qui présentent une fluidité modifiée de la membrane d'après Tasaka *et al*. 1996) adaptées à une faible lumière bleue-verte ont été successivement illuminées avec une lumière bleue-verte à 440 µmol photon.m^{-2}.s^{-1} pour induire l'état quenché, puis avec une lumière bleue-verte faible à 20 µmol photon.m^{-2}.s^{-1} pour permettre la récupération de la fluorescence. Les modifications du rendement de fluorescence maximal (Fm') ont été mesurées avec un fluorimètre PAM. L'état quenché a été induit à 30°C (triangles) ou à 18°C (cercles et carrés) et la récupération de la fluorescence a été faite à 30°C (triangles et cercles) et à 18°C (carrés). A 18°C, les thylacoïdes de ce mutant sont en phase solide. De la lincomycine (300 µg.mL^{-1}), un inhibiteur de la synthèse protéique, était présente dans toutes les expériences pour montrer que les phénomènes observés ne sont pas dus à de la photoinhibition.

Caroténoïde (figure I.24). Wilson *et al.* (2006) ont ensuite démontré qu'une protéine soluble liant un caroténoïde (l'hydroxyechinénone), nommée l'Orange Carotenoid Protein (OCP), joue un rôle central dans ce mécanisme associé aux phycobilisomes (figure I.25). Ils ont prouvé que la lumière bleue-verte induit un déclin de fluorescence (qE_{cya}) provenant des phycobilisomes et du transfert de l'énergie des phycobilisomes vers les centres réactionnels. Ce mécanisme est induit en présence d'inhibiteurs de la formation du ΔpH (figure I.26), en présence d'inhibiteurs du transport d'électrons entre les quinones du PSII (figure I.26) et en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique (figure I.27). Ce mécanisme n'est donc pas relié à la photoinhibition ou à des transitions d'état.

5. État des lieux des connaissances sur l'OCP : description et fonction

5.1 Description et caractéristiques de l'OCP

L'Orange Carotenoid Protein (OCP) a été décrite pour la première fois par Holt et Krogman (Holt et Krogmann 1981), puis a été caractérisée chez *Arthrospira maxima*, *Microcystis aeroginosa* et *Synechocystis* (Wu et Krogmann 1997). L'OCP est une protéine de 35kDa, qui contient un seul caroténoïde lié de façon non-covalente à la protéine (Holt et Krogmann 1981; Wu et Krogmann 1997; Kerfeld 2004a ; et pour revue : Kerfeld 2004b). Ce caroténoïde est un 3'-hydroxyechinenone chez *Arthrospira maxima* et *Synechocystis* (Kerfeld *et al.* 2003; Wilson *et al.* 2006) (figure I.28C).
Il existe d'autres protéines à caroténoïdes moins bien caractérisées décrites par d'autres laboratoires (Masamoto *et al.* 1987; Diverse-Pierluissi et Krogmann 1988; Engle *et al.* 1991). Cependant leur séquence n'est pas proche de celle de l'OCP (Reddy *et al.* 1989; Kerfeld 2004a). Dans cette étude le terme «OCP» sera restreint aux protéines contenant un caroténoïde qui sont de véritables homologues de la protéine de 35kDa de *Synechocystis*.
Le gène codant pour l'OCP chez *Synechocystis* est *slr*1963 (Wu et Krogmann 1997). Des homologues du gène de l'OCP hautement conservés sont retrouvés dans beaucoup de génomes de cyanobactéries connus, mais semblent être absents chez la forme *Prochlorococcus* (Kerfeld 2004a ; et pour revue : Kerfeld 2004b).

Chez *Synechocystis*, l'OCP est exprimée de façon constitutive (Wilson *et al.* 2006). Cependant des conditions de stress peuvent augmenter le niveau de transcription du gène de l'OCP (pour revue : Kirilovsky 2007). En effet, avant le début de mon doctorat, des études ont montré que le niveau de transcription de l'OCP augmente dans des conditions de forte lumière (Hihara *et al.* 2001). Et des études de protéomique ont montré que l'OCP est produite en plus grandes quantités en réponse au stress salin (Fulda *et al.* 2006).

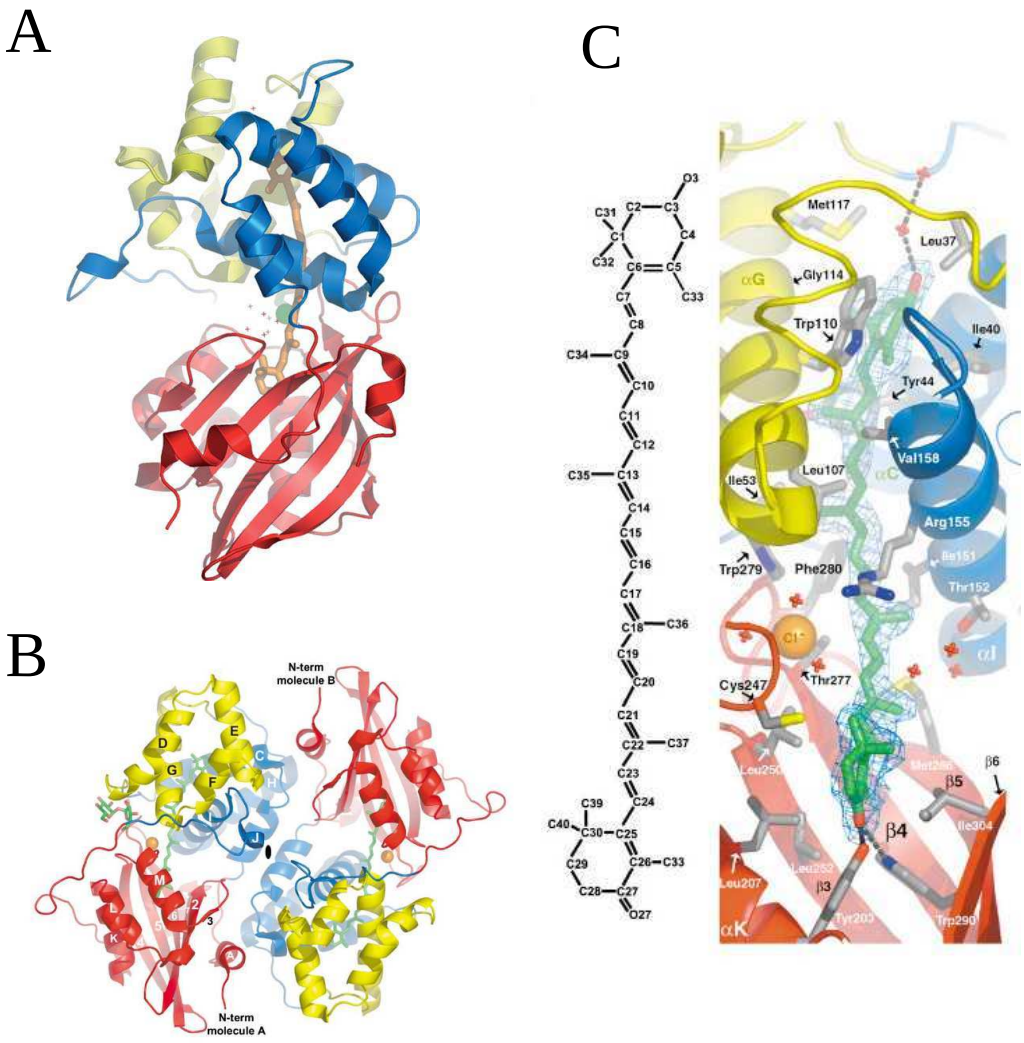


Figure I.28 : Structure de l'OCP chez *Arthrospira maxima* d'après Kerfeld *et al*. (2003)
La structure du monomère de l'OCP est représentée en **(A)**, celle du dimère asymétrique en **(B)** et le détail du 3'-hydroxyechinénone en **(C)** (avec, à gauche, le détail de sa structure chimique et, à droite, les résidus de la protéine qui l'entoure).
Le domaine N-terminal est en jaune et bleu et le domaine C-terminal est en rouge (NTF2-like). La molécule de 3'-hydroxyechinénone est en orange dans **(A)** et en vert dans **(B**) et **(C)**, son groupe cétone est vers le bas et son groupe hydroxy vers le haut. Les feuillets et hélices sont nommés comme dans Kerfled *et al*. 2003. Les petites croix indiquent la position des molécules d'eau et l'ion chloride est la sphère verte dans **(A)** et orange dans **(B)** et **(C)**. Une molécule de sucrose est associée (à gauche) avec l'une des molécules de l'homodimère dans **(B)**. La figure a été réalisée avec le logiciel Pymol (W.L. Delano 2002 disponible sur www.pymol.org).

La structure de l'OCP d'*Arthrospira maxima* a été déterminée à 2.1Å (Kerfeld *et al.* 2003) et plus récemment à 1.6Å chez *Synechocystis* (communication personnelle de C. Kerfeld) (figure I.28). L'OCP est constituée de deux domaines : un domaine N-terminal en α-hélice et un domaine C-terminal avec des α-hélices et feuillets β qui ressemble au repliement d'un facteur de transport nucléaire 2 (NTF-2). Le caroténoïde, une molécule de 3'-hydroxyechinénone à l'intérieur de la protéine, a une configuration « trans » et est en contact avec les deux domaines (Kerfeld *et al.* 2003). La partie cétone sur l'un des anneaux à l'extrémité du caroténoïde se trouve dans la « poche » hydrophobe de la partie homologue à un NTF-2 (en bas sur la figure I.28C) et la partie hydroxy de l'autre anneau du caroténoïde se situe en haut (sur la figure I.28C). L'OCP a été isolée sous forme de dimère, le dimère du cristal est asymétrique et seulement 3.4% de la surface du caroténoïde est accessible aux solvants dans le monomère (Kerfeld *et al.* 2003). La protéine a un large effet sur les caractéristiques spectroscopiques du caroténoïde. Dans les solvants organiques le 3'-hydroxyechinénone est jaune (λmax = 450nm), mais est orange dans l'OCP (λmax = 465 et 495nm) (Kerfeld *et al.* 2003; Polivka *et al.* 2005). Les conditions acides induisent la formation d'une forme rouge de l'OCP (Kerfeld 2004a) qui pourrait résulter d'un changement conformationel de la protéine qui expose une plus grande partie du caroténoïde au solvant.

Lors de la purification de l'OCP dans plusieurs cyanobactéries, une protéine rouge contenant un caroténoïde (nommée RCP), a aussi été isolée (Wu et Krogmann 1997; Kerfeld 2004a ; et pour revue : Kerfeld 2004b). Le séquençage de la partie N-terminale de l'OCP, ainsi que des analyses de spectroscopie de masse ont indiqué que la RCP pourrait être un fragment de protéolyse de 16kDa de l'OCP où le domaine C-terminal a été ôté. Ceci résulterait de l'exposition de presque la moitié du caroténoïde au solvant en accord avec les changements de spectre qui ont lieu quand on acidifie l'OCP (qui devient rouge). Cependant des analyses de spectrométrie de masse sur l'OCP rouge acidifiée ont montré qu'elle n'était pas protéolysée (Kerfeld 2004a ; et pour revue : Kerfeld 2004b).

L'utilisation d'un mutant de *Synechocystis* où l'OCP a été fusionnée avec la GFP (« Green Fluorescente Protein ») a permis de déterminer la localisation cellulaire de l'OCP (figure I.29). Les études des cellules de ce mutant marquées par immunogold au microscope électronique ont montré que la plupart des protéines fusionnées OCP-GFP sont présentes dans la région cytoplasmique inter-thylacoïdienne qui est le côté de la membrane où se trouvent les phycobilisomes (Wilson *et al.* 2006).

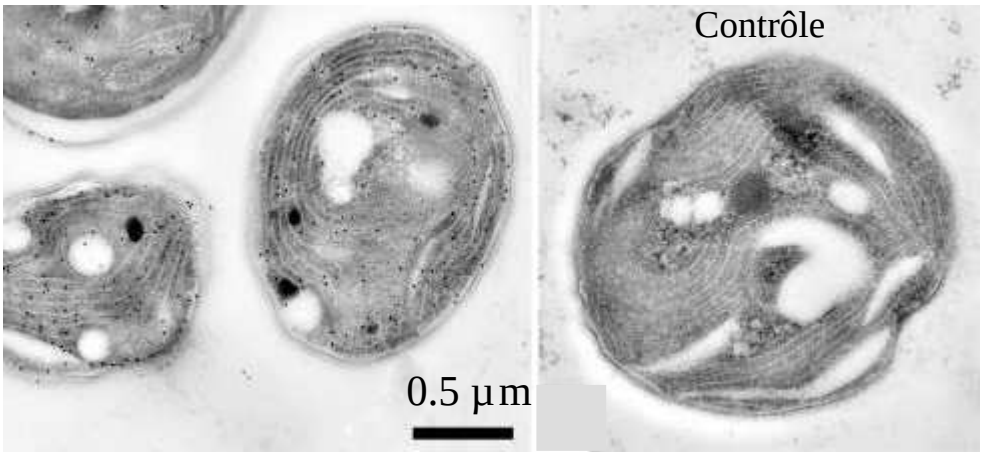


Figure I.29 : La localisation de l'OCP d'après Wilson *et al*. (2006)
Des cellules d'un mutant de *Synechocystis* où l'OCP a été fusionnée avec la GFP (« Green Fluorescente Protein ») ont été marquées par immunogold. A gauche, les cellules ont été marquées avec un anticorps polyclonal anti-GFP couplé avec des particules d'or de 10nm et, à droite, les anti-corps n'ont pas été ajoutés (contrôle).

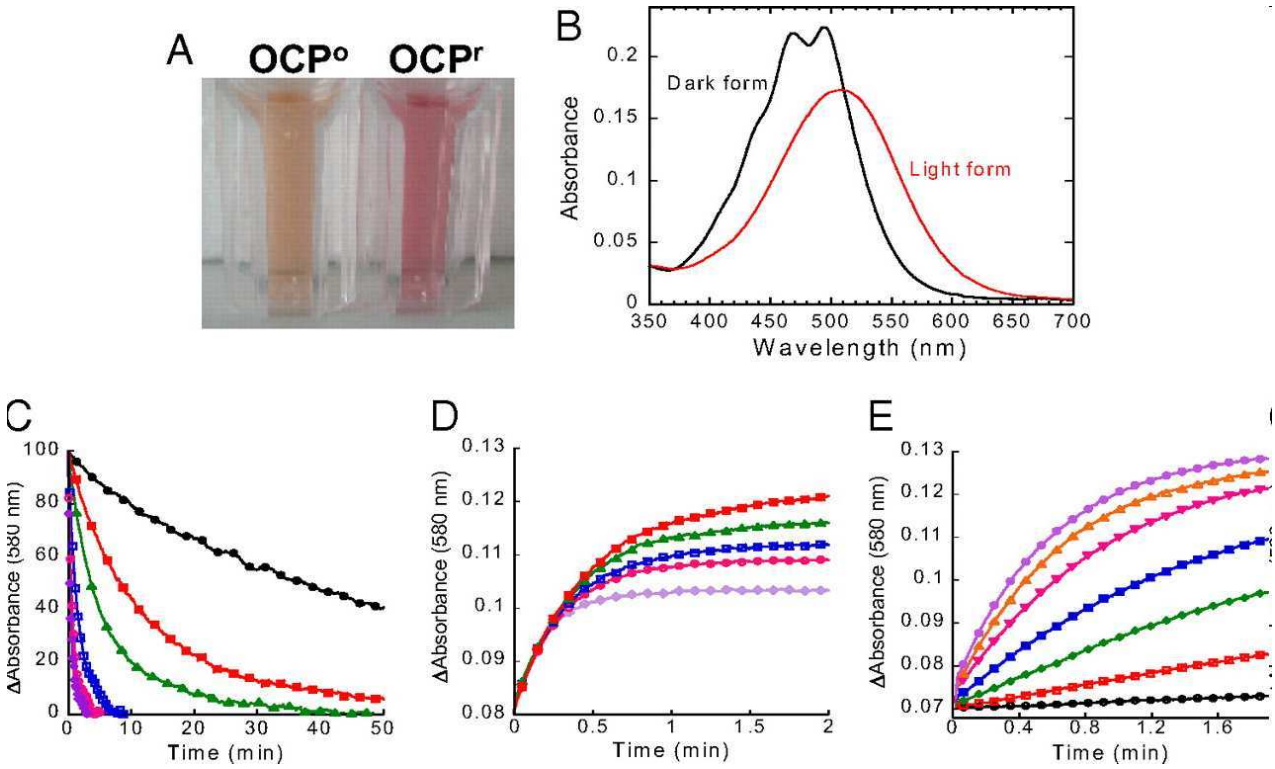


Figure I.30 : L'OCP isolée répond à la lumière bleue : photo-conversion et reconversion à l'obscurité d'après Wilson *et al.* (2008)

A est une photographie de la forme orange (OCP^o) et rouge (OCP^r) de l'OCP isolée. OCP^r a été obtenue après une illumination par une lumière bleue-verte de 740 µmol photon.m^{-2}.s^{-1} à 12°C pendant 2 min. **B** est le spectre d'absorbance de la forme orange (trait noir) et de la forme rouge illuminée (trait rouge). **C** montre la reconversion à l'obscurité de la forme rouge à la forme orange (diminution de l'absorbance à 580nm). **D** montre la photo-conversion de la forme orange à la forme rouge en utilisant une lumière bleue-verte de 350 µmol photon.m^{-2}.s^{-1} (augmentation de l'absorbance à 580nm) à différentes températures: 32°C (violet), 28°C (rose), 24°C (bleu), 19°C (vert), 15°C (rouge), et 11°C (noir). **E** montre l'accumulation d'OCP^r à 11°C sous différentes intensités lumineuses : 20 (noir), 50 (rouge), 120 (vert), 210 (bleu), 350 (rose), 740 (orange), et 1 200 (violet) µmol photon.m^{-2}.s^{-1} de lumière bleue-verte (400–550nm). La concentration de la protéine est de DO_{495nm}=0.2 dans les expériences.

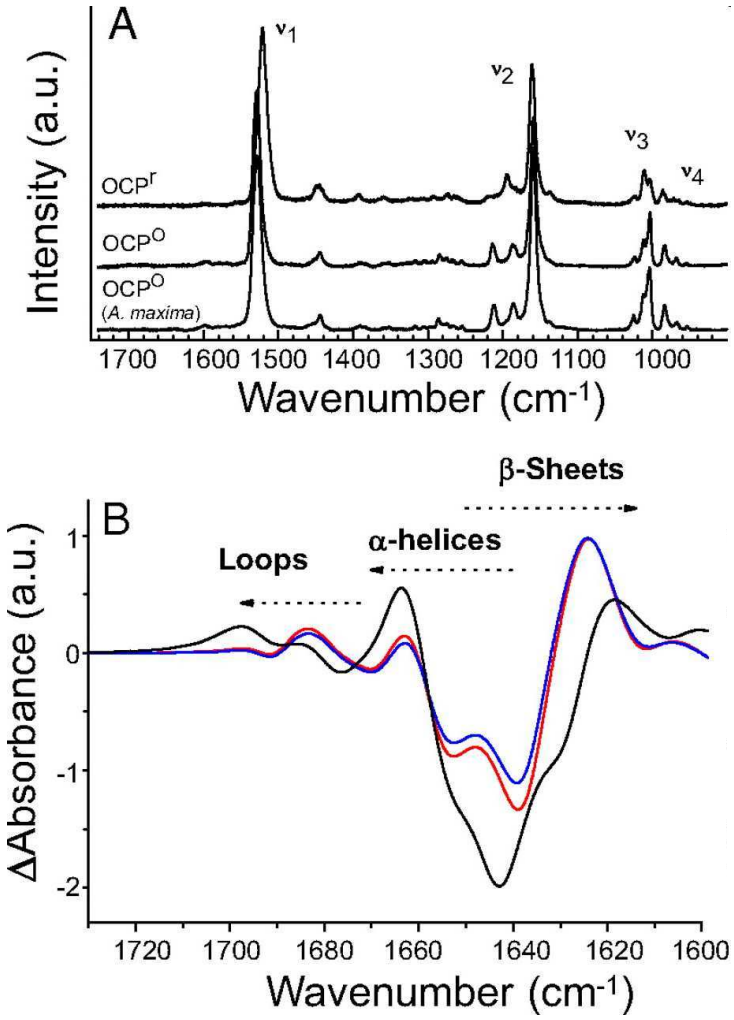


Figure I.31 : Changements dans le caroténoïde et la protéine sous illumination d'après Wilson *et al.* (2008)

A montre un spectre de Résonance Raman de l'OCP active rouge (OCP^r) et de l'OCP inactive orange (OCP^o) de *Synechocystis*, ainsi que de l'OCP^r *d'Arthrospira maxima* dans une gamme de 1 740 à 820 cm^{-1}. **B** montre un spectre « lumière moins obscurité » FTIR (light-induced Fourier Transform InfraRed) de l'OCP dans de l'H_2O (noir), dans de l'D_2O environ 5sec (trait rouge) ou 50sec (ligne bleue) après illumination avec une LED bleue dans la région du carbonyl entre 1 700 et 1 600cm^{-1} (région Amide I). Un shift vers le haut des vibrations Amide I des hélices α correspond à un affaiblissement des liaisons hydrogènes NH-C=O qui connectent les hélices. Ceci indique une structure en hélice moins rigide dans une partie importante de la forme OCP^r. Un shift vers le bas des vibrations Amide I des feuillets β correspond à un raccourcissement (donc une fortification) des liaisons hydrogènes NH-C=O qui connectent les couches des feuillets β. Ceci correspond à une compaction du domaine en feuillets β dans la forme OCP^r.

5.2 Avancées récentes sur le mécanisme de l'OCP : une molécule photo-active impliquée dans le mécanisme de photo-protection qE_{cya}

J'ai commencé mon doctorat en septembre 2006 où les connaissances sur le mécanisme qE_{cya} et sur l'OCP étaient comme je les ai décrites dans les parties 4.4 et 5.1 de cette introduction. Je décrirai ci-dessous le travail récent (depuis 2006) qui a été réalisé en parallèle de mon travail de thèse sur la photo-activité de l'OCP et son implication dans qE_{cya}.

L'OCP apparaît orange à l'obscurité ou à faible lumière et son spectre d'absorption est typique des caroténoïdes : il reflète les transitions S_0-S_2 avec trois bandes vibrationelles distinctes (Kerfeld *et al.* 2003; Polivka *et al.* 2005; Wilson *et al.* 2008a) (figure I.30B). La position et la forme de cette transition correspondent au 3'-hydroxyechinenone bloqué dans une conformation *trans* par la protéine (Kerfeld *et al.* 2003; Polivka *et al.* 2005). Sous illumination avec une lumière bleue-verte, la forme orange de l'OCP est complètement photo-convertie en une forme rouge (Wilson *et al.* 2008a) (figure I.30A, B et D). Le taux de photo-conversion dépend de l'intensité de la lumière et est indépendant de la température (figure I.30D). A l'obscurité, la forme rouge de l'OCP est spontanément reconvertie en forme orange (Wilson *et al.* 2008a). Cette étape n'est pas accélérée par une illumination et est dépendante de la température (figure I.30C). Les études des différences de spectres des formes rouge et orange de l'OCP par spectroscopie de résonance Raman et par FTIR (« Fourier Transform InfraRed » en anglais) ont démontré que l'absorbance de la lumière par l'OCP n'induit pas seulement des changements au niveau du caroténoïde mais aussi au niveau de l'apo-protéine (Wilson *et al.* 2008a) (figure I.31). Dans la forme rouge, le 3'-hydroxyechinénone serait moins contraint par la conformation de la protéine et pourrait avoir une structure plus plane, moins distordue (figure I.31).

Après avoir démontré que l'OCP est une molécule photo-active, le lien entre la forme rouge induite par la lumière et le mécanisme de photo-protection qE_{cya} a été étudié. La différence de spectre calculée entre celui des formes rouge et orange suggère fortement que la forme rouge s'accumule *in vivo* dans les conditions qui induisent la dissipation d'énergie et le déclin de fluorescence (Wilson *et al.* 2008a). De plus, la forte dépendance à l'intensité de lumière du mécanisme qE_{cya} induit par la lumière bleue-verte dans les cellules entières (Wilson *et al.* 2006) est en accord avec la formation de la forme rouge *in vitro* (Wilson *et al.* 2008a) (figure I.30E). *In vivo*, la cinétique de récupération de qE_{cya} montre aussi une dépendance à la température (El Bissati *et al.* 2000; Wilson *et al.* 2006; Rakhimberdieva *et al.* 2007), cependant celle-ci est moins rapide que la conversion de la forme rouge vers la forme orange à l'obscurité. Ceci suggère que la forme rouge est plus stable *in vivo* qu'*in vitro* ou que le déclin de fluorescence dure plus longtemps que la forme rouge. Au contraire, le taux initial de photo-conversion (forme orange vers forme rouge) est indépendant de la température. Ainsi, à intensité de lumière fixe, la concentration de la forme rouge à l'équilibre dépend de la

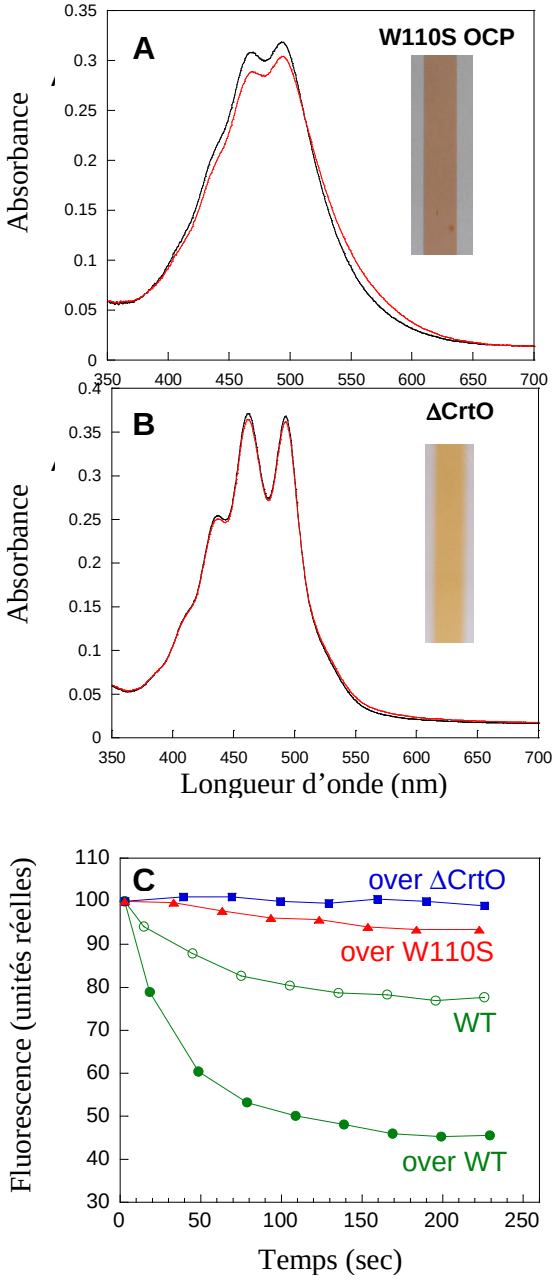


Figure I.32 : La forme rouge est la forme active essentielle à la formation du déclin de fluorescence dans le mécansime qE_{cya} d'après Kirilovsky 2009 (Wilson *et al.* 2008a; Punginelli *et al.* 2009)

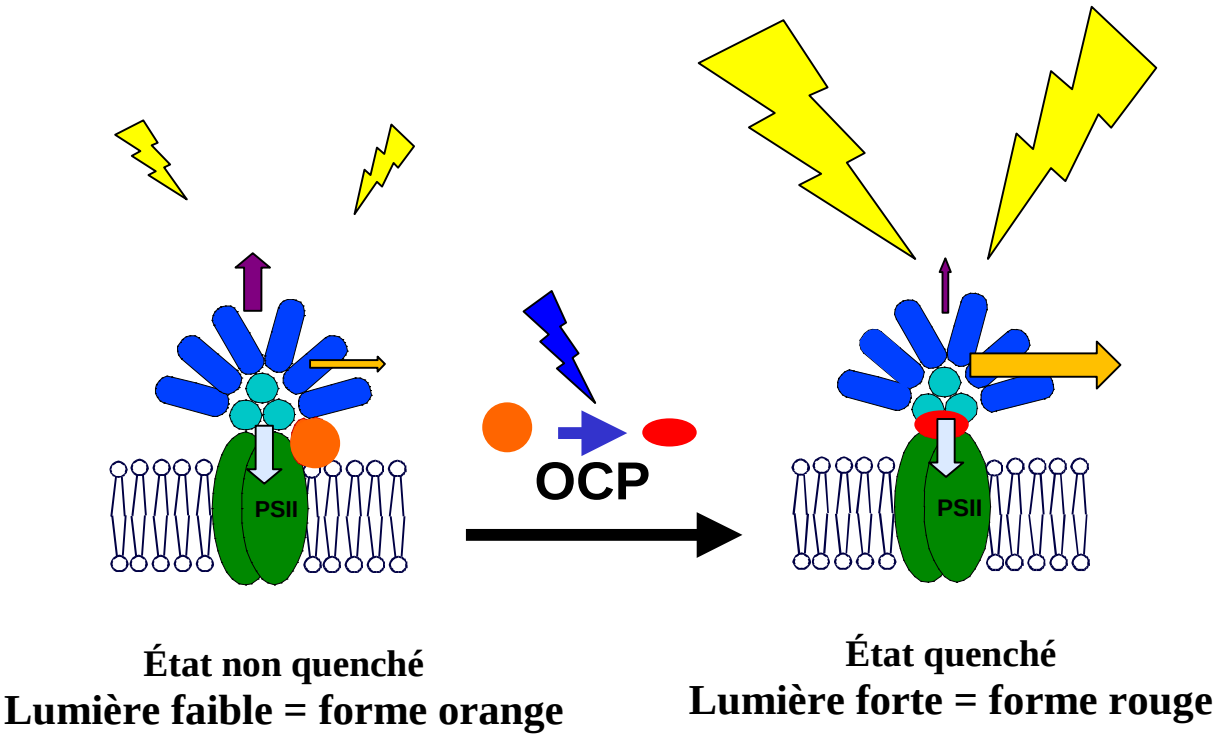
A montre la photo-conversion du mutant W110S où l'OCP est mutée au niveau de son tryptophane 110 et **B** montre la photo-conversion du mutant ΔCrtO où l'enzyme CrtO qui permet la formation de l'échinénone et du 3'-hydroxyechinénone est absente. La photo-conversion a été faite en utilisant une lumière bleue-verte de 1050 µmol photon.m^{-2}.s^{-1} à 12°C (trait noir avant illumination et trait rouge après illumination). Elle est quasi inexistente dans ces deux mutants. Une photographie de l'OCP isolée de ces mutants après l'illumination accompagne le spectre d'absorbance. **C** montre le rendement de fluorescence (obtenu avec un fluorimètre PAM) de cellules du sauvage (cercles verts vides), du mutant surexprimant l'OCP non mutée (cercles verts pleins), du mutant surexprimant l'OCP W110S (triangles rouges) et du mutant ΔCrtO surexprimant l'OCP (carrés bleus). Avant la mesure, les cellules diluées à 2µgChl.mL^{-1} ont été adaptées à l'obscurité puis, pendant la mesure, elles ont été illuminées avec une forte lumière bleue-verte de 740 µmol photon.m^{-2}.s^{-1}.

température. L'OCP apparaît alors comme un senseur des conditions de photoinhibition (c'est à dire une illumination croissante et une température descendante) qui induit plus de photo-protection en dissipant l'énergie sous forme de chaleur.

Ces observations mises bout à bout suggèrent déjà fortement que la forme active de l'OCP est la forme rouge. Ceci a été confirmé par l'étude de qE_{cya} dans des mutants de *Synechocystis* (Wilson *et al.* 2008a; Punginelli *et al.* 2009). L'OCP surexprimée dans un mutant qui ne contient pas le gène *crt*O, le gène codant pour la β-carotène monocétolase qui catalyse la formation d'échinénone et de 3'-hydroxyechinénone, n'induit pas de déclin de fluorescence sous forte lumière (figure I.32C). Dans ce mutant, l'OCP lie majoritairement de la zéaxanthine et est jaune (Punginelli *et al.* 2009) (figure I.32B). De plus, un mutant ponctuel au niveau du résidu tryptophane 110 de l'OCP chez *Synechocystis* ne présente pas (ou très peu) de déclin de fluorescence sous une forte lumière (figure I.32C). L'OCP de ce mutant n'est pas photo-actif et contient majoritairement de l'échinenone et du 3'-hydroxyechinenone (Wilson *et al.* 2008a; Punginelli *et al.* 2009) (figure I.32A). Ce mutant au niveau du tryptophane montre donc que la forme rouge stabilisée est nécessaire pour qE_{cya} et le mutant du gène *crt*O montre que l'échinénone ou le 3'-hydroxyechinénone sont nécessaires pour la formation de cette forme rouge.

En comparant l'OCP avec d'autres molécules photo-actives sensibles à la lumière bleue-verte et en analysant le phénotype de différents mutants de l'OCP, il est possible de spéculer sur le(s) rôle(s) de l'OCP dans le mécanisme qE_{cya} (voir la partie sur les photorécepteurs chez les cyanobactéries I.3). Il apparaît notamment, qu'en plus de partager une réponse spécifique à la lumière bleue-verte, certains photorécepteurs cyanobactériens ont des structures similaires à celles de l'OCP. En effet, certaines phototropines avec un domaine LOV et la PYP (« Photoactive Yellow Protein » en anglais, qui est un membre de la superfamille des protéines à domaine PAS), contiennent une structure avec 4 ou 5 feuillets β similaires à ceux de la partie C-terminale de l'OCP (communication personnelle de Diana Kirilovsky).

En considérant toutes les données présentées dans cette introduction, il apparaît que beaucoup de progrès ont été réalisés ces dernières années dans la caractérisation des mécanismes de photo-protection des organismes photosynthétiques et en particulier du mécanisme de photo-protection qE_{cya} impliquant l'OCP. Cependant, beaucoup de points concernant les modifications au niveau de la protéine et du caroténoïde de l'OCP, la présence de qE_{cya} chez les cyanobactéries en général et les autres éléments impliqués dans ce mécanisme restent à être élucidés. Mon travail de thèse présenté ci-après est basé sur ce questionnement et je suis fière d'avoir pu y apporter des éléments de réponse.



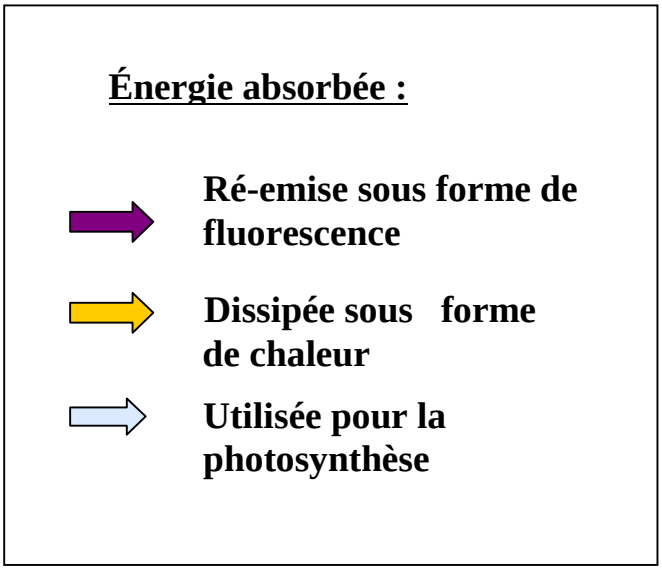


Figure I.33 : Modèle du mécanisme de l'OCP dans qE_{cya}
Le mécanisme de photo-protection qE_{cya} implique l'Orange Carotenoid Protein (l'OCP) et les phycobilisomes. L'absorption de la lumière bleue-verte par le caroténoïde active l'OCP par des changements dans le caroténoïde et la protéine qui induisent l'augmentation de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur. Sous faible lumière où l'OCP est sous sa forme orange inactive, les cellules sont dans un état « non quenché » et, sous forte lumière, l'OCP est sous sa forme rouge active, les cellules sont alors dans un état « quenché ».

Objectif

Le mécanisme de photo-protection qE_{cya} impliquant les phycobilisomes et l'Orange Carotenoid Protein (OCP) chez les cyanobactéries a été découvert dans les dix dernières années. Au début de ma thèse, le modèle concernant ce mécanisme de photo-protection qE_{cya} proposé par mon équipe était le suivant : l'absorption de la lumière bleue-verte par le caroténoïde active l'OCP par des changements dans le caroténoïde et/ou la protéine qui induisent l'augmentation de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur (figure I.33). Jusqu'en 2006, toutes les études avaient été réalisées chez *Synechocystis* et en conditions de culture normales. Le but de ma thèse était d'aller plus loin dans la caractérisation de ce mécanisme.

Ma thèse peut se diviser en deux parties. La première partie est décrite dans les chapitres I et II, elle porte sur la généralisation du mécanisme de l'OCP en situation de stress et chez les cyanobactéries. La deuxième partie est constituée des chapitres III, IV et V. Cette partie est consacrée à l'interaction de l'OCP avec d'autres éléments (chapitre III) et en particulier à l'identification d'un nouvel élément impliqué en plus de l'OCP dans le mécanisme de photo-protection qE_{cya} (chapitres IV et V).

Les résultats présentés dans cette thèse ont donné lieu à 3 articles et 1 proceeding :

1. Wilson, A., **Boulay, C**., Wilde, A., Kerfeld, C.A., and Kirilovsky, D. (2007). "Light-induced energy dissipation in iron-starved cyanobacteria: roles of OCP and IsiA proteins". Plant Cell 19, 656-672. (Chapitre I)

2. **Boulay, C**., Abasova, L., Six, C., Vass, I., and Kirilovsky, D. (2008). "Occurrence and function of the orange carotenoid protein in photoprotective mechanisms in various cyanobacteria". BBA Bioenergetics 1777, 1344-1354. (Chapitre II)

3. **Boulay, C**., Wilson, A., and Kirilovsky, D. (2008). "Orange carotenoid protein (OCP) related NPQ in *Synechocystis* PCC 6803 OCP-phycobilisomes interactions". In Photosynthesis. Energy from the Sun. Proceedings of the 14th International congress on photosynthesis, G.E. Allen JF, Gantt E, Golbeck JH, Osmond B, ed (Heidelberg: Springer), p997. (Chapitre III)

4. **Boulay, C**., D'Haene, S., Wilson, A., and Kirilovsky, D. (2009). "The FRP, a new protein involved in the fluorescence recovery of the OCP-related photoprotective mechanism in cyanobacteria". En préparation. (Chapitres IV et V)

Participations à des congrès pendant la thèse et autres proceedings :

5-10 sept. 2009	13th Congress of Photobiology, exposé oral "*The photoactive Orange Carotenoid Protein and photoprotection in cyanobacteria*" (Wroclaw, Pologne)
9-14 août 2009	13th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, présentation d'un poster "*A new protein involved in the OCP-related photoprotective mechanism in cyanobacteria"* (Montréal, Canada)
8-9 juin 2009	Journées françaises de la photosynthèse, exposé oral «*A new protein involved in the OCP-related photoprotective mechanism in cyanobacteria* » (SFΦ, Paris, France)
2-3 oct. 2008	1st Joint Retreat of the PhD Students in Experimental Plant Sciences, exposé oral "*Occurence and functions of the Orange Carotenoid Protein in photoprotective mechanisms in various cyanobacteria*" (Wageningen, Pays-Bas)
10-11 avril 2008	Journées françaises de la photosynthèse, présentation d'un poster « *NPQ processes in different strains of cyanobacteria containing or not the Orange Carotenoid Protein* » (SFΦ, Paris, France)
29 mars -3 avril 2008	Molecular Bioenergetics of Cyanobacteria : Towards Systems Biology Level of Understanding, présentation d'un poster (idem 10-11/04/08) (Barcelone, Espagne)
7-11 fév. 2008	Final INTRO2 Network on Photosystem II meeting, exposé oral « *Photoprotective processes in different cyanobacteria containing or not the Orange Carotenoid Protein* » (Interdisciplinary Network for Training and Research on Photosystem 2 - INTRO2, Lanzarote, îles Canaries, Espagne)
12-14 sept. 2007	Experimental Plant Sciences PhD Student Day 2007, présentation d'un poster « *Orange Carotenoid Protein (OCP) related NPQ in Synechocystis PCC 6803 OCP-Phycobilisomes interactions* » (Wageningen, Pays-Bas)
23-29 juil. 2007	14th International Congress of Photosynthesis (PS07), présentation d'un poster (idem 12-14/06/08) (Glasgow, Ecosse) 2 proceedings : - Wilson, A., **Boulay, C.**, and Kirilovsky, D. (2008b). "Light induced energy dissipation in iron-starved cyanobacteria". In Photosynthesis. Energy from the Sun. Proceedings of the 14th international congress on photosynthesis, G.E. Allen JF, Gantt R, Golbeck JH, Osmond B, ed (Heidelberg: Springer), p1605. - Abasova, L., **Boulay, C.**, Vass, I., and Kirilovsky, D. (2008). "Non-photochemical-quenching mechanisms in the cyanobacterium *Thermosynecococcus elongatus*. In Photosynthesis". Energy from the Sun. Proceedings of the 14th international congress on photosynthesis, G.E. Allen JF, Gantt E, Golbeck JH, Osmond B ed (Heidelberg: Springer), p993.
19-22 juil. 2007	PS07 satellite meeting on light harvesting, poster (idem 12-14/06/08) élu meilleur poster qui a donné le droit à un exposé oral « *Non-Photochemical Quenching in cyanobacteria and the Orange Carotenoid Protein* » (Drymen, Ecosse)
18-19 juin 2007	Journées françaises de la photosynthèse (SFΦ, Paris, France)
13-16 mai 2007	INTRO2 Network on Photosystem II annual meeting, exposé oral « *Characterization of the Orange Carotenoid Protein (OCP) in Synechocystis PCC 6803* » (INTRO2, Röjtökmuzsaj, Hongrie)
24-26 janv 2007	Workshop on single particule electronic microscopy (INTRO2, Gröningen, Pays-Bas)
24-27 sept. 2006	International Workshop on Non-Photochemical Quenching and Photo-protection in Photosystem II (INTRO2, Parsberg, Allemagne)

Matériels et Méthodes

1. Construction des mutants

Les oligopeptides, plasmides et souches utilisés dans cette étude et décrits ci-dessous sont listés dans les tableaux 2, 3 et 4, respectivement. Les figures MM.1, MM.4 et MM.6 décrivent des constructions clonées dans *E.coli* et dans *Synechocystis*. L'annexe A1 contient la séquence 1766900-1769250 (comprenant les gènes *slr*1963 et *slr*1964) de *Synechocystis*.

1.1 Constructions pour surproduire la FRP dans *E.coli*

Les notices d'information du fournisseur de pASK-IBA7$^+$, pASK-IBA3$^+$ et pET-15b se trouvent en annexe A3, A4 et A2, respectivement.

Pour surproduire Slr1964 avec un StrepTag aux extrémités N et C-terminales dans *E.coli*, le gène *slr*1964 a été amplifié par PCR en utilisant les paires d'oligopeptides F64NterST/R64NterST et F64CterST/R64CterST (figure MM.2B) ; les fragments de 402bp et 399bp ont été introduits après digestion *Bsa*I dans les plasmides pASK-IBA7$^+$ (StrepTag en N-terminal, IBA) et pASK-IBA3$^+$ (StrepTag en C-terminal, IBA), respectivement. Ces deux constructions ont été nommées pCB7 et pCB8, respectivement. La figure MM.2 décrit les étapes de vérification de la construction de pCB7, où l'insertion du gène *slr*1964 a été vérifié par digestion *Bsa*I (figure MM.2C). Pour surproduire la FRP avec un HisTag à l'extrémité N-terminale de la protéine, le gène *slr*1964 a été amplifié par PCR en utilisant la paire d'oligopeptides 64NterNdeI/64CterBamHI. Le fragment de 405bp a été introduit après digestion *Nde*I-*Bam*HI dans le plasmide pET-15b (Novagene) pour donner la construction nommée pCB9 (figure MM.3). La souche ultracompétente XL10-gold (Stratagene) a été transformée avec les plasmides pCB7, pCB8 et pCB9 (voir figure MM.1), puis ces plasmides ont été extraits et utilisés pour la transformation de la souche BL21(Stratagene) adaptée pour la surproduction de protéines.

La séquence des plasmides obtenue a été vérifiée par séquençage (MWG) en utilisant les oligopeptides de séquençage décrits dans la notice de pASK-IBA7$^+$ (IBA), pASK-IBA7$^+$ (IBA) et pET-15b (Novagene) pour pCB7, pCB8 et pCB9, respectivement.

1.2 Construction de la souche Δ*slr*1964 chez *Synechocystis*

La région du génome de *Synechocystis* contenant les gènes *slr*1963 et *slr*1964 a été amplifiée par PCR comme décrit dans Wilson *et al*. (2008a). Le fragment de PCR a été cloné dans un vecteur SK(+) résistant à l'ampicilline (Stratagene). Puis, un gène de résistance à la kanamycine de 1.3kb a été introduit dans le site unique de restriction *Hind*III se

Tableau 2 : Souches cyanobactériennes utilisées

Souches	Description	Source ou référence
E. coli		
BL 21	F$^-$ *dcm ompT hsdS*($r_B^-m_B^-$) *gal* Souche compétente optimisée pour la surproduction de protéines	Stratagene
XL10-gold	Tet^R Δ(*mcrA*)*183* Δ(*mcrCB-fsdSMR-mrr*)*173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte [F' *proAB lacI*^{q}*ZΔM15* Tn*10*(Tet^r) Amy Cam^r] Souche ultracompétente pour la transformation	Stratagene
BL21 pCB7	Souche surproduisant Slr1964 avec un StrepTag en N-terminal, Amp^R	Cette étude
BL21 pCB8	Souche surproduisant Slr1964 avec un StrepTag en C-terminal, Amp^R	Cette étude
BL21 pCB9	Souche surproduisant Slr1964 avec un HisTag en N-terminal, Amp^R	Cette étude
Synechocystis PCC 6803		
WT	Souche sauvage	
CK	Souche mutée ne contenant pas de phycocyanine, seul le cœur des phycobilisomes est présent, Sp^R Sm^R	Thomas *et al.* 2006
ΔOCP	Souche mutée où une cassette de résistance a été introduite dans le gène *slr*1963, Sp^R Sm^R	Wilson *et al.* 2006
ΔIsiA	Souche mutée où une cassette de résistance a été introduite dans le gène *sll*0247, Sp^R Sm^R	Wilson *et al*. 2006
PAL	Souche mutée où il n'y a plus de phycobilisomes (ni phycocyanine, ni allophycocyanine et ni L_{CM}, l'une des protéines qui lie les phycobilisomes)	Ajlani and Vernotte 1998
Δ*slr1964*	Souche mutée où une cassette de résistance a été introduite dans le gène *slr*1964, Kan^R	Wilson *et al.* 2008
WTCB12	Souche mutée surproduisant l'OCP et Slr1964 avec un HisTag en N-terminal, Sp^R Sm^R	Cette étude

WTCB13	Souche mutée surproduisant l'OCP et Slr1964 avec un HisTag en C-terminal, Sp^R Sm^R	Cette étude
WTCB14	Souche mutée surproduisant l'OCP et Slr1964 avec un HisTag en N-terminal et ayant un codon de départ ATG au lieu du GTG initial, Sp^R Sm^R	Cette étude
WTCB15	Souche mutée surproduisant l'OCP et Slr1964 avec un HisTag en C-terminal et ayant un codon de départ ATG au lieu du GTG initial, Sp^R Sm^R	Cette étude
WTCB19	Souche surproduisant Slr1964 (ATG codon de départ) avec un HisTag en N-terminal, Sp^R Sm^R	Cette étude
WTCB20	Souche surproduisant Slr1964 (ATG codon de départ) avec un HisTag en C-terminal, Sp^R Sm^R	Cette étude
WTCB21	Souche surproduisant Slr1964 (ATG codon de départ) sans HisTag, Sp^R Sm^R	Cette étude
Δ64CB12	Souche mutée, où le gène de *slr*1964 dans son locus initial a été interrompu, surproduisant l'OCP et Slr1964 avec un HisTag en N-terminal, Sp^R Sm^R Kan^R	Cette étude
Δ64CB13	Souche mutée, où le gène de *slr*1964 dans son locus initial a été interrompu, surproduisant l'OCP et Slr1964 avec un HisTag en C-terminal, Sp^R Sm^R Kan^R	Cette étude
Δ64CB14	Souche mutée, où le gène de *slr*1964 dans son locus initial a été interrompu, surproduisant l'OCP et Slr1964 avec un HisTag en N-terminal et ayant un codon de départ ATG au lieu du GTG initial, Sp^R Sm^R Kan^R	Cette étude
Δ64CB15	Souche mutée, où le gène de *slr*1964 dans son locus initial a été interrompu, surproduisant l'OCP et Slr1964 avec un HisTag en C-terminal et ayant un codon de départ ATG au lieu du GTG initial, Sp^R Sm^R Kan^R	Cette étude
Δ64CB19	Souche mutée, où le gène de *slr*1964 dans son locus initial a été interrompu, surproduisant Slr1964 (ATG codon de départ) avec un HisTag en N-terminal, Sp^R Sm^R Kan^R	Cette étude
Δ64CB20	Souche mutée, où le gène de *slr*1964 dans son locus initial a été interrompu, surproduisant Slr1964 (ATG codon de départ) avec un HisTag en C-terminal, Sp^R Sm^R Kan^R	Cette étude
Δ64CB21	Souche mutée, où le gène de *slr*1964 dans son locus initial a été interrompu, surproduisant Slr1964 (ATG codon de départ) sans HisTag, Sp^R Sm^R Kan^R	Cette étude

Tableau 3 : Plasmides utilisés

Plasmide	Description	Source ou référence
pPSBA2	Contient les régions en amont et en aval du gène *psbaII*, cloné dans pSL1180 (Pharmacia Biotec), permet de surexprimer un gène après transformation dans *Synechocystis*, Amp^{Rb}	Lagarde *et al.* 2000
pET-15b	Vecteur de surexpression dans *E.coli*, HisTag en N-terminal suivi d'un site de clivage protéique (Thrombine), Amp^{R}	Novagene
pASK-IBA7^{+}	Vecteur de surexpression dans *E.coli*, Strep-Tag en N-terminal suivi d'un site de clivage protéique (Xa), Amp^{R}	IBA
pASK-IBA3^{+}	Vecteur de surexpression dans *E.coli*, Strep-Tag en C-terminal , Amp^{R}	IBA
pPBSBA2-6364	Contient un fragment *Nde*I-*Hpa*I de 1528bp (amplifié à partir de l'ADN génomique de *Synechocystis*) avec les gènes *slr*1963 et *slr*1964, Amp^{R}	Wilson *et al.* 2008
pCB7	Contient un fragment *Bsa*I-*Bsa*I de 402pb amplifié par PCR du gène *slr*1964 cloné dans pASK-IBA7^{+}, Amp^{R}	Cette étude
pCB8	Contient un fragment *Bsa*I-*Bsa*I de 399pb amplifié par PCR du gène *slr*1964 cloné dans pASK-IBA3^{+}, Amp^{R}	Cette étude
pCB9	Contient un fragment *Nde*I-*Bam*HI de 405bp amplifié par PCR du gène *slr*1964 cloné dans pET-15b, Amp^{R}	Cette étude
pCB10	HisTag ajouté par mutagenèse dirigée en N-terminal de *slr*1964 à pPBSA2-6364, Amp^{R}	Cette étude
pCB11	HisTag ajouté par mutagenèse dirigée en C-terminal de *slr*1964 à pPBSA2-6364, Amp^{R}	Cette étude
pCB12	Cassette de résistance ajoutée dans le site *Hpa*I (après *slr*1964) dans pCB10, Amp^{R} Sp^{R} Sm^{R}	Cette étude
pCB13	Cassette de résistance ajoutée dans le site *Hpa*I (après *slr*1964) dans pCB11, Amp^{R} Sp^{R} Sm^{R}	Cette étude
pCB14	GTG (codon de départ) de *slr*1964 muté en ATG par mutagenèse dirigée dans pCB12, Amp^{R} Sp^{R} Sm^{R}	Cette étude
pCB15	GTG (codon de départ) de *slr*1964 muté en ATG par	Cette étude

	mutagenèse dirigée dans pCB13, Amp^R Sp^R Sm^R	
pCB16	Contient un fragment *Nde*I-*Hpa*I de 506bp amplifié par PCR contenant le gène *slr*1964 cloné dans pBSA2, Amp^R	Cette étude
pCB17	HisTag ajouté par mutagenèse dirigée en N-terminal de *slr*1964 à pCB15, Amp^R	Cette étude
pCB18	HisTag ajouté par mutagenèse dirigée en C-terminal de *slr*1964 à pCB16, Amp^R	Cette étude
pCB19	Cassette de résistance ajoutée dans le site *Hpa*I (après *slr*1964) dans pCB17, Amp^R Sp^R Sm^R	Cette étude
pCB20	Cassette de résistance ajoutée dans le site *Hpa*I (après *slr*1964) dans pCB18, Amp^R Sp^R Sm^R	Cette étude
pCB21	Cassette de résistance ajoutée dans le site *Hpa*I (après *slr*1964) dans pCB16, Amp^R Sp^R Sm^R	Cette étude

[a]Les plasmides pCB (Clémence Boulay) ont été construits par l'auteur
[b]Résistances antibiotiques : Amp^R pour l'ampicilline, Sp^R pour la spectinomycine et Sm^R pour la streptomycine

Tableau 4 : Oligopeptides utilisés

Nom	Séquence 5'-3'	Fonction
PSBA2UP2	ACG CCC TCT GTT TAC CCA TGG AA[a]	Seq[b]
psba2down2	CCA GGC CTC AAC CCG GTA CAG AG	Seq
F64CterST	GCA TGA GTG *GTC TCA* AAT GGG CTT CTC GTT GCA GAG CAG	Dir. mut.[c]
R64CterST	GAA AAA AAG *GTC TCA* GCG CTC AGC CGG GCC AGG GCC TTA	Dir. mut.
F64NterST	GAA TAA AAG *GTC TCA* GCG CGG CTT CTC GTT GCA GAG CAG	Dir. mut.
R64NterST	GCA TGA GTG *GTC TCA* TAT CAC AGC CGG GCC AGG GCC TTA	Dir. mut.
psbA2HPA1	GCA TCG *GTT AAC* GGT GTA CAC CTA CAG CAA GCA A	RS PCR[d]
F64NterHis	CAC CAC CAC CAC CAC CAC GGC TTC TCG TTG CAG AGC AGG CTC ACT TTT T	Dir. mut.
R64NterHis	GTG GTG GTG GTG GTG GTG CAC AGT TAT TAG TAT TTT GGC TGC TTG TCC G	Dir. mut.
F64CterHis	GTG CAC CAC CAC CAC CAC CAC TGA TTC TAG TAA ATA TCT AAA ACT CCA C	Dir. mut.
R64CterHis	GTG GTG GTG GTG GTG GTG CAC CCG GGC CAG GGC CTT AAT TTT AGA TTG C	Dir. mut.
64NterNdeI	GCA TTC *CAT ATG* GGC TTC TCG TTG CAG AGC AGG C[e]	RS PCR
64CTerBamHI	ATT TTA GG*A TCC TCA* CAG CCG GGC CAG GGC CTT A	RS PCR
R64NterHisII	GTG GTG GTG GTG GTG GTG CAT ATG GTT ATA ATT CCT TAT GTA TTT GTC G	Dir. mut.
F64HisN-ATG	GCC AAA ATA CTA ATA ACT ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC	Dir. mut.
R64HisN-ATG	GTG GTG GTG GTG GTG GTG CAT AGT TAT TAG TAT TTT GGC	Dir. mut.
F64HiCatg2	GCC AAA ATA CTA ATA ACT ATG GGC TTC TCG TTG CAG AGC	Dir. mut.
R64HisC-ATG	GCT CTG CAA CGA GAA GCC CAT AGT TAT TAG TAT TTT GGC	Dir. mut.
CarF	AAT TTT CCC TAA CAC CCT AGC[f]	RT-PCR[g]
CarR	AGT AAT TCT TTG GGG GAA GCA	RT-PCR
64F	TTG CAG AGC AGG CTC ACT TTT	RT-PCR
64R	TTT AGA TTG CTT ATC GGC GGC	RT-PCR
64-136F	TTC CGT AAG GCC TAC CAA AGA G	RT-PCR
TrpA-156F	GCC CTA TTC CGA TCC TTT G	RT-PCR
TrpA-569R	GAT CCC ACT TCC GTT CTC AC	RT-PCR
64-33R	AAA AGT GAG CCT GCT CTG CA	RT-PCR
64-232R	GGA GTT TCC AAA GAT CAT CG	RT-PCR
64-394R	CCA GGG CCT TAA TTT TAG ATT GC	RT-PCR
63-241F	CAG GCC ATG TGT GAC TTG G	RT-PCR
63-334F	CGT TTA GGC GAA CTG ATG	RT-PCR

63-612F	CCT CAA TGC CAA TGA CTT C	RT-PCR
63-744R	CAG GTT TTG GCA CTC TTC	RT-PCR

[a] Les couleurs (surlignages) sont en accord avec la coloration des gènes des figures MM1, MM4 et MM6 ; en gras une mutation introduite pour créer un site *Apa*L1 ; la séquence des sites de restriction sauf *Apa*L1 est en italique ; le site de restriction *Apa*L1 introduit pour vérifier la mutagenèse dirigée quand cela était possible est souligné ; les codons « start » et « stop » sont en rouge.
[b] Utilisé pour le séquençage
[c] Utilisé pour la mutagenèse dirigée
[d] Utilisé pour créer un site de restriction par PCR
[e] Le ATG de cet oligopeptide sert de codon « start » dans pCB16 et pas dans pCB9 (où celui-ci se trouve avant l'HisTag)
[f] L'annexe A1 montre la localisation des oligopeptides utilisés pour la transcription réverse et la PCR quantitative en temps réel sur les gènes *slr*1963 et *slr*1964
[g] Utilisé pour la transcription réverse et/ou la PCR quantitative

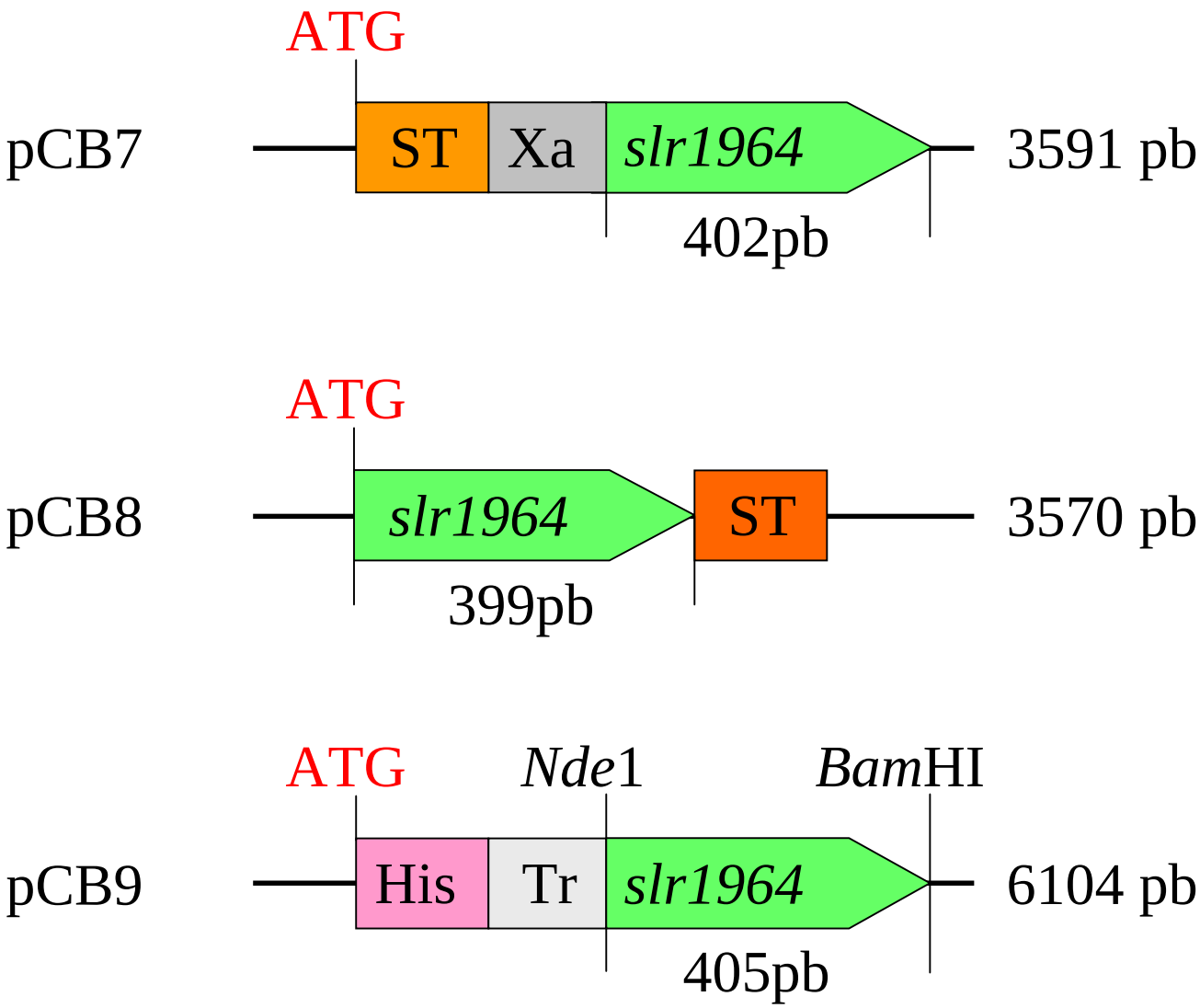


Figure MM.1 : Constructions réalisées pour surproduire la FRP dans *E.coli*
A droite, figure le nom du plasmide, au milieu, le schéma de la construction d'intérêt et à gauche, la taille totale du plasmide qui contient chaque construction. His et ST correspondent à HisTag et StrepTag, respectivement, et Tr et Xa à trombine et facteur Xa, respectivement. Les couleurs sont en accord avec le tableau 4 qui décrit les oligopeptides utilisés pour les constructions.

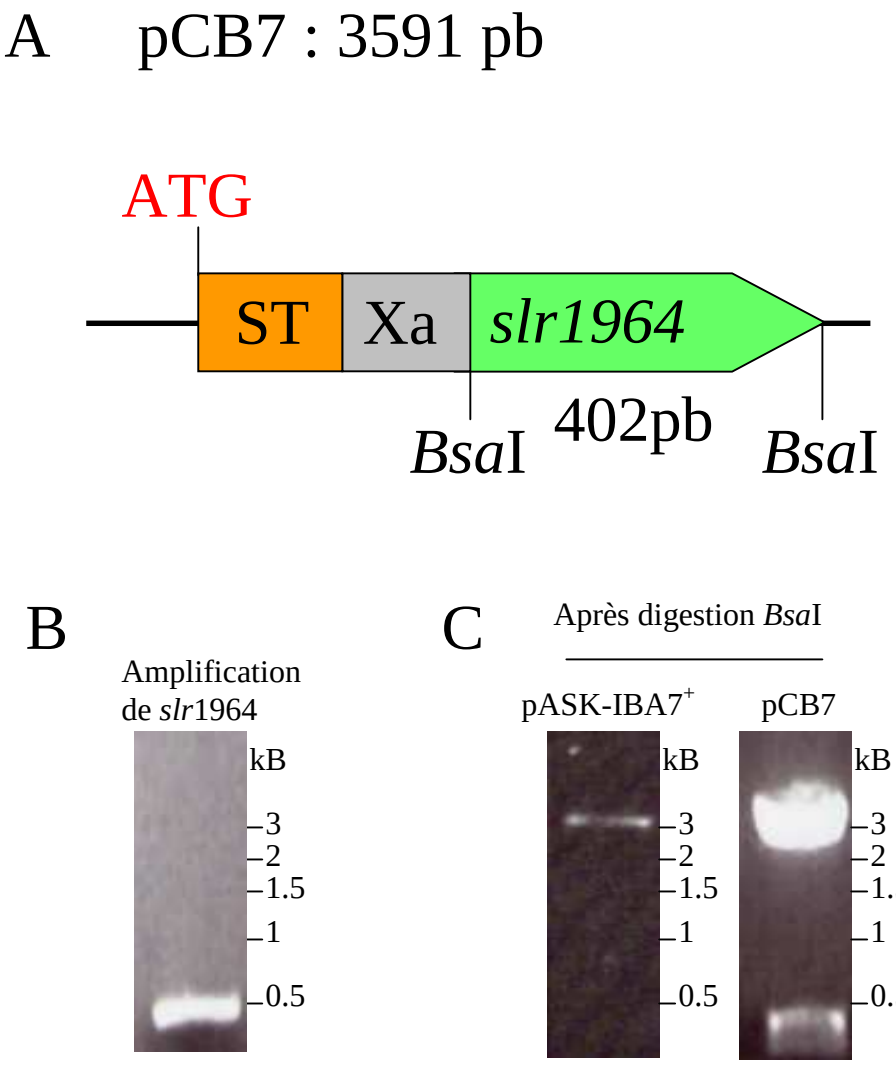
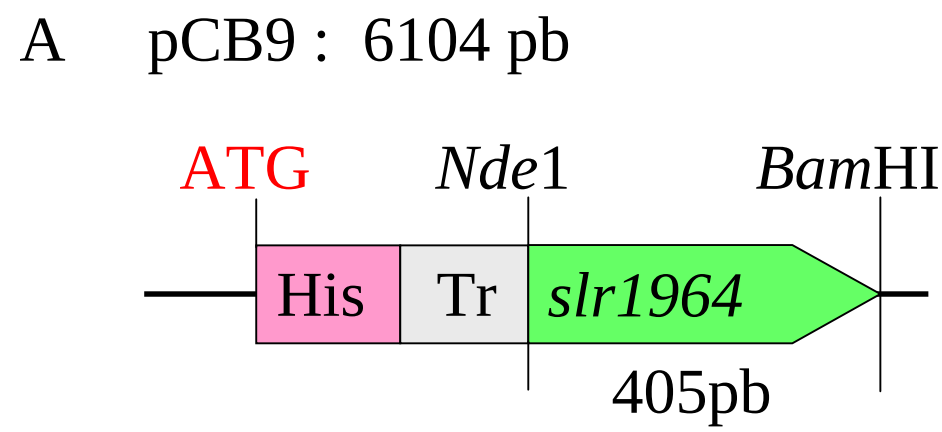


Figure MM.2 : Construction du plasmide pCB7 qui permet la surexpression de la FRP N-terminal Strep-taggée dans *E.coli*

A montre le schéma de la construction pCB7. Pour surproduire la FRP avec un StrepTag à l'extrémité N-terminale dans *E.coli*, le gène *slr*1964 a été amplifié par PCR en utilisant la paire d'oligopeptides F64NterST/R64NterST (voir tableau 4); le fragment de 402bp obtenu après digestion *Bsa*I (**B**) a été introduit dans le plasmide pASK-IBA7^{+} (StrepTag en N-terminal, IBA). Puis l'insertion du gène *slr*1964 dans pASK-IBA7^{+} a été vérifiée par re-digestion *Bsa*I (**C**). Dans **B** et **C**, l'ADN a été chargé sur un gel agarose 1%.



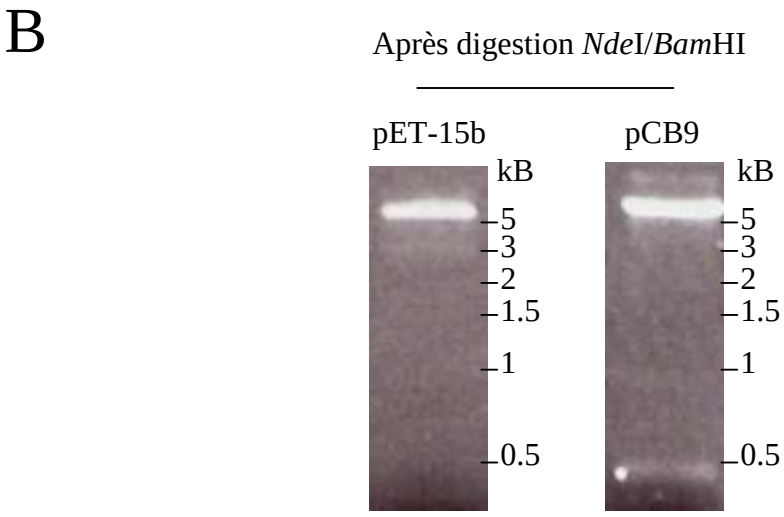


Figure MM.3 : Construction du plasmide qui permet la surexpression de la FRP N-terminal His taggée dans *E.coli* (pCB9)
A montre le schéma de la construction pCB9. Pour surproduire la FRP avec un HisTag à l'extrémité N-terminale dans *E.coli*, le gène *slr*1964 a été amplifié par PCR en utilisant la paire d'oligopeptides 64NterNdeI/64CterBamHI (voir tableau 4); le fragment de 405bp obtenu après digestion *Nde*I/*Bam*HI a été introduit dans le plasmide pET-15b (Novagene). L'insertion du gène *slr*1964 dans pET-15b a été vérifiée par re-digestion *Nde*I/*Bam*HI (**B**). Dans **B**, l'ADN a été chargé sur un gel agarose 1%.

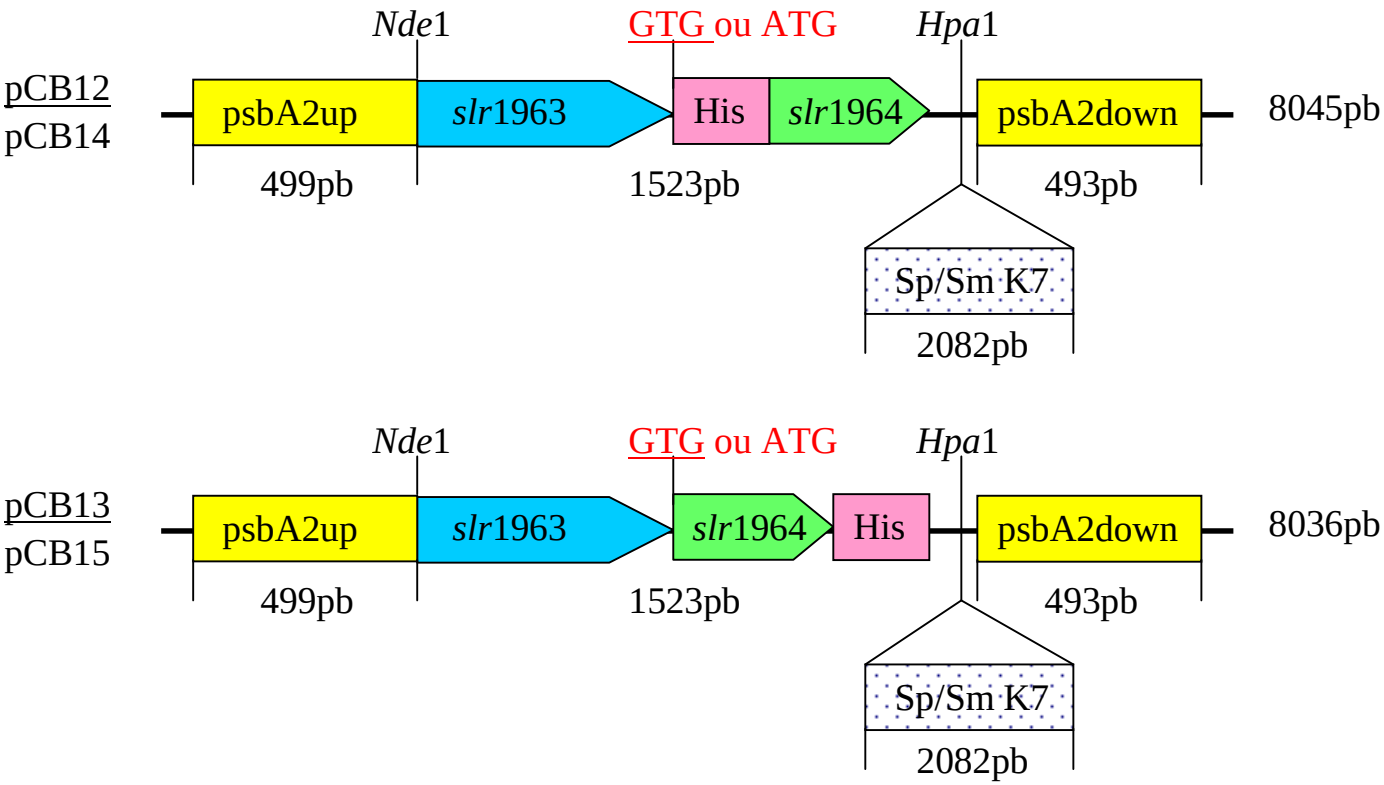


Figure MM.4 : Constructions réalisées pour surproduire l'OCP et la FRP dans *Synechocystis*

A droite, figure le nom du plasmide, au milieu, le schéma de la construction d'intérêt et à gauche, la taille totale du plasmide. His correspond à HisTag et Sp/Sm K7 à une cassette de résistance à la spectinomycine et à la streptomycine. psbA2up et psbA2down sont les régions en amont et en aval du gène *psb*AII qui permettent la transformation par recombinaison homologue dans *Synechocystis* et ainsi mettre *slr*1963 et *slr*1964 sous le contrôle du promoteur fort du gène (*psb*AII) de la protéine D1. Les couleurs sont en accord avec le tableau 4 qui décrit les oligopeptides utilisés pour les constructions.

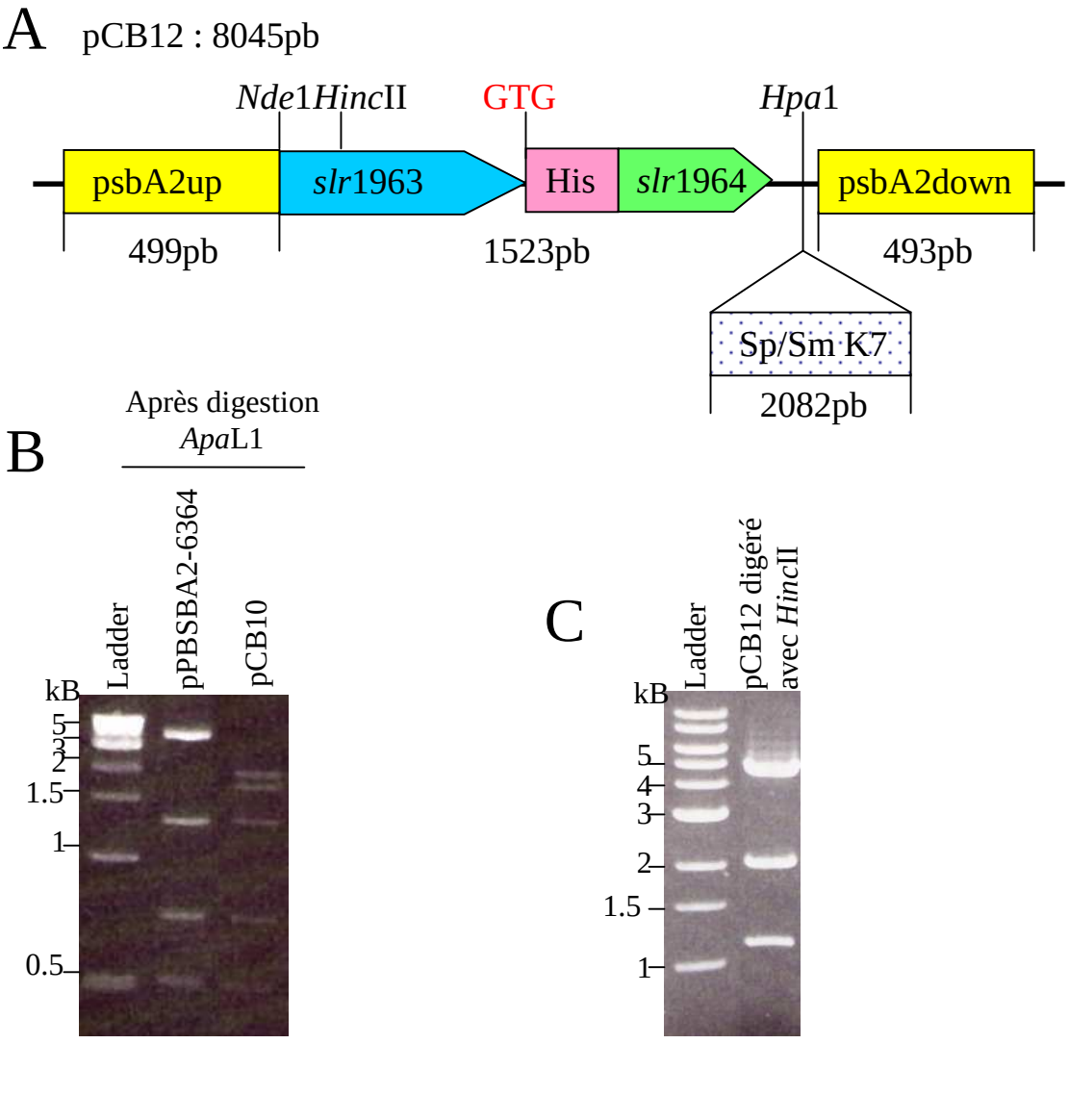


Figure MM.5 : Construction du plasmide pCB12 qui, après transformation, permet la surexpression de l'OCP et de la FRP His taggée en N-terminal dans *Synechocystis*

A montre le schéma de la construction pCB12. Afin de surproduire l'OCP et la FRP avec un HisTag à l'extrémité N-terminale dans *Synechocystis*, des nucléotides codant pour 6 histidines ont été ajoutés à l'extrémité 3' du gène *slr*1964 par mutagenèse dirigée (Quickchange XL site-directed mutagenesis kit, Stratagene) sur le plasmide pPSBA2-6364 (Wilson *et al*. 2008) contenant le gène *slr*1963 suivi de *slr*1964 pour donner le plasmide pCB10. La paire d'oligopeptides utilisée (F64NterHis/R64NterHis, tableau 4) introduisait aussi un site *Apa*L1 supplémentaire, ce qui a permis de vérifier l'insertion de l'HisTag par digestion *Apa*L1 (**B**). On voit clairement que la bande à 3.5kb du contrôle (pPBSA2-6364) est divisée en deux bandes de 1.6 et 1.9kb après la digestion *Apa*L1 (pCB10) (**B**). Une cassette de résistance à la spectinomycine et à la streptomycine de 2000bp a ensuite été insérée dans le site unique de restriction *Hpa*I de pCB10 pour donner pCB12. L'insertion de cette cassette a été vérifiée par digestion *Hinc*II (**C**). 3 sites de restriction *Hinc*II sont attendus sur la construction pCB12 : 1 sur la séquence de l'OCP et deux de part et d'autre de la cassette ; les bandes atttendues (1.2kb, 2kb et 4.8kb) sont bien celles observées sur **C**. Dans **B** et **C**, l'ADN a été chargé sur un gel agarose 1%.

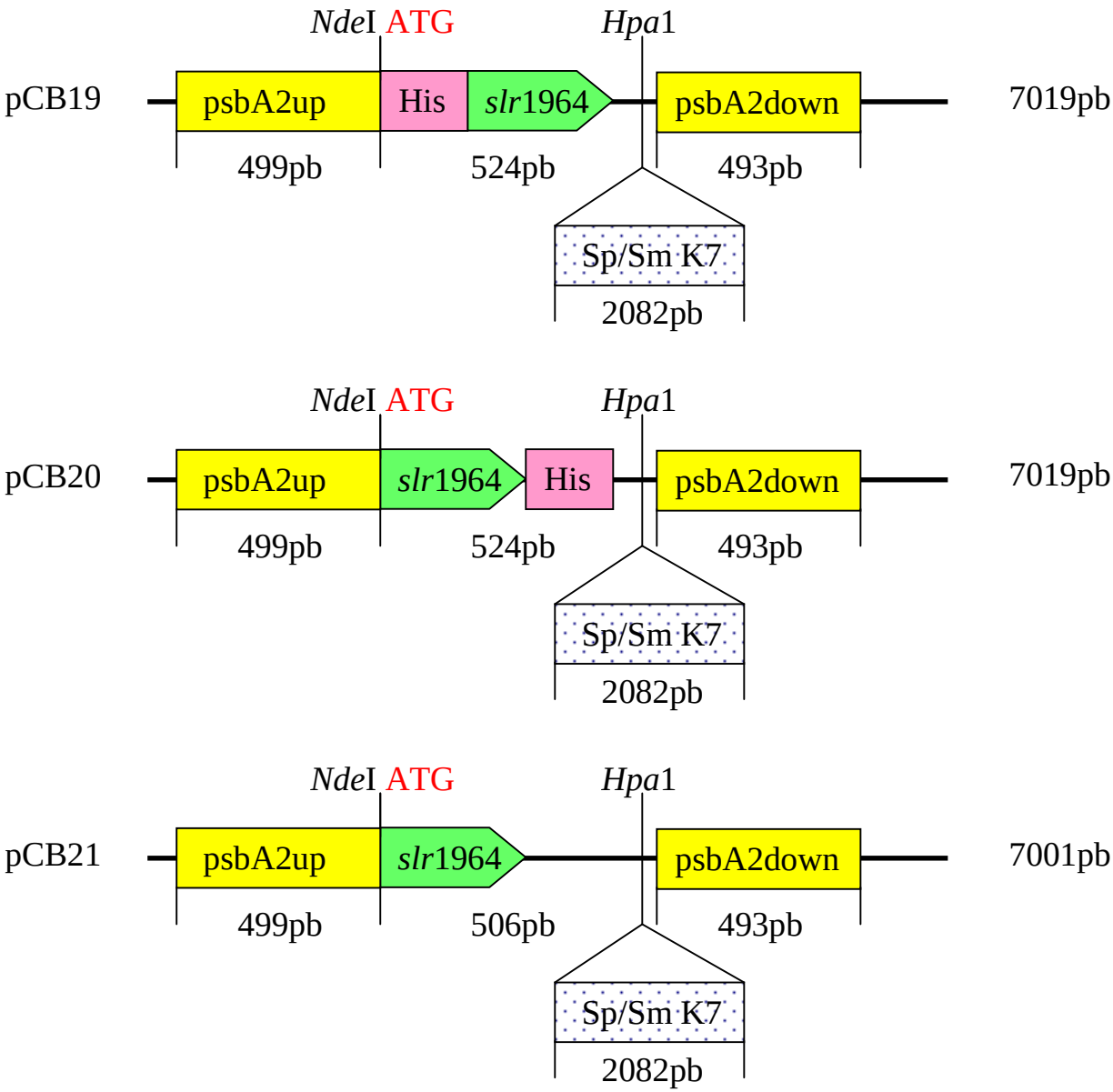


Figure MM.6 : Constructions réalisées pour surproduire la FRP dans *Synechocystis*
A droite, figure le nom du plasmide, au milieu, le schéma de la construction d'intérêt et à gauche, la taille totale du plasmide. His correspond à HisTag et Sp/Sm K7 à une cassette de résistance à la spectinomycine et à la streptomycine. psbA2up et psbA2down sont les régions en amont et en aval du gène *psbAII* qui permettent la transformation par recombinaison homologue dans *Synechocystis* et ainsi mettre *slr*1964 sous le contrôle du promoteur fort de la protéine D1. Les couleurs sont en accord avec le tableau 4 qui décrit les oligopeptides utilisés pour les constructions.

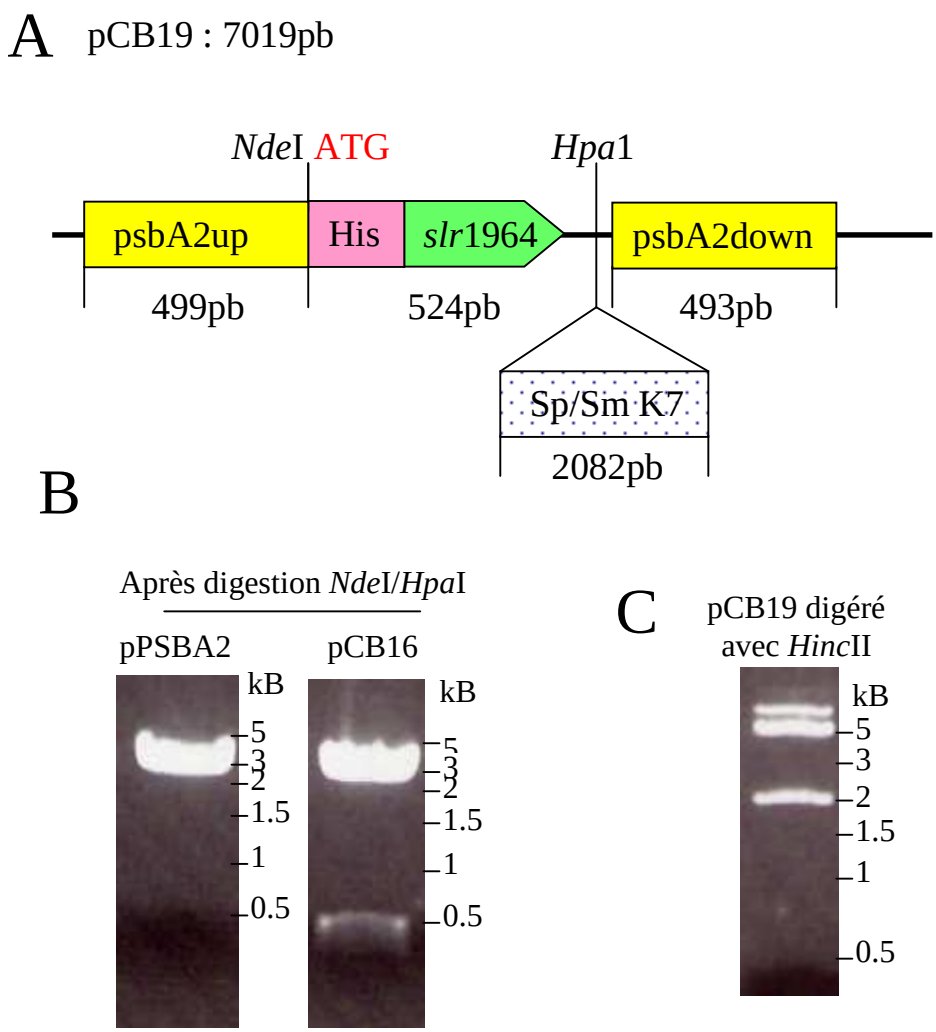


Figure MM.7 : Construction du plasmide pCB19 qui, après transfromation, permet la surexpression de la FRP His taggée en N-terminale dans *Synechocystis*

A montre le schéma de la construction pCB19. Afin de surproduire la FRP avec un HisTag à l'extrémité N-terminale dans *Synechocystis*, le gène *slr*1964 a été amplifié par PCR en utilisant la paire d'oligopeptides 64NterNdeI/psbA2HPAI (tableau 4). Le fragment de 506bp a été introduit après digestion *Nde*I-*Hpa*I dans le plasmide pPSBA2 (Lagarde *et al*. 2000) pour donner la construction nommée pCB16. L'insertion de *slr*1964 dans pCB16 a été vérifiée par re-digestion *Nde*I-*Hpa*I (**B**). Puis l'HisTag a été ajouté à l'extrémité 3' du gène *slr*1964 par mutagenèse dirigée (Quickchange XL site-directed mutagenesis kit, Stratagene) sur le plasmide pCB16 en utilisant la paire d'oligonucléotides F64NterHis/R64NterHisII pour donner le plasmide pCB17. Une cassette de résistance à la spectinomycine et à la streptomycine de 2000bp a été ensuite insérée dans le site unique de restriction *Hpa*I de pCB17 pour donner pCB19. L'insertion de cette cassette a été vérifiée par digestion *Hinc*II (**C**). 2 sites de restriction *Hinc*II sont attendus sur la construction pCB19 de part et d'autre de la cassette de 2kb, cette bande est clairement observée sur **C**. Dans **B** et **C**, l'ADN a été chargé sur un gel agarose 1%.

trouvant sur le gène *slr*1964 (Wilson *et al.* 2008a). Pour finir, la souche sauvage de *Synechocystis* a été transformée avec ce plasmide comme décrit dans les paragraphes suivants.

1.3 Constructions pour surproduire la FRP dans *Synechocystis*

Deux types de construction ont été réalisés pour surexprimer la FRP chez *Synechocystis* : (1) le gène *slr*1963 (codant pour l'OCP) suivi du gène *slr*1964 (codant pour la FRP) a été cloné en phase avec le promoteur du gène *psb*AII dans le plasmide PBSA2-6364 (Wilson *et al.* 2008a) et (2) le gène *slr*1964 a été mis directement sous le contrôle du promoteur du gène *psb*AII dans le plasmide pCB16.

(1) Afin de surproduire l'OCP et la FRP avec un HisTag aux extrémités N et C-terminales dans *Synechocystis*, des nucléotides codant pour 6 histidines ont été ajoutés aux extrémités 3' et 5' du gène *slr*1964 par mutagenèse dirigée (Quickchange XL site-directed mutagenesis kit, Stratagene) sur le plasmide pPBSA2-6364 (Wilson *et al.* 2008a) contenant le gène *slr*1963 suivi de *slr*1964 pour donner les plasmides pCB10 et pCB11 (figure MM.5). Les paires d'oligopeptides utilisées pour le tag aux extrémités N et C-terminales sont F64NterHis/R64NterHis et F64CterHis/R64CterHis, pour pCB10 et pCB11, respectivement. Une cassette de résistance à la spectinomycine et à la streptomycine de 2000bp a ensuite été insérée dans le site unique de restriction *Hpa*I de pCB10 et pCB11 pour donner pCB12 et pCB13, respectivement (figure MM.5). Le codon de départ GTG de *slr*1964 a été muté en ATG par mutagenèse dirigée (Quickchange XL site-directed mutagenesis kit, Stratagene) sur les plamides pCB12 et pCB13 en utilisant les paires d'oligopeptides F64HisN-ATG/R64HisN-ATG et R64HiCatg2/R64HisC-ATG pour donner pCB14 et pCB15, respectivement.

(2) Afin de surproduire seulement la FRP avec un HisTag aux extrémités N et C-terminales dans *Synechocystis*, le gène *slr*1964 a été amplifié par PCR en utilisant la paire d'oligopeptides 64NterNdeI/psbA2HPAI. Le fragment de 506bp a été introduit après digestion *Nde*I-*Hpa*I dans le plasmide pPSBA2 (Lagarde *et al.* 2000) pour donner la construction nommée pCB16 (figure MM.7). Puis l'HisTag a été ajouté aux extrémités 3' et 5' du gène *slr*1964 par mutagenèse dirigée (Quickchange XL site-directed mutagenesis kit, Stratagene) sur le plasmide pCB16 en utilisant les paires d'oligonucléotides F64NterHis/R64NterHisII et F64CterHis/R64CterHis pour donner les plasmides pCB17 (HisTag en N-terminal) et pCB18 (HisTag en C-terminal), respectivement. Une cassette de résistance à la spectinomycine et à la streptomycine de 2000bp a été ensuite insérée dans le site unique de restriction *Hpa*I de pCB17 et pCB18 pour donner pCB19 et pCB20, respectivement (figure MM.7). Un plasmide de contrôle sans HisTag nommé pCB21 a été construit en insérant la même cassette de résistance que ci-dessus dans le site unique de restriction *Hpa*I de pCB16.

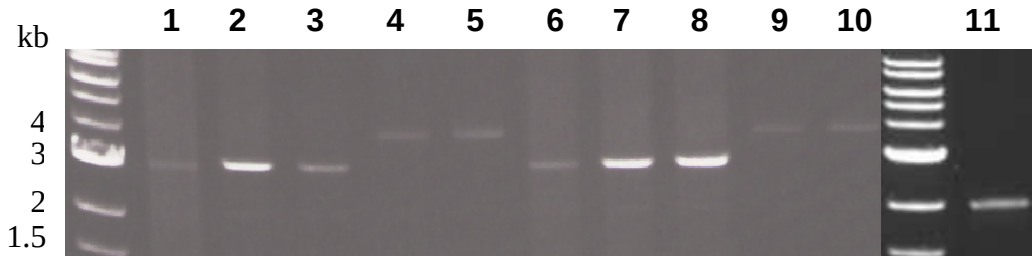


Figure MM.8 : Vérification de la construction et de la ségrégation des mutants de la FRP dans *Synechocystis*

La figure montre l'amplification de l'ADN génomique des mutants Δ*64*CB19 (puits 1), Δ*64*CB20 (puits 2), Δ*64*CB21 (puits 3), Δ*64*CB14 (puits 4), Δ*64*CB15 (puits 5), WTCB19 (puits 6), WTCB20 (puits 7), WTCB21 (puits 8), WTCB14 (puits 9), WTCB15 (puits 10), et du sauvage (puits 11) de *Synechocystis*. La taille en kb du marqueur moléculaire est indiquée. Les oligopeptides utilisés sont PSBA2UP2 et psba2down2 (voir tableau 4), la taille attendue est environ 3kb pour les mutants surexprimant la FRP (puits 1, 2, 3, 6, 7 et 8), environ 4kb pour les mutants surexprimant l'OCP + la FRP (puits 4, 5, 9 et 10) et environ 2kb pour le sauvage (11).

Deux souches réceptrices ont été utilisées : la souche sauvage et le mutant Δ*slr*1964 de *Synechocystis*. Elles ont été transformées par double recombinaison avec les plasmides pCB12, pCB13, pCB14, pCB15, pCB19, pCB20 et pCB21 (voir figure MM.4 pour les 4 premiers et figure MM.6 pour les 3 autres). La sélection des mutants a été réalisée à basse lumière à 32°C sur des boîtes contenant les antibiotiques appropriés à différentes concentrations : 25 ou 12.5µg.mL^{-1} de spectinomycine, 10 ou 5µg.mL^{-1} de streptomycine et 40µg.mL^{-1} de kanamycine.

Tous les mutants obtenus ont été séquencés pour vérifier que les mutations étaient celles attendues et que leur ségrégation était complète. Leur ADN génomique a été extrait (Cai et Wolk 1990) et purifié (voir paragraphe 1.5), puis amplifié avec la paire d'oligopeptides PSBA2UP2/psba2down2 pour amplifier la séquence entre les régions en amont et en aval du gène *psbAII* (voir figure MM.4 et MM.6, figure MM.8). Ces fragments de PCR de 4000bp (pCB12, pCB13, pCB14 et pCB15) et de 3000bp (pCB19, pCB20 et pCB21) ont été envoyés pour séquençage (MWG).

1.4 Transformation des souches

Transformation des cellules XL10 Golds Ultracompétentes (Stratagene) et BL21 (Stratagene) d'E.coli par choc thermique :

50µl de cellules compétentes + 4µl de β-mercaptoéthanol ont été incubés 10 minutes dans un tube Ependorf de 1mL à 4°C. Entre 2 et 5µl de produit de ligation ou de mutagenèse dirigée y ont ensuite été ajoutés, mélangés doucement et l'ensemble a été incubé 20 minutes à 4°C. Le choc thermique a été réalisé par l'immersion du tube dans un bain-marie à 42°C pendant 1 minute. Le tube a ensuite été remis 2 minutes à 4°C, puis son contenu a été mélangé avec 0.5mL de milieu NZY$^+$ (LB +12.5mM $MgCl_2$-$MgSO_4$ + 40mM Glucose) dans un tube de culture (volume 6mL) et incubé 1 heure à 37°C sous agitation. Pour finir, 180µl x 3 du contenu du tube ont été étalés sur 3 boîtes LB Agar contenant les antibiotiques appropriés (voir tableau 2). Et les boîtes ont été incubées une nuit à 37°C.

Transformation des cellules de Synechocystis (sur 3 jours)

Avant la transformation, les cellules ont été cultivées pendant au moins 2 semaines avec une dilution tous les 3-4 jours de façon à ce que leur DO_{800nm} n'excède pas 1.2.

Le jour n°1, 2mL de cellules à DO_{800nm} = 0.6-1 ont été centrifugés 5min/6000xg/25°C et les cellules ont été resuspendues dans 400µl de milieu de culture. Ensuite 200µl de cellules + environ 15µl d'ADN à introduire dans les cellules ont été incubés une nuit à température ambiante, sans agitation et à l'obscurité. Le jour n°2, 1mL de milieu de culture a été ajouté au mélange et celui-ci a été transféré dans un tube de culture, puis incubé 4 heures à 33°C sous lumière blanche (30 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}). 4 x 300µl du mélange ont ensuite été étalés sur 4

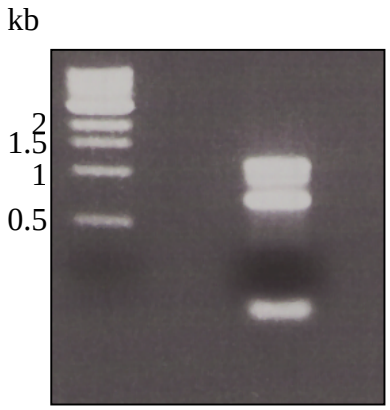


Figure MM.9 : gel agarose 1.5% d'ARN purifié
Le puits contient 2µl de l'ARN purifié du sauvage de *Synechocystis* avec la méthode décrite dans les matériels et méthodes. La taille en kb du marqueur moléculaire est indiquée.

boîtes de pétri contenant du milieu de culture gélifié (voir la partie 3 pour la composition du milieu de culture). Et les boîtes ont été placées une nuit dans un incubateur à 33°C sous agitation et lumière blanche faible (30 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}). Le jour n°3, les antibiotiques appropriés (à concentrations normales pour deux des boîtes et divisées par deux pour les deux autres) ont été ajoutés et les boîtes ont été remises dans l'incubateur pendant 11 jours jusqu'à l'apparition des colonies.

1.5 Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique a été extrait selon la méthode initialement décrite par Cai et Wolk (Cai et Wolk 1990).

Les cellules de *Synechocystis* poussées sur boîte ont été resuspendues dans 200µl de tampon Tris-HCl 50mM pH 8, 0.1M EDTA. 50 à 100µl de billes de verre (Invitrogen), 20µl de SDS à 10% et 200µl de phénol pH 6.9 (Sigma) ont été ajoutés et les cellules ont été cassées en vortexant pendant 1 minute. Afin d'ôter les cellules non cassées, le mélange a été centrifugé 2min/10000xg /4°C. La phase aqueuse contenant l'ADN a été prélevée puis 200µl de phénol : chloroform : alcool isoamyl (25 : 24 : 1, Sigma) y ont été ajoutés et, après agitation, le mélange a été centrifugé 2min/10 000xg/4°C. Afin d'ôter les traces de phénol de la phase aqueuse, cette opération a été répétée une deuxième fois. L'ADN génomique a ensuite été précipité en ajoutant 0.7 volume d'isopropanol (Fluka) à la solution aqueuse obtenue, le mélange a été agité, puis centrifugé 20min/10000xg/4°C. Le culot contenant l'ADN génomique a été rincé avec 200µl d'éthanol à 70% glacé et re-centrifugé 15min/10000xg/4°C. Et pour finir le culot a été séché 30 minutes à 37°C et l'ADN génomique resuspendu dans 50µl d'eau désionisée.

L'ADN génomique obtenu a parfois été purifié avec un kit (kit GENOMICS de Millipore).

La qualité de l'ADN obtenu a été vérifiée en faisant migrer 2µl de la solution d'ADN sur un gel d'agarose 1% contenant 0.06µg.mL^{-1} de bromure d'éthidium (tampon de migration TBE : 89mM Tris Borate, 89mM acide Borique, 2mM EDTA, pH 8.3).

2. Purification de l'ARN et RT-PCR

2.1 Purification de l'ARN

L'ARN a été isolé à partir de 10mL de cellules de *Synechocystis* à une DO_{800nm} = 0.8. Toutes les solutions et matériaux ont été pré-traités avec 0.1% de DEPC (Diéthypyrocarbonate) et autoclavés quand cela était possible. Les cellules suspendues dans

800µl d'eau distillée 0.1% DEPC, 600µl de phénol pH 4.3 (Sigma) et 1/3 du volume en billes de verre (Sigma) ont été cassées par 2 fois 1 minute de vortex. La phase aqueuse a été séparée par centrifugation à 15000xg puis mélangée avec 750µl de phénol pH 4.3. Ensuite la phase aqueuse a été re-séparée et l'opération de mélange avec le solvant+centrigugation a été répétée 2 fois avec 700µl de chloroforme pour ôter le phénol. L'ARN a été précipité par l'ajout d'un volume d'isopropanol et d'1/10 de volume d'acétate de sodium pH 4.3. Le culot contenant l'ARN a ensuite été lavé avec de l'éthanol 70%, séché 20-30min à température ambiante et resuspendu dans 50µl d'eau désionisée contenant 0.1% DEPC. L'obtention d'ARN a été vérifiée en faisant migrer 2µl de cette solution sur un gel 1.5% d'agarose (figure MM.9). 5µl d'ADNse ARNase-free (Sigma) ont été ajoutés et l'ADN résiduel a été digéré pendant 30min. La qualité de l'ARN a ensuite été vérifiée avec un spectophotomètre (biophotometer, Eppendorf) : le rapport $A_{260nm/280nm}$ vaut 2 ± 0.1 et $A_{260nm/230nm}$ vaut 2.1 ± 0.1 s'il n'y a pas de contamination en ADN, protéines et résidus de phénol. Pour finir, la quantité d'ARN a été estimée en utilisant la formule :
A_{260nm} = 1 = 40ng d'ARN

2.2 Transcription réverse

La transcription réverse a été réalisée avec l'Omniscript® transcriptase (du « Omniscript RT kit », Qiagen) en utilisant 2 µg d'ARN et 10µM d'oligopeptides réverses spécifiques. Le tableau 4, liste des oligopeptides utilisés, et l'annexe A1 montrent leur localisation sur les gènes *slr*1963 et *slr*1964. La réaction a été réalisée dans un volume total de 20µl pendant 1h30 à 37°C selon le manuel d'utilisation du kit du fournisseur (Qiagen). 2µl d'ADN complémentaire issu de la transcription réverse ont été utilisés par réaction de PCR dans Robocycler Gradient 96 (Stratagene) avec le programme suivant : 1 cycle de 5min à 95°C ; 30 cycles de 30s à 95°C, 30s à 50°C et 1min30 à 72°C ; 1 cycle de 30s à 95°C, 30s à 50°C et 7min à 72°C ; 1 cycle de 4min à 4°C. La *tfl* DNA polymérase (Promega) a été utilisée et la réaction de PCR a eu lieu dans un volume total de 50µl selon les conseils du fournisseur.

3. Conditions de culture liquide des cyanobactéries

3.1 Conditions normales

Les cyanobactéries mésophiliques d'eau douce *Synechocystis*, *Arthrospira maxima*, *Anabaena variabilis* et *Synechococcus elongatus* PCC 7942 ont été cultivées dans des conditions phototrophiques dans un milieu BG11 modifié (contenant le double de nitrate de sodium) (Herdman *et al.* 1973). Les mutants de *Synechocystis* ont été cultivés en présence des

antibiotiques appropriés (voir tableau 2) aux dilutions suivantes : 25µg de spectinomycine par mL, 10µg de streptomycine par mL et 40µg de kanamycine par mL. Les cellules ont poussé dans un incubateur à 33°C, sous agitation (120rpm) et sous éclairage par des lampes blanches fluorescentes donnant une intensité totale d'environ 30-40 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} dans une atmosphère enrichie en CO_2. La souche thermophile *Thermosynechococcus elongatus* a été cultivée dans des conditions similaires à celles précédemment citées sauf que le milieu était du DTN (Mühlenhoff et Chauvat 1996) et la tempétature à 45°C. Les cellules ont été maintenues dans la phase logarithmique de croissance et collectées à une DO_{800nm}=0.6-0.8.

Les picocyanobactéries marines *Synechococcus* RS9917, WH8018, RCC307 et WH8102 ont été cultivées par notre collaborateur Dr. C. Six (Mount Allison University, Canada) (Boulay *et al.* 2008b). Les cellules ont poussé dans un milieu PCR-11 (Rippka *et al.* 2000) dans des flasques de culture en polystyrène à 22 ± 1°C et à 25 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} de lumière blanche provenant de néons fluorescents (Sylvania Daylight).

3.2 Conditions de carence en fer

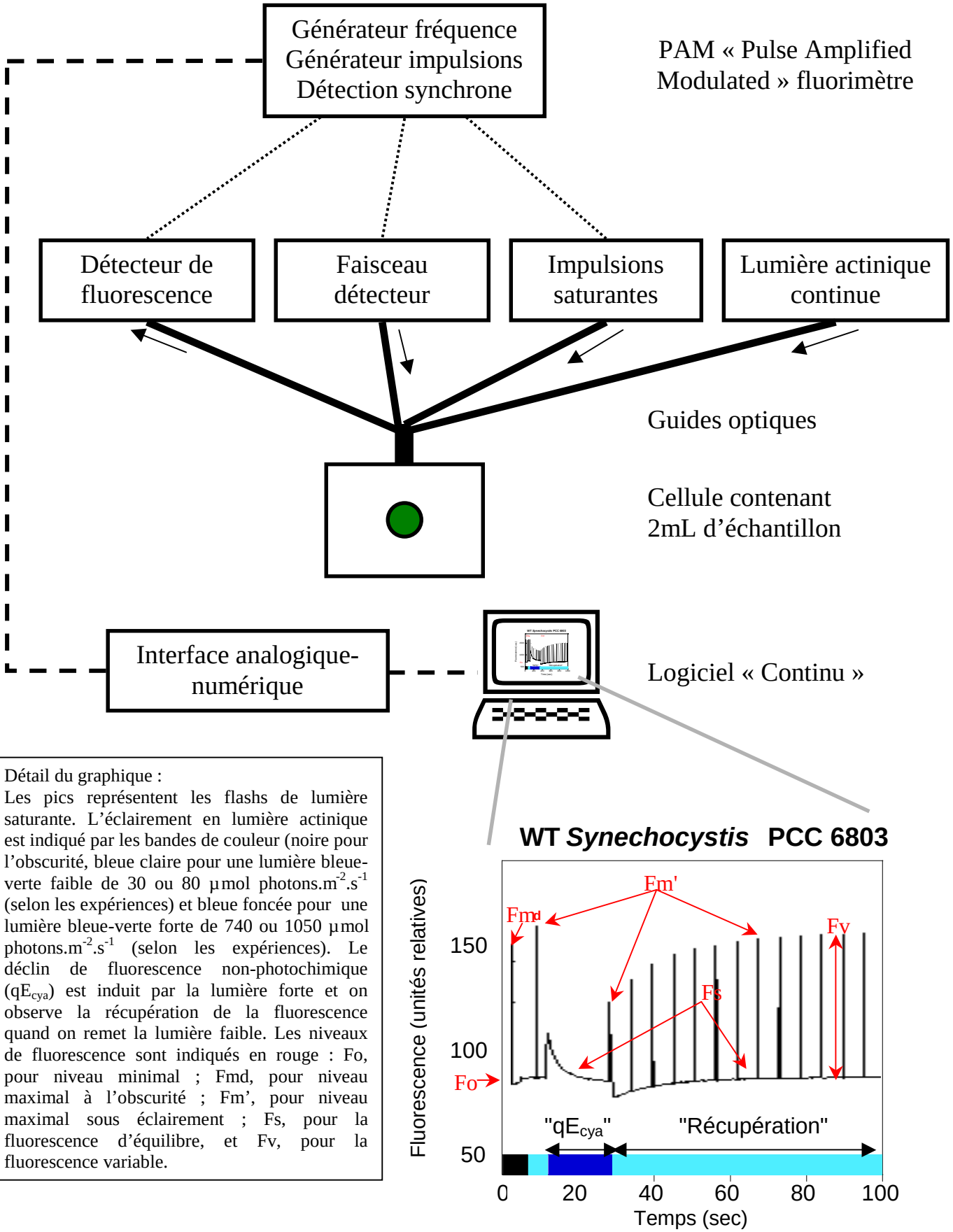
Les cyanobactéries ont été collectées dans la phase de croissance logarithmique, précipitées et resuspendues (DO_{800nm}=0.6) dans le milieu modifié BG11 (Herdman *et al.* 1973) ou DTN (Mühlenhoff et Chauvat 1996) dans lequel le $FeSO_4$ $7H_2O$ contenant le fer a été remplacé par du Na_2SO_4. Les cellules ont poussé sous un éclairage moyen de 90-120 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}. Les cellules ont été diluées de façon à maintenir la concentration à une DO_{800nm} comprise entre 0.6 et 1.2.

4. Mesures d'absorbance

Les mesures d'absorbance en ultraviolet et en visible ont été réalisées avec un spectromètre $UVIKON_{XL}$ (SECOMAN, Alès) en utilisant des cuvettes adaptées (quartz pour l'ultraviolet).

4.1 Concentration en chlorophylle

La mesure a été réalisée à partir de 2mL de suspension cellulaire qui ont ensuite été concentrés 10 fois par centrifugation puis resuspendus dans 200µl de milieu de culture. 50µl de cette resuspension ont été solubilisés dans 950µl de méthanol (Bennett et Bogorad 1973). Les débris cellulaires ont été ôtés par une rapide centrifugation et l'intensité du pic correspondant à la chlorophylle a été mesurée à 665nm. Les mesures ont été réalisées en double ou en triple.



Détail du graphique :
Les pics représentent les flashs de lumière saturante. L'éclairement en lumière actinique est indiqué par les bandes de couleur (noire pour l'obscurité, bleue claire pour une lumière bleue-verte faible de 30 ou 80 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} (selon les expériences) et bleue foncée pour une lumière bleue-verte forte de 740 ou 1050 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} (selon les expériences). Le déclin de fluorescence non-photochimique (qE_{cya}) est induit par la lumière forte et on observe la récupération de la fluorescence quand on remet la lumière faible. Les niveaux de fluorescence sont indiqués en rouge : Fo, pour niveau minimal ; Fmd, pour niveau maximal à l'obscurité ; Fm', pour niveau maximal sous éclairement ; Fs, pour la fluorescence d'équilibre, et Fv, pour la fluorescence variable.

Figure MM.10 : Principe de montage du PAM et exemple de mesures du rendement de fluorescence du sauvage de *Synechocystis*

Le coefficient d'extinction molaire de la chlorophylle *a* à cette longueur d'onde est 79.24 $mL.mg^{-1}.cm^{-1}$ (Lichtenthaler 1987).
Le calcul est le suivant :

$$\text{Concentration de chlorophylle en } mg.mL^{-1} = \frac{DO_{665} \text{ x Volume total du tube}}{79.24 \text{ x Volume d'échantillon dans le tube}} \text{ x dilution}$$

4.2 Le ratio phycobiliprotéine/chlorophylle (PC/Chl)

Les PC et APC constituent le pic attribué aux phycobiliprotéines à environ 625nm sur le spectre d'absorbance visible des cyanobactéries testées dans cette thèse. Celui de la chlorophylle est à 681nm en conditions normales et à 673nm en conditions de carence en Fer (Laudenbach et Straus 1988; Burnap *et al.* 1993). Le ratio a été calculé à partir de spectres d'absorption en utilisant la formule suivante :

$$\text{Ratio} = \frac{DO_{625nm} - DO_{800nm}}{DO_{681} \text{ ou } DO_{673nm} - DO_{800nm}}$$

Les caroténoïdes et la chorophylle affectent légèrement le pic des PC et APC (des phycobiliprotéines). Malgré cette contribution parasite, nous avons considéré que cet index donne une idée réaliste des variations du ratio phycobiliprotéine/chlorophylle pendant la carence en fer.

5. Mesures de fluorescence

5.1 Mesures du rendement de fluorescence avec un fluorimètre PAM

Le rendement de fluorescence est défini comme le nombre de quanta d'énergie émis sur le nombre de quanta absorbés par le système photosynthétique étudié. Ce signal de fluorescence peut être suivi à température de vie des cellules en fonction du temps (ordre de la seconde à la minute dans ce travail de thèse). Cette mesure reflète en temps réel les évènements photosynthétiques qui ont lieu dans la cellule dans les différentes conditions imposées de l'expérience.

Le rendement de fluorescence a été mesuré avec un fluorimètre à pulse d'amplitude modulée (« Pulse Amplified Modulated fluorimeter »), plus simplement nommé fluorimètre

PAM (101/102/103-PAM pour les souches d'eau douce et Xenon-PAM pour les souches marines ; Walz, Effelrich, Germany) (voir figure MM.10).

Dans ce type de fluorimètre, la source détectrice de la fluorescence est modulée et la fluorescence est mesurée par un amplificateur conçu pour rejeter les signaux qui n'ont pas cette fréquence de modulation (ici : 1.6KHz). Cet équipement permet de mesurer un vrai rendement de fluorescence, l'intensité de fluorescence étant indépendante de l'intensité de la lumière actinique (figure MM.10). Les termes utilisés dès à présent tels que mesure du « déclin de fluorescence », de la «récupération de fluorescence » ou du « niveau de fluorescence » en général, correspondant à des adaptions de l'appareil photosynthétique sous différents éclairements, sont pour être précis des mesures du déclin du rendement de fluorescence, de récupération du rendement de fluorescence et du niveau du rendement de fluorescence en général.

Les échantillons pour toutes les mesures du rendement de fluorescence ont été mis dans une cuvette de 1cm avec un système d'agitation à 32°C pour *Synechocystis*, *Arthrospira Maxima* et *Anabaena variabilis* et 40°C pour *Thermosynechococcus elongatus*.
Après une illumination à base irradiance de lumière bleue-verte (400-500nm, 30 ou 80 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} selon les expériences) d'environ 1 minute des cellules adaptées à l'obscurité, le déclin de fluorescence a été induit avec 740 ou 1050 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} (selon les expériences) de lumière bleue-verte pendant environ 5 minutes. Ensuite les cellules ont été remises sous la lumière à base irradiance pendant 1 minute ou, dans le cas de la mesure de la récupération de la fluorescence (« recovery »), pendant environ 20-30 minutes.
Pour les mesures de transitions d'état, après une illumination de faible intensité de lumière bleue-verte (400-500nm, 80 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}), la transition d'état 2 (State 2) a été induite par lumière orange (600-650nm) à 20 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} d'intensité lumineuse ; puis les cellules ont été ré-illuminées avec une faible intensité de lumière bleue-verte.

Les différents paramètres mesurés avec le PAM sont (voir les détails dans le texte ci-après) (figure MM.10) :

- Fo : la fluorescence initiale
- Fm' : la fluorescence maximale
- Fm_d : la fluorescence maximale à l'obscurité
- Fm' : la fluorescence maximale à la lumière
- Fs : la fluorescence d'équilibre
- Fv : la variable de fluorescence

La lumière de mesure du PAM a un maximum d'excitation à 650nm et la fluorescence est détectée au delà de 700nm. Chez les cyanobactéries, la fluorescence détectée est émise par la chlorophylle *a* et par les phycobiliprotéines (Campbell *et al.* 1998b) parce que la lumière

mesurante est absorbée aussi bien par les phycobilisomes que par la chlorophylle *a*. Ainsi le niveau de fluorescence minimal (Fo) varie en fonction de la concentration de phycobiliprotéine cellulaire, plus il y a de phycobilisomes, plus Fo est élevée (Campbell *et al.* 1998b; El Bissati *et al.* 2000). Fo a été déterminée sur les échantillons adaptés à l'obscurité en illuminant ces cellules avec une lumière basse modulée (1.6 kHz, 0.024 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}, 650nm pour les souches d'eau douce et 4Hz ; 0.1 µmol photon.m^{-2}.s^{-1}, 520nm pour les souches marines, travail réalisé par Dr. C. Six (Boulay *et al.* 2008b)). Des pulses saturants de 2000 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} pendant 1s ou de 5000 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} pendant 400ms ont été appliqués sur les cyanobactéries d'eau douce et de 4000 µmol photons.m^{-2}.s^{-1} pendant 0.5s sur les cyanobactéries marines. Ils ont été appliqués pour mesurer les niveaux de fluorescence maximale Fm_d et Fm' pour les échantillons adaptés à l'obscurité ("d" pour "dark") et à la lumière, respectivement (figure MM.10). Le fait d'appliquer de tels pulses, qui ferment immédiatement tous les centres de PSII, sert à distinguer le déclin de fluorescence photochimique (qP) et non-photochimique (le "non-photochemical quenching" ou NPQ ou qT ou qE_{cya}, voir partie 4.1 de l'introduction). Fs est le niveau de fluorescence d'équilibre des centres ouverts et fermés sous une condition d'illumination (fluorescence quand il n'y a pas de flash saturant qui ouvre tous les centres) et Fv est la variable de fluorescence (différence entre Fo et Fm' lors d'un flash saturant qui ferme tous les centres).

5.2 Mesure de fluorescence à 77°K, 10°C et température ambiante

Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence à 77°K, à 10°C et à température ambiante ont été réalisés avec un spectrophotomètre de fluorescence CARY Eclipse (Varian, USA). Les cellules étaient à une concentration de 3 µg chl.mL^{-1}. Les phycobilisomes isolés du sauvage de *Synechocystis* ont été dilués à DO_{622nm}=0.06 et ceux du mutant CK (contenant seulement le cœur des phycobilisomes) à DO_{655nm}=0.06. Pour les spectres à 77°K, les échantillons ont été rapidement congelés dans des capillaires en verre (diamètre de 5mm) par immersion d'abord dans un mélange de carboglace et d'éthanol, puis dans de l'azote liquide.

6. Préparation de membranes (MB) et de membranes liées aux phycobilisomes (MP)

Tampon MES pour faire les MB : 20 mM MES (pH 6.8)
Tampon PC pour faire les MP : 0.7 M K-phosphate / 0.3 M Na-Citrate (pH 6.8)
Juste avant utilisation, des inhibiteurs de protéases et de la DNase ont été ajoutés aux tampons PC et MES :

- 1mM d'EDTA
- 1mM d'acide caproïque
- 1mM de phényl-méthylsulfonyl fluoride
- 1mM de benzamidine
- 50 µg.ml^{-1} de DNase I (bovine pancreas type IV, Sigma).

6.1 Préparation des membranes (MB)

Les cellules ont été resuspendues dans 1-2mL à une concentration de 1mg Chl.mL^{-1} et cassées dans un mélangeur en présence de 1/3 du volume de billes de verre dans le tampon MES pour obtenir les MB. Les cellules non cassées ont été ôtées par centrifugation 5min/2000xg/20°C. Puis les membranes contenues dans le surnageant ont été précipitées par centrifugation 30min/20000xg/20°C. Les MB ainsi culottées après avoir jeté le surnageant bleu (qui contient des phycobilisomes libres) ont été re-suspendues dans 50µl de tampon MES et leur concentration en chlorophylle a été mesurée. Ces préparations de MB ont ensuite été conservées à -80°C jusqu'à utilisation pour les électrophorèses sur gel.
Une variante de cette technique a été utilisée pour les expériences sur la localisation de la FRP dans les membranes (chapitre IV, partie 5). Le tampon utilisé était composé de Tris-HCl 100mM pH 8, des inhibiteurs de protéases et de DNase (voir ci-dessus). 35mL de cellules à 1mg Chl.mL^{-1} y ont été resuspendus et les cellules ont été cassées par 3 cycles de presse de French à 700psi. Les MB ont ensuite été collectées par centrifugation comme décrit dans le paragraphe ci-dessus.

6.2 Préparation des membranes liées aux phycobilisomes (MP)

Les cellules ont été resuspendues dans 1-2mL à une concentration de 1mg Chl.mL^{-1} et cassées dans un mélangeur en présence de 1/3 du volume de billes de verre dans le tampon PC pour obtenir les MP. Les cellules non cassées ont été ôtées par centrifugation 5min/2000xg/20°C. Puis les MP contenues dans le surnageant ont été précipitées par centrifugation 30min/20000xg/20°C. Les MP ainsi culottées après avoir jeté le surnageant limpide ont été re-suspendues dans 50µl de tampon Tris-HCl 100mM pH8 (utilisation sur des gels SDS-PAGE) ou de tampon PC (mesure de leur fluorescence) et leur concentration en chlorophylle a été mesurée. Ces préparations de MP ont été conservées à -80°C jusqu'à utilisation pour les électrophorèses sur gel. Et pour les spectres de fluorescence, les fractions de MP ont été utilisées immédiatement sans congélation.

7. Purification des phycobilisomes (PBS)

Les phycobilisomes ont été isolés comme décrit par Ajlani *et al.* (1995). Les cellules (1L) à DO_{800nm} = 0.6-0.8 ont été centrifugées 6min/3000xg/20°C et resuspendues à une concentration de 0.7mg Chl.mL^{-1} dans 3-6mL de tampon K-Phosphate 0.75M pH 7.5 (et avec les anti-protéases et la DNase comme décrit dans la partie 6) dans un tube falcon de 15mL. Les cellules ont été cassées par 3 cycles de vortex de 2min dans ce tube en présence de 1/3 du volume de billes de verres. Les cellules non cassées ont été ôtées par centrifugation 5min/2000xg/20°C et le surnageant a été incubé avec 2% de Triton pendant 1 à 2 heures à température ambiante. Le matériel non-solubilisé a ensuite été séparé par centrifugation 20min/20000xg/20°C. Puis le surnageant a été appliqué sur un gradient de saccharose et ultracentrifugé 150000xg(Ti70,36000rpm)/20°C pendant une nuit (minimum 10h). Le gradient de saccharose contenait de bas en haut : 3.5mL à 1.5M, 2.5mL à 0.75M, 2mL à 0.5M et 1mL à 0.25M. La bande bleue contenant les phycobilisomes entiers de la souche sauvage de *Synechocystis* a été obtenue à l'interface des fractions 0.75M et 1.5M de saccharose et celle contenant les cœurs de phycobilisome du mutant CK dans la fraction 0.5M de saccharose (figure CIII.1).

8. Purification de l'Orange Carotenoid Protein (OCP) surexprimée

La purification de l'OCP a été réalisée comme décrit dans Wilson *et al.* (2008). Les cellules du mutant surproduisant l'OCP marquée avec un HisTag dans *Synechocystis* (Wilson *et al.* 2008a) ont poussé jusqu'à une DO_{800nm}=1 et ont été récoltées (environ 15L) par centrifugation 5min/3000xg/4°C. Les culots ont été resuspendus à une concentration finale de 1 mgChl.ml^{-1} dans un tampon Tris-HCl à 0.1M pH 8, 1mM de benzamidine, 1mM d'acide caproïque, 5mM d'EDTA, 1mM de phényl-méthylsulfonyl fluoride et 50 µg.ml^{-1} de DNase I (bovine pancreas type IV, Sigma). Les cellules en suspension ont été cassées dans la pénombre par 4 cycles de presse de French à 700psi. Après avoir ôté les cellules non cassées par centrifugation 5min/2000xg/4°C, les membranes ont été culottées par ultracentrifugation à 180000xg pendant 1h30 à 4°C. Le surnageant a été chargé dans une colonne sur une résine Ni-ProBond (Invitrogen) préalablement équilibrée avec 40mM de Tris-HCl pH 8, 150mM de tampon K-phosphate pH 8, 500mM de NaCl, et 10% de glycérol. La colonne a été lavée avec 4 volumes de tampon d'équilibration contenant 30mM d'imidazole et l'OCP a été éluée avec 160mM d'imidazole dans le tampon d'équilibration. L'éluat a été dialysé contre 40mM de Tris-HCl pH 8 à 4°C pendant 24h. La purification de la protéine a été améliorée en la passant sur une colonne Whatman DE-52 cellulose. L'OCP a été éluée en utilisant 80mM de NaCl dans 40mM de Tris-HCl pH 8, dialysée contre 40mM de Tris-HCl pH 8 à 4°C pendant 24h et concentrée. Pour déterminer le poids moléculaire et la pureté, la protéine a été analysée par

SDS-PAGE et spectres d'absorbance ultraviolet et visible. Le ratio d'absorbance A_{467nm}/A_{280nm} a été utilisé comme critère de pureté et était proche de 1.97 dans la plupart des préparations.

9. Purification de la Fluorescence Recovery Protein (FRP) surexprimée

Différentes souches ont été créées pour purifier la FRP surexprimée avec soit un StrepTag dans *E.coli*, soit un HisTag dans *E.coli* et soit un HisTag dans *Synechocystis*.

9.1 Purification de la FRP avec un StrepTag dans *E.coli*

La FRP surproduite avec un StrepTag dans *E.coli* forme des corps d'inclusion même dans une souche adaptée à la surproduction de protéines comme la souche BL21 (les souches avec un StrepTag créées pour cette étude étant BL21pCB7 (Tag en N-terminal) et BL21pCB8 (Tag en C-terminal), voir tableau 2). Le protocole décrit ci-dessous a donc été adapté pour la purification de la FRP à partir de corps d'inclusion.

200mL de cellules ont été cultivés à 37°C. La surexpression de la FRP a été induite à DO_{600nm} = 1 avec 200µg/mL d'anhydrotétracycline selon la procédure conseillée par le fournisseur (IBA) car l'expression des plasmides pCB7 et pCB8 est sous le contrôle du promoteur tétracycline (annexes A3 et A4). Après leur incubation pendant 12h à 37°C, les cellules ont été centrifugées (6min/3000xg/4°C) et resuspendues dans 5-10mL de tampon 100mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 1mM d'EDTA, 1mM d'acide caproïque, 1mM de benzamidine et de la DNAase (50 $\mu g.ml^{-1}$ de DNase I). Puis, les cellules ont été cassées par 3 cycles de sonication à 40% (Sonicator Cell Disruptor Model W-225R ; Heat Systems-Ultrasonics,INC).

Un test SDS-PAGE et un western blot anti-StrepTag (kit de révélation rapide avec un anticorps primaire et secondaire couplé, IBA) ont ensuite été réalisés sur les cellules cassées pour estimer la quantité de FRP présente sous forme de corps d'inclusion. La quantité de FRP produite étant très faible (voir chapitre V, partie 1 et figure CV.1), les expériences de purification avec ces souches BL21pCB7 et BL21pCB8 produisant la FRP avec un StrepTag n'ont pas été poursuivies.

9.2 Purification de la FRP avec un HisTag dans *E.coli*

La souche *E.coli* avec un HisTag créée pour la purification de la FRP dans cette étude est nommée BL21pCB9 (Tag en N-terminal) (voir tableau 2). La FRP surproduite avec un HisTag dans *E.coli* forme aussi des corps d'inclusion mais en plus grandes quantités que les

souches la produisant avec un StrepTag (chapitre V, partie 1 et figure CV.2). Le protocole décrit ci-dessous a donc été adapté pour la purification de la FRP à partir de corps d'inclusion.

Les cellules (375mL) ont été cultivées à 37°C et la surexpression de la FRP a été induite à DO_{600nm}= 0.5 avec 0.8mM d'IPTG car le plasmide pCB9 (surexprimant la FRP avec un HisTag) est sous le contrôle du promoteur lactose (voir annexe A2). Après leur incubation pendant 12h, les cellules ont été centrifugées (6min/3000xg/4°C) et resuspendues dans 50mL de tampon 20mM Tris-HCl pH 8, 100mM NaCl, 5mM d'acide caproïque, 5mM de benzamidine, 2mM de $MgCl_2$, 0.5% de triton et de la DNAase (50 $\mu g.ml^{-1}$ de DNase I). Puis les cellules ont été cassées par 3 fois 1 minute de sonication à 40%, et les corps d'inclusion ont été purifiés dans le culot par 3 étapes successives de sonication/centrifugation à 20000xg/resuspension dans 50mL de tampon (figure CV.3). La solubilisation de la FRP en corps d'inclusion a été testée avec plusieurs détergents (voir chapitre V et la figure CV.4), la méthode utilisée pour purifier la FRP qui a servi à faire les anticorps anti-FRP est décrite ci-après. Le culot contenant les corps d'inclusion purifiés a été resuspendu dans 15mL de tampon 100mM Tris-HCl pH 8, 12.5% de saccharose, 5mM de benzamidine, 5mM d'acide caproïque, 2% de LiDS et agité (solubilisation des corps d'inclusion par le LiDS). Le LiDS a ensuite été précipité soit par ajout de KCl, soit par ajout de cyclodextrine. Dans le cas de la précipitation au KCl, 150mM de KCl + 6M d'urée + 0,03% de β-DM ont été ajoutés à la solution. Celle-ci a ensuite été centrifugée (20min/20000xg/4°C) pour séparer le culot, qui contenait le LiDS précipité, de la FRP recombinante solubilisée. Puis, le surnageant a été dialysé 12h contre un tampon 40mM Tris-HCl pH 8 et 0.03% β-DM, et les 12mL de corps d'inclusion solubilisés ont été conservés à 4°C. Dans le cas de la précipitation du LiDS avec de la cyclodextrine, la solution a été diluée 5 fois, puis la cyclodextrine a été ajoutée progressivement jusqu'à une concentration de 20mM. La solution a ensuite été agitée pendant 50 minutes, dialysée 12h contre un tampon 40mM Tris-HCl pH 8 et 0.03% β-DM. Puis, la solution dialysée a été centrifugée (20000xg, 15min, 4°C) pour ôter le LiDS précipité avec la cyclodextrine et la solution a été re-dialysée 12h contre le même tampon que la première dialyse. Les 100mL de FRP solubilisée obtenus ont été conservés à 4°C. Les solutions de FRP solubilisées où le LiDS a été ôté soit par précipitation avec du KCl soit avec de la cyclodextrine ont ensuite été purifiées (séparément) dans une colonne sur une résine Ni-ProBond (Invitrogen) préalablement équilibrée avec 40mM de Tris-HCl pH 8, 150mM de tampon K-phosphate, 500mM de NaCl et 10% de glycérol. La colonne a été lavée avec 4 volumes de tampon d'équilibration contenant 15mM d'imidazole, puis 30mM d'imidazole et la FRP a été éluée avec 160mM d'imidazole dans le tampon d'équilibration. Et l'éluat a été dialysé contre 40mM de Tris-HCl pH=8 et 0,03% de β-DM à 4°C pendant 12h. La quantité de FRP obtenue a été estimée par un test de Bradford (Bradford 1976), sa qualité vérifiée en la faisant migrer sur un gel SDS-PAGE et par western blot (figure CV.6).

9.3 Purification de la FRP avec un HisTag dans *Synechocystis*

Dans *Synechocystis*, la FRP surproduite est liée à la membrane (voir chapitre IV et les figures CIV.9 et CIV.10). 12L de cellules du mutant Δ64CB19 (surexprimant la FRP avec un HisTag en N-terminal) ont été concentrés à 1 mg Chl.mL^{-1}, cassés dans un tampon 100mM Tris-HCl pH 8, 1mM d'acide caproïque, 1mM de benzamidine et de la DNAase (50 µg.ml^{-1} de DNase I). Les cellules non cassées ont été ôtées par centrifugation 5min/2000xg/4°C. Puis le surnageant contenant les cellules cassées a été incubé pendant 1 heure à 4°C en présence de 1% de β-dodecylmaltoside et ultracentrigugés (1h/180000xg/4°C). Le surnageant contenant les protéines solubles et les protéines membranaires solubilisées a été chargé dans une colonne contenant une résine Ni-ProBond (Invitrogen) préalablement équilibrée avec 40mM de Tris-HCl pH 8, 150mM de tampon K-phosphate pH 8, 500mM de NaCl, et 10% de glycérol. La colonne a été lavée avec 4 volumes de tampon d'équilibration contenant 30mM d'imidazole et la FRP a été éluée avec 160mM d'imidazole dans le tampon d'équilibration. L'éluat (25mL) a ensuite été dialysé contre 40mM de Tris-HCl pH 8 à 4°C pendant 12h. Après concentration à 1-2mL (centriprep utracel YM-10, Millipore), celui-ci a été analysé par SDS-PAGE pour déterminer sa pureté.

La quantité de FRP obtenue avec la méthode décrite précédemment était faible et contenait des impuretés composées de protéines membranaires de haut poids moléculaire (figure CIV.11), la méthode décrite ci-dessous permet d'améliorer sa purification (figure CIV.12). 30L de cellules du mutant Δ*64*CB19 (surexprimant la FRP avec un HisTag en N-terminal) ont été concentrés à 1 mg Chl.mL^{-1}, cassés dans un tampon 100mM Tris-HCl pH 8, 1mM d'acide caproïque, 1mM de benzamidine et contenant de la DNAase (50 µg.ml^{-1} de DNase I). Les cellules non cassées ont été ôtées par centrifugation 5min/2000xg/4°C et le surnageant a été ultracentrifugé 1h/180000xg/4°C. Les membranes culottées ont ensuite été resuspendues à 0.8mg Chl.mL^{-1} puis incubées pendant 20 minutes à température ambiante dans le tampon d'équilibration (décrit ci-dessous) en présence de 1.2% de β-DM et ultracentrifugées (1h/180000xg/4°C). Le surnageant contenant les protéines membranaires solubilisées a été mélangé dans un bécher contenant 20mL de résine Ni-ProBond (Invitrogen) préalablement équilibrée avec le tampon d'équilibration 40mM de Tris-HCl pH 8, 150mM de tampon K-phosphate pH 8, 500mM de NaCl, 0.03% de β-DM et 10% de glycérol. La résine a été chargée sur une colonne, puis lavée avec 4 volumes de tampon d'équilibration plus 30mM d'imidazole. La FRP a ensuite été éluée avec 160mM d'imidazole dans le tampon d'équilibration. L'éluat (25mL) a ensuite été dialysé contre 40mM de Tris-HCl pH 8 + 0.03% de β-DM à 4°C pendant 12h. Après concentration à 1-2mL (centriprep ultracel YM-10, Millipore), celui-ci a été analysé par SDS-PAGE pour déterminer sa pureté.

10. Conditions pour la reconstitution et l'incubation des phycobilisomes en présence de l'OCP

Les phycobilisomes (PBS) ont été dissociés par une incubation de 20 minutes à 4°C dans un tampon phosphate 0.05M (pH 7). Puis, ils ont été reconstitués à température ambiante par dialyse pendant 2 heures sous agitation contre un tampon phosphate 0.8M (pH 7) en présence d'un excès d'OCP (et sans l'OCP pour les contrôles). Les quantités mélangées de PBS et de l'OCP ont été ajustées à 2nmol de l'OCP et 0.2nmol de PBS pour avoir un ratio OCP/PBS de 10/1 (voir ci-dessous pour le détail du calcul). Pour les expériences d'incubation, les phycobilisomes ont été incubés 2h en présence de l'OCP (ratio idem précédemment) dans un tampon phosphate 0.8M (pH 7). Les phycobilisomes reconstitués et incubés ont ensuite été chargés sur un gradient de saccharose non linéaire (du haut en bas : 0.25M, 0.5M, 0,75M et 1.5M) et ultracentrifugés 12h/150000xg/20°C. La phase contenant les protéines qui ont migré dans 0.25M de saccharose a ensuite été nommée la fraction F1 ; F2 et F3, celles dans 0.5M et dans l'interface 0.75/1.5M, respectivement (figures CIII.4 et CIII.5). La fluorescence des fractions F1, F2 et F3 a été mesurée sans congélation. Les fractions F1, F2 et F3 ont été précipitées avec du TCA 10% avant migration sur gel SDS-PAGE et western blot.

Calculs réalisés pour ajuster les quantités mélangées au ratio 2nmol d'OCP/0.2nmol de PBS

OCP :

La concentration massique de l'OCP purifiée à DO_{495nm} = 3.75 (utilisée pour ces expériences) correspond à 700µg.mL d'après la technique de Bradford (Bradford 1976). Sachant que la masse molaire de l'OCP est de 35 000 $g.mol^{-1}$, la concentration molaire de cette OCP purifiée (à DO_{495nm} = 3.75) est 20 $nmol.mL^{-1}$ (700/35000). 100µl de cette OCP purifiée était donc nécessaire dans le mélange pour en avoir 2 nmoles.

Phycocyanine :

95% de l'absorbance à 622nm correspond à celle de la phycocyanine. Donc la DO mesurée à 622nm = 62 correspondant à celle des phycobilisomes isolés contient une DO_{622nm} = 59 à laquelle uniquement la phycocyanine contribue (95% de 62). L'Єmax d'un hexamère de phycocyanine $(\alpha^{PC}\beta^{PC})_6$ d'λmax = 622nm vaut 2370 $mM.cm^{-1}$ (Glazer 1984). Et il y a 3 hexamères dans les 6 bras (cylindres) des phycobilisomes entiers chez la souche sauvage de *Synechocystis*. La concentration molaire de ces phycobilisomes entiers isolés est donc de 1.4µM ou 1.4$nmol.mL^{-1}$ (59 / (2370 x 3 x 6)). 150µL de ces PBS entiers isolés étaient donc nécessaires dans le mélange pour en avoir 0.2 nmoles.

Allophycocyanine :

Les cœurs de phycobilisomes isolés du mutant CK utilisés dans ces expériences avaient une DO_{655nm} = 5.2. Pour le trimère d'allophycocyanine $\alpha_3^{APC}\beta_3^{APC}$ dont λmax = 655nm, l'Єmax vaut environ $1000mM.cm^{-1}$ (Glazer 1984). Il y a 4 trimères par cylindre et 3 cylindres forment le cœur des phycobilisomes chez *Synechocystis*. La concentration molaire de ces cœurs de phycobilisomes isolés est donc de 0.45µM ou $0.45nmol.mL^{-1}$ (5.2 / (1000 x 4 x 3)). 450µL de ces cœurs de PBS isolés étaient donc nécessaires dans le mélange pour en avoir 0.2 nmoles.

Les mélanges d'OCP et de PBS entiers ou d'OCP et de cœur de PBS ont eu lieu dans un volume total de 2mL pour les expériences de reconstitution et d'incubation. Les quantités d'OCP, de PBS entier et de cœur de PBS mises dans les mélanges sont celles décrites ci-dessus et le volume des mélanges a ensuite été ajusté à 2mL avec du tampon K-Phosphate 0.05M pH 7 pour les expériences de reconstitution et avec du tampon K-Phosphate 0.8M pH 7 pour les expériences d'incubation.

11. Western blot et immuno-déctection

Les protéines totales des cellules, des fractions de MP et MB, et des fractions d'élution ont été analysées par SDS-PAGE sur des gels contenant 2M d'urée dans un système TRIS/MES avec 12% de polyacrylamide dans le cas de la comparaison de l'OCP à 35kDa, et avec 17% de polyacrylamide dans le cas de la FRP à 13kDa (Kashino *et al.* 2001). La protéine IsiA a été détectée par un anticorps polyclonal anti-IsiA (Dühring *et al.* 2006) et l'OCP a été détectée par un anticorps anti-OCP. La protéine FRP a été détectée dans un premier temps avec des anticorps anti-HisTag (Sigma) puis avec des anticorps anti-FRP. Les anticorps anti-OCP ont été faits dans des lapins en utilisant l'OCP recombinante (500µg) issue de *Synechocystis* (CoVance, Denver PA et COVALAB, Lyon, France). Les anticorps anti-FRP ont été réalisés sur des lapins en utilisant 500µg de la FRP recombinante purifiée à partir de corps d'inclusion produits dans *E.coli* (COVALAB, Lyon, France) (voir chapitre V, partie 2). Les dilutions utilisées ont été 1/1000 pour l'anticorps anti-OCP, 1/5000 pour l'anti-IsiA, 1/500 pour l'anti HisTag et 1/1000 pour l'anti-FRP. La liaison des anticorps a été révélée par la réaction colorée de l'alkaline phosphatase. Certaines membranes ont ensuite été scannées et la densité des bandes a été mesurée en utilisant le logiciel Image Mastertotal Lab v1.11 (Amersham Pharmacia).

Une procédure légèrement différente a été utilisée pour l'immuno-détection de l'OCP dans les *Synechococcus* marines par notre collaborateur Dr. C. Six (Boulay *et al.* 2008b). Les cellules ont été récoltées par centrifugation et les protéines extraites par 2 cycles de

décongélation-sonication dans un tampon d'extraction contenant du LiDS. Les protéines totales des *Synechococcus* marines ont été analysées sur un gel NuPAGE avec un gradient 4-12% d'acrylamide (Invitrogen).

12. Co-immunoprécipitation

Les protéines totales (500µg par expérience) des cellules du mutant Δ64CB19 (surexprimant la FRP avec un HisTag en N-terminal) ont été solubilisées pendant 1h à 4°C dans un tampon de solubilisation 50mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 5mM d'EDTA, 1% de β-DM et 0.5% de triton. Elles ont ensuite été incubées pendant 12h à 4°C en présence de 10µl d'anticorps anti-HisTag (« +αHis »), ou en présence de 10µl d'anticorps anti-OCP (« +αOCP »), ou sans anticorps (« -αHis », « -αOCP », contrôles). L'anticorps anti-HisTag (souris) a été utilisé pour accrocher la FRP car le bruit généré par la réaction de l'anticorps secondaire (anti-lapin) avec la grosse sous-unité (50kDa) et la petite sous unité (25kDa) de l'IgG de l'anticorps anti-FRP (lapin) gêne la détection de la bande de l'OCP à 35kDa. 5mg de protéine A sépharose 6B (Sigma) ont été préalablement lavés dans un tampon 20mM d'HEPES pH 7.5, 10% glycérol et 0.1% de β-dodécylmaltoside, et équilibrés dans du tampon de solubilisation. Puis, une incubation pendant 5h de 5mg de billes de protéine A sépharose et des protéines totales mélangées avec les anticorps (ou sans anticorps pour les contrôles) a permis aux protéines accrochées aux anticorps de précipiter avec les billes. Les billes ont ensuite été lavées 3 fois avec le tampon de solubilisation et 1 fois avec un tampon PBS (Phosphate Buffered Saline : 60mM $NaHPO_4$ $12H_2O$, 20mM NaH_2PO_4 $2H_2O$, 70mM NaCl, pH 7.4). Et les protéines accrochées à la protéine A ont été éluées par le tampon de chargement du gel SDS-PAGE. Les expériences («+αHis , -αHis (control), +αOCP, -αOCP (control) ») ont été chargées sur un gel SDS-PAGE. Un western blot anti-OCP a été réalisé sur «+αHis » et « -αHis ». Et un western blot anti-FRP a été réalisé sur «+αOCP » et « -αOCP ».

13. Logiciel de graphique

L'ensemble des graphiques présentés dans cette thèse a été réalisé avec le logiciel KaleidaGraph (Synergy Software).

Chapitre I : Étude des rôles des protéines OCP et IsiA dans la dissipation d'énergie induite par la lumière sous carence en fer

Sous carence en fer, la lumière bleue induit une diminution importante de la fluorescence. Cadoret *et al*. (2004) ont suggéré que cette diminution (quenching) de fluorescence est liée à un mécanisme de photo-protection qui implique la protéine IsiA. IsiA, qui appartient à la vaste famille des protéines liant de la chorophylle, est induite par la carence en fer (Laudenbach et Straus 1988; Burnap *et al.* 1993) ainsi que par d'autres stress (Jeanjean *et al.* 2003; Yousef *et al.* 2003; Havaux *et al.* 2005) et forme des anneaux autour du PSI (Bibby *et al.* 2001; Boekema *et al.* 2001). Cadoret *et al*. (2004) ont proposé que la lumière bleue convertit IsiA en un capteur efficace d'énergie excitatrice, ceci réduit l'énergie atteignant le PSII et protège le système de la photoinhibition lors d'un excès lumineux. La forme excitée de IsiA est instable et son énergie est dissipée en une dizaine de minutes sous forme de chaleur (Cadoret *et al.* 2004). Dans la continuité de cet article, Joshua *et al*. (2005) ont proposé que la carence en fer induit un couplage des phycobilisomes à IsiA et que ce dernier est déclenché par un changement d'affinité d'IsiA pour les phycobilisomes. Ce couplage permettrait de diminuer l'énergie arrivant au PSII .

Cependant, El Bissati *et al*. (2000) avaient démontré en 2000 qu'il existait un déclin de fluorescence non-photochimique induit par la lumière bleue-verte impliquant les phycobilisomes. Ensuite en 2006, Wilson *et al*. ont montré que les phycobilisomes et l'Orange Carotenoid Protein (OCP) jouaient un rôle essentiel dans ce mécanisme de photo-protection (Wilson *et al.* 2006). Ce mécanisme (qE_{cya}) diminue l'énergie provenant des phycobilisomes et arrivant aux centres réactionnels (principalement celui du PSII). L'absorbance de la lumière bleue-verte par le caroténoïde de la protéine OCP augmente la dissipation d'énergie sous forme de chaleur au niveau des phycobilisomes (ou de l'OCP) diminuant en même temps l'émission de fluorescence des phycobilisomes (figure I.26). Wilson *et al*. ont aussi observé la présence de ce mécanisme de déclin de fluorescence dans un mutant ne contenant pas la protéine IsiA (ΔIsiA) (Wilson *et al.* 2006).

Quand je suis arrivée au laboratoire, j'ai contribué à la finalisation d'une étude qui avait pour but d'apporter une clarification quant à l'implication de l'OCP et d'IsiA dans le mécanisme de qE_{cya}. Nous avons étudié ce mécanisme dans différents mutants de *Synechocystis* carencés en fer. Nous avons caractérisé un mutant sans IsiA (ΔIsiA), un mutant sans l'OCP (ΔOCP) et un mutant sans phycobilisomes (PAL) (voir le tableau 2 pour la description des souches). Ce travail a été publié dans *Plant Cell* dans un article dont je suis le deuxième auteur (Wilson *et al.* 2007). Pour une meilleure compréhension du sujet, je décrirai l'ensemble des expériences de ce travail. Je ferai une description plus détaillée des

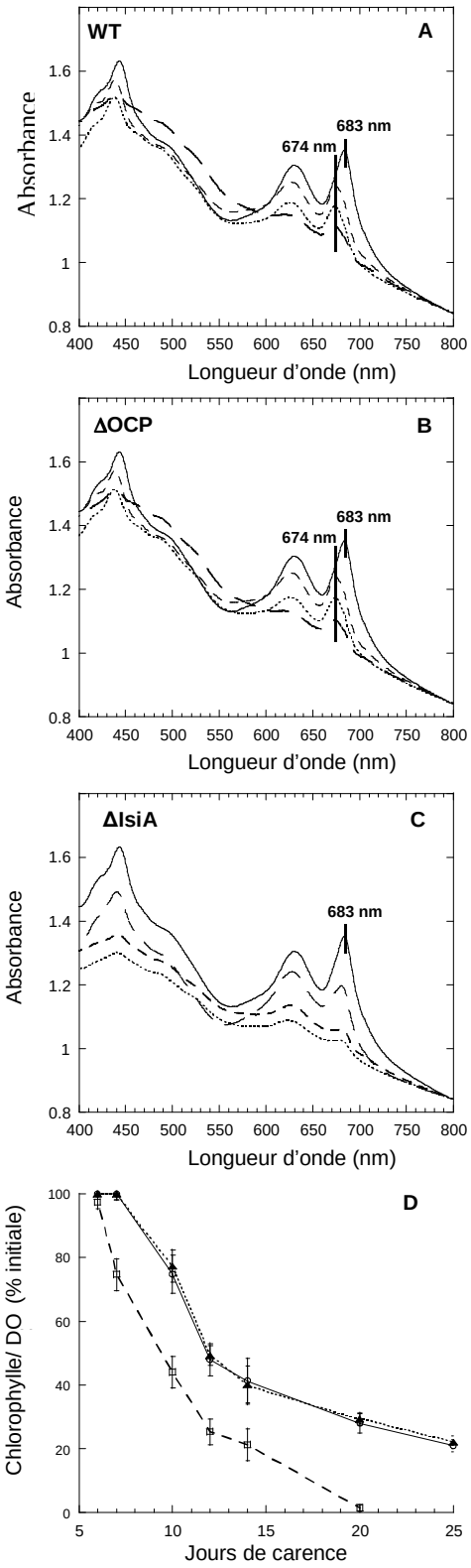


Figure CI.1 :Changements dans le spectre d'absorption et le contenu en chlorophylle induit par une carence en fer chez le sauvage, les mutants ΔOCP et ΔIsiA de *Synechocystis*

A, **B** et **C** correspondent respectivement aux spectres d'absorption des cellules du sauvage, de ΔOCP et de ΔIsiA en conditions de culture normales (trait pleins) et de carence en fer après 12 jours (trait hachuré large), 14 jours (trait hachuré petit) et 20 jours (trait pointillé).

D représente le contenu en chlorophylle *a* pendant la carence de fer des cellules du sauvage (cercles), de ΔOCP (triangles) et de ΔIsiA (carrés). Les points sont une moyenne de 7 expériences indépendantes. 100% de chlorophylle correspond à environ 6µg chl.mL-1 pour une culture de DO à 800nm de 0.8.

expériences auxquelles j'ai participé (en résumé, je n'ai pas travaillé sur les expériences pour tester la photoinhibition (figure CI.7), ni sur le mutant PAL (figure CI.10)).

1. Caractérisation des changements induits par la carence en fer au niveau de l'appareil photosynthétique chez le sauvage, les mutants ΔIsiA et ΔOCP de *Synechocystis*

Il a été démontré dans le passé que les cyanobactéries, cultivées en conditions de carence en fer, présentent une diminution de leur contenu en chlorophylle et en phycocyanine (Öquist 1971; Öquist 1974a; Guikema et Sherman 1983; Sandmann 1985). Le contenu en PSI, PSII (Spiller et Terry 1980; Guikema et Sherman 1983) et en thylacoïdes (Sherman et Sherman 1983) diminue aussi pendant la carence en fer, avec une diminution plus rapide du PSI (Guikema et Sherman 1983; Sandmann 1985). De plus, la présence d'IsiA induit un shift du pic d'absorbance de la chlorophylle *a* vers le bleu (de 680nm à 673nm). En carence prolongée, le spectre de fluorescence de la chlorophylle *a* à 77°K devient dominé par une émission importante à 685nm (Öquist 1974b; Burnap *et al.* 1993; Falk *et al.* 1995; Park *et al.* 1999). Odom *et al.* (1993) ont été les premiers à décrire ces changements chez *Synechocystis* en conditions de carence en fer.

1.1 Diminution des pigments : phycobiliprotéines et chlorophylles

Dans nos conditions de carence en fer (voir matériels et méthodes), le shift de la chlorophylle *a* caractéristique de la carence est visible sur les cellules à partir du 6ème jour (figure CI.1D). L'absorbance du pic de chlorophylle passe de 683nm à 674nm après 10 jours de carence dans les cellules du sauvage et de ΔOCP (figure CI.1A et B). Les contenus en chlorophylle et en phycocyanine des cellules diminuent à partir du 10ème jour . Le ratio PC/chl reste presque constant. Par contre chez les cellules ΔIsiA, le shift vers le bleu du pic de la chlorophylle n'est pas observé et le ratio PC/chl augmente (figure CI.1C). De plus, le contenu en chlorophylle des cellules ΔIsiA diminue rapidement. Les cellules meurent après 20 jours de carence alors que celles du sauvage et de ΔOCP sont capables de survivre jusqu'à 50 jours avec un niveau de chlorophylle bas et beaucoup de caroténoïdes.

1.2 Diminution du PSI et du PSII

a. Spectres d'émission et d'excitation des cellules entières

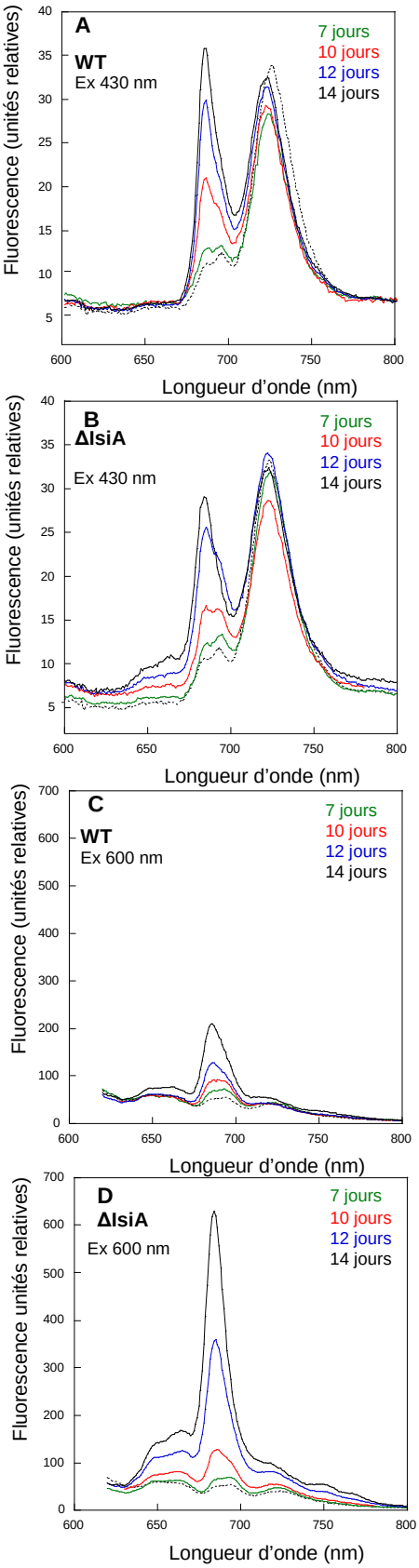


Figure CI.2 : Changements dans le spectre d'émission de fluorescence à 77°K induits par une carence en fer chez le sauvage et le mutant ΔIsiA de *Synechocystis*

A et **C** représentent les spectres du sauvage et **B** et **D** de ΔIsiA. Le spectre des cellules non carencées est en noir pointillé, en vert pour 7 jours de carence, en rouge pour 10, en bleu pour 12 et en noir plein pour 14. **A** et **B** sont des spectres d'émission avec une excitation à 430nm et **C** et **D** à 600nm. Chaque spectre est une moyenne de 4 spectres. Les spectres ont été normalisés d'après la fluorescence émise à 800nm. Les cellules étaient diluées à 3µg chl.mL^{-1} pour chaque mesure.

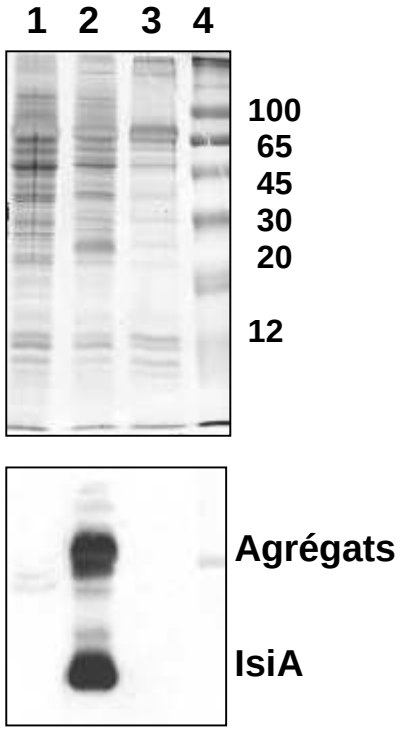


Figure CI.3 : Immunodétection d'IsiA dans des membranes isolées de cellules carencées et non carencées du sauvage et du mutant ΔIsiA de *Synechocystis*
Le gel coloré au bleu de coomassie est au dessus de la membrane issue du western blot après détection de IsiA. Les lignes **1** et **2** contiennent respectivement des cellules à 1µg chl du mutant ΔIsiA et du sauvage après 10 jours de carence, et la ligne **3** des cellules du sauvage non carencé. La ligne **4** contient le marqueur moléculaire en kilodaltons. L'anticorps anti-IsiA réagit aussi avec les agrégats d'IsiA.

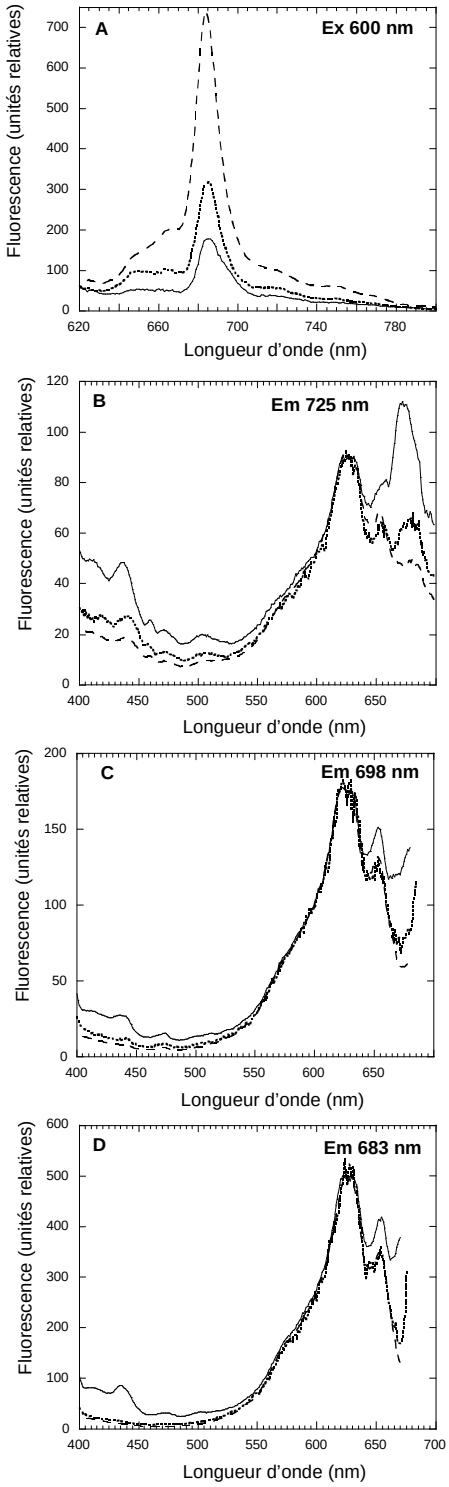


Figure CI.4 : Spectres de fluorescence d'excitation et d'émission à 77°K des cellules du sauvage et du mutant ΔIsiA

A correspond aux spectres d'émission (excitation à 600nm) des cellules du sauvage à 11 jours de carence (trait solide) et 11 (trait pointillé) et 15 jours (trait hachuré) de carence des cellules du mutant ΔIsiA.

B, **C** et **D** correspondent aux spectres d'excitation des mêmes cellules aux émissions à 725nm, 698nm et 683nm, respectivement.

Les cellules ont été diluées à 2µg chl.mL^{-1}.

Des spectres d'émission de fluorescence ont été faits en utilisant une lumière excitatrice à 430nm (absorption préférentielle de la chlorophylle) et une lumière excitatrice à 600nm (absorption préférentielle des phycobilisomes) pour suivre les modifications de l'appareil photosynthétique induites par la carence en fer. La figure CI.2 montre ces spectres d'émission à 77°K des cellules du sauvage et de ΔIsiA carencées depuis 0, 7, 10, 12 et 14 jours. Quand les cellules du sauvage et de ΔIsiA carencées sont excitées à 430nm, le spectre à 77°K présente des pics mineurs à 685 et 695nm correspondant respectivement aux antennes chlorophyliennes CP43 et CP47 du PSII (Vandorssen *et al.* 1987; Siefermann-Harms 1988), et un pic important à 725nm correspondant au PSI (figure CI.2A et B). Au début de la carence, les cellules du sauvage et de ΔIsiA présentent une augmentation de la fluorescence du PSII (des pics à 685nm et à 695nm) par rapport à celle du PSI suggérant une augmentation du rapport PSII/PSI (figure CI.2A et B). Ceci est en accord avec le fait que le contenu en PSI, qui contient 4 centres « fer-soufre », diminue plus vite que celui du PSII, qui contient seulement 3 molécules de fer (Guikema et Sherman 1983; Sandmann 1985; Falk *et al.* 1995; Ivanov *et al.* 2000).

Dans une carence plus avancée, les deux souches affichent une augmentation plus rapide de l'émission à 685nm qu'à 695nm (figure CI.2A et B), celle-ci est plus prononcée dans le sauvage. Ce phénomène est expliqué par la présence d'agrégats d'IsiA sans PSI qui émettent plus à 685nm (Andrizhiyevskaya *et al.* 2002; Yeremenko *et al.* 2004). La présence d'IsiA est confirmée par western blot (figure CI.3). En effet, la figure CI.3 montre que IsiA et des agrégats d'IsiA sont absents dans les cellules du sauvage non carencées et présents dans celles carencées. De plus, les agrégats sont aussi absents des cellules du mutant ΔIsiA après 10 jours de carence en fer. Dans les cellules carencées en fer du mutant ΔIsiA, l'émission à 685nm n'est évidemment pas associée à IsiA, l'émission de l'émetteur terminal des phycobilisomes dans les phycobilisomes déconnectés pourrait contribuer à cette émission.

Le spectre de fluorescence généré à 77°K par une excitation à 600nm dans les cellules contient des pics d'émission correspondant aux phycocyanines (650nm), aux allophycocyanines (660nm), au PSII (685nm et 695nm) et au PSI (725nm) (figure CI.2C et D). Le pic à 695nm dérive de l'émission de la chlorophylle *a* de l'antenne CP47 du PSII et du centre réactionnel. L'émission à 685nm est principalement due à l'émetteur terminal des phycobilisomes (le L_{CM}) mais l'émission de l'antenne CP43 du PSII y contribue aussi (Redlinger et Gantt 1982; Vandorssen *et al.* 1987). Quand les complexes d'IsiA sont présents, leur émission de fluorescence contribue aussi significativement au pic de 685nm.

Dans ces spectres, la première manifestation de la carence en fer dans les cellules du sauvage et du mutant ΔIsiA est une augmentation du ratio de la fluorescence des pics

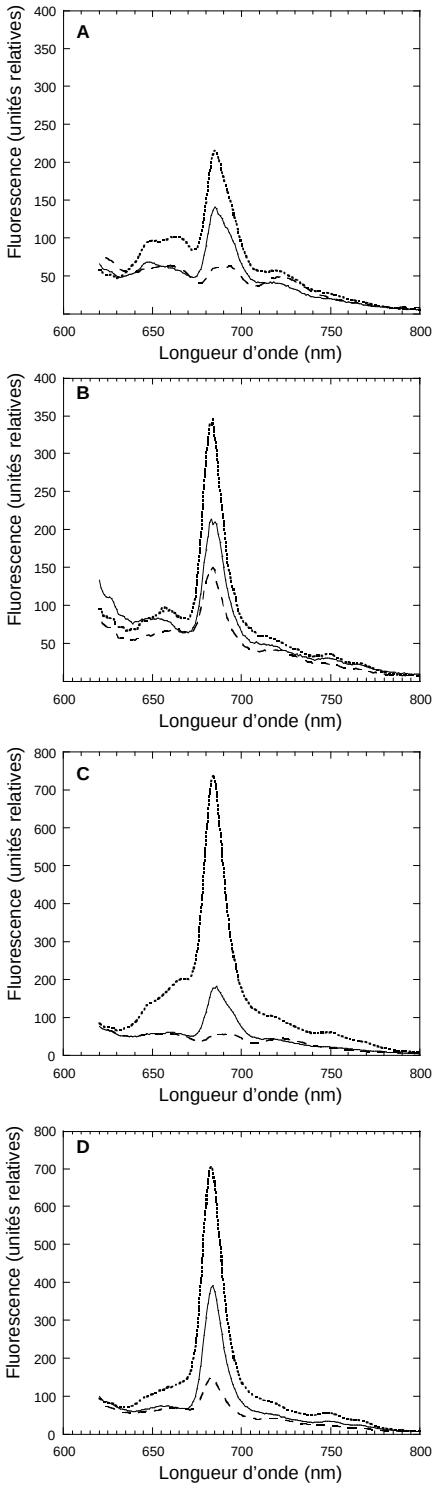


Figure CI.5 : Spectres d'émission de fluorescence à 77°K des MP et des cellules du sauvage et du mutant ΔIsiA

Les spectres des cellules non carencées sont représentés par un trait hachuré (**A** et **C**) ; ceux des cellules de la souche sauvage carencées pendant 12 jours, par un trait plein dans **A** ; et ceux des cellules du mutant ΔIsiA carencées pendant 12 jours, par en trait pointillé dans **A**. Dans **C**, les spectres des cellules de la souche sauvage carencées pendant 15 jours du sauvage sont représentées par un trait plein et les spectres des cellules du mutant ΔIsiA avec un trait pointillé.

B et **D** correspondent aux mêmes conditions de carence pour les fractions de MP.

correspondant au PSII (685nm et 695nm) par rapport à ceux du PSI (figure CI.2C et D). Plus la carence est avancée plus le pic à 685nm est important. Cette augmentation est plus rapide et plus prononcée dans les cellules du mutant ΔIsia que dans le sauvage (figure CI.2C et D). Dans chaque souche, les origines de cette augmentation sont différentes. Dans la souche ΔIsiA, ne contenant pas la protéine IsiA, cette augmentation peut seulement être reliée à l'émetteur terminal des phycobilisomes (le L_{CM}) qui traduit une accumulation de phycobilisomes hautement fluorescents fonctionnellement déconnectés. Dans le sauvage, cette augmentation peut être associée à l'émission d'IsiA (Yeremenko *et al.* 2004) due au transfert d'énergie à partir des phycobilisomes vers les complexes d'IsiA comme le suggèrent Joshua *et al.* (2005) et à une petite population de phycobilisomes fonctionnellement déconnectés dans les cellules carencées à long terme.

Ceci a été confirmé par la comparaison des spectres d'excitation à 77°K dans les cellules du sauvage et de ΔIsiA carencées. En effet, la figure CI.4 permet de déterminer quels éléments excitent (phycobiliprotéines ou chlorophylle) lors d'une émission à 725nm (émission du PSI), 698nm (émission du PSII) et 683nm (émission des agrégats de IsiA et des phycobilisomes) dans les figures CI.4B, C et D, respectivement. La figure CI.4A rappelle les spectres d'émission de ces cellules réalisés avec une lumière excitatrice à 600nm. Le spectre d'excitation des cellules carencées du sauvage montre une plus grande contribution de la chlorophylle *a* (pics à 435nm et 680nm) et une plus petite contribution des composants à 570nm, 620nm (phycocyanine) et 650nm (allophycocyanine) que dans les cellules ΔIsiA carencées (figure CI.4). Ces résultats suggèrent fortement que plus de phycobilisomes déconnectés (non fonctionnels) sont présents dans le mutant ΔIsiA.

b. Spectre d'émission des fractions membranes-phycobilisomes (MP)

Des fractions de membranes associées aux phycobilisomes isolés (MP) des cellules non carencées et carencées (11 et 15 jours) du sauvage et du mutant ΔIsiA ont été préparées en cassant les cellules dans un tampon phosphate/citrate (voir matériels et méthodes pour la préparation des MP). Cette préparation avait pour but de démontrer la présence de phycobilisomes fonctionnellement déconnectés associés aux thylacoïdes. Après avoir ôté les cellules non cassées, les MP ont été obtenus par centrifugation. Dans tous les cas, le surnageant était peu coloré indiquant que la plupart des phycobilisomes restait attachée aux thylacoïdes. Le ratio PC/chl des MP dans ΔIsiA s'est avéré supérieur à celui des MP du sauvage comme dans les cellules entières. Les fractions de MP présentent une émission à 685nm plus forte que les cellules entières, ceci suggère une connexion médiocre entre les phycobilisomes et les thylacoïdes *in vitro* (figure CI.5). Quoi qu'il en soit, comme dans les cellules entières, les MP du mutant ΔIsiA présentent une émission plus importante à 685nm que ceux du sauvage (figure CI.5). Ainsi, nous concluons que dans les cellules carencées du

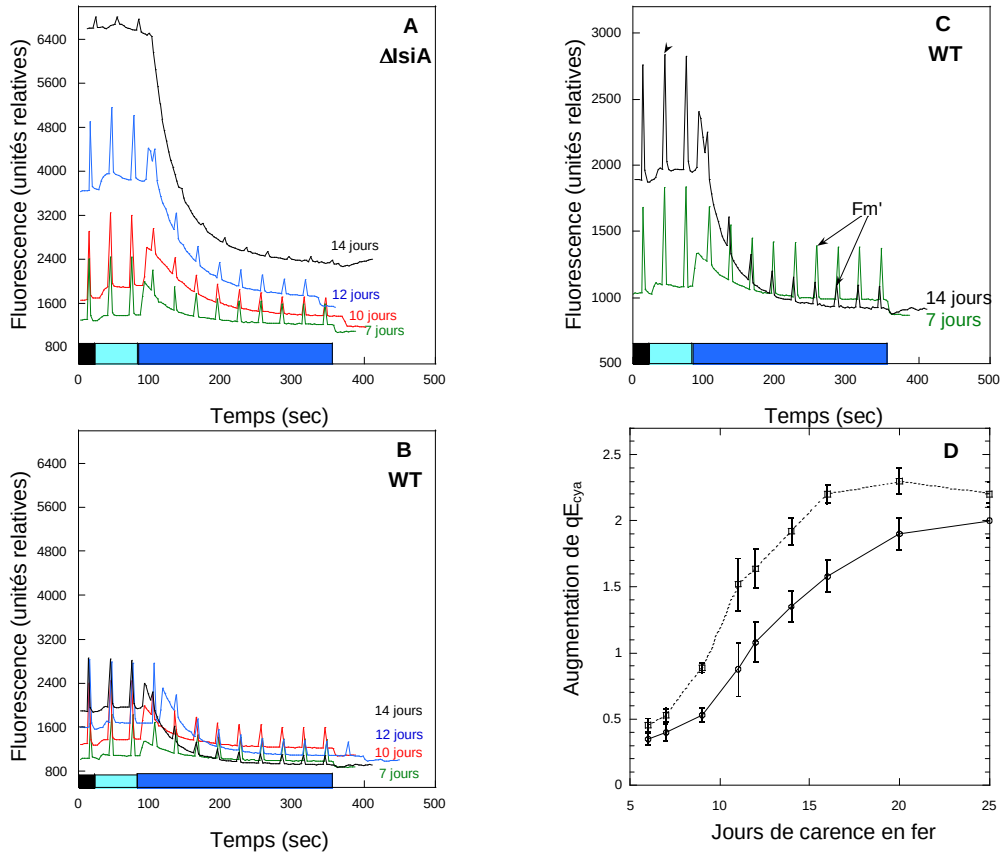


Figure CI.6 : Mesures de qE_{cya} induit par la lumière bleue-verte dans les cellules carencées du sauvage et du mutant ΔIsiA de *Synechocystis*

Les cellules (à 3µg chl.mL^{-1}) carencées à 0 jour (vert), 10 jours (rouge), 12 jours (bleu) et 14 jours (noir) du mutant ΔIsiA et du sauvage sont représentées en **A** et **B**. Dans **C**, les changements du signal de fluorescence à 7 et 14 jours de carence du sauvage sont à une autre échelle que **A** et **B** pour clarifier la différence de qE_{cya}.

Les cellules ont été adaptées à l'obscurité puis illuminées successivement par une lumière de basse intensité (400 à 500nm, 80 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) et par une lumière de forte intensité (740 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}). Des pulses saturants ont été appliqués pour mesurer le maximum de fluorescence (Fm') et la fluorescence minimale (Fo) (voir **C**).

D montre l'augmentation de qE_{cya} [(Fm-Fm')/Fm'] pendant la carence en fer du sauvage (cercles et traits pleins) et de ΔIsiA (carrés et traits pointillés). Le graphique est une moyenne de 4 expériences indépendantes et l'écart type est représenté par les barres d'erreurs.

mutant ΔIsiA tous les phycobilisomes sont attachés aux thylacoïdes comme dans les cellules du sauvage mais qu'un plus grand nombre est fonctionnellement déconnecté.

2. Étude du déclin de fluorescence (qE_{cya}) dans les cellules carencées du sauvage et du mutant ΔIsiA

L'induction du déclin de fluorescence induit par la lumière bleue-verte a été réalisée avec un fluorimètre PAM (voir Matériels et Méthode pour le détail de son fonctionnement). Il permet de mesurer la fluorescence de la chlorophylle et des phycobiliprotéines.

La figure CI.6 (A, B et C) compare le rendement de fluorescence après 7, 10, 12 et 14 jours de carence des cellules du sauvage et du mutant ΔIsiA mesuré avec le fluorimètre PAM. La fluorescence des cellules entre les jours 0 et 7 de la carence est similaire. Après une adaptation à l'obscurité, les cellules ont été illuminées successivement par une lumière bleue-verte faible et une lumière bleue-verte forte. Les cellules sous une illumination bleue-verte faible, qui excite préférentiellement le PSI, montrent un haut niveau de fluorescence caractéristique de l' « état 1 » (« State 1 ») induit par une oxydation de la plastoquinone. Par la suite, une exposition des cellules à une forte lumière induit une diminution de tous les niveaux de fluorescence (Fm' et Fo) dans les cellules du sauvage et de ΔIsiA. Le déclin de fluorescence augmente dans les deux souches en conditions de carence en fer et cette augmentation est plus importante et plus rapide dans le mutant ΔIsiA (figure CI.6D). Une carence prolongée (14 jours) semble aussi entraîner une inhibition des transitions d'état dans ΔIsiA (Fv n'est pas modifiée lors de l'illumination des cellules adaptées à l'obscurité avec une faible lumière bleue-verte) (figure CI.6A). Les cellules du sauvage et de ΔOCP présentent le même phénomène lors d'une carence en fer supérieure à 18 jours (données non montrées).

Le niveau de fluorescence minimum (Fo) dans les cellules adaptées à l'obscurité dépend de la concentration cellulaire en phycobiliprotéines (voir l'explication sur les mesures de fluorescence dans Matériels et Méthodes). Mais, il peut aussi être influencé par l'état de liaison (fonctionnel avec le photosystème) des phycobilisomes ; ceux qui sont liés, « couplés », ont une faible émission, alors que ceux ayant une mauvaise liaison, « découplés », ont un haut niveau de fluorescence car l'énergie n'est pas transmise correctement. Nous avons observé une augmentation de Fo et de la variable de fluorescence (Fv) après 6-7 jours de carence, ceci peut être expliqué par une augmentation du ratio PSII/PSI en accord avec les spectres de fluorescence à 77°K (figures CI.2, CI.4 et CI.5). Dans une carence plus avancée, Fv commence à diminuer et Fo continue à augmenter, indiquant une perte du PSII actif, une accumulation d'IsiA (dans le sauvage) et de phycobilisomes « découplés » (figure CI.6). Ce processus est plus rapide dans le mutant ΔIsiA. Cela entraîne la mort des cellules après une vingtaine de jours de carence (contre 50 jours pour le sauvage).

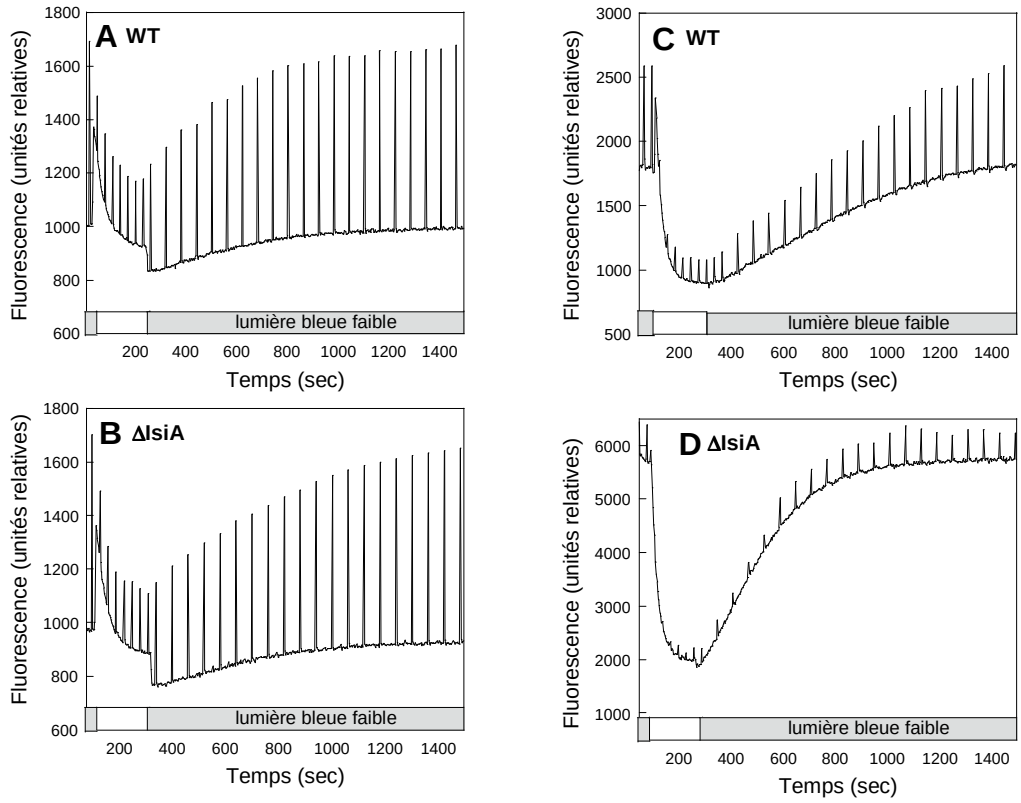


Figure CI.7 : Le déclin de fluorescence induit par la lumière bleue-verte dans les cellules carencées du sauvage et du mutant ΔIsiA est réversible quand la synthèse protéique est inhibée

La figure montre la mesure du rendement de fluorescence par un fluorimètre PAM. Les mesures des cellules du sauvage (WT) sont en **A** et **C** et celles du mutant ΔIsiA en **B** et **D**. Les mesures en **A** et **B** sont réalisées sur des cellules non carencées et celles en **C** et **D** sur des cellules carencées. Les cellules, diluées à 3µg chl.mL^{-1}, ont été adaptées à l'obscurité puis illuminées successivement par une lumière de basse intensité (400 à 500nm, 80 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) et par une lumière de forte intensité (740 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}). Ensuite la récupération de la fluorescence a été mesurée sous basse intensité de lumière. Du chloramphénicol était présent dans toutes les expériences.

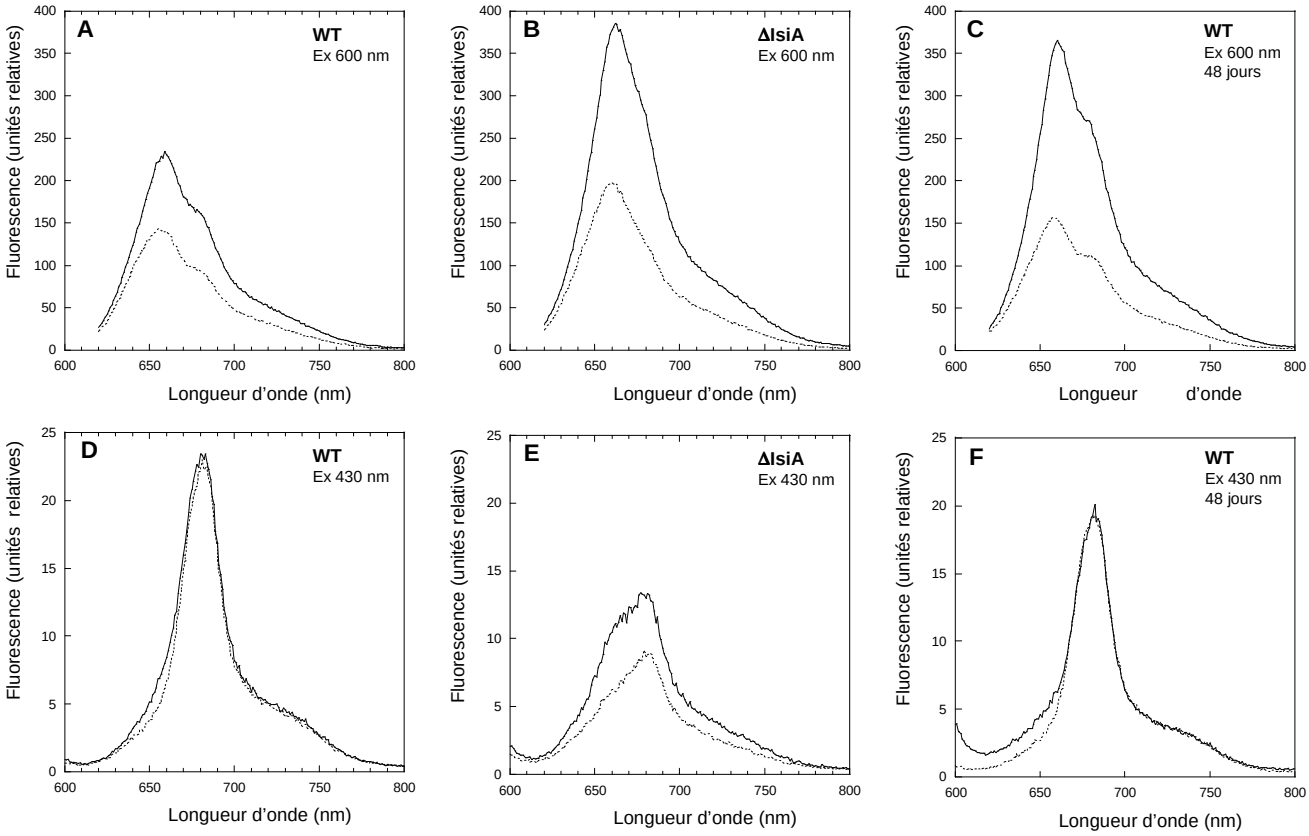


Figure CI.8 : Spectres de fluorescence à température ambiante des cellules adaptées à l'obscurité (trait plein) et après illumination (trait pointillé)

Les cellules carencées pendant 12 jours du sauvage (WT) sont en **A** et **D**, celles du mutant ΔIsiA en **B** et **E**, et celles du sauvage carencées pendant 48 jours en **C** et **F**. L'excitation a été faite à 600nm de **A** à **C** et à 430nm de **D** à **F**.

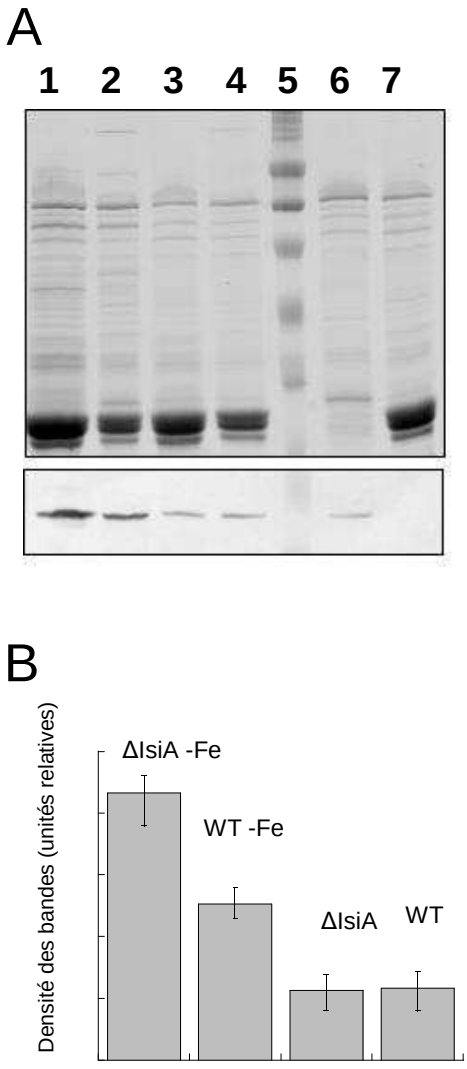


Figure CI.9 : Détection de l'OCP dans les cellules entières et dans les MP des cellules carencées et non-carencées du sauvage et des mutants

En **A**, gel coloré au bleu de coomassie après électophorèse (haut) et détection d'OCP par western blot (bas). La ligne **1** contient des cellules de ΔIsiA carencées pendant 12 jours ; la ligne **2**, des cellules du sauvage (WT) à 12 jours de carence ; la ligne **3**, des cellules de ΔIsiA non carencées ; la ligne **4**, des cellules du sauvage non carencées ; la ligne **5**, le marqueur ; la ligne **6**, des cellules non carencées du mutant PAL ; et la ligne **7**, des cellules non carencées de ΔOCP. Chaque ligne contient 1.5µg de chlorophylle.

En **B**, densimétrie comparative des bandes de l'OCP dans les cellules entières carencées et non carencées du sauvage et du mutant ΔIsiA. La moyenne de quatre expériences indépendantes a été faite et les barres d'erreurs représentent leur écart type.

Dans ce mutant, l'augmentation importante de Fo peut être expliquée par une population de phycobilisomes « découplés » énergiquement (détectée dans les spectres à 77°K). Dans le sauvage, l'augmentation de Fo (beaucoup plus faible que dans ΔIsiA) peut-être due aux complexes d'IsiA et aux phycobilisomes « découplés ». Il a déjà été montré que IsiA protège les cellules (Park *et al.* 1999; Sandström *et al.* 2001; Havaux *et al.* 2005) d'un stress généré par une carence en fer (Havaux *et al.* 2005; Latifi *et al.* 2005). Il semblerait, qu'en absence d'IsiA, le mécanisme de photo-protection induit par la lumière bleue-verte (qE_{cya}) soit insuffisant pour protéger les cellules de ce stress.

Pour confirmer le fait que la diminution de fluorescence est reliée au mécanisme de photo-protection et non à la photoinhibition (dégradation et disfonctionnement de la protéine D1), les cellules ont été exposées à une lumière bleue-verte faible en présence de chloramphénicol (un inhibiteur de la synthèse protéique). Elles ont bien récupéré leur maximum de fluorescence (voir figure CI.7; et pour des expériences comparables voir (El Bissati *et al.* 2000; Wilson *et al.* 2006).

3. Le déclin de fluorescence est-il dû à une baisse de l'émission des phycobilisomes ou de la chlorophylle ?

Comme décrit précédemment, une diminution des niveaux de fluorescence observée dans le PAM (excitation à 650nm) peut être due à (1) une diminution de l'émission des phycobilisomes, (2) à une diminution de l'émission de la chlorophylle *a*, ou (3) à une diminution de l'énergie transférée des phycobilisomes vers la chlorophylle. Dans Wilson *et al.* (2006), notre équipe a déjà démontré que le déclin de fluorescence était dû à (1) et (3) chez *Synechocystis* (en conditions de culture normales).

Les spectres de fluorescence aident à élucider l'origine du déclin de fluorescence dans les cellules carencées en fer (figure CI.8). Quand les cellules carencées pendant 12 jours sont excitées à 600nm (lumière principalement absorbée par les phycobilisomes), le pic à 660mn (attribué aux phycobilisomes) est beaucoup plus important dans les cellules carencées de ΔIsia que celles du sauvage (figure CI.8A et B). La forte fluorescence à 660nm dans les cellules ΔIsiA est probablement due aux phycobilisomes déconnectés. L'épaulement à 680nm, observé dans les cellules de la souche sauvage, est attribué à la présence d'IsiA et à un transfert d'énergie des phycobilisomes vers IsiA (voir figures supplémentaires dans Wilson *et al.* 2007).

Dans les cellules carencées du sauvage et de ΔIsiA, qui ont été illuminées avec une lumière bleue-verte forte pendant 5min (induction de qE_{cya}), une diminution importante du pic à 660nm est observé (figure CI.8A et B). Les cellules carencées pendant une longue durée (48 jours) présentent une émission de fluorescence à 660nm plus importante et par conséquent un

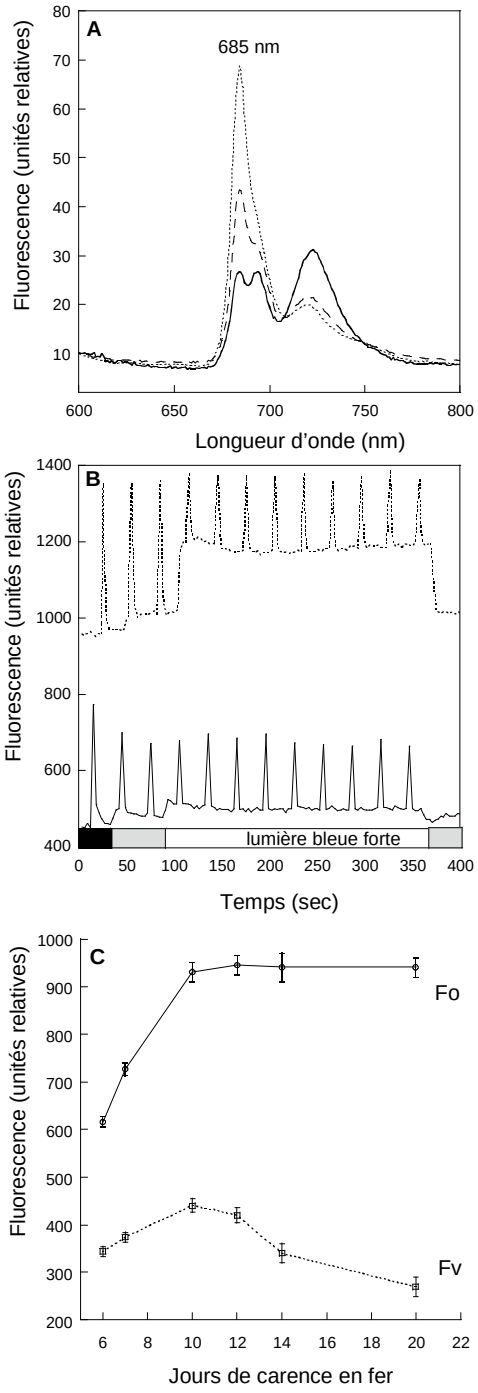


Figure CI.10 : Changements de fluorescence dans les cellules carencées en fer du mutant PAL

En **A**, la figure montre le spectre de fluorescence des cellules (diluées à 2µgchl.mL^{-1}) non carencées (trait plein), des cellules carencées pendant 7 jours (trait hachuré) et 10 jours (trait pointillé) du mutant PAL.

En **B**, les cellules ont été adaptée à l'obscurité puis illuminées successivement par une lumière de basse intensité (400 à 500nm, 80 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) et par une lumière de forte intensité (740 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}). Le spectre des cellules du mutant PAL non carencées est représenté avec un trait plein et celui des cellules carencées avec un trait pointillé.

En **C**, évolution de Fv et Fo pendant la carence en fer. Le rendement de fluorescence a été mesuré avec un fluorimètre PAM. Les cellules ont été diluées à 2µgchl.mL^{-1}. Le graphique montre la moyenne de 3 expériences indépendantes et les barres d'erreur représentent leur écart type.

plus grand déclin de fluorescence après l'illumination (figure CI.8C, en accord aussi avec la figure CI.6).

Quand les cellules carencées sont excitées à 430nm (lumière principalement absorbée par la chlorophylle), un pic important à 680nm est observé. Il correspond à l'accumulation de complexes d'IsiA. Ce pic, lié à la chlorophylle, n'est pas diminué après illumination avec une forte lumière bleue-verte, ni dans les cellules carencées à 12 jours, ni dans celles à 48 jours du sauvage (figure CI.8D et F). Les cellules carencées du mutant ΔIsiA présentent une émission à 660nm (pic attribué aux phycobilisomes) même quand elles sont excitées à 430nm (figure CI.8E). Cette émission est diminuée par une forte lumière bleue-verte. Pour conclure, les spectres de fluorescence à température ambiante des cellules carencées du sauvage et de ΔIsiA (avant et après induction de qE_{cya} par une forte lumière bleue-verte) suggèrent fortement que le déclin de fluorescence est du à une diminution de l'émission de fluorescence des phycobilisomes et non de la chlorophylle.

Pour élucider la relation entre l'intensité du déclin de fluorescence (qE_{cya}) et la quantité de l'OCP, des analyses western blot ont été réalisées. Les protéines totales des cellules ont été séparées par SDS-PAGE et la protéine OCP a été détectée avec un anticorps anti-OCP (figure CI.9). La bande à 35kDa attribuée à l'OCP est bien absente dans le mutant ΔOCP. La réaction anticorps est plus importante dans les cellules carencées que dans celles non-carencées. De plus, avec la même quantité de chlorophylle par puits, l'OCP est présente en plus grande quantité dans les cellules carencées du mutant ΔIsiA que dans celles du sauvage (figure CI.9).

4. Études de souches mutantes délestées des phycobilisomes (PAL) et de l'OCP (ΔOCP)

Pour mieux caractériser le déclin du fluorescence (qE_{cya}) induit par la lumière en condition de carence en fer, deux mutants supplémentaires ont été étudiés : les mutants PAL et ΔOCP. Le mutant PAL ne contient pas de phycobilisomes (Δ*apcAB*, Δ*apcE*, PC^-) (Ajlani et Vernotte 1998), et le mutant ΔOCP ne contient pas la protéine essentielle pour l'induction de qE_{cya} (OCP) impliquant les phycobilisomes en conditions de culture normale (Wilson *et al.* 2006).

Je n'ai pas participé à la caractérisation du mutant PAL, la figure CI.10 décrit les résultats de l'étude de ce mutant. En résumé, l'induction d'IsiA par la carence en fer est plus importante dans ce mutant que dans le sauvage, permettant aux cellules de ce mutant de mieux résister à la carence que celles du sauvage (figure CI.10). Même si ce mutant contient l'OCP, il s'est montré incapable d'avoir un déclin de fluorescence induit par la lumière bleue-verte en conditions normales et de carence fer. Ceci est en accord avec l'hypothèse que les

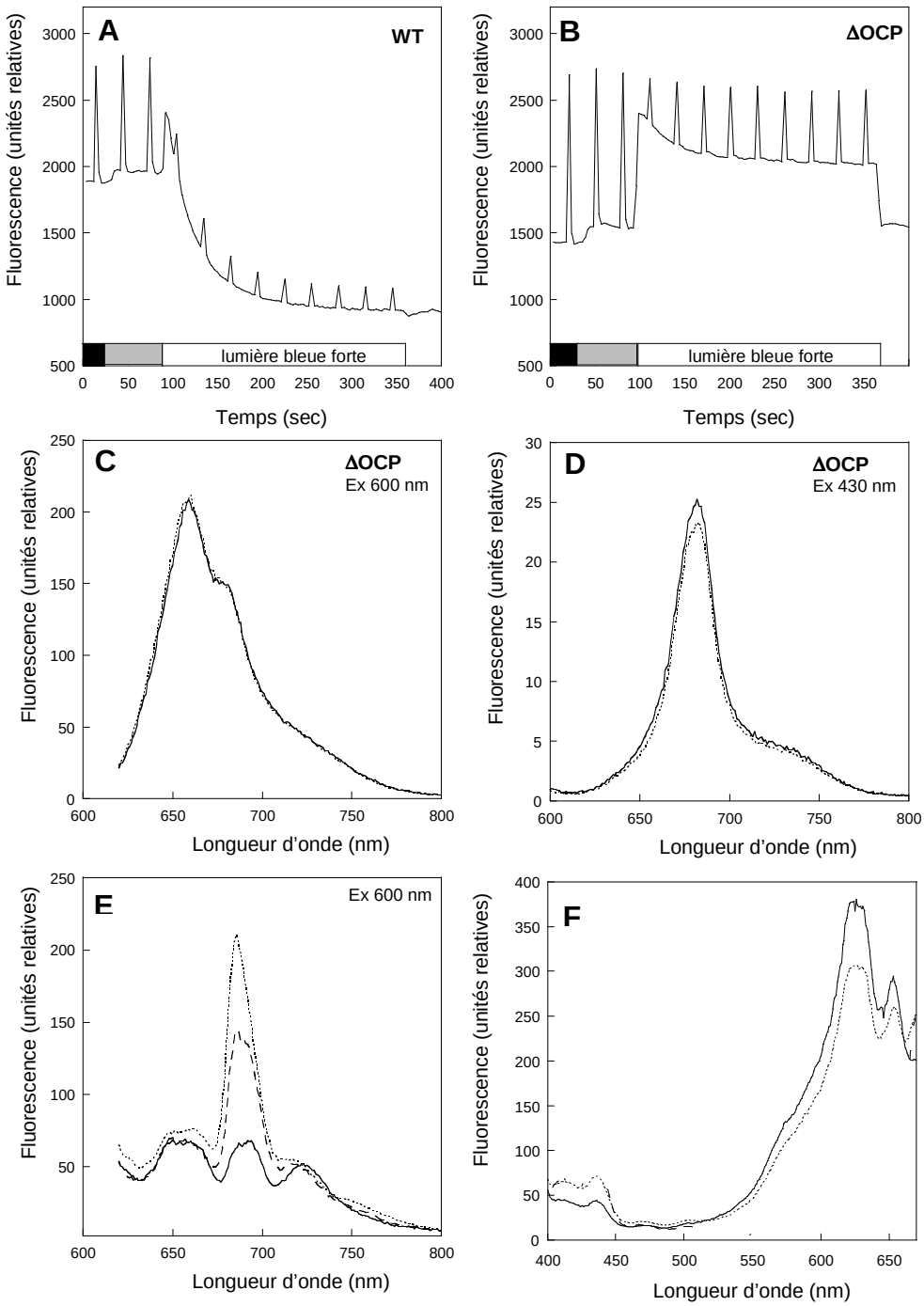


Figure CI.11 : Les cellules carencées en fer du mutant ΔOCP n'ont pas de quenching de fluorescence

A et **B**, changements de fluorescence mesurés avec le fluorimètre PAM dans les cellules du mutant ΔOCP carencées en fer. Les cellules à 3µgchl.mL^{-1} adaptées à l'obscurité après 14 jours de carence du sauvage (WT) (**A**) et du mutant ΔOCP (**B**) ont été illuminées successivement avec une lumière de basse intensité (de 400 à 550nm ; 80µmol photon.m^{-2}.s^{-1}) et de forte intensité (de 400 à 550nm ; 740µmol photon.m^{-2}.s^{-1}).

C et **D**, spectre de fluorescence à température ambiante des cellules du mutant ΔOCP adaptées à une basse intensité de lumière bleue-verte (trait plein) et après 5min d'illuminatation à forte intensité de lumière bleue-verte (trait pointillé). L'excitation a été faite à 600nm pour **C** et 430nm pour **D**.

E représente un spectre d'émission de fluorescence des cellules non-carencées (trait plein), après 14 jours de carence (trait pointillé) du sauvage, et après 14 jours de carence (trait hachuré) du mutant ΔOCP. L'excitation a été faite à 600nm.

F représente un spectre de fluorescence d'excitation des cellules après 14 jours de carence du sauvage (trait plein) et du mutant ΔOCP (trait pointillé). L'émission a été réalisée à 685nm et les cellules diluées à 3µgchl.mL^{-1}.

phycobilisomes et l'OCP sont essentiels pour réaliser le mécanisme qE_{cya} induit par la lumière chez *Synechocystis* (Wilson *et al.* 2006).

Le comportement des cellules du mutant ΔOCP en condition de carence en fer concernant la diminution de la chlorophylle et le ratio PC/chl est similaire à celui des cellules du sauvage (figure CI.11B et C). Les valeurs de Fo et Fv sont similaires dans les cellules du sauvage et ΔOCP en conditions de culture normale. De plus, le niveau de Fo est supérieur dans les cellules carencées du sauvage par rapport à celui des cellules du mutant ΔOCP, alors que Fv, la variable de fluorescence, est plus importante dans les cellules de ΔOCP que dans celles du sauvage (figure CI.11A et B). Ceci suggère la même quantité de PSII actif dans les cellules du sauvage et de ΔOCP et la présence de plus de phycobilisomes déconnectés dans le sauvage. Quand les cellules étaient excitées à 600nm, le pic d'émission à 685nm était moins important dans des cellules du mutant ΔOCP que dans le sauvage, suggérant la présence d'une plus petite quantité de phycobilisomes déconnectés dans les cellules carencées de ΔOCP (figure CI.11E). Cette hypothèse est confirmée par la comparaison des spectres d'excitation de fluorescence à une émission de 685nm dans les cellules carencées en fer du sauvage et de ΔOCP. En effet, dans ces dernières, le spectre montre une plus grande contribution de la chlorophylle *a* (pic à environ 435nm) et une contribution plus faible des composants à 570nm, à 620nm (provenant de la phycocyanine) et à 650nm (provenant de l'allophycocyanine) que dans les cellules carencées du sauvage (figure CI.11F).

La plupart du temps, les spectres d'émission à 77°K en excitant à 430nm montrent un pic à 685nm plus important, suggérant la présence d'une plus grande population de complexes d'IsiA dans les cellules de ΔOCP que dans celles du sauvage (figure CI.12A). Ceci est confirmé par western blot (figure CI.12B). Les cellules carencées du mutant ΔOCP contiennent 20-25% plus d'IsiA que celles du sauvage.

Les figures CI.11A et B montrent le rendement de fluorescence des cellules carencées pendant 14 jours du sauvage et du mutant ΔOCP. En l'absence de l'OCP, la lumière bleue-verte n'induit pas de déclin de fluorescence (qE_{cya}) (figure CI.11B). Les spectres à température ambiante confirment l'absence de qE_{cya} induit par la lumière bleue-verte (figure CI.11C et D). La figure CI.11D démontre clairement que la lumière bleue-verte n'induit pas de diminution de fluorescence de la chlorophylle qui est principalement reliée aux agrégats d'IsiA dans les cellules carencées en fer du mutant ΔOCP.

En conclusion, en condition de croissance sous une illumination faible, la présence d'IsiA est suffisante pour protéger les cellules ΔOCP, en dépit de l'absence du mécanisme de déclin de fluorescence induit par la lumière bleue-verte.

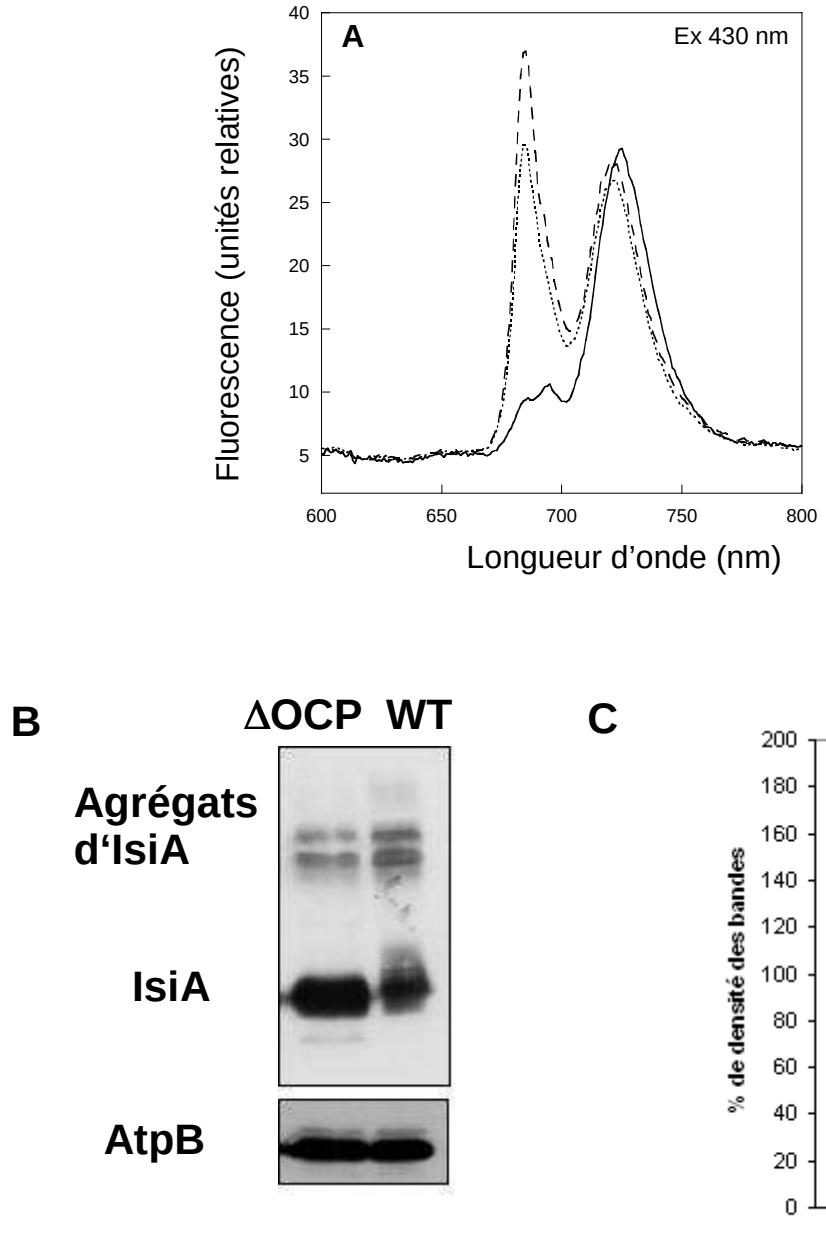


Figure CI.12 : Présence d'IsiA dans les cellules du mutant ΔOCP carencées en fer
A représente un spectre d'émission de fluorescence de cellules non-carencées en fer (trait plein), après 14 jours de carence du sauvage (WT) (trait pointillé) et après 14 jours de carence du mutant ΔOCP (trait hachuré). L'excitation a été faite à 430nm et les cellules diluées à 3µgchl.mL^{-1}.
B représente la détection d'IsiA par western blot (haut). Les membranes des cellules ont été isolées après 13 jours de carence du mutant ΔOCP et du sauvage, et ont ensuite été chargées à 2µgchl.mL^{-1} par puits. Un anticorps dirigé contre la sous-unité AtpB de l'ATP synthase a été utilisé comme standard interne (bas).
C est un graphique de densimétrie comparative de la quantité d'IsiA dans les membranes du mutant ΔOCP et du sauvage. La moyenne a été faite sur 3 expériences indépendantes et l'écart type est représenté par la barre d'erreur.

5. Conclusion du chapitre I

Les résultats de ce chapitre seront discutés dans une discussion commune avec ceux du chapitre II.

Le mécanisme de photo-protection (qE_{cya}) impliquant l'OCP et les phycobilisomes a aussi lieu sous carence en fer. Seul ce mécanisme est responsable du déclin de fluorescence induit par la lumière bleue-verte dans les cellules de *Synechocystis* carencées en fer. Sous carence en fer, la concentration de l'OCP et la dissipation d'énergie augmente dans les phycobilisomes (qE_{cya}) dans le but de diminuer l'énergie arrivant aux thylacoïdes à partir d'une population de phycobilisomes fonctionnellement déconnectés des photosystèmes.

Les complexes d'IsiA vides (non associés au PSI) qui s'accumulent au cours de la carence en fer pourraient être responsables d'une dissipation permanente de l'énergie sous forme de chaleur. Cependant ce mécanisme impliquant IsiA n'est pas modulé par la lumière. Ihalainen *et al*. ont montré *in vitro* que la diminution de fluorescence dépendante de la température des complexes d'IsiA était indépendante de la qualité et de l'intensité de la lumière (Ihalainen *et al.* 2005). Dans nos conditions expérimentales, les cellules sans IsiA étaient plus sensibles à la carence en fer que les cellules sans l'OCP. Ceci indique, qu'en carence en fer, IsiA apporte une meilleure protection que le mécanisme impliquant l'OCP et les phycobilisomes. L'absence d'IsiA, de HLIP (« High Light Inducible Proteins » décrites par He *et al*. (2001) et Havaux *et al*. (2003)), ainsi que celle d'OCP, rend les cellules plus sensibles aux fortes intensités lumineuses. Dans les cellules du sauvage, IsiA et les HLIPs sont présentes uniquement en conditions de stress comme sous une carence en fer ou sous une illumination forte prolongée, respectivement. Cependant le mécanisme impliquant l'OCP est toujours présent, suggérant que les mécanismes impliquant IsiA et les HLIPs interviennent quand celui de l'OCP est insuffisant pour protéger les cellules.

Chapitre II : Études de la présence et de la fonction de l'Orange Carotenoid Protein dans les mécanismes de photo-protection chez les cyanobactéries

Dans les études précédentes de l'équipe Kirilovsky et dans le chapitre précédent, nous avons montré que l'OCP était essentielle au mécanisme de photo-protection qE_{cya} chez *Synechocystis* dans les conditions de culture normale (Wilson *et al.* 2006) et sous carence en fer (chapitre I, Wilson *et al.* 2007). Nous avons démontré que le déclin de fluorescence induit par une forte illumination bleue-verte sous carence en fer était dépendant de l'OCP et non de la protéine IsiA comme l'avait proposé Cadoret *et al*. (2004) et Joshua *et al*. (2005). Ceci confirme le rôle essentiel de l'OCP dans l'acclimatation de *Synechocystis* sous différentes conditions environnementales.

Etant donné que la fonction de l'OCP dans ce mécanisme de photo-protection, impliquant les phycobilisomes et dissipant l'énergie sous forme de chaleur, n'a été examinée que chez *Synechocystis*, nous avons cherché à savoir si l'OCP et son mécanisme associé étaient répandus chez les cyanobactéries.

Dans ce chapitre, nous décrivons la présence du gène de l'OCP et le fait qu'il soit associé à la capacité de réaliser le mécanisme de photo-protection induit par la lumière bleue-verte chez diverses cyanobactéries originaires de milieux différents. Nous avons vérifié si l'augmentation du déclin de fluorescence sous forte lumière, associée à une plus grande production de l'OCP en carence en fer (Wilson *et al.* 2007), est répandue chez les cyanobactéries quand le gène entier de l'OCP est présent. Nous avons travaillé sur trois cyanobactéries arborant trois configurations différentes du gène de l'OCP. *Arthrospira maxima* contenant un gène entier homologue de celui de l'OCP a été étudiée, ainsi que *Thermosynechococcus elongatus* et *Synechococcus elongatus* qui ne contiennent pas de gène entier homologue de l'OCP. Cependant, *T. elongatus* contient deux gènes qui se suivent, correspondant à des parties N-terminale et C-terminale homologues du gène de l'OCP. Nous avons aussi comparé la capacité à réaliser les transitions d'état de ces trois cyanobactéries sous une carence en fer par rapport aux conditions de culture normales. Ce travail a été publié dans *BBA Bioenergetics*, dans un article où je suis le premier auteur (Boulay *et al.* 2008b); et dans un proceeding réalisé à l'issue du 14ème congrès international sur la photosynthèse (Abasova *et al.* 2008).

1. Recherche des gènes homologues à l'OCP chez les cyanobactéries

Il y a une dizaine d'années, il a été démontré que l'OCP est encodée par le gène *slr*1963 chez *Synechocystis* (Wu et Krogmann 1997). Des recherches dans les bases de

Tableau 5 : Présence du gène encodant l'OCP et ses paralogues plus courts dans les différentes souches cyanobactériennes (identité par rapport au gène de l'OCP de *Synechocystis*)

Souche[1]	Gènes d'OCP	ID[2] (%)	Gènes OCP N-ter[3]	Gènes OCP C-ter[3]
Synechocystis PCC 6803	*slr1963*	100		
Arthrospira maxima CS-328	*OCP_SPIMA P83689*	82		
Microcystis aeruginosa NIES-843	*MAE_18910*	81		
Microcystis aeruginosa PCC 7806	*IPF_5686*	81		
Cyanothece sp. PCC 7424	PCC7424_4467	81	*PCC7424_1930*	*PCC7424_2720*
	PCC7424_5565	58	*PCC7424_1426*	
Lyngbya sp. PCC 8106	*L8106_2910*	80	*L8106_29395*	*L8106_29390*
			L8106_04666	
Cyanothece sp. CCY 0110	*CY0110_09677*	78	*CY0110_08696*	*CY0110_08806*
Cyanothece ATCC 51142	*cce_1649*	78	*cce_1537*	*cce_0742*
			cce_1991	
Anabaena sp. PCC 7120	*all3149*	75	*All1123*	*All4940*
			Alr4783	
			All4941	
			All3221	
Anabaena variabilis ATCC 29413	*Ava_3843*	75	*Ava_2052*	*Ava_2231*
			Ava_2230	
			Ava_4694	
Microcoleus chthonoplastes PCC 7420	*MC7420_3617*	74	MC7420_905	MC7420_6621
Synechococcus sp. PCC 7335	*S7335_2791*	74	S7335_4819	S7335_4977
	S7335_487	74	S7335_2204	
	S7335_655	65		
Synechococcus sp. PCC 7002	*SYNPCC7002_A28010*	72		
Synechococcus sp. WH 5701	*WH5701_04010*	68		
	WH5701_00210 (219aa)	60		
Nostoc punctiforme PCC 73102	*Npun02003015*	66	*Npun0200500*	*Npun02003027*
	Npun02000033	55	*Npun02001317*	
			Npun02003030	
			Npun02004998	
Synechococcus sp. RCC307	*RCC307_1992*	65		
Synechococcus sp. RS9917	*RS9917_00692*	64		
Synechococcus sp. WH7803	*SynWH7803_0929*	64		
Synechococcus sp. CC9311	*Sync_1803*	64		
Synechococcus sp. BL107	*BL107_14105*	63		
Synechococcus sp. WH7805	*WH7805_01202*	63		
Synechococcus sp. CC9902	*syncc9902_0973*	63		
Synechococcus sp. WH8102	*SYNW1367*	62		

Nodularia spumigena CCY9414	*N9414_13085*	56	*N9414_12098* *N9414_22258*	*N9414_22253*
'*Nostoc azollae'* 0708	AazoDRAFT_1458	54	*AazoDRAFT_3427* *AazoDRAFT_3422* *AazoDRAFT_5633*	*AazoDRAFT_3428*
Gloeobacter violaceus PCC 7421	*glr3935 (274aa)* *glr0050*	50 49	*gll0260 (217aa)* *gll0259*	*glr2503*
Cyanobium sp. PCC 7001				*CPCC7001_1352*
*Cyanothece sp.*PCC 7822			*Cyan7822DRAFT_2378* *Cyan7822DRAFT_2276* *Cyan7822DRAFT_4359*	*Cyan7822DRAFT_4358*
Nostoc sp. PCC 7425			*Cyan7425_1628* *Cyan7425_4810* *Cyan7425_0443*	*Cyan7425_1627*
Cyanothece sp. PCC 8801			*PCC8801_2551*	*PCC8801_2552*
Cyanothece sp. PCC 8802			*Cyan8802DRAFT_1697*	*Cyan8802DRAFT_1698*
Crocosphaera watsonii WH8501			*CwatDRAFT_0985*	*CwatDRAFT_5349*
Thermosynechococcus elongatus BP-1			*tll1269*	*tll1268*

[1] L'ordre du classement des souches (du plus au moins proche par rapport à leur homologue de Slr1963 de *Synechocystis*) est celui du programme NCBI BLASTP 2.2.16 [Mar-25-2007], qui prend en compte l'identité (acides animés identiques), la similarité (acides animés proches) et les « gaps»

[2] Pourcentage d'identité (= ID), pour les acides aminés identiques obtenus pour le BLASTP entre le premier et dernier acide animé du blast

[3] Les gènes « OCP N-ter » et « OCP C-ter » correspondent à des gènes ayant une séquence similaire à la partie N-terminale du gène *slr*1963 (OCP) et la partie C-terminale du gène *slr*1963 de *Synechocystis*, respectivement

données disponibles actuellement ont montré que des gènes codant pour des protéines homologues à l'OCP de *Synechocystis* étaient présents dans la plupart des cyanobactéries contenant des phycobilisomes (tableau 5). Dans ce paragraphe, quand je parle de protéine homologue de l'OCP, je fais référence aux protéines dont la séquence est déduite à partir des gènes homologues à *slr*1963 avec lequel j'ai réalisé les recherches d'homologies. On ne sait pas si ces protéines sont réellement produites. L'identité (nombre d'acides aminés identiques) de ces protéines est variable par rapport à l'OCP chez *Synechocystis*. Cette identité varie entre 50% (*Gloeobacter violaceus*) et 82% (*Arthrospira maxima*). Les séquences des protéines prédites homologues à l'OCP chez les cyanobactéries marines *Synechococcus* sont très similaires entre elles (entre 95 et 77% par rapport à *Synechococcus* WH7805) mais sont moins similaires que les séquences des cyanobactéries d'eau douce par rapport à *Synechocystis* : 62 à 64% pour les cyanobactéries marines contre 82 à 66% pour les cyanobactéries d'eau douce (tableau 5). Les séquences de l'OCP de *Gloeobacter violaceous* (50%), *'Nostoc azollae'* 0708 (54%) et *Nodularia spumigena* (56%) présentées dans le tableau 5 sont les plus éloignées de la séquence de l'OCP chez *Synechocystis*. *Acaryochloris marina* contient un gène « OCP-like » avec très peu de ressemblance (moins de 25%) par rapport à celui de *Synechocystis*, l'identité étant très faible, on ne peut pas vraiment le considérer comme « OCP-like », je ne l'ai donc pas inclus dans le tableau 5. Parmi les cyanobactéries contenant des phycobilisomes, seulement 12 souches sur 39 n'ont pas d'homologue de l'OCP entier. Ces dernières sont les cyanobactéries d'eau douce *Synechococcus elongatus* PCC 7942 et PCC 6301, les cyanobactéries thermophiles *Thermosynechococcus elongatus*, *Synechococcus* sp. A et *Synechococcus* sp. B', les cyanobactéries fixatrices d'azote *Cyanothece* sp. PCC 7822, *Cyanothece* sp. PCC 8801, *Cyanothece* sp. PCC 8802 et *Nostoc* sp. PCC 7425, et les cyanobactéries marines *Synechococcus* sp. CC9605, *Cyanobium* PCC 7001 et *Crocosphaera watsonii* WH8501. Toutes les souches citées précedemment n'ont pas d'homologue de l'OCP entier, cependant *T. elongatus*, *Cyanothece* sp. PCC 7822, *Cyanothece* sp. PCC 8801, *Cyanothece* sp. PCC 8802, *Nostoc* sp. PCC 7425 et *C. watsonii* WH8501 contiennent deux cadres de lecture codant l'un pour une partie N-terminale et l'autre pour une partie C-terminale homologue du gène d'OCP (tableau 5). Ils apparaissent tous comme des gènes séparés mais adjacents sauf dans le génome de *C. watsonii* où ils se trouvent dans deux parties différentes du génome. *Cyanothece* sp. PCC 7822 et *Nostoc* sp. PCC 7425 contiennent aussi plusieurs copies codant pour la partie N-terminale homologue de l'OCP. Et *Cyanobium* PCC 7001 contient seulement une protéine homologue à la partie C-terminale du gène de l'OCP chez *Synechocystis*.

Synechocystis, *Mycrocystis aeruginosa*, *Arthrospira maxima* et toutes les cyanobactéries marines *Synechococcus* contiennent une seule copie du gène codant pour l'OCP. D'autres cyanobactéries incluant *Lyngbya* sp. PCC 8106, *Cyanothece* CCY0110, *Nostoc* sp. PCC 7120, *'Nostoc azollae'* 0708, *Anabaena variabilis*, *Nostoc punctiforme* PCC

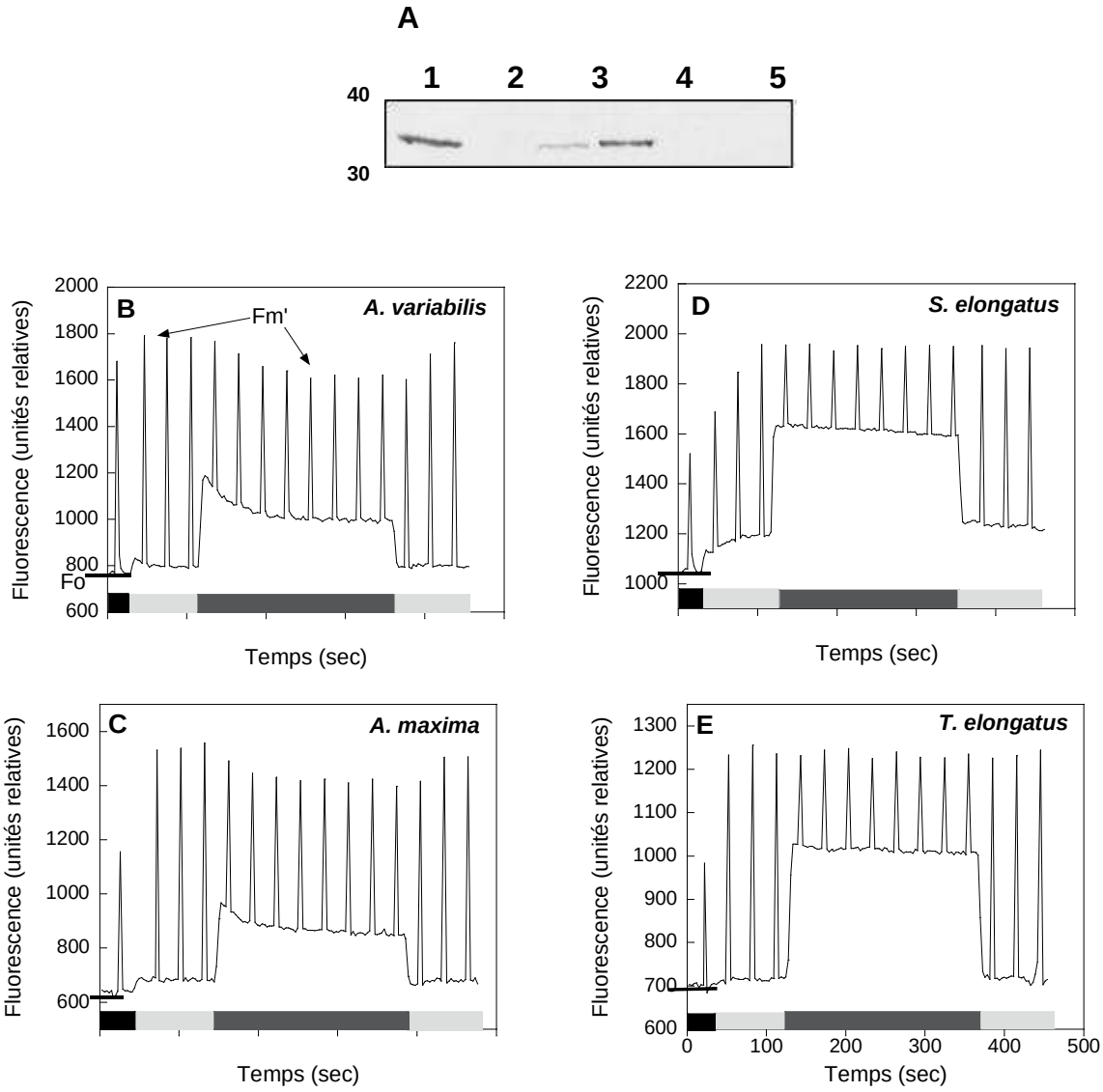


Figure CII.1: Détection de l'OCP par western blot et induction du déclin de fluorescence (qE_{cya}) par une lumière bleue-verte chez les cellules de *A. variabilis*, *A. maxima*, *S. elongatus* et *T. elongatus*

En **A**, détéction de l'OCP par western blot sur des fractions de MP isolées du sauvage de *Synechocystis* (**1**), du mutant ΔOCP de *Synechocystis* (**2**), d'*A. variabilis* (**3**), d'*A. maxima* (**4**), de *S. elongatus* (**5**) et de *T. elongatus* (**6**). Chaque puits contient 1µg de chlorophylle. De **B** à **E**, mesures du rendement de fluorescence par un fluorimètre PAM de *A. variabilis* (**B**), *A. maxima* (**C**), *S. elongatus* (**D**) et *T. elongatus* (**E**). Les cellules, diluées à 3 µgchl.mL^{-1}, ont été adaptées à l'obscurité, puis illuminées successivement par une lumière bleue-verte faible (400-550nm, 80 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) et une lumière bleue-verte forte (740 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}). Ensuite, les cellules ont été re-illuminées avec une lumière bleue-verte faible. Des pulses saturants ont été appliqués pour mesurer les niveaux maximaux de fluorescence (Fm').

73102, *Nodularia spumigena* CCY9414, et *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, ont, en plus, de multiples copies codant pour la partie N-terminale et une seule copie codant pour la partie C-terminale homologues de l'OCP chez S*ynechocystis*. Ces copies sont dispersées dans leurs génomes mais l'unique copie de la partie C-terminale est souvent proche d'une des parties N-terminales (tableau 5). Par ailleurs, les souches *Prochlorococcus*, un phylum de cyanobactéries dépourvues de phycobilisomes, ne contiennent aucune trace du gène de l'OCP.

2. Induction du déclin de fluorescence (qE_{cya}) par une lumière bleue-verte dans les souches cyanobactériennes contenant l'OCP et dépourvues de l'OCP

2.1 Chez les cyanobactéries d'eau douce

La relation entre la présence du gène de l'OCP et la capacité des cellules à réaliser le mécanisme de photo-protection (qE_{cya}) sous une forte lumière bleue-verte a été étudiée. Premièrement, nous avons comparé les cyanobactéries d'eau douce *A. maxima* et *A. variabilis* (contenant toutes deux un gène très proche de *slr*1963) avec *T. elongatus* et *S. elongatus* PCC 7942 (deux souches ne contenant pas de gène homologue à celui de l'OCP entier). Dans ces cyanobactéries, la présence de la protéine OCP a été vérifiée par western blot avec un anticorps anti-OCP (figure CII.1A). Nous avons détecté une bande correspondant à l'OCP à 35kDa chez *Synechocystis* (contrôle positif), *A. maxima* et *A. variabilis*. L'anticorps a mieux réagi avec l'OCP de *A. maxima* qu'avec celui de *A. variabilis* en accord avec l'identité du gène de l'OCP de ces cyanobactéries par rapport à celle du gène de l'OCP de *Synechocystis* (tableau 5). Aucune bande à 35kDa (ou avec un plus petit poids moléculaire) n'a été détectée chez le mutant ΔOCP de *Synechocystis* (contrôle négatif), chez *S. elongatus* (pas d'homologue du gène de l'OCP) et *T. elongatus* (seulement des parties N et C-terminales homologues au gène de l'OCP).

Le suivi des changements de fluorescence induis par différentes illuminations a été réalisé avec un fluorimètre PAM. Dans les cellules adaptées à l'obscurité, le pool de plastoquinones est réduit, en conséquence les cellules sont à l'état 2 (« State 2 ») et la fluorescence du PSII est basse (Dominy et Williams 1987; Mullineaux et Allen 1990) (figure CII.1B à E). Les cellules adaptées à l'obscurité de *S. elongatus* (figure CII.1D) ont un niveau minimal de fluorescence Fo plus important que les autres cyanobactéries (à concentration de chlorophylle égale). Ceci peut être expliqué par un ratio PC/chl supérieur aux autres cyanobactéries comme on peut l'observer sur leurs spectres d'absorbance (figure CII.5). Dans un fluorimètre PAM utilisant une lumière excitatrice à 650nm absorbée efficacement par les

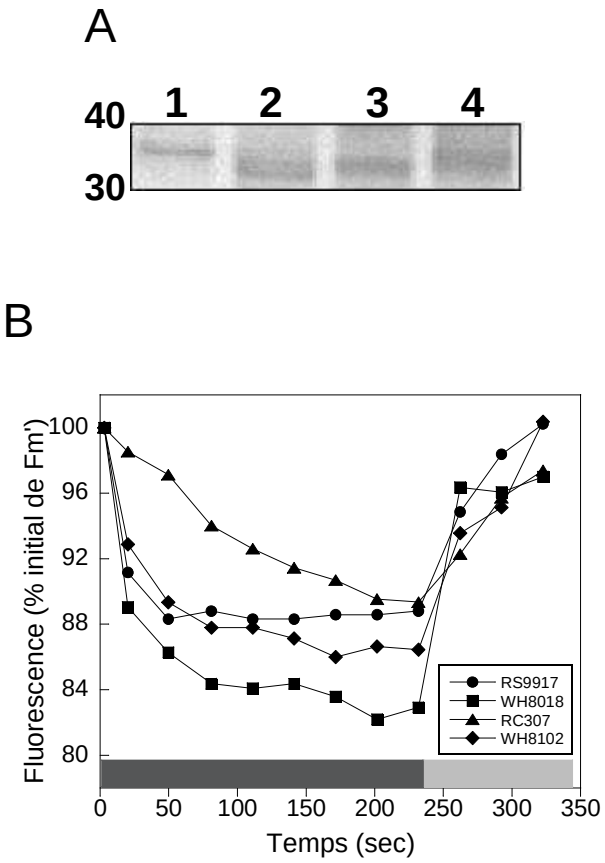


Figure CII.2: Détection de l'OCP par western blot et induction du déclin de fluorescence (qE_{cya}) par une lumière bleue-verte chez les cyanobactéries marines

En **A,** détection de l'OCP par western blot à partir des protéines totales isolées des cyanobactéries marines *Synechococcus* RS9917 (**1**), *Synechococcus* WH8018 (**2**), *Synechococcus* RCC307 (**3**) et *Synechococcus* WH8102 (**4**). Chaque puits contient 3µg de protéines totales. En **B**, mesures du maximum de fluorescence (Fm') sur les cellules diluées à 1 µgchl.mL^{-1} de *Synechococcus* WH8018 (carré)**,** *Synechococcus* WH8102 (losange), *Synechococcus* RS9917 (cercle) et *Synechococcus* RCC307 (triangle). Les cellules ont été adaptées à une lumière bleue-verte faible (400-550nm, 80 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}), puis illuminées successivement par une lumière bleue-verte forte (740 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) et une lumière bleue-verte faible. La mesure est montrée sous forme de pourcentage de Fm' initiale (100% correspond à la fluorescence sous lumière bleue-verte faible, juste avant l'illumination avec la lumière forte). Cette mesure du rendement de fluorescence a été effectuée dans un fluorimètre PAM et des pulses saturants ont été appliqués pour mesurer les niveaux maximaux de fluorescence.

phycobilisomes, le niveau Fo varie en fonction de la concentration cellulaire en phycobiliprotéines (Campbell *et al.* 1998b; El Bissati et Kirilovsky 2001). Quand des cellules adaptées à l'obscurité sont illuminées par une lumière bleue-verte faible (qui excite préférentiellement le PSI), une augmentation du niveau maximum de fluorescence (Fm') (correspondant à l'état 1, « State 1 ») est observée dans toutes les souches. La transition à l'état 1 est induite par l'oxydation du pool de plastoquinones qui a lieu lors du passage de l'obscurité à la lumière. L'augmentation de fluorescence a toujours été plus lente dans les cellules de *S. elongatus*. Ceci suggère que le pool de plastoquinones est plus réduit à l'obscurité et/ou qu'il y a des mouvements plus lents des PS et/ou des phycobilisomes chez *S. elongatus* par rapport aux autres souches étudiées (figure CII.1D).

Comme décrit chez *Synechocystis* (Wilson *et al.* 2006), l'exposition à une forte lumière bleue-verte induit aussi le déclin du maximum de fluorescence (Fm') chez *A. maxima* et *A. variabilis*, les souches contenant l'OCP. Les spectres de fluorescence et l'étude des mécanismes de photo-protection dans des mutants sans phycobilisomes et sans PSII de *Synechocystis* ont montré que cette diminution de fluorescence était spécifique à la diminution de l'émission de fluorescence des phycobilisomes (Rakhimberdieva *et al.* 2004; Scott *et al.* 2006; Wilson *et al.* 2006). Par contre, l'exposition à une forte lumière des souches *S. elongatus* et *T. elongatus*, qui ne contiennent pas de gène entier homologue à celui de l'OCP, n'induit pas la diminution de la fluorescence. Ceci suggère que l'OCP entière est nécessaire pour le mécanisme de photo-protection. De plus, nos résultats indiquent que les produits encodés par les homologues des parties N et C-terminale du gène de l'OCP (s'ils sont traduits) dans *T. elongatus* ne participent pas au mécanisme de photo-protection induit par la lumière bleue-verte, au moins en conditions de culture normale.

2.2 Chez les cyanobactéries marines

Les cyanobactéries marines *Synechococcus* ont aussi un gène homologue à celui de l'OCP (*slr*1963) mais son identité est plus faible que celles des souches d'eau douce par rapport à *slr*1963. De plus, leurs phycobilisomes ont des structures variées et ne contiennent généralement pas que les phycocyanines (PC) mais aussi des phycoérythrines (PE), toutes deux liant des phycobilines variées (Six *et al.* 2007). Des souches représentatives du groupe des *Synechococcus* marines ont été choisies pour tester la présence du mécanisme de photo-protection induit par la lumière bleue-verte : *Synechococcus* sp. RS9917 (contenant uniquement des PC, A_{max}=620 nm), *Synechococcus* sp. WH8018 (contenant des PE-I, A_{max}=570 nm), *Synechococcus* sp. WH8102 et *Synechococcus* sp. RCC307 (contenant des PE-I et des PE-II avec des chromophores phycoérythrobilines (A_{max}=550 nm) et phycourobilines (A_{max}=495 nm)). Le génome de *Synechococcus* sp. WH8018 n'a pas encore été séquencé, mais cette cyanobactérie marine est très similaire à *Synechococcus* sp. WH7805

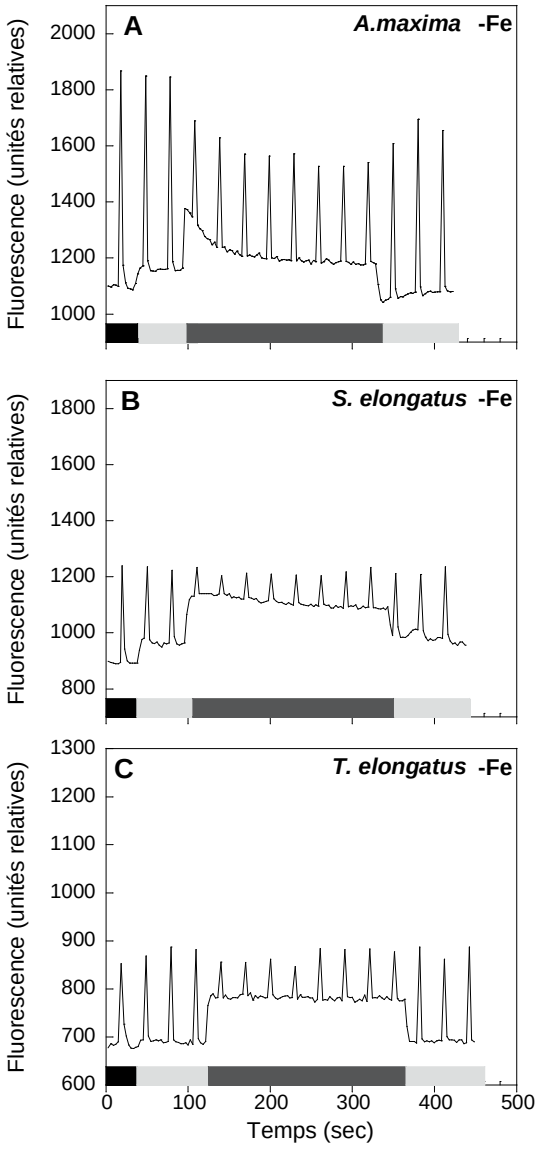


Figure CII.3: Modifications du rendement de fluorescence induit par la lumière bleue-verte forte dans les cellules sous carence en fer de *A. maxima* (A), *S. elongatus* (B) et *T. elongatus* (C)

Les cellules diluées à 3 µgchl.mL^{-1} carencées en fer pendant 10 jours on été adaptées à l'obscurité puis illuminées successivement par une lumière bleue-verte faible (400-550nm, 80 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) et par une lumière bleue-verte forte (740 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}). Ensuite les cellules ont été ré-illuminées avec une lumière bleue-verte faible. Les mesures ont été réalisées avec un fluorimètre PAM et des pulses saturants ont été appliqués pour mesurer le niveau de fluorescence maximal (Fm').

(Fuller *et al.* 2003) qui contient un gène homologue à celui de l'OCP. La figure CII.2A montre que les anticorps anti-OCP reconnaissent un polypeptide de 35kDa dans toutes les souches. L'anticorps réagit moins par rapport à la réaction observée avec les souches d'eau douce, ceci est en accord avec la ressemblance plus faible de l'OCP des souches marines par rapport à l'OCP de *Synechocystis*.

L'induction du déclin de fluorescence par la lumière bleue-verte a été suivie par des mesures dans un fluorimètre PAM. L'exposition à une lumière bleue-verte faible des cellules adaptées à l'obscurité induit une augmentation du maximum de fluorescence (Fm') associée à la transition à l'état 1 (« State 1 ») dans toutes les souches (données non montrées). Ensuite l'exposition de ces cellules hautement fluorescentes à une forte lumière bleue-verte induit une diminution de Fm' comme dans les cyanobactéries d'eau douce contenant l'OCP (figure CII.2B). Bien que dans les cellules contenant des PE, la lumière bleue-verte ne soit pas seulement absorbée par la chlorophylle (elle est aussi absorbée par les phycobilisomes), il est improbable que le déclin de fluorescence observé induit par une forte lumière bleue-verte soit dû à une transition à l'état 2. Une faible lumière bleue-verte induit la transition à l'état 1 causée par l'oxydation du pool de plastoquinones (due à une plus grande activité du PSI que du PSII dans cette condition d'éclairement). Quand les *Synechococcus* marines sont remises en condition de faible éclairement avec une lumière bleue-verte, on observe une récupération de la fluorescence (Fm' ré-augmente) (figure CII.2B). Ainsi, même chez ces souches cyanobactériennes marines, avec une OCP moins proche de l'OCP de *Synechocystis* et une composition différente de leurs phycobilisomes, la lumière bleue-verte induit un déclin de la fluorescence caractéristique du mécanisme de photo-protection qE_{cya}. Dans ces souches marines, une faible lumière bleue-verte induit aussi l'oxydation du pool de plastoquinones et la transition à l'état 1 comme dans les souches ne contenant pas de PE.

3. Induction du déclin de fluorescence (qE_{cya}) par une lumière bleue-verte chez les cellules cyanobactériennes en conditions de carence en fer

Sous carence en fer, la lumière bleue-verte forte induit une diminution importante de fluorescence (qE_{cya}) (Cadoret *et al.* 2004; Joshua *et al.* 2005; Rakhimberdieva *et al.* 2007; Wilson *et al.* 2007). Une plus grande diminution de Fo et Fm', corrélée à une concentration plus importante de l'OCP (dans des cellules à même concentration de chlorophylle), est induite sous carence en fer par rapport aux conditions normales chez les cellules du sauvage de *Synechocystis* (parties 2 et 3 du chapitre I, figures CI.6 et CI.9, Wilson *et al.* 2007). Ici, nous comparons le comportement de trois autres cyanobactéries sous carence en fer ayant trois configurations différentes du gène de l'OCP : *T. elongatus*, *A. maxima* et *S. elongatus*. *A. maxima* a le gène entier de l'OCP, *T. elongatus* a deux gènes codant pour des parties N- et C-

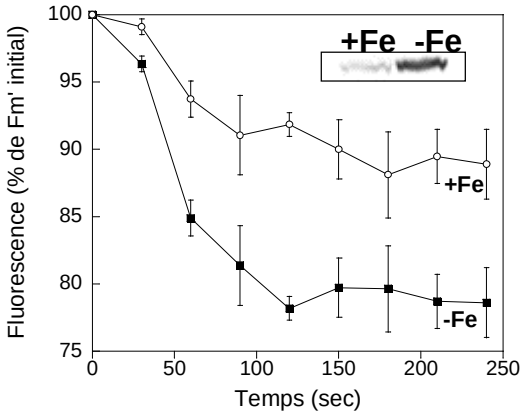


Figure CII.4 : Mesures du déclin de fluorescence (Fm') induit par la lumière bleue-verte chez les cellules de *A. maxima* cultivées en milieu normal et sous carence en fer

Le niveau de fluorescence maximal (Fm') induit par la lumière bleue-verte forte a été mesuré par l'application de flashs saturants avec un fluorimètre PAM dans les cellules de *A. Maxima* cultivées en conditions normales (+Fe) et sous carence en fer (-Fe). Dans l'insert : détection de l'OCP par western blot de fractions membranes-phycobilisomes isolées de ces cellules (chaque puits contient 1 µg de chlorophylle). Le graphique représente la moyenne de trois expériences indépendantes et les barres d'erreurs indiquent leur écart type.

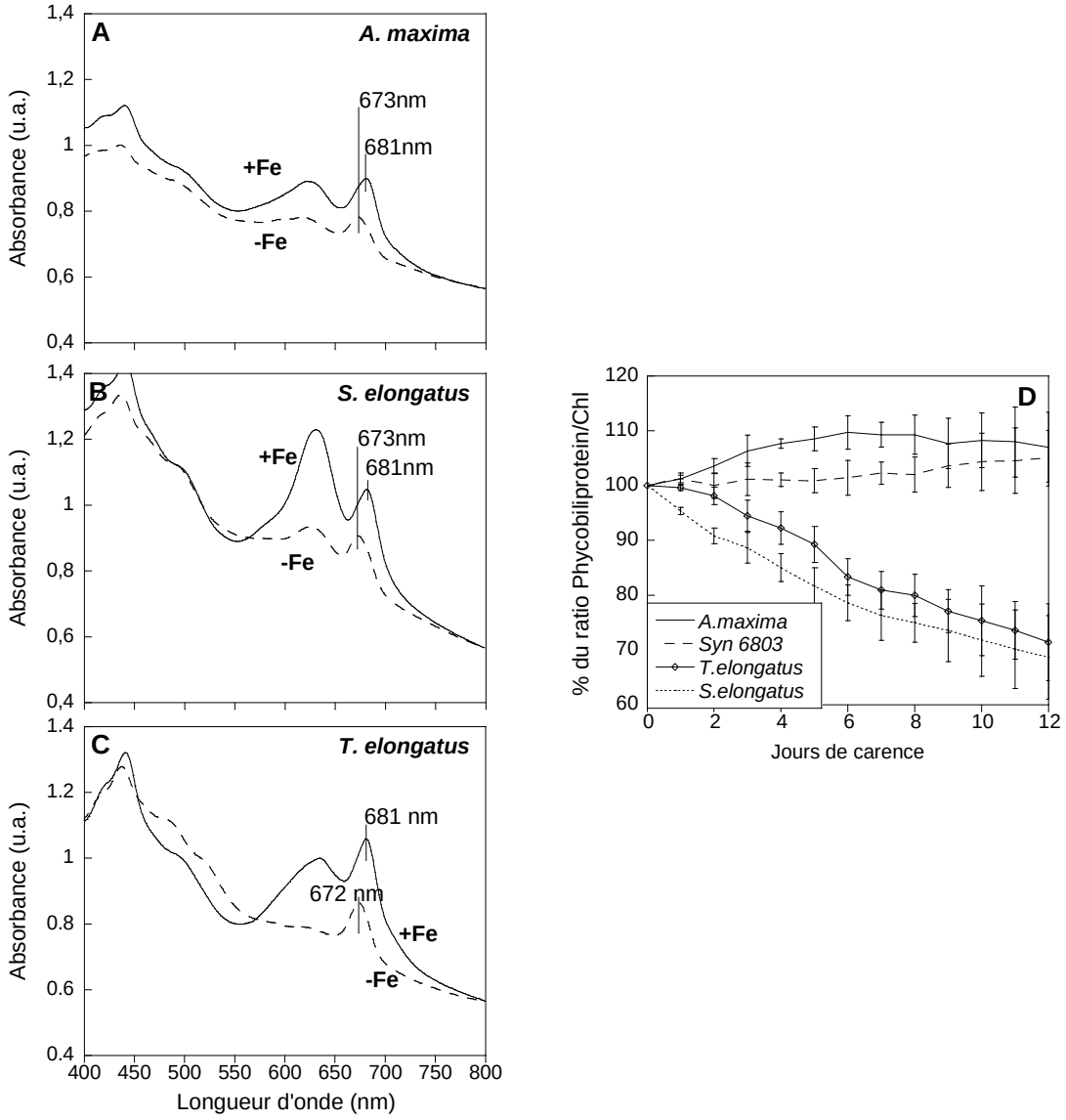


Figure CII.5 : Variations des propriétés d'absorption des cellules sous carence en fer de *A. maxima*, *S. elongatus* et *T. elongatus*

A, **B**, et **C** montrent les spectres d'absorption des cellules cultivées en milieu normal (trait plein, +Fe) et sous carence en fer depuis 10 jours (trait hâchuré, -Fe) de *A. maxima*, *S. elongatus* et *T. elongatus*, respectivement. Les spectres d'absorbance ont été normalisés à l'absorbance à 800nm.

En **D**, modifications du ratio phycocyanine/chlorophylle pendant la carence en fer dans les cellules de *A. maxima* (trait plein), *Synechocystis* (trait hâchuré), *T. elongatus* (trait plein avec des losanges) et *S. elongatus* (trait pointillé). Les variations sont indiquées en pourcentage par rapport au ratio des cellules non carencées. Chaque courbe est la moyenne de trois expériences indépendantes et les barres d'erreurs indiquent leur écart type.

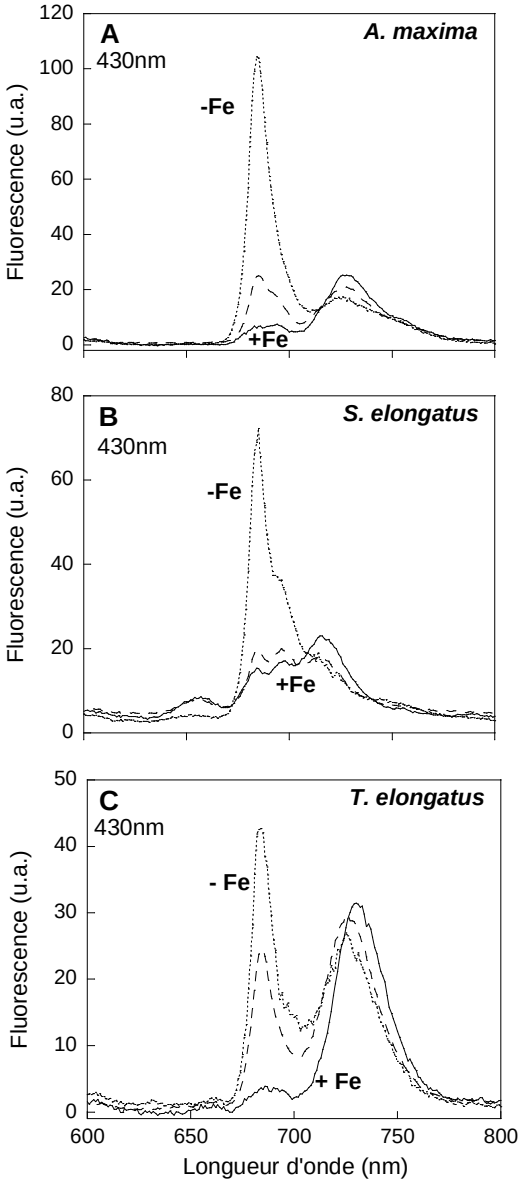


Figure CII.6 : Variations des spectres d'émission de fluorescence à 77°K (excitation à 430nm) induites par une carence en fer dans les cellules de *A. maxima* (A), *S. elongatus* (B) et *T. elongatus* (C)

Les spectres à 77°K des cellules non carencées (trait plein, +Fe), des cellules carencées depuis 6 jours (trait hâchuré, -Fe) et depuis 10 jours (trait pointillé, -Fe) sont montrés. Les cellules ont été diluées à 3 $\mu g chl.mL^{-1}$. Les spectres de fluorescence à 77°K ont été normalisés à la fluorescence émise à 800nm. Chaque spectre est la moyenne de trois réplicats.

terminales homologues au gène de l'OCP et *S. elongatus* ne contient aucun gène homologue au gène de l'OCP. La figure CII.3 montre la mesure du rendement de fluorescence de cellules carencées pendant 10 jours de *A. maxima*, *T. elongatus*, et *S. elongatus*. Comparé à celui des cellules cultivées dans un milieu normal, le niveau de Fo diminue légèrement chez les cellules de *T. elongatus* et *S. elongatus* alors qu'il augmente dans celles de *A. maxima*, comme nous l'avions déjà observé chez *Synechocystis* (chapitre I.2, figure CI.6, Wilson *et al*. 2007). Le niveau Fo ne dépend pas seulement de la concentration en phycobiliprotéines mais aussi du couplage fonctionnel des phycobilisomes. Les phycobilisomes couplés (fonctionnels) ont une émission de fluorescence basse, alors que les phycobilisomes découplés ont une émission de fluorescence importante. Il a déjà été montré que le haut niveau de Fo dans les cellules carencées à long terme de *Synechocystis* est dû à une population importante de phycobilisomes déconnectés fonctionnellement (chapitre I, figures CI.2, CI.4 et CI.5, Wilson *et al*. 2007). Il semblerait que ce soit aussi le cas dans les cellules de *A. maxima* (voir plus bas). Quand les cellules adaptées à l'obscurité sont illuminées avec une lumière bleue-verte faible presque aucun changement du niveau Fm' n'est observé dans les trois souches (figure CII.3 et voir aussi la partie sur les transitions d'état dans le chapitre II.6). Ensuite, une illumination avec une lumière bleue-verte forte induit un déclin de fluorescence seulement dans les cellules de *A. maxima*, la souche contenant un gène entier d'OCP. Un déclin de fluorescence plus important est observé dans les cellules carencées en fer de *A. maxima* et celui-ci correspond à un ratio d'OCP/chl plus grand (figure CII.4).

4. Caractérisation des cellules carencées en fer : spectres d'absorbance et de fluorescence

4.1 Spectres d'absorbance

Pour mieux caractériser les cellules carencées en fer et savoir si les souches contenant ou non l'OCP utilisent des stratégies physiologiques différentes pour gérer la carence en fer, nous avons caractérisé leur contenu en pigments et complexes photosynthétiques. La figure CII.5 compare les spectres d'absorption des cellules non carencées et des cellules carencées pendant 10 jours. Dans toutes les souches après 3 jours de carence, nous observons un shift de 681 à 673nm du pic associé à la chlorophylle. Ceci est caractéristique de l'accumulation d'IsiA (Laudenbach et Straus 1988; Burnap *et al.* 1993). Une diminution importante des phycobiliprotéines (PC et APC) et de la chlorophylle est observée dans les cellules carencées car les pics à 625nm et 673-681nm, respectivement, diminuent. Ceci est en accord avec la littérature (Öquist 1971; Öquist 1974a; Guikema et Sherman 1983; Sandmann 1985). Le contenu en chlorophylle des cellules diminue à la même vitesse pour les trois souches

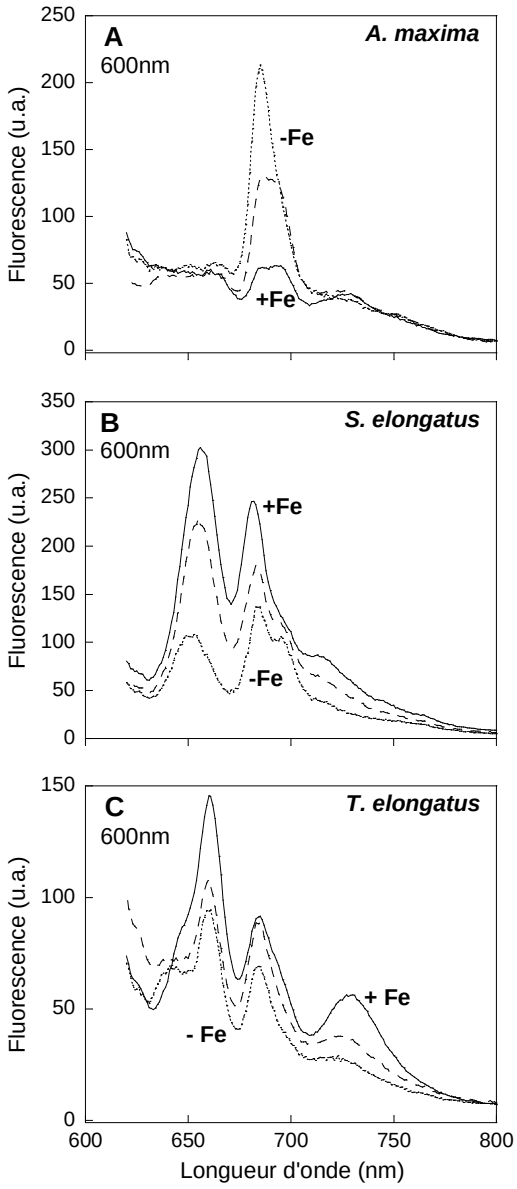


Figure CII.7 : Variations des spectres d'émission de fluorescence à 77°K (excitation à 600nm) induites par une carence en fer dans les cellules de *A. maxima* (A), *S. elongatus* (B) et *T. elongatus* (C)

Les spectres à 77°K des cellules non carencées (trait plein, +Fe), des cellules carencées depuis 6 jours (trait hâchuré, -Fe) et depuis 10 jours (trait pointillé, -Fe) sont montrés. Les cellules ont été diluées à 3 $\mu g chl.mL^{-1}$. Les spectres de fluorescence à 77°K ont été normalisés à la fluorescence émise à 800nm. Chaque spectre est la moyenne de trois réplicats.

(données non montrées). Cependant nous remarquons qu'en carence en fer, le ratio phycobiliprotéines/chlorophylles de *A.maxima* et *Synechocystis* reste constant ou augmente très peu, alors que celui de *T. elongatus* et *S. elongatus* diminue (figure CII.5D). Ceci indique que le contenu en phycobiliprotéines (comparé au contenu en chlorophylles) diminue plus rapidement dans les deux souches sans l'OCP.

4.2 Spectres d'émission de fluorescence avec l'excitation de la chorophylle à 430nm

Le contenu en PSI, en PSII et en thylacoïdes est connu pour diminuer sous carence en fer avec une diminution plus rapide du PSI (Spiller et Terry 1980; Guikema et Sherman 1983; Sherman et Sherman 1983; Sandmann 1985). Les spectres d'émission de fluorescence, avec une excitation à 430nm (préférentiellement absorbée par la chlorophylle) et à 600nm (préférentiellement absorbée par les phycobilisomes riches en PC), sont utilisés pour observer les changements de l'appareil photosynthétique sous la carence en fer. La figure CII.6 montre les spectres de fluorescence à 77°K (excitation à 430nm) des cellules cultivées en milieu normal et sous carence en fer de *A. maxima, S. elongatus* et *T. elongatus*. Le spectre montre des pics à 685 et 695nm associés respectivement aux antennes internes CP43 et CP47 du PSII (Vandorssen *et al.* 1987; Siefermann-Harms 1988) et un pic à 730nm associé au PSI. Le ratio de fluorescence des PSI/PSII varie parmi les souches, il est plus important dans *A. maxima* et *T. elongatus* que dans *S. elongatus*. Au début de la carence, une augmentation du ratio de fluorescence des PSII/PSI est observée. Ceci est en accord avec le fait que le contenu en PSI qui contient 4 centres Fe-S diminuent plus vite que celui en PSII qui contient seulement 3 fers (Guikema et Sherman 1983; Sandmann 1985; Falk *et al.* 1995; Ivanov *et al.* 2000). Il a aussi été proposé que l'augmentation du ratio de fluorescence des PSII/PSI reflète le fait que les cellules adaptées à l'obscurité, cultivées en milieu normal sont à l'état 2, alors que celles sous carence en fer sont à l'état 1 (Ivanov *et al.* 2006). Toutes les souches ont montré une augmentation importante de la fluorescence du pic à 685nm par rapport à celui à 695nm. Cette augmentation est associée à l'accumulation d'agrégats d'IsiA non associés au PSI, comme décrit dans Yeremenko *et al*. (2004). Dans les trois souches, nous avons aussi observé le shift typique du pic associé au PSI de 730 à 725nm. Ce shift est du à la formation d'un complexe de 18 protéines IsiA autour du PSI (Öquist 1974b; Burnap *et al.* 1993; Falk *et al.* 1995; Park *et al.* 1999) (figure CII.6).

4.3 Spectres d'émission de fluorescence avec l'excitation des phycobilisomes à 600nm

La figure CII.7 montre les spectres d'émission de fluorescence à 77K réalisés avec une lumière excitatrice à 600nm qui excite préférentiellement les phycobilisomes. Les spectres présentent les pics associés aux PC (650nm), à l'APC (660nm), au PSII (685 et 695nm) et au

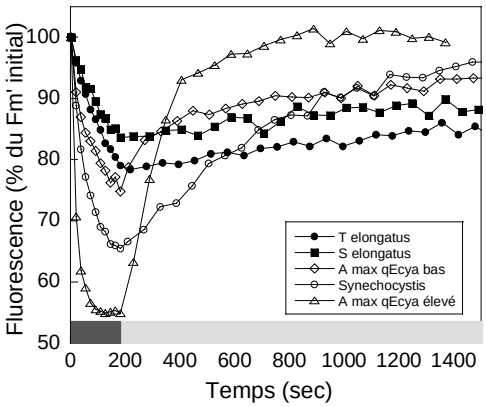


Figure CII.8 : Photoinhibition dans les cellules de *A. maxima*, *Synechocystis*, *S. elongatus* et *T. elongatus*

La mesure du maximum de fluorescence (Fm') pendant différentes illuminations des cellules de *A. maxima* (15 jours de carence) (triangles vides), *Synechocystis* (ronds vides), *A. maxima* (milieu normal) (losanges vides), *T. elongatus* (ronds pleins) et S. *elongatus* (carrés pleins) a été réalisée. Les cellules diluées à 3 µgchl.mL^{-1} et adaptées à l'obscurité ont été pré-illuminées par une lumière bleue-verte faible (400-550nm, 80 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}), puis illuminées pendant 3 min par une lumière saturante (2500 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) et ensuite ré-illuminées avec une lumière bleue-verte faibe. Le rendement de fluorescence a été détecté dans un fluorimètre PAM et des pulses saturants ont été appliqués pour mesurer les niveaux maximaux de fluorescence.

PSI (730nm). L'émission de fluorescence de CP47 et du centre réactionnel du PSII contribue au pic à 695nm. L'émission à 685nm est principalement due à l'émetteur terminal des phycobilisomes (L_{CM}) et dans une moindre mesure à l'antenne CP43 du PSII (Redlinger et Gantt 1982; Vandorssen *et al.* 1987). Quand les complexes vides d'IsiA sont présents, leur émission de fluorescence contribue aussi au pic à 685nm. Au début de la carence en fer, les cellules de *A. maxima* ont une augmentation du ratio de la fluorescence du PSII (pics à 685 et 695nm) sur la fluorescence du PSI (pic à 730nm). Ces observations ont lieu parallèlement à l'augmentation du ratio Fv/Fo suggérant une augmentation du ratio PSII/PSI. Comme décrit précédemment pour les cellules carencées de *Synechocystis* (chapitre I.b, figure CI.2 et Wilson *et al*. 2007), l'avancée de la carence induit un pic important à 685nm, correspondant à l'accumulation de phycobilisomes déconnectés fonctionnellement (c'est pourquoi ils sont très fluorescents). Cependant dans les cellules carencées de *S. elongatus* et *T. elongatus*, bien que l'augmentation du ratio de la fluorescence PSIII/PSI soit aussi observée, l'émission de fluorescence associée aux phycobilisomes entiers (685nm) et aux PC et APC (650-660nm) diminue. Ceci indique qu'il n'y a pas d'accumulation de phycobilisomes déconnectés fonctionnellement dans ces souches. Ainsi, les cellules de *S. elongatus* et *T. elongatus* se comportent différemment de celles de *A. maxima* et *Synechocystis* en conditions de carence en fer. Dans les souches *T.* et *S. elongatus*, le contenu en phycobiliprotéines diminue plus rapidement que celui en chlorophylle et il n'y a pas d'accumulation de phycobilisomes fonctionnellement déconnectés. Cette organisation est probablement essentielle pour une survie plus longue des cellules en absence du mécanisme de photo-protection induit par une forte lumière bleue-verte.

5. Étude de la photoinhibition des souches contenant l'OCP et dépourvues de l'OCP

Un excès de lumière qui atteint le centre réactionnel du PSII induit un endommagement de la protéine D1, puis sa dégradation (Prasil *et al.* 1992; Aro *et al.* 1993; Vass et Aro 2007; Tyystjärvi 2008). Ce phénomène, nommé photoinhibition, se traduit par une diminution du rendement de fluorescence (après une forte illumination de lumière blanche) mesurée avec le fluorimètre PAM. Quand les cellules sont remises en conditions d'éclairement normales après un excès de lumière, la photoinhibition est réversible (en quelques heures) car la synthèse de nouvelles protéines D1 permet la restauration des PSII endommagés (Prasil *et al.* 1992; Aro *et al.* 1993; Vass et Aro 2007; Tyystjärvi 2008). Le mécanisme de photo-protection qE chez les plantes supérieures (nommé qE_{cya} dans les cyanobactéries) est induit par un excès de lumière, notamment, dans les cas d'intensités de lumière fluctuantes (Kulheim *et al.* 2002). Nous avons donc testé ici la sensibilité des souches

Tableau 6 : Diminution de la fluorescence variable (Fv) pendant une illumination avec de fortes intensités de lumière blanche

	3 minutes (% de Fv initial ± 5%)	8 minutes (% de Fv initial ± 5%)	12 minutes (% de Fv initial ± 5%)
A. maxima (qE_{cya} élevé)	98	81	70
A. maxima (qE_{cya} bas)	86	74	61.5
Synechocystis	88	75	61
S. elongatus	80	62	42
T. elongatus	75	57	38

Les cellules ont été illuminées avec une haute intensité de lumière blanche (2500 µmol photon.m^{-2}.s^{-1} pendant 3 minutes, 8 minutes (4 périodes de 2 minutes séparées par 5 minutes de lumière bleue-verte faible) et 12 minutes (6 périodes de 2 minutes séparées par 5 minutes de lumière bleue-verte faible). Ensuite, les cellules ont été ré-illuminées avec une lumière bleue-verte faible. Fv a été mesurée 20 minutes après la dernière illumination de lumière blanche dans le but d'assurer la relaxation du déclin de fluorescence associée au mécanisme de photo-protection qE_{cya}.

contenant et ne contenant pas l'OCP à des intensités lumineuses fortes lors de plusieurs périodes de temps courtes. Pour cette étude, nous avons utilisé des cellules d'*A. maxima* avec un qE_{cya} faible et élevé (pas de carence et 15 jours de carence en fer, respectivement), des cellules de *Synechocystis* avec un qE_{cya} relativement faible et des cellules de *S.* et *T. elongatus* (qui ne semblent pas avoir de mécanisme de photo-protection associé à qE_{cya}). La figure CII.8 montre la variation de Fm' dans ces cellules adaptées à une faible intensité de lumière bleue-verte qui ont été illuminées avec une lumière saturante blanche. Les niveaux Fm' diminuent dans toutes des souches. Quand les cellules sont remises sous une faible intensité de lumière bleue-verte, une récupération importante des niveaux de fluorescence Fm' est observée dans les souches contenant l'OCP, c'est à dire pour *A. maxima* et *Synechocystis* (figure CII.8). Ceci montre que la diminution de Fm' est principalement due à qE_{cya} et non à la photoinhibition. Au contraire, dans les cellules de *T. elongatus* et *S. elongatus*, la diminution de Fm' est due à une photoinhibition car la diminution n'est presque pas réversible (seulement 5% pendant les 20min qui suivent la forte illumination). Ces résultats montrent aussi que les illuminations de forte lumière blanche, comme celles de lumière bleue-verte, sont incapables d'induire qE_{cya} chez *T. elongatus* et *S. elongatus*.

Nous avons aussi réalisé une série de mesures avec des illuminations de lumière blanche forte (conditions de photoinhibition) plus longues. Les cellules ont été illuminées avec 4 à 6 périodes de 2 minutes de lumière blanche saturante. Entre les périodes de forte lumière blanche et après, les cellules ont été illuminées avec une lumière bleue-verte faible (20min). Après la récupération de la fluorescence associée à qE_{cya} (environ 15 minutes), la fluorescence variable (Fv=Fm'-Fo) comparée à la fluorescence variable initiale donne une estimation de la photoinhibition (tableau 6). Une illumination plus longue induit une perte de Fv plus importante dans toutes les souches, mais la perte est plus prononcée pour les souches ne contenant pas l'OCP. De plus, la perte de Fv semble être inversement proportionnelle à l'induction de qE_{cya}. En effet, après 12 minutes d'illumination avec une forte lumière blanche (6 périodes de 2 minutes), *S.* et *T. elongatus* perdent environ 60% de leur Fv initiale, alors que *Synechocystis* et *A. maxima* (avec un qE_{cya} bas) ont une perte de Fv d'environ 40% (même 30% pour *A.maxima* avec un qEcya élevé) (tableau 6). Il est aussi intéressant de remarquer qu'une diminution de Fv plus importante est induite dans les cellules de *T. elongatus* par rapport à celles de *S. elongatus* suggérant une plus grande sensibilité de *T. elongatus* aux intensités de lumière forte.

6. Étude des transitions d'état en conditions de carence en fer

Les transitions d'état sont une adaptation de l'appareil photosynthétique en fonction de la qualité de l'éclairement. L'état 1 et l'état 2 sont respectivement induits par une illumination

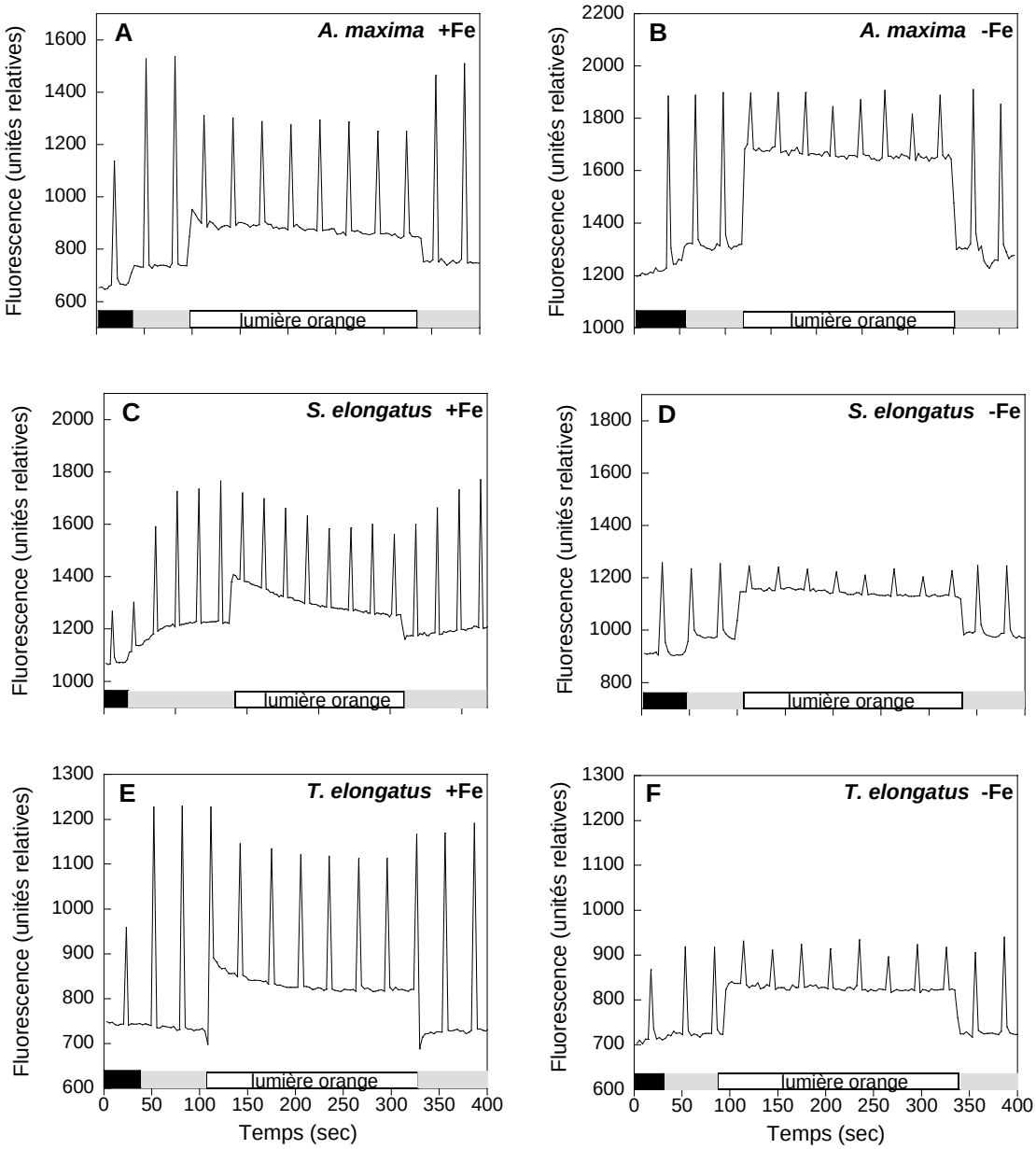


Figure CII.9 : Transitions d'état dans les cellules de *A. maxima* (A, B), *S. elongatus* (C, D) et *T. elongatus* (E, F) en présence (A,C,E) (+Fe) et en abscence de fer (B,D,F) (-Fe)

Les cellules de *T. elongatus*, *A.maxima* et *S. elongatus* ont été cutivées en milieu normal ou carencées pendant 10 jours. Ces cellules diluées à 3 µgchl.mL^{-1} adaptées à l'obscurité ont été illuminées successivement avec une lumière bleue-verte faible (400-550nm, 80 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) et une lumière orange faible (20 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}). Elles ont ensuite été ré-illuminées avec une lumière bleue-verte faible. Le rendement de fluorescence a été mesuré avec un fluorimète PAM et des pulses saturants ont été appliqués pour mesurer les niveaux maximum de fluorescence.

qui favorise l'activité du PSI et du PSII (voir l'Introduction pour plus de détails). Nous avons testé le comportement des souches sous différentes qualités de lumière. La figure CII.9 montre le rendement de fluorescence des cellules carencées et non carencées de *A. maxima*, *S. elongatus* et *T. elongatus* après des illuminations successives de lumière bleue-verte faible et de lumière orange faible. Comme mentionné plus haut, les cyanobactéries adaptées à l'obscurité sont à l'état 2 (Dominy et Williams 1987; Mullineaux et Allen 1990). Les cellules non carencées illuminées par une lumière bleue-verte montrent une augmentation du niveau maximal de fluorescence (Fm') et l'état 1 est atteint. Quand les cellules adaptées à la lumière bleue-verte sont illuminées par une lumière orange (efficacement absorbée par les phycobilisomes riches en PC et préférentiellement transférée vers le PSII induisant une réduction du pool de plastiquinones), une diminution du niveau Fm' est observée (figure CII.9A, C et E). Ceci est caractéristique de la transition à l'état 2. La cinétique des transitions d'état est plus lente dans les cellules de *S. elongatus* que dans les autres souches (figure CII.9C). Les transitions d'état sont complètement inhibées après 10 jours de carence en fer dans les cellules de *A. maxima, S. elongatus* et *T. elongatus* (figure CII.9B, D et F, respectivement). Fm' reste au même niveau dans les cellules adaptées à l'obscurité (Fm_d) sous une illumination bleue et orange. Nous remarquons aussi, sous une même intensité de lumière orange, que la fluorescence d'équilibre (Fs) est plus importante dans les cellules carencées que dans les cellules non carencées. Ceci indique une concentration plus importante de Q_A^- et de centres réactionnels fermés. Ces observations sont en accord avec un pool de plastoquinones plus réduit à cause d'un ratio PSII/PSI plus important et avec un système de transport des électrons diminué dans les cellules carencées (Ivanov *et al.* 2000).

7. Conclusion du chapitre II

Notre étude suggère que la plupart des cyanobactéries se protègent des fluctuations de lumière en utilisant le mécanisme de photo-protection (qE_{cya}) associé à l'OCP et aux phycobilisomes. Le gène entier de l'OCP est nécessaire et le rôle des fragments (multiples dans certaines souches) du gène de l'OCP est encore inconnu. En conditions de stress, comme en carence en fer, l'OCP est produite en plus grandes quantités et on observe un qE_{cya} plus important. La plus grande quantité d'OCP permet de dissiper sous forme de chaleur l'excès d'énergie provenant des phycobilisomes déconnectés observés en grand nombre en conditions de carence en fer, ces derniers sont ainsi moins dangereux pour les cellules. Ces résultats sont en accord avec nos travaux précédents sur la carence en fer chez *Synechocystis* (chapitre I, Wilson *et al*. 2007). Les quelques cyanobactéries qui ne contiennent pas l'OCP sont incapables de réaliser le mécanisme de photo-protection qE_{cya}. Ces souches sont plus sensibles aux conditions de photoinhibition. Elles semblent avoir adopté une stratégie

physiologique différente basée sur une dégradation plus rapide des phycobilisomes. Les transitions d'état présentes dans toutes les cyanobactéries étudiées, semblent être inhibées lors de la carence en fer et ne sont pas affectées par la présence du mécanisme de photo-protection qE_{cya}. Ce mécanisme d'adaptation de l'appareil photosynthétique en fonction de la qualité de l'éclairement existe donc en parallèle au mécanisme de photo-protection impliquant l'OCP. Ce dernier est plus important quand les transitions d'état sont inhibées comme c'est le cas en condition de carence en fer, ceci permet aux cellules contenant l'OCP de mieux résister au stress. Si l'OCP est aussi répandue chez les cyanobactéries que nous l'observons, sa présence a dû jouer un rôle clé dans la capacité de ces organismes à réguler l'utilisation de la lumière et a dû leur permettre de s'adapter dans beaucoup de niches écologiques.

Discussion des chapitres I et II

1. Discussion sur l'implication d'IsiA et de l'OCP dans les mécanismes associés au déclin de fluorescence non photochimique en conditions normales et sous carence en fer

1.1 IsiA protège les cellules pendant la carence en fer mais elle ne participe pas au mécanisme qE_{cya} associé à l'OCP qui est augmenté pendant la carence

Dans les années précédant ma thèse, il avait été proposé par différents groupes que la protéine membranaire IsiA synthétisée en carence en fer (« Iron Stress Induced » en anglais), qui attache des molécules de chlorophylle et des caroténoïdes, était responsable du large quenching de fluorescence induit par la lumière bleue-verte chez *Synechocystis* (Park *et al.* 1999; Sandström *et al.* 2001). Il avait été proposé que la forte lumière pourrait induire des changements conformationnels dans IsiA, ce qui transformerait les complexes d'IsiA en dissipateurs d'énergie (Cadoret *et al.* 2004) ou modifierait l'affinité d'IsiA pour les phycobilisomes (Joshua *et al.* 2005).

Nos résultats dans le chapitre I démontrent clairement que IsiA n'est pas impliquée dans le mécanisme qE_{cya} induit par la lumière bleue-verte. Dans les cellules carencées en fer, comme dans les cellules cultivées en milieu normal, le déclin de fluorescence induit par la lumière est associé aux phycobilisomes et à l'OCP, mais pas à IsiA. Dans le mutant ΔIsiA, un déclin de fluorescence important est toujours induit par la lumière. Au contraire, dans les mutants sans phycobilisomes (le mutant PAL) ou sans l'OCP (le mutant ΔOCP), la lumière bleue-verte est incapable d'induire un déclin de fluorescence, même après une longue période de carence en fer. De plus, dans les cellules carencées en fer du sauvage et du mutant ΔIsiA, les spectres d'émission de fluorescence montrent qu'aucun quenching de fluorescence associé à la chlorophylle n'est induit. Alors qu'un large quenching de fluorescence émise par les phycobilisomes et une diminution du transfert d'énergie des phycobilisomes vers les centres réactionnels sont observés.

Nos résultats dans le chapitre II sont en accord avec ceux du chapitre I, nous observons l'accumulation de la protéine IsiA dans les cellules carencées en fer de toutes les souches contenant ou non l'OCP. Cette accumulation est indiquée par un shift vers le bleu (de 683nm à 671nm) du pic d'absorption de la chlorophylle (Laudenbach et Straus 1988; Burnap *et al.* 1993) et par l'émission de fluorescence du PSI à 77°K (Burnap *et al.* 1993; Falk *et al.* 1995; Park *et al.* 1999) avec une augmentation spécifique du pic d'émission de fluorescence à 685nm (Yeremenko *et al.* 2004).

L'augmentation de qE_{cya} est associée à une augmentation de la concentration de l'OCP car une plus grande concentration de l'OCP est observée dans les cellules carencées en fer par rapport aux cellules non carencées chez *Synechocystis* (chapitre I) et *A. maxima* (chapitre II). L'abondance de l'OCP est encore plus importante dans les cellules carencées du mutant ΔIsiA de *Synechocystis*. La transcription du gène de l'OCP est connue pour être augmentée dans d'autres conditions de stress telles qu'une illumination sous forte lumière blanche (Hihara *et al.* 2001), une lumière UV-B (communication personnelle de I. Vass) et le stress salin (communication personnelle de M. Hagemann). Il est possible que d'autres stress régulent aussi l'activité de ce gène. Et, il se peut que le mécanisme de photo-protection qE_{cya}, associé aux phycobilisomes et à l'OCP, joue un rôle photoprotecteur significatif dans une large gamme de conditions de stress.

Dans les cellules du mutant ΔOCP de *Synechocystis* cultivées sous carence en fer prolongée, la lumière bleue-verte est incapable d'induire un déclin de fluorescence même en présence de phycobilisomes fonctionnellement déconnectés et des complexes vides (sans PSI) d'IsiA. Ceci confirme que l'OCP est bien essentielle pour le mécanisme qE_{cya} sous carence en fer.

L'absence d'IsiA rend les cellules de *Synechocystis* plus sensibles au stress généré par la carence en fer ou par une forte intensité lumineuse (Park *et al.* 1999; Havaux *et al.* 2005; Latifi *et al.* 2005), chapitre I) mais n'inhibe pas le processus de qE_{cya}. IsiA semble donc protéger les cellules par un ou plusieurs autre(s) mécanisme(s). En combinant nos résultats avec les résultats présentés dans la littérature, nous proposons que, pendant les premiers jours de la carence, IsiA protège les cellules en agissant comme un complexe de récolte de la lumière (un LHC) du PSI qui augmente la taille de l'antenne du PSI (Andrizhiyevskaya *et al.* 2002; Melkozernov *et al.* 2003). De cette manière, une activité plus importante du PSI est maintenue, aussi bien que l'équilibre entre les activités du PSI et du PSII, diminuant ainsi la pression d'excitation du PSII et le stress oxydant qui pourrait en résulter. Pendant une carence en fer prolongée, les complexes vides d'IsiA pourraient recevoir de l'énergie provenant des phycobilisomes et la convertir en chaleur, ainsi l'énergie arrivant aux centres réactionnels du PSII et aux thylacoïdes serait diminuée. Les agrégats d'IsiA isolés, qui s'accumulent sous une carence en fer chronique, ont une durée de vie de fluorescence très faible, ce qui indique qu'ils sont de bons dissipateurs d'énergie (Ihalainen *et al.* 2005).

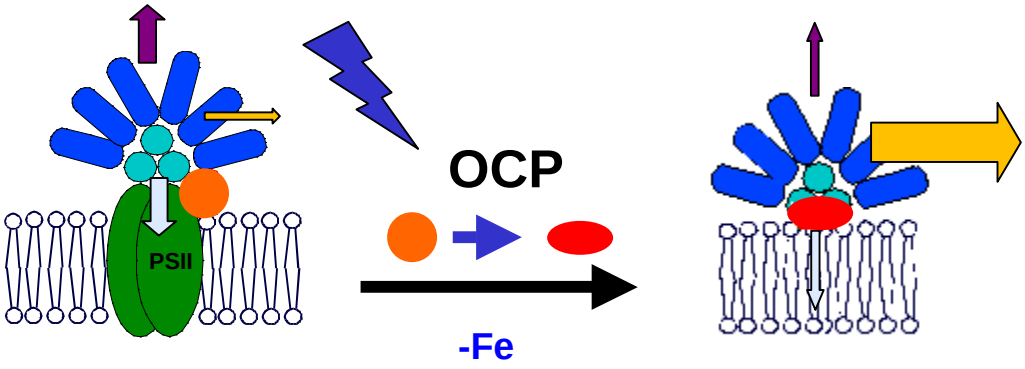
1.2 Les transitions d'état sont inhibées par la carence en fer

Nos résultats dans les chapitres I et II indiquent que la présence ou l'absence de l'OCP ou d'IsiA n'affectent pas les transitions d'état chez les cyanobactéries. Dans les cellules cultivées en conditions normales, toutes les souches testées étaient à l'état 2 à l'obscurité ou sous lumière orange et à l'état 1 sous lumière bleue. L'illumination des cellules carencées en

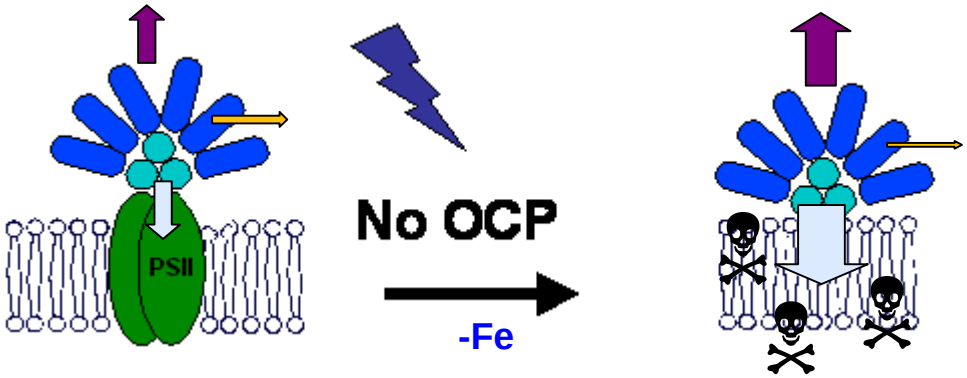
fer par une lumière bleue-verte n'induit pas d'augmentation de la fluorescence comme Ivanov *et al*. l'avait déjà observé (Ivanov *et al.* 2006). De plus, le fait d'illuminer des cellules adaptées à la lumière bleue avec de la lumière orange n'induit aucun changement de fluorescence indiquant que les transitions d'état sont inhibées par la carence en fer.

1.3 Les cyanobactéries ne contenant pas l'OCP sont plus sensibles à la photoinhibition

Wilson *et al.* (2006) ont montré que la sensibilité à la lumière est augmentée dans un mutant sans l'OCP de *Synechocystis* qui ne peut pas induire qE_{cya}. L'activité de production d'oxygène diminue plus rapidement dans le mutant que dans le sauvage quand ils sont exposés à une forte lumière (Wilson *et al.* 2006). De plus, le mutant perd 30% de sa fluorescence variable initiale (Fv), alors que le sauvage n'en perd que 15% après 2 minutes de forte illumination quand elle a été mesurée après relaxation de la photo-protection (Wilson *et al.* 2006) (tableau 6). Les résultats décrits dans cette thèse suggèrent fortement que les souches contenant l'OCP et qui utilisent le mécanisme qE_{cya} sont plus résistantes à des épisodes de forte illumination que les souches ne contenant pas l'OCP. Il est délicat de comparer la sensibilité à la lumière de souches qui ont un ratio PSII/PSI et un contenu en phycobiliprotéines différents. Le taux de photoinhibition dépend de la quantité l'énergie qui arrive au PSII et de l'équilibre entre les activités du PSII et du PSI : une plus grosse antenne et/ou un pool de plastoquinones plus réduit induisent une photoinhibition plus importante à la même intensité lumineuse (Prasil *et al.* 1992; Aro *et al.* 1993; Vass et Aro 2007). Cependant, indépendamment de ces ratios physiologiques, nos résultats (décrits dans le chapitre II) suggèrent une relation entre la résistance à une forte lumière et la capacité à utiliser le mécanisme qE_{cya} induit par la lumière bleue-verte. Nous remarquons que *S. elongatus* et *T. elongatus*, qui ne peuvent pas induire le mécanisme qE_{cya}, ont des ratios PSII/PSI et PBS/chl différents, mais qu'elles sont toutes les deux plus sensibles à la lumière. D'un autre côté, bien que les cellules de *A. maxima* carencées en fer depuis 15 jours aient des ratios PSII/PSI et phycobiliprotéines/chlorophylles plus élevés que celui des cellules non-carencées, elles sont plus résistantes aux fortes intensités lumineuses et présentent un mécanisme qE_{cya} plus important.



Cyanobactéries où l'OCP est présente



Cyanobactéries où l'OCP n'est pas présente

Figure D.1 : Modèle schématique du comportement des phycobilisomes déconnectés fonctionnellement sous carence en fer quand l'OCP est absente ou présente

Les cyanobactéries qui ne contiennent pas l'OCP et le mécanisme qE_{cya} qui lui est associé, dégradent rapidement leur contenu en phycobiliprotéines pour prévenir l'apparition de phycobilisomes déconnectés dangereux.

☠ = stress oxydant au niveau de la membrane
PSII = photosystème II
OCP = Orange Carotenoid Protein
-Fe = carence en fer
Flèche violette, jaune et bleue claire = énergie ré-emise sous forme de fluorescence, énergie dissipée sous forme de chaleur et énergie transmisse aux photosystèmes (quand les phycobilisomes y sont connectés), respectivement.

2. Reflexions sur le fonctionnement des mécanismes de photo-protection impliquant l'OCP et IsiA en rapport avec l'apparition des phycobilisomes déconnectés fonctionnellement chez les cyanobactéries

2.1 Les cyanobactéries qui ne contiennent pas l'OCP ni le mécanisme qE_{cya} qui lui est associé, dégradent rapidement leur contenu en phycobiliprotéines pour prévenir l'apparition de phycobilisomes déconnectés dangereux

Le déclin de fluorescence induit par la lumière bleue-verte est observé chez les cyanobactéries contenant l'OCP cultivées en conditions normales (El Bissati *et al*. 2000 ; Wilson *et al*. 2006, chapitre II), mais il est encore plus marqué dans les cellules carencées en fer (Cadoret *et al*. 2004 ; chapitres I et II). De plus, pendant la carence en fer, le déclin de fluorescence est plus rapide dans les cellules du mutant ΔIsiA que dans celles du sauvage chez *Synechocystis* (chapitre I). Dans les cellules carencées en fer de *A. maxima*, du sauvage et du mutant ΔIsiA de *Synechocystis*, une augmentation de la population des phycobilisomes fonctionnellement déconnectés et hautement fluorescents est constatée. Une augmentation du pic à 685nm dans les spectres d'émission de fluorescence à 77°K et une augmentation du pic à 660nm dans les spectres de fluorescence à température ambiante et de Fo sont observées. Dans les cellules du sauvage de *Synechocystis*, le nombre de phycobilisomes déconnectés augmente plus lentement que dans les cellules du mutant ΔIsiA. Ainsi, nos résultats révèlent clairement la relation entre la baisse de fluorescence et le nombre de phycobilisomes déconnectés. Les cellules contenant un grand nombre de ces phycobilisomes déconnectés montrent un niveau plus élevé de dissipation de l'énergie sous forme de chaleur (qE_{cya}), ainsi, elles se protègent (grâce à l'OCP) en diminuant la quantité d'énergie qui atteint leurs photosystèmes et thylacoïdes.

Au contraire, dans les cellules ne contenant pas l'OCP (*S. elongatus*, *T. elongatus* (chapitre II)), l'apparition de phycobilisomes déconnectés est évitée grâce à la diminution rapide du contenu en phycobiliprotéines. Le ratio de l'absorbance phycobiliprotéines/chlorophylles diminue pendant la carence en fer chez ces souches, alors qu'il reste constant dans les cellules carencées en fer de *Synechocystis* et *A. maxima*. Ces résultats supportent l'hypothèse que ces phycobilisomes fonctionnellement déconnectés sont « dangereux » pour les cellules car ils pourraient transférer un excès d'énergie aux thylacoïdes. Ceci pourrait induire des dommages oxydants (par exemple : la péroxydation des lipides) quand l'énergie absorbée ne peut pas être dissipée sous forme de chaleur au niveau des phycobilisomes ou des complexes d'IsiA (chapitre I, Havaux *et al*. 2005). Ainsi, quand les cyanobactéries sont incapables de réduire la quantité d'énergie provenant des phycobilisomes qui arrive aux thylacoïdes (grâce à l'OCP), elles se protègent en diminuant le ratio PBS/PS (figure D.1).

2.2 IsiA pourrait participer à la dissipation de l'excès d'énergie provenant des phycobilisomes déconnectés fonctionnellement

L'augmentation du nombre de phycobilisomes déconnectés et la diminution de Fv sont plus lentes dans les cellules du mutant ΔOCP carencées en fer que dans celles du sauvage de *Synechocystis*. Ceci apparaît être la conséquence d'une plus grande concentration d'IsiA. L'augmentation d'IsiA pourrait être expliquée par le fait que les cellules du mutant ΔOCP, étant plus sensibles à la lumière, sont soumises à un stress oxydant permanent plus important que les cellules du sauvage. Il a déjà été démontré que le stress oxydant induit l'accumulation de transcrits d'IsiA (Jeanjean *et al.* 2003; Yousef *et al.* 2003). Singh *et al*. (Singh *et al.* 2005) ont montré que les cellules du mutant ΔIsiA sont un peu plus résistantes en présence de H_2O_2 que les cellules du sauvage. Ils ont proposé que cette résistance plus importante était associée à une induction plus forte d'un groupe des gènes incluant une péroxyrédoxine impliquée dans la détoxification des péroxydes. Ainsi, sous différentes conditions de stress, les cellules ΔOCP peuvent synthétiser d'autres protéines que la protéine IsiA (par exemple : des HLIPs, des catalases, des péroxydases) pour essayer de compenser le manque de protection apporté par le mécanisme qE_{cya}. Ceci pourrait expliquer pourquoi les cellules du mutant ΔOCP sont un peu plus résistantes à la carence en fer que les cellules du sauvage dans le chapitre I.

En comparant les effets de la carence en fer dans les cellules du mutant ΔIsiA et dans les cellules du sauvage, nous concluons que le mécanisme associé à IsiA apporte une protection plus efficace aux cellules sous carence en fer. Notre équipe a déjà démontré que le mécanisme qE_{cya} est induit uniquement par une forte intensité de lumière bleue ou de lumière blanche (Wilson *et al.* 2006). Ainsi, même si la capacité d'induction du mécanisme qE_{cya} est augmentée sous carence en fer, elle ne protège pas les cellules contre le stress de la carence. Cependant, dans les cellules carencées en fer qui sont plus sensibles à la photoinhibition, la synthèse de l'OCP et la capacité de quenching associée, apportent une plus grande capacité de photo-protection contre les fortes intensités lumineuses.

Nous observons que la concentration de phycobilisomes hautement fluorescents est inversement proportionnelle à la concentration de complexes IsiA vides. Ceci suggère que les phycobilisomes transfèrent l'énergie absorbée aux complexes d'IsiA. Les spectres d'émission de fluorescence et d'excitation des cellules du sauvage sont en accord avec cette suggestion. Le pic à 685nm observé dans les spectres d'émission de fluorescence à 77°K, quand on excite à 600nm, est largement associé à l'émission d'IsiA. Ceci indique un transfert d'énergie des phycobilisomes vers IsiA. Park *et al*. (1999) et Sandström *et al*. (2001) ont déjà rapporté que la taille des antennes du PSII est inversement proportionnelle à la concentration d'IsiA : plus IsiA est présente, plus l'antenne est petite. Ainsi, les complexes d'IsiA induit par la carence en fer pourraient protéger le PSII en induisant la diminution de la taille efficace

de l'antenne car il serait en compétition avec les phycobilisomes pour la récolte de l'énergie. Une fonction similaire, de participation à la dissipation de l'excès d'énergie, a été proposé pour les HLIPs qui sont des protéines spécifiquement induites par une forte illumination chez les cyanobactéries (Adamska 1997).

Nous avons déjà suggéré (plus haut) que l'énergie absorbée par les phycobilisomes qui n'est pas utilisée pour la photochimie pourrait aussi être responsable des dommages dûs au stress oxydant (par exemple la péroxydation des lipides) (figure D.1). Par exemple, Havaux *et al*. (2005) ont déjà démontré qu'il y a plus de péroxydation des lipides et qu'une concentration plus importante d'espèces oxygénées réactives (ROS) est produite dans les cellules du mutants ΔIsiA par rapport à celles du sauvage. Ceci peut être causé par une plus grande production de radicaux oxygénés dans l'antenne chlorophyllienne mais aussi par la production de radicaux centrés sur un carbone dans d'autres protéines de la membrane qui peuvent réagir avec l'oxygène et former des radicaux peroxyl. Le stress décrit précédemment étant très dangereux pour les cyanobactéries, nous suggérons que celles-ci ont développé plusieurs moyens, en fonction des conditions environnementales, pour le limiter. L'OCP (production constitutive), IsiA (production sous carence en fer) et les HLIPs (production sous forte illumination) participeraient à la dissipation de l'excès d'énergie provenant des phycobilisomes déconnectés. Le rôle de l'OCP semble être d'autant plus important que les quelques cyanobactéries, qui ne la produisent pas, semblent avoir développé un mécanisme rapide de dégradation des phycobilisomes en conditions de stress (au moins sous carence en fer).

Jusqu'ici la plupart des études sur IsiA a été réalisée soit chez *Synechococcus* PCC7942 (Park *et al.* 1999; Boekema *et al.* 2001; Sandström *et al.* 2001; Yousef *et al.* 2003; Ivanov *et al.* 2006) soit chez *Synechocystis* (Bibby *et al.* 2001; Jeanjean *et al.* 2003; Melkozernov *et al.* 2003; Havaux *et al.* 2005; Ihalainen *et al.* 2005; Singh *et al.* 2005). Pour avoir plus d'informations concernant l'implication d'IsiA dans le quenching de l'énergie provenant des phycobilisomes déconnectés ou sur d'éventuels échanges entre l'OCP et IsiA, il serait pertinent de comparer la capacité de dissipation d'énergie d'IsiA et les transferts d'énergie dans la souche qui ne contient pas l'OCP (*Synechococcus elongatus* PCC7942) et dans la souche qui contient l'OCP (*Synechocystis*).

3. Répartition du gène de l'OCP et évolution des cyanobactéries

La classification des cyanobactéries est encore en cours d'étude. Par exemple, la conservation des protéines Pcb/IsiA/CP43 est étudiée pour comprendre l'évolution des

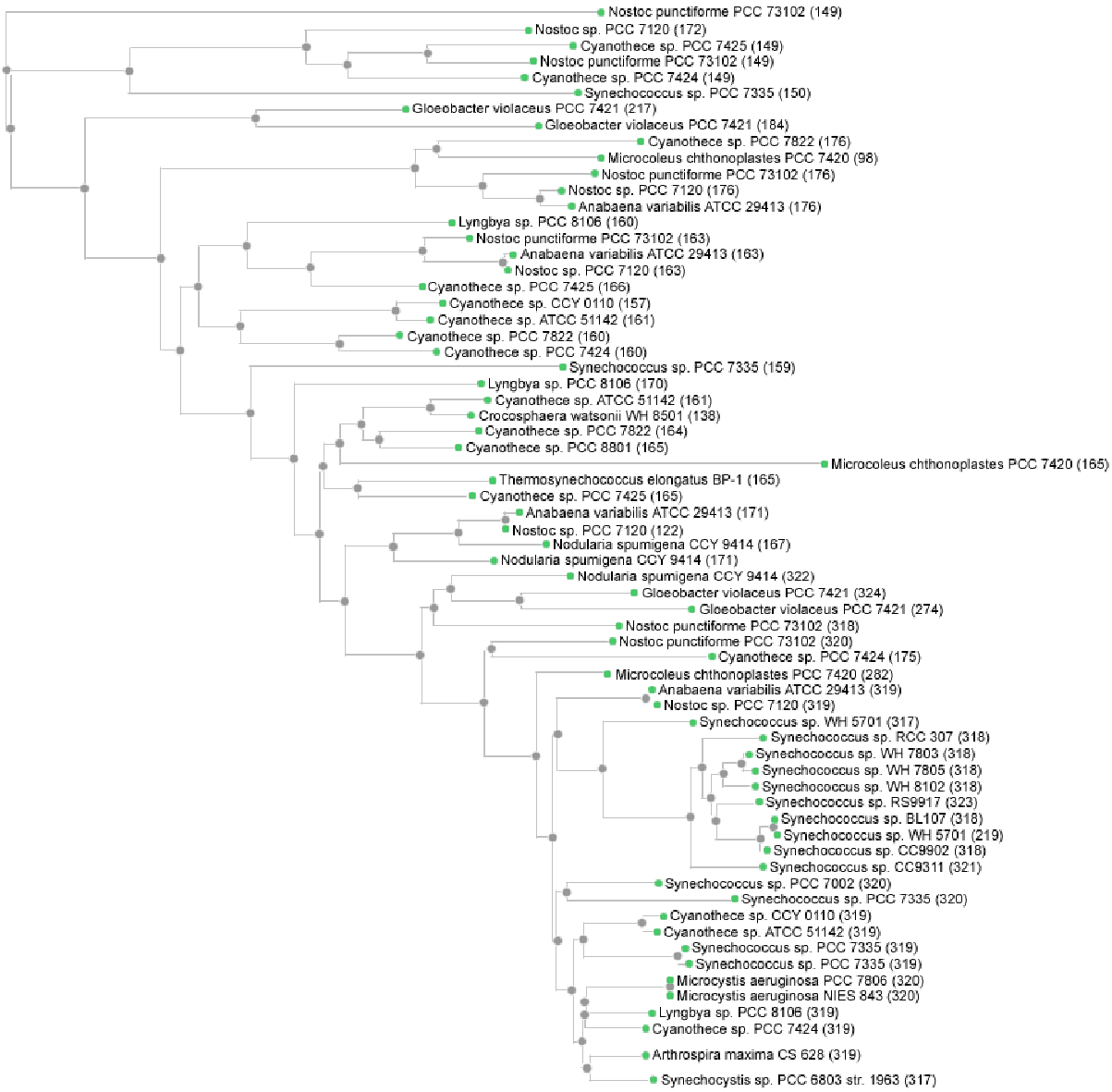


Figure D.2 : Arbre phylogénique des paralogues de l'OCP (entière) et de l'OCP N-terminale d'après Kerfeld 2009

La méthode utilisée pour générer l'arbre est celle du Neighbor Joining. La longueur des branches est approximativement proportionnelle à la distance entre les gènes. La figure a été adaptée à partir de IMG ("Integrated Microbial Genomes"), http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi. Les numéros entre parenthèses après les noms des cyanobactéries correspondent au nombre d'acides aminés dans les protéines paralogues de l'OCP. Cet arbre phylogénique réalisé en 2009 est une communication personnelle de C. Kerfeld.

antennes chez les cyanobactéries à phycobilisomes et les prochlorophytes (Chen et Bibby 2005b; Murray *et al.* 2006). L'arbre phylogénique des cyanobactéries d'après l'identité de leurs gènes qui codent pour l'OCP (figure D.2) nous indique que le gène de l'OCP est très conservé. L'étude de la répartition et de la conservation de ce gène associé au mécanisme qE_{cya} pourrait aider à classer et comprendre l'évolution des cyanobactéries. En effet, nous avons démontré que l'OCP est essentielle pour le mécanisme qE_{cya} induit par la lumière bleue-verte chez *Synechocystis* (Wilson *et al*. 2006 ; chapitre I), et nous avons étendu ces observations chez d'autres cyanobactéries. Beaucoup de cyanobactéries contiennent un homologue du gène *slr*1963, ces cyanobactéries sont issues d'habitats divers et sont réparties dans un vaste arbre phylogénique (figures I.3 et I.4). Ceci suggère que le gène *slr*1963, codant pour l'OCP, joue un rôle important dans la physiologie de ces micro-organismes.

Dans le chapitre II, nous avons étudié 7 souches cyanobactériennes contenant un gène homologue à l'OCP entier. Ces 7 souches sont capables de réaliser le mécanisme qE_{cya} induit par la lumière bleue-verte. De plus, des souches ne contenant pas d'homologue entier du gène de l'OCP ont été testées et le mécanisme qE_{cya} s'est avéré inexistant dans ces souches. Ces résultats suggèrent fortement que le mécanisme qE_{cya} induit par la lumière bleue-verte est corrélé à la présence du gène de l'OCP.

Un certain nombre de génomes cyanobactériens, surtout chez les cyanobactéries fixatrices d'azote, contient des fragments codant soit pour une partie N-terminale homologue, soit pour une partie C-terminale homologue au gène de l'OCP. Chez *Nostoc punctif*orme plusieurs paralogues N-terminaux sont exprimés (Anderson *et al.* 2006). Chez *Cyanothece* 51142, une étude du génome entier par micropuces a été utilisée pour détecter les variations de transcrits produits à la lumière et à l'obscurité. Dans cette étude, il est apparu qu'un des fragments N-terminaux et le fragment C-terminal avaient le même cycle de transcription que l'OCP entier pendant la phase lumineuse (Stockel *et al.* 2008). L'expression ou la transcription de ces fragments n'a pas encore été rapportée chez les autres cyanobactéries. Chez *T. elongatus*, nos résultats montrent que, même dans le cas où ils seraient traduits, leur présence ne permet pas l'induction de qE_{cya}. La fonction des produits des homologues N- et C-terminaux du gène de l'OCP reste à déterminer (s'ils en ont une). Il est aussi possible que ces fragments dispersés, plus ou moins bien conservés, soit le résultat de duplications successives et d'évènements de recombinaison, qui bien que traduits, n'ont pas de fonction précise dans la cellule. Pour étudier cette hypothèse, il faudrait construire des mutants de *T. elongatus* avec un gène entier de l'OCP reconstituée à partir de ces deux fragments et/ou remplacé par celui de *Synechocystis*. Il serait intéressant de tagger cette OCP reconstituée, de la purifier et de vérifier si elle accroche les mêmes caroténoïdes que l'OCP de la souche sauvage de *Synechocystis*. Il faudrait aussi mettre le gène *slr*1964 qui suit celui de l'OCP chez *Synechocystis*, car la protéine qui en résulte semble aussi être impliquée dans le mécanisme (chapitres IV et V). Ces expériences seraient une confirmation du fait que seulement l'OCP et

la protéine produite par le gène en aval de celui de l'OCP (voir chapitre IV) sont responsables du mécanisme qE_{cya} chez les cyanobactéries. Une autre approche pertinente serait de purifier l'ARN messager et de faire des expériences de RT-PCR pour voir si les gènes codant pour une OCP modifiée de ces mutants est transcrit.

Une question reste en suspend en ce qui concerne les souches cyanobactériennes qui ne contiennent pas l'OCP et son mécanisme de photo-protection associé. Leur absence chez les bactéries thermophiles, comme *T. elongatus*, *Synechococcus* sp. A et *Synechococcus* sp. B', pourrait être expliquée par leur niche écologique particulière (haute température). L'absence de l'OCP entière chez certaines formes *Nostoc* et *Cyanothece*, sa présence dans d'autres, ainsi que la présence de multiples copies homologues aux parties N et C-terminale de l'OCP dans ces cyanobactéries fixatrices d'azote suggèrent un transfert de gène complexe difficile à interpréter avec nos connaissances actuelles sur les rôles de ces différentes parties de l'OCP. Les cas des espèces d'eau douce *S. elongatus* PCC 7942, PCC 6301 et des espèces marines *Synechococcus* CC9605, *Cyanobium* PCC 7001 et *Crocosphaera watsonii* WH8501 sont plus intrigants puisqu'elles partagent leur habitat avec des cyanobactéries qui contiennent l'OCP. *Crocosphaera watsonii* WH8501 est proche de *Synechocystis* d'après les arbres phylogéniques des cyanobactéries (figure I. 3 et I.4) et contient deux fragments similaires à une partie N- et C-terminales du gène de l'OCP à deux endroits de son génome. Il est possible qu'un événement de recombinaison ait eu lieu déplaçant les fragments du gène de l'OCP dans deux parties du génome.

Pour les souches *S. elongatus* PCC 7942 et PCC 6301, elles se situent à la base de l'arbre phylogénique (lors de la divergence eau salée/eau douce) de la figure I.4 avec *Synechococcus* WH5701. Cette souche (*Synechococcus* WH5701) ainsi que *Cyanobium* PCC 7001) sont proposées comme proches d'un ancêtre commun avant la divergence *Prochlorococcus* et *Synechococcus* (Komarek *et al.* 1999; Fuller *et al.* 2003; Rocap *et al.* 2003; Swingley *et al.* 2008). De plus ces souches peuvent supporter les milieux marin et d'eau douce (Waterbury *et al.* 1986; Komarek *et al.* 1999; Fuller *et al.* 2003). *Synechococcus* WH5701 et *Cyanobium* PCC 7001 pourraient alors être des analogues modernes d'un organisme transitionnel vers l'adaptation en eau douce. Le fait que l'OCP soit présente chez *Synechococcus* WH5701 et non chez les souches *T.* et *S. elongatus* n'est pas en accord avec cette proposition à moins que les cyanobactéries marines à phycobilisomes aient acquis le gène de l'OCP par transfert de gène plus tardivement et/ou que les souches *Synechococcus elongatus* (PCC6301 et PCC7942) aient perdu le gène de l'OCP. Le fait que *Cyanobium* PCC 7001 soit l'unique cyanobactérie actuellement séquencée qui possède uniquement un gène homologue à la partie C-terminale du gène de l'OCP est difficile à expliquer. La divergence eau douce/milieu marin et *Synechococcus* / *Prochlorococcus* est un point charnière mais encore flou concernant l'évolution des cyanobactéries et du gène de l'OCP en particulier.

Un autre argument pour expliquer l'absence du gène de l'OCP chez les souches *Synechococcus elongatus* (PCC6301 et PCC7942) est qu'elles sont les seules souches d'eau douce avec un cœur des phycobilisomes qui contient 2 cylindres (les autres en contiennent 3 ou 5) (Sidler 1994). Un mutant contenant seulement les cœurs des phycobilisomes (Thomas *et al.* 2006) est toujours capable de réaliser le mécanisme qE_{cya} indiquant que le site du quenching serait peut-être au niveau du cœur des phycobilisomes (Wilson *et al.* 2006). Si le mécanisme qE_{cya} implique une interaction de l'OCP au niveau du cœur dans une cavité formée par au moins 3 cylindres, ce mécanisme ne pourrait pas avoir lieu chez les souches *Synechococcus elongatus* et l'OCP serait donc inutile. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de rajouter le gène de l'OCP avec ou sans un gène codant pour un L_{CM} (linker core-membrane) permettant la formation d'un cœur à 3 cylindres (Capuano *et al.* 1993) dans *Synechococcus elongatus* (PCC7942 car PCC6301 a perdu sa capacité de transformation). En ce qui concerne l'absence de l'OCP chez *Synechococcus* CC9605, il est difficile d'expliquer l'abscence d'un homologue du gène de l'OCP car la plupart des autres cyanobactéries marines en ont un. Il serait intéressant de vérifier si un mécanisme qE_{cya} est présent chez *Synechococcus* CC9605. Il se pourrait que cette *Synechococcus* marine ait un mécanisme qEcya non associé à l'OCP comme cela semble être le cas chez les *Prochlorococcus* (Bailey *et al.* 2005). Des études plus approfondies sur les acteurs de qE chez ces organismes en terme de proximité par rapport aux mécanismes observés chez les plantes apporteraient des informations.

Chapitre III : Étude des interactions OCP-phycobilisome chez *Synechocystis*

Nous avons montré que chez les cyanobactéries, la présence de l'OCP est essentielle pour induire le mécanisme de photo-protection (qE_{cya}) qui diminue le transfert d'énergie du phycobilisome aux centres réactionnels (Wilson *et al.* 2006 ; chapitres I et II). A l'état inactivé l'OCP est orange ; une forte lumière bleue-verte active l'OCP qui devient rouge. Cette forme rouge activée induit la dissipation de l'excès d'énergie absorbée par les phycobilisomes sous forme de chaleur (Wilson *et al.* 2008a). De plus, notre équipe propose que l'OCP soit le dissipateur de l'énergie. Ainsi une relation entre l'OCP, les phycobilisomes et la membrane est nécessaire au fonctionnement de la protéine.

Nous avons déjà montré que l'OCP est localisée du même côté des thylacoïdes que les phycobilisomes et que la totalité de l'OCP se trouve dans des complexes phycobilisome-membranes (Wilson *et al.* 2006). Pour pouvoir avancer dans les études du mécanisme de photo-protection et comprendre l'interaction entre le phycobilisome et l'OCP, il est très important de pouvoir reproduire *in vitro* le quenching de fluorescence. Pour cette raison, pendant ma thèse j'ai réalisé des expériences préliminaires, dans lesquelles j'ai essayé d'induire le quenching de fluorescence dans des complexes phycobilisome-OCP. Ce chapitre décrit les résultats de ces expériences. Dans cette étude, j'ai utilisé des phycobilisomes de la souche sauvage et d'une souche qui ne synthétise pas de phycocyanine, la souche CK (Thomas *et al.* 2006). Les phycobilisomes de cette souche sont donc seulement formés du cœur d'allophycocyanine. Le mécanisme de photo-protection (qE_{cya}) est toujours observé dans ce mutant CK (Wilson *et al.* 2006), suggérant que l'OCP interagit au niveau du cœur des phycobilisomes.

Ce travail a été publié dans un proceeding à l'issue du 14ème congrès international de la photosynthèse qui a eu lieu à Glasgow en été 2007 (Boulay *et al.* 2008a).

1. L'OCP peut-elle être co-isolée avec des phycobilisomes?

Dans la littérature, il a déjà été démontré qu'il est possible d'isoler des phycobilisomes avec une autre protéine interagissant avec eux, la FNR. Chez *Synechocystis*, la FNR existe sous une forte courte et sous une forme large qui a de fortes interactions avec les hexamères de PC dans les bras des phycobilisomes (Schluchter et Bryant 1992; van Thor *et al.* 1999; Gomez-Lojero *et al.* 2003; Thomas *et al.* 2006). Pour cette raison, en pensant que la relation de l'OCP avec les phycobilisomes pouvait être forte comme celle de la FNR, j'ai essayé d'isoler des phycobilisomes contenant de l'OCP. Pour cet isolement, nous avons utilisé la méthode décrite par le groupe dirigé par E. Gantt (Gantt et Conti 1966b; Gantt *et al.* 1976a;

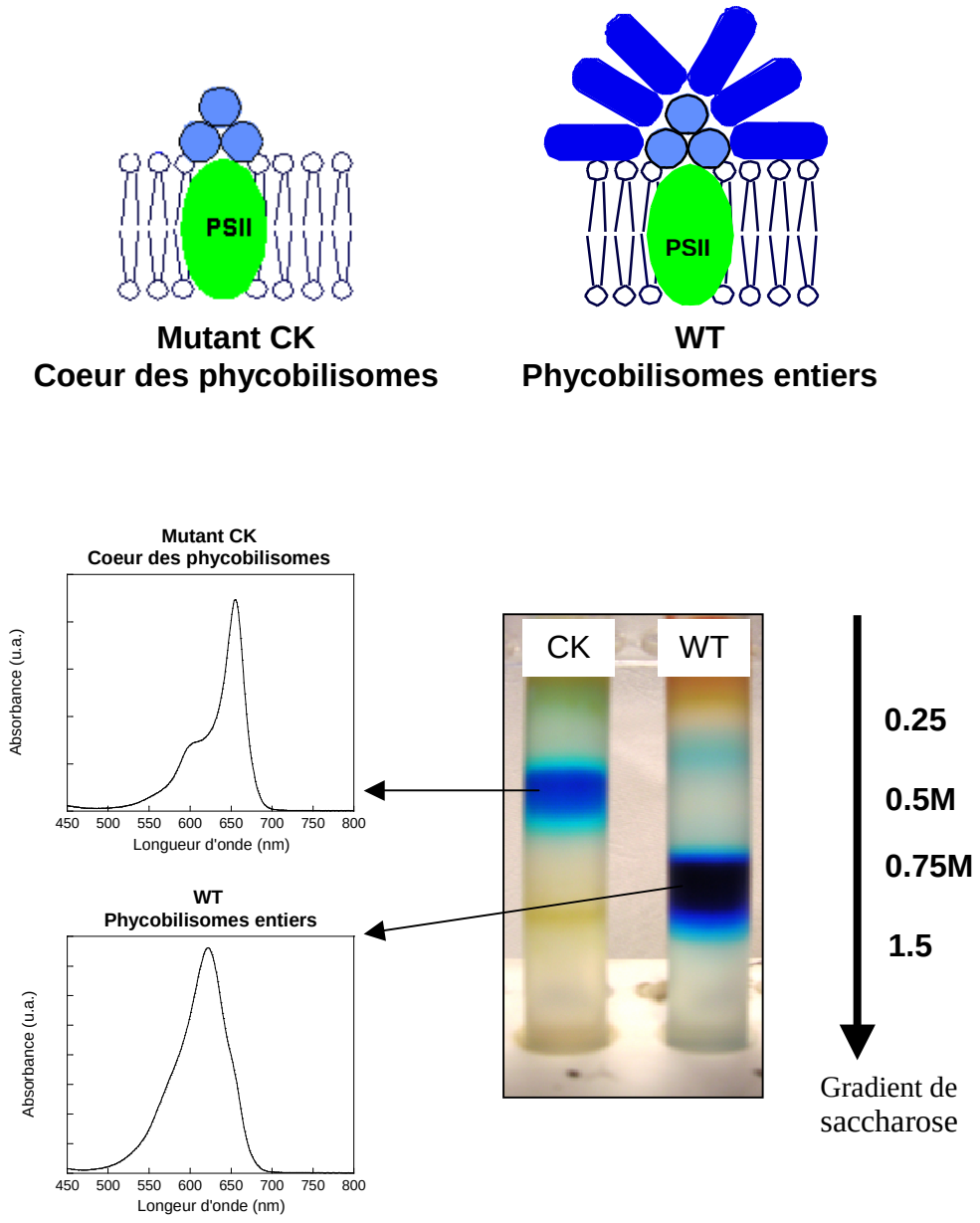


Figure CIII.1 : Purification des phycobilisomes entiers du sauvage et des cœurs de phycobilisomes du mutant CK de *Synechocystis*

En haut, les cœurs de phycobilisomes du mutant CK (à gauche) et les phycobilisomes entiers du sauvage (WT) (à droite) sont représentés sur le PSII.

En bas, la photographie montre les cœurs de phycobilisomes (CK) et les phycobilisomes entiers (WT) dans un gradient de saccharose. Les cellules du sauvage et du mutant CK de *Synechocystis* ont été cassées dans un tampon contenant 2% de Triton-X et ont ensuite été chargées sur un gradient de saccharose non linéaire dont les concentrations sont de 0.25M, 0.5M, 0.75M et 1.5M du haut vers le bas. Les fractions bleues ont été isolées et les flèches indiquent les spectres d'absorbance à température ambiante de ces fractions de phycobilisomes purifiées.

Gantt *et al.* 1976b; Gantt *et al.* 1979). En bref, les cellules de *Synechocystis* ont été cassées (en utilisant une presse de French) en présence d'une forte concentration de phosphate pour maintenir les phycobilisomes intègres. Après que les débris cellulaires ont été écartés, les membranes ont été dissoutes par la présence de Triton-X (1-2%) et le surnageant a été chargé sur un gradient de saccharose. La figure CIII.1 montre le profil des gradients (après ultra-centrifugation) contenant les phycobilisomes isolés de la souche sauvage et de la souche CK. Les phycobilisomes du sauvage se trouvent à l'interface des couches contenant 0.75 et 1.5M de saccharose et ceux du mutant CK dans la couche contenant 0.5M de saccharose.

Le spectre d'absorbance des phycobilisomes du sauvage (APC + PC) a un maximum d'absorbance à 622nm proche du maximum d'absorbance de la phycocyanine (620 nm) due au ratio élevé PC/APC. Le spectre d'absorbance des phycobilisomes du mutant CK (contenant uniquement de l'APC) a un maximum d'absorbance à 650nm avec un épaulement à environ 620nm, caractéristique des trimères d'APC (figure CIII.1) (MacColl 1998; MacColl 2004). Le « pattern » des protéines présentes dans les deux types de phycobilisomes est montré dans la figure CIII.2. Dans les phycobilisomes du sauvage, le linker « Core-Membrane » (L_{CM}) est observé à 90kDa, la Ferredoxine NADH oxidoReductase (FNR) à 47kDa, les linkers L_{RC}^{29}, L_R^{30} et L_R^{33} à respectivement 29, 30 et 33 kDa, et les monomères de phycocyanine (PC) et d'allophycocyanine (APC) entre 15 et 20 kDa. Dans les cœurs de phycobilisomes du mutant CK, le L_{CM} est aussi observé à 90kDa, les trois bandes entre 50 et 65 kDa correspondent à des sous-unités de l'ATP^{ase} et de la rubisco (contaminants), et les monomères d'APC sont observés à 15 et 18 kDa. La FNR est observée uniquement dans le sauvage, cette donnée est en accord avec la littérature. En effet, la FNR est connue pour interagir avec les bras des phycobilisomes (van Thor *et al.* 1999) qui ne sont pas présents dans le mutant CK. Aucune bande correspondant au poids moléculaire de l'OCP (35kDa) n'a été observée. Nous avons augmenté la sensibilité de détection en utilisant des anticorps polyclonaux contre l'OCP mais aucune trace de l'OCP n'a été détectée par western blot. L'expérience a été répétée en utilisant 10 fois la concentration des phycobilisomes mais les résultats étaient similaires (données non montrées). Notre équipe avait déjà montré que l'OCP a des interactions très fortes avec la membrane ; ces interactions sont apparemment plus fortes qu'avec les phycobilisomes (Wilson *et al.* 2006). Le traitement avec du Triton, qui dissout les membranes, détache vraisemblablement l'OCP des phycobilisomes.

2. Incubations et reconstitutions des phycobilisomes en présence de l'OCP

Après avoir vérifié que l'OCP ne co-purifie pas avec les phycobilisomes (traité avec 1-2% de triton) et afin de restaurer l'interaction entre l'OCP et le phycobilisome, j'ai réalisé des

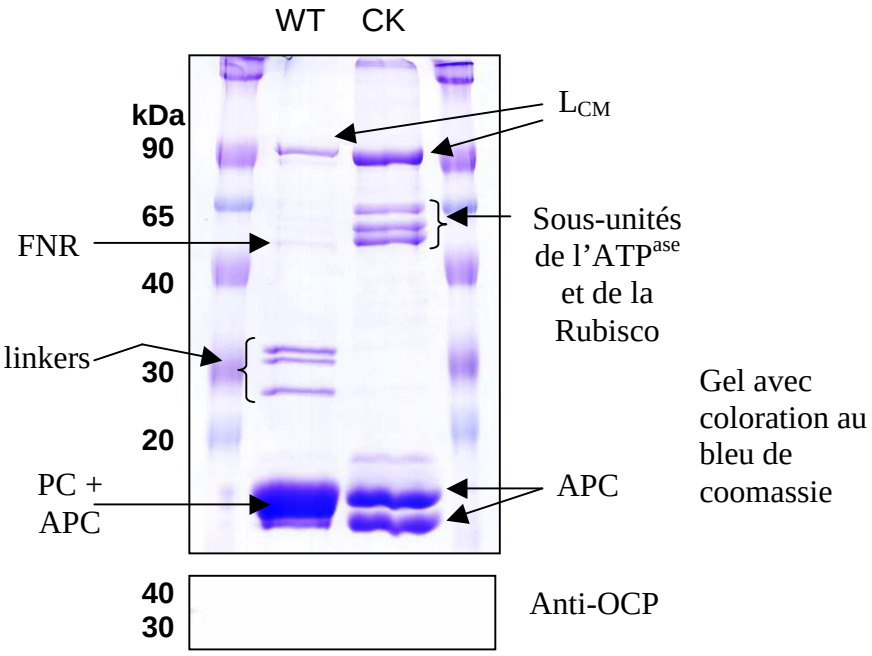
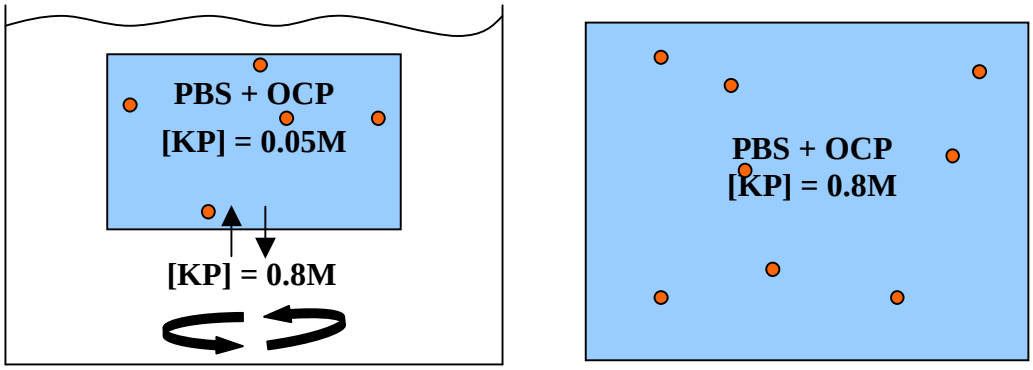


Figure CIII.2 : Recherche de l'OCP par western blot dans les phycobilisomes purifiés
En haut, des fractions concentrées en cœurs de phycobilisomes du mutant CK (CK) et en phycobilisomes entiers du sauvage (WT) de *Synechocytsis* (purifiées comme le décrit la figure CIII.I) ont été chargées sur un gel SDS-PAGE et colorées au bleu de coommassie. Chaque puits contient environ 20µg de protéines qui ont été précipités avec 10% de TCA puis resuspendus dans un tampon Tris-HCl 100mM pH=8 avant d'être chargés sur le gel contenant 12% d'acrylamide.
En bas, recherche de l'OCP par western blot dans ces fractions concentrées en phycobilisomes.Dans les phycobilisomes du sauvage, le linker « Core-Membrane » (L_{CM}) est observé à 90kDa, la Ferredoxine NADH oxidoReductase (FNR) à 47kDa, les linkers L_{RC}^{29}, L_R^{30} et L_R^{33} à respectivement 29, 30 et 33 kDa, et les monomères de phycocyanine (PC) et d'allophycocyanine (APC) entre 15 et 20 kDa. Dans les cœurs de phycobilisomes du mutant CK, le L_{CM} est aussi observé à 90kDa, les trois bandes entre 50 et 65 kDa correspondent à des sous-unités de l'ATP^{ase} et de la rubisco (contaminants), et les monomères d'APC sont observés à 15 et 18 kDa.



Reconstitution par dialyse

Incubation

Figure CIII.3 : Schéma des expériences de reconstitution et d'incubation des phycobilisomes

Les expériences de reconstitution (à gauche) et d'incubation (à droite) sont schématisées. La reconstitution des phycobilisomes en présence de l'OCP dans un tampon phosphate 0.05M a été faite lors d'une dialyse de 2h contre un tampon phosphate 0.8M. Les phycobilisomes et l'OCP ont été mélangés pendant 2h dans un tampon phosphate 0.8M lors des expériences d'incubation.

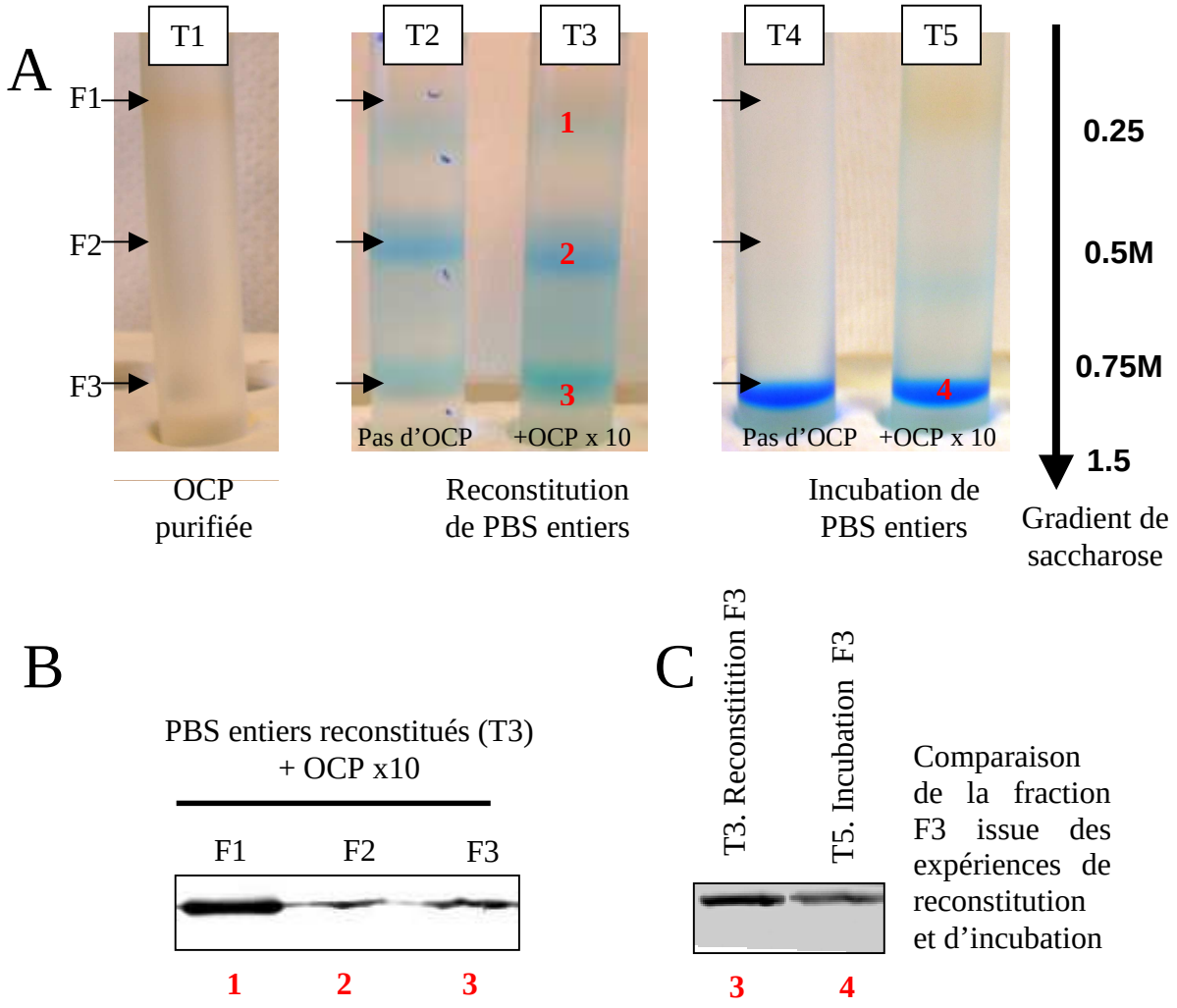


Figure CIII.4 : Expériences de reconstitution et d'incubation de phycobilisomes entiers issus du sauvage de *Synechocystis* en présence de l'OCP

En **A**, la photographie montre des gradients de saccharose après y avoir chargé et ultracentrifugé les phycobilisomes reconstitués et incubés. Le gradient de saccharose est non linéaire, les concentrations sont 0.25M, 0.5M, 0.75M et 1.5M du haut vers le bas. Le tube T1 (contrôle OCP seul) contient 2nmol de l'OCP purifiée. Les tubes T2 et T3 contiennent les expériences de reconstitution, le tube T2 (contrôle : PBS reconstitués seuls) contient 0.2nmol de PBS ; le tube T3 contient 10 OCP (2nmol) pour 1 phycobilisome (0.2nmol). Les tubes T4 et T5 contiennent les expériences d'incubation, le tube T4 (contrôle : PSB incubés seuls) contient 0.2nmol de PBS ; le tube T5 contient 10 OCP (2nmol) pour 1 phycobilisome (0.2nmol). 3 fractions ont été extraites de ces tubes, ces fractions F1, F2 et F3 sont indiquées par des flèches.

B montre la détection par western blot de l'OCP dans les fractions du tube T3 et **C** montre la détection de l'OCP des fractions F3 issues des expériences de reconstitution (T3) et d'incubation (T5). La même quantité de protéines a été chargée par puits, les échantillons ont été concentrés par précipitation avec du TCA à 10% puis chargés sur un gel. Pour une meilleure lisibilité de la figure, un numéro rouge pour chaque fraction testée par western blot est reporté au niveau de leur localisation dans les tubes en **A**.

Les données montrées sont des expériences réprésentatives des 4 expériences de reconstitution et des 3 expériences d'incubation réalisées en tout.

expériences d'incubation des phycobilisomes avec l'OCP dans un tampon phosphate 0.8M (Gantt *et al.* 1979). En parallèle, j'ai réalisé des expériences de reconstitution des phycobilisomes en présence de l'OCP. L'idée était que, peut-être, dans les expériences d'incubations, l'OCP ne peut pas atteindre son lieu d'interaction car les phycobilisomes sont déjà associés lors de leur mise en présence avec l'OCP. Dans les expériences de reconstitution, les phycobilisomes isolés ont été dissociés et reconstitués en présence de l'OCP isolée. Pour la dissociation, les phycobilisomes ont été incubés à 4°C dans un tampon contenant une faible concentration en phosphate (0.05M) (Gantt *et al.* 1979). Ensuite, j'ai reconstitué les phycobilisomes dissociés en présence de l'OCP en les dialysant contre un tampon phosphate 0.8M (figure CIII.3) (Gantt *et al.* 1979). La quantité de l'OCP (2nmoles) était environ 10 fois supérieure à celle des phycobilisomes (0.2nmole) dans les expériences d'incubation et de reconstitution (voir les matériels et méthodes).

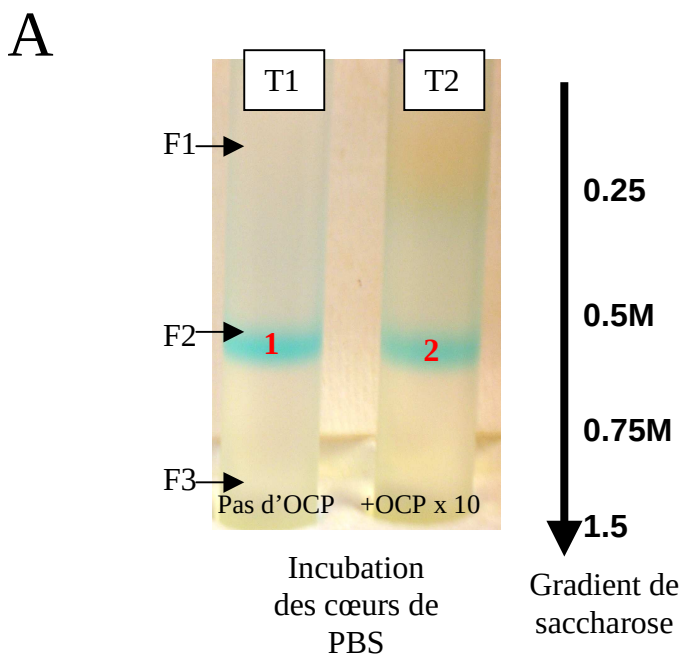
Les phycobilisomes issus de la souche sauvage reconstitués ou incubés en présence de l'OCP ont ensuite été re-purifiés dans un gradient de saccharose (figures CIII.4A et CIII.5A). L'OCP seule migre dans la fraction F1 à 0.25M de saccharose (figure CIII.4A). Les phycobilisomes entiers migrent à l'interphase 0.75-1.5M saccharose (F3) et dans les expériences de reconstitution la fraction F2 à 0.5M de saccharose contient des cœurs et des bras de phycobilisomes (figure CIII.4A). Les analyses par western blot (figures CIII.4C) révèlent la présence de l'OCP dans les fractions contenant les phycobilisomes entiers indiquant l'association de l'OCP aux phycobilisomes. Les analyses par western blot (figures CIII.4B) révèlent aussi la présence de l'OCP dans les fractions F2 à 0.5M de saccharose dans les expériences de reconstitution des phycobilisomes. Etant donné que cette fraction contient des coeurs du phycobilisome, la présence de l'OCP n'est pas surprenante.

La figure CIII.5 montre que l'OCP s'attache aussi aux phycobilisomes du mutant CK contenant seulement le cœur. Les cœurs des phycobilisomes migrent dans la fraction F2 à 0.5M de saccharose (figure CIII.5A). L'OCP est détectée par western blot dans cette fraction F2 (figure CIII.5B).

Ces résultats montrent qu'il existe une interaction entre l'OCP et au moins le cœur du phycobilisome mais ne nous indique rien sur la spécificité et la qualité de cette interaction.

3. Le déclin de fluorescence associé au mécanisme de photo-protection (qE_{cya}) peut-il être induit *in vitro* ?

Pour prouver la spécificité de l'attachement de l'OCP aux phycobilisomes, j'ai testé si le déclin de fluorescence pouvait être induit *in vitro* en utilisant les complexes phycobilisome-OCP obtenus et décrits dans la section précédente. La figure CIII.6 montre les spectres d'émission de fluorescence obtenus en utilisant une excitation à 600nm (lumière



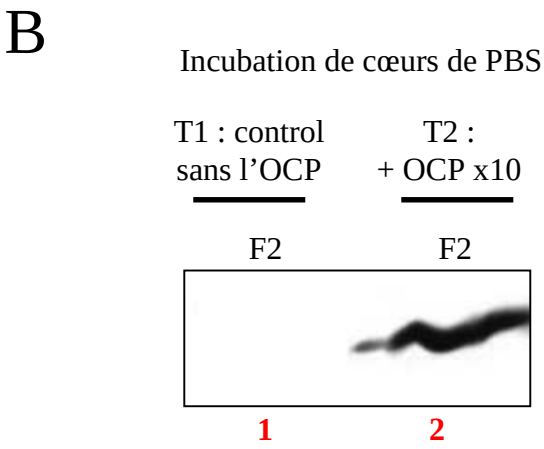


Figure CIII.5 : Expériences de reconstitution et d'incubation de cœurs de phycobilisomes issus du mutant CK de *Synechocystis* en présence de l'OCP

En **A**, la photographie montre des gradients de saccharose après y avoir chargé et ultracentrifugé les cœurs de phycobilisome incubés. Le gradient de saccharose est non linéaire, les concentrations sont 0.25M, 0.5M, 0.75M et 1.5M du haut vers le bas. Le tube T1 (contrôle : cœurs de PBS seuls) contient 0.2nmol de cœur de PBS du mutant CK et le tube T2 contient 10 OCP (2nmol) pour 1 cœur de PBS (0.2nmol). 3 fractions ont été extraites de ces tubes, ces fractions F1, F2 et F3 sont indiquées avec des flèches.

B montre la détection par western blot de l'OCP dans les fractions d'intêret (ici F2) issues des expériences d'incubation. Les fractions ont été concentrées par précipitation avec du TCA à 10% puis chargées sur un gel. Pour une meilleure lisibilité de la figure, un numéro rouge pour chaque fraction testée par western blot est reporté au niveau de leur localisation dans les tubes en **A**.

Les données montrées sont des expériences réprésentatives des 3 expériences de reconstitution et des 4 expériences d'incubation réalisées en tout.

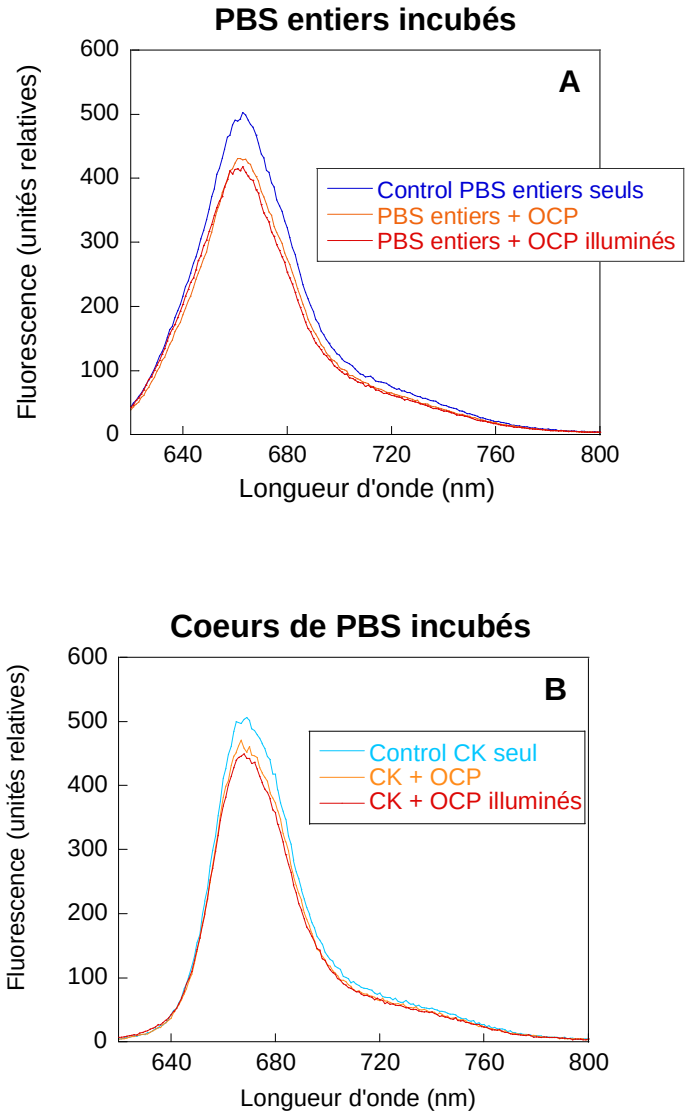


Figure CIII.6 : Spectres d'émission de fluorescence avec une excitation à 600nm des phycobilisomes incubés en présence de l'OCP

Les fractions (F3) issues d'expériences d'incubation (similaires à celles décrites dans les figures CIII. 4 et CIII.5) de phycobilisomes en présence de l'OCP ont été mesurées. Les fractions ont été diluées à DO_{622nm} =0.06 pour les phycobilisomes entiers (**A**) issus du sauvage et à DO_{650nm}=0.06 pour les cœurs de phycobilisomes issus du mutant CK (**B**) de *Synechocystis*. Pour chaque expérience, le spectre d'émission de fluorescence des phycobilisomes seuls (control, trait bleu) est comparé à celui des phycobilisomes en présence de l'OCP adaptés à l'obscurité (trait orange) et à celui-ci des phycobilisomes en présence de l'OCP après une forte illumination de lumière bleue-verte (740 µmol photon.m^{-2}.s^{-1}) (trait rouge). Les mesures ont été réalisées à température ambiante. Chaque spectre est la moyenne de trois réplicats.

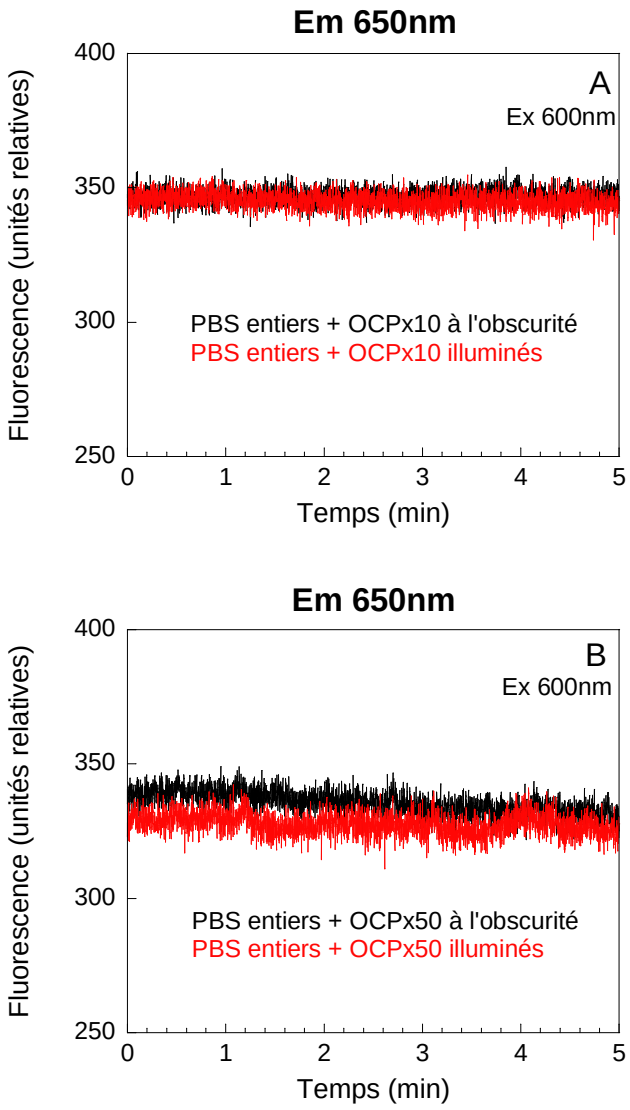


Figure CIII.7 : Cinétique de l'émission de fluorescence avec une excitation à 600nm des phycobilisomes entiers reconstitués en présence de l'OCP

Les fractions (F3) issues d'expériences de reconstitution (similaires à celles décrites dans la figure CIII. 4) ont été mesurées. **A** et **B** montrent les cinétiques de l'émission de fluorescence à 650nm de phycobilisomes entiers reconstitués en présence de10 OCP pour 1 phycobilisome (**A**) et de 50 OCPs pour 1 phycobilisome (**B**) à l'obscurité (trait noir) et pendant un forte illumination de lumière bleue-verte (740 µmol photon.m^{-2}.s^{-1}) (trait rouge). Les fractions ont été diluées à DO_{622nm} =0.06 pour les phycobilisomes entiers issus du sauvage de *Synechocystis*. Les mesures ont été réalisées à 10°C. Chaque spectre est un spectre représentatif des trois réplicats réalisés.

principalement absorbée par les phycobilisomes) avant et après illumination des complexes OCP-PBS issus des expériences d'incubation avec une forte lumière bleu-verte. Les spectres issus des expériences de reconstitution ne sont pas montrés. En mesurant le spectre d'absorbance avant et après illumination, nous avons observé que l'OCP inactive (orange) est photoconvertie en forme OCP active (rouge) qui induit le quenching de fluorescence (données non montrées) (Wilson *et al.* 2008a). Dans nos expériences, la présence de l'OCP a légèrement diminué la fluorescence des phycobilisomes mais la photo-conversion de l'OCP n'a induit aucun quenching de fluorescence supplémentaire (figure CIII.6). De plus, l'OCP ne diminue pas la fluorescence dans les complexes OCP-PBS reconstitués (données non montrées). Des illuminations de lumière blanche et bleue-verte de plusieurs intensités ont été testées, les spectres ont été réalisés à 77°K, à 10°C et à température ambiante. Et plusieurs fractions issues d'expériences d'incubation ou de reconstitution de PBS (entiers et cœurs de PBS) en présence de l'OCP contenant différents ratio OCP/PBS (50/1, 100/1) ont été testées. Les résultats (non montrés) de ces tests n'apportent rien de plus que ceux décrits dans la figure CIII.6.

Pour éviter qu'une reconversion de la forme rouge à la forme orange entre l'illumination et la mesure du spectre nous cache un possible quenching de fluorescence, j'ai suivi les changements de fluorescence à 650 et 660nm en même temps que j'illuminais l'échantillon avec une lumière bleue-verte. Aucune diminution de fluorescence n'a été observée (figure CIII.7). Ce résultat confirme qu'il est impossible d'induire le quenching *in vitro* dans nos conditions expérimentales.

4. La concentration forte en phosphate nécessaire au maintien des phycobilisomes entiers *in vitro* inhibe-t-elle le déclin de fluorescence?

Une des raisons qui peut expliquer l'absence de quenching de fluorescence induit par l'OCP *in vitro* est la forte concentration de phosphate. Il a déjà été montré que celle-ci peut inhiber le mouvement des phycobilisomes dans les cellules, ce qui empêche les transitions d'état (Mullineaux 1993; Joshua et Mullineaux 2004). De plus, aucun groupe de recherche n'a réussi à induire des transitions d'état *in vitro*. Il a aussi été reporté qu'*in vivo* la forte concentration de phosphate inhibe la récupération de fluorescence après une forte illumination (Joshua *et al.* 2005). Cependant d'après Joshua *et al.* (2005), le déclin de fluorescence induit par une forte illumination bleue-verte est toujours observé en présence de 0.5M phosphate dans les cellules de *Synechocystis*.

La figure CIII.8A montre la diminution de fluorescence (qE_{cya}) induite par une forte lumière bleue-verte dans les cellules du sauvage de *Synechocystis* en présence de concentrations en phosphate croissantes. Comme Joshua *et al.* (2005), nous

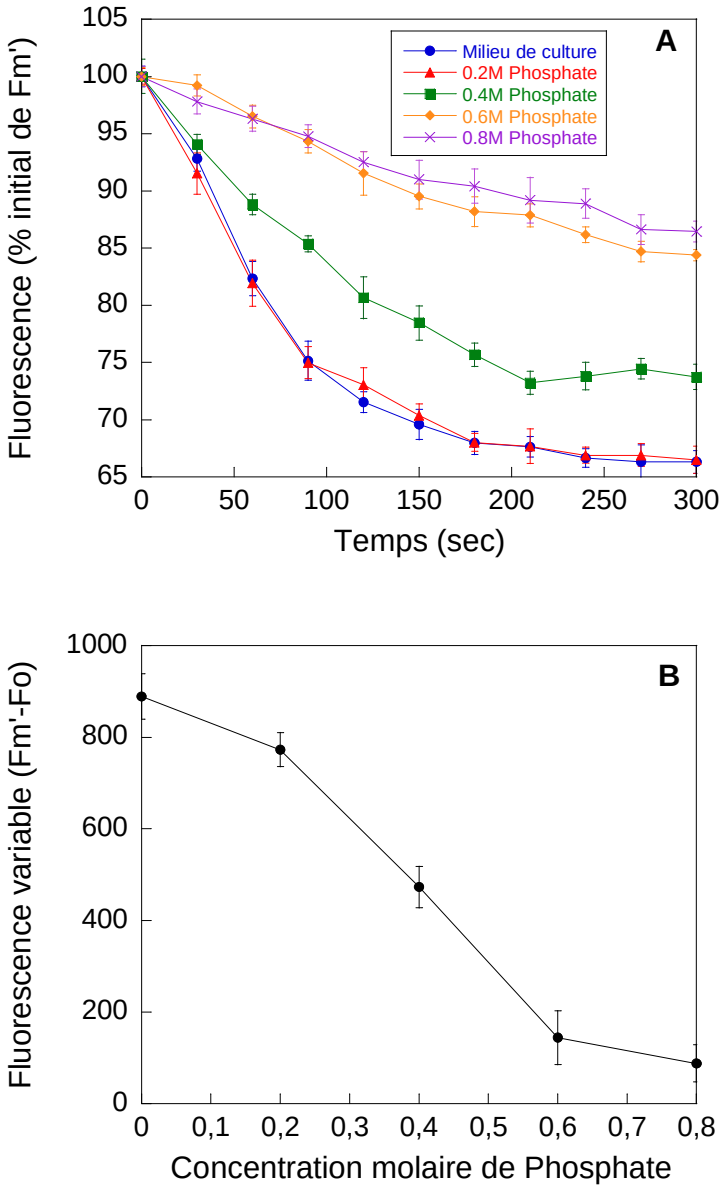


Figure CIII.8 : Effet de concentrations croissantes de phosphate sur l'induction du déclin de fluorescence (qE_{cya}) par une lumière bleue-verte (A) et sur la variable de fluorescence Fv (B) dans les cellules du sauvage de *Synechocystis*

Le graphique **A** montre le pourcentage du rendement de fluorescence (Fm') (mesuré avec un fluorimètre PAM) de cellules de *Synechocystis* dans le milieu de culture (rond bleu), puis dans ce milieu contenant des concentrations croissantes en phosphate : 0.2M (triangle rouge), 0.4M (carré vert), 0.6M (losange orange) et 0.8M (croix violette). Les cellules ont été adaptées à l'obscurité, puis illuminées successivement par une lumière bleue-verte faible (400-550nm, 80 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) (Fm' = 100%) et une lumière bleue-verte forte (740 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}).

Le graphique **B** montre la valeur de la variable de fluorescence Fv (Fm'-Fo) mesurée lors d'un pulse saturant quand les cellules sont adaptées à l'obscurité. Les cellules du sauvage de *Synechocystis* ont été diluées à 3 µgchl.mL^{-1}. Les barres d'erreur montre l'écart type des mesures.

observons toujours un déclin de fluorescence quand les cellules sont en présence de phosphate, cependant celui-ci est fortement diminué quand la concentration en phosphate dépasse 0.6M. Une forte concentration de phosphate inhibe donc partiellement l'intensité du déclin de fluorescence du mécanisme qE_{cya}. La figure CIII.8B montre que la variable de fluorescence Fv diminue quand la concentration de phosphate augmente. Ceci montre que l'activité du PSII est aussi affectée par une grande concentration en phosphate (supérieure à 0.6M). Nos résultats suggèrent que la forte concentration de phosphate nécessaire au maintien des phycobilisomes entiers peut être responsable de l'impossibilité d'induire le quenching de fluorescence *in vitro*. D'autres causes seront évoquées dans la discussion.

Discussion du chapitre III

1. Les conditions expérimentales *in vitro* sont trop éloignées de celles *in vivo* pour permettre l'induction du mécanisme qE_{cya} dans les phycobilisomes isolés en présence de l'OCP

Dans ce chapitre, j'ai montré qu'après incubation (ou reconstitution) des phycobilisomes avec l'OCP, ils co-migrent dans un gradient de saccharose. L'OCP co-migre à la fois avec les cœurs des phycobilisomes et avec les phycobilisomes entiers. Cependant, je n'ai pas réussi à induire le mécanisme qE_{cya} *in vitro* en illuminant des complexes OCP-phycobilisomes avec une forte lumière bleue-verte. Beaucoup d'hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Je pense que globalement nos conditions expérimentales *in vitro* sont trop éloignées de celles *in vivo*. Les cinq points ci-dessous décrivent les conditions qui selon moi participent le plus à l'éloignement des conditions *in vivo*.

(1) Des éléments peuvent manquer au système, par exemple d'autres protéines. Le gène (*slr*1964) situé juste après celui de l'OCP code pour une protéine inconnue qui pourrait être une candidate. L'étude de cette protéine sera développée dans le chapitre IV.

(2) L'interaction entre les phycobilisomes et l'OCP ainsi que les mouvements relatifs entre les complexes ou au sein des protéines peuvent être perturbés par la concentration importante de phosphate. Une forte concentration en phosphate d'environ 0.8M est nécessaire pour maintenir les phycobilisomes associés *in vitro* (Gantt *et al.* 1979) mais semble être nocive pour les cellules *in vivo*. Il a déjà été reporté que les transitions d'état ainsi que le mouvement des phycobilisomes étaient bloquées quand la concentration en phosphate est supérieure à 0.5M (Mullineaux 1993; Joshua et Mullineaux 2004). Joshua *et al.* proposent que l'inhibition des transitions d'état est due à cette immobilisation des phycobilisomes (Joshua et Mullineaux 2004). Ils ont aussi observé que la récupération du déclin de fluorescence associé au mécanisme qE_{cya} était inhibée par une concentration en phosphate supérieure à 0.5M mais pas la formation du quenching de fluorescence (Joshua et Mullineaux 2004). Mes résultats montrent aussi que le mécanisme qE_{cya} est toujours présent dans les cellules de *Synechocystis* en présence d'une forte concentration de phosphate, cependant il est diminué de 70% à 0.8M phosphate. J'observe aussi que l'activité du PSII est diminuée de 90%. Il semble donc que le phosphate à forte concentration soit nocif pour les cellules. *In vivo*, il empêche le mouvement des phycobilisomes, affecte les niveaux de fluorescence des complexes membranaires comme le PSII, inhibe partiellement la formation du quenching de fluorescence et inhibe complètement sa récupération.

(3) Dans les phycobilisomes isolés et plus encore dans ceux reconstitués utilisés dans cette étude, le transfert d'énergie semble être perturbé. En effet, la fluorescence des phycobilisomes isolés incubés et surtout celle des phycobilisomes reconstitués dans les expériences indiquaient que le transfert de l'énergie ne se faisait pas correctement jusqu'aux derniers accepteurs d'énergie des phycobilisomes. Un phycobilisome entier fonctionnel n'émet pas (ou très peu) de fluorescence au niveau des chromophores de la phycocyanine car ceux-ci transfèrent l'énergie efficacement et rapidement à travers les bras jusqu'aux cœurs des phycobilisomes. Les trimères d'allophycocyanine qui constituent les cœurs des phycobilisomes émettent à 660nm (Glazer 1984). Leur émission de fluorescence est faible quand les cœurs sont fonctionnels car ils transfèrent l'énergie efficacement vers les derniers émetteurs du phycobilisome, $\alpha^{APC\text{-}B}$, $\beta^{18.3}$ et L_{CM} qui émettent à 680 nm à température ambiante (Glazer 1984). Il est très difficile d'obtenir des phycobilisomes isolés (surtout chez *Synechocystis*) dans lesquels le transfert d'énergie vers les derniers accepteurs est maintenu. Si l'OCP est le quencher de fluorescence et qu'elle reçoit l'énergie du L_{CM} (par exemple) *in vivo*, l'OCP ne pourra pas dissiper l'énergie *in vitro* parce qu'elle n'arrive pas jusqu'au L_{CM}. Ceci pourrait expliquer pourquoi nous n'observons pas la diminution de fluorescence dans nos expériences *in vitro*.

(4) En solution l'OCP est un dimère (Kerfeld *et al.* 2003). Le fait d'être un dimère ne l'empêche pas de se convertir en sa forme active rouge (Wilson *et al.* 2008a). Nous ne savons pas si *in vivo* l'OCP est un dimère ou un monomère. La forme active rouge pourrait être préférentiellement sous forme de monomère ou de dimère *in vivo*, et il en est de même pour la forme inactive orange. Peut-être que la forme dimérique obtenue en solution n'est pas capable d'interagir avec le cœur du phycobilisome de façon correcte et/ou que le transfert de l'énergie ne se produit pas.

Cependant, une fluorescence plus basse des phycobilisomes incubés en présence de l'OCP est observée par rapport aux mélanges contrôles sans l'OCP. Cette observation a été faite à la fois avec les cœurs de phycobilisomes et avec les phycobilisomes entiers incubés en présence de l'OCP (figure CIII.6). Il semble donc que la forme orange, la forme inactive de l'OCP, permet au système de dissiper une petite partie de l'énergie provenant des phycobilisomes sous forme de chaleur. La mise en présence de l'OCP avec les phycobilisomes dans nos expériences permet donc le quenching d'une petite partie de l'énergie. Ce résultat est en accord avec des mesures du Dr. Polivka (communication personnelle) d'après lesquelles le caroténoïde de la forme orange de l'OCP, bien que moins efficacement que la forme rouge, serait aussi capable de dissiper de l'énergie.

(5) La présence des membranes est peut-être nécessaire pour la bonne interaction entre l'OCP et les phycobilisomes. Cette proposition est envisageable mais une forte illumination de complexes membranes-phycobilisomes (MP) purifiés n'induit pas de quenching de fluorescence (communication personnelle du Dr. D. Kirilovsky). Il apparaît donc que nous

n'arrivons pas à induire le quenching de fluorescence même sur des MP purifiés, cette donnée est en accord avec le point (2) développé plus haut d'après lequel le phosphate inhiberait le mécanisme qE_{cya}. En effet, une grande concentration de phosphate (0.8M) est nécessaire pour purifier les complexes membranes-phycobilisomes.

2. Perspectives concernant l'étude des interactions entre l'OCP et les phycobilisomes

Les études préliminaires sur les interactions des phycobilisomes avec l'OCP décrites dans ce 3ème chapitre ont été réalisées au début de mon doctorat. Le fait que le mécanisme qE_{cya} ne soit pas induit *in vitro* en illuminant un mélange de phycobilisomes et de l'OCP avec une forte lumière m'a conduit à arrêter assez rapidement ces expériences de biochimie sur les interactions OCP/phycobilisomes. Les résultats sur la caractérisation de la protéine Slr1964 impliquée dans le mécanisme qE_{cya} étant prometteurs, j'ai consacré le temps restant de mon doctorat à l'avancée de cette partie décrite dans les chapitres IV et V. Cependant d'autres pistes sont encore à explorer pour comprendre les interactions entre l'OCP et les phycobilisomes. Des expériences avec un effort particulier sur la purification de phycobilisomes intacts pourraient apporter des données plus précises sur le transfert de l'énergie entre l'OCP et les phycobilisomes. Il serait aussi pertinent de travailler sur l'interaction possible entre les trimères d'APC et l'OCP. En effet, la concentration de phosphate nécessaire à la purification des trimères d'APC est assez faible (0.1-0.3M), cela permettrait peut-être au transfert de l'énergie de se faire correctement. D'une manière générale, les expériences biochimiques de mélanges de phycobilisomes et de l'OCP *in vitro* se sont avérées délicates pour les raisons exposées dans la partie précédente de cette discussion, une approche par la biologie moléculaire semble être plus prometteuse.

La structure d'un peptide de liaison dans le cœur des phycobilisomes (nommé L_C^{10}) (communication personnelle du Dr N. Adir ; Wilson *et al*. 2008 ; Glazer 1989) semble être proche de la partie C-terminale de l'OCP (Wilson *et al.* 2008a). Il est possible que cette structure commune permette à l'OCP de s'accrocher au cœur des phycobilisomes. L'étude d'un mutant délesté du L_C^{10} permettrait d'avoir des informations sur cette possibilité de locus d'interaction OCP/phycobilisomes et sur une éventuelle compétition entre l'OCP et L_C^{10} pour ce locus. Il est certain que l'affinité du L_C^{10} avec ce site dans le phycobilisome est supérieure à celle de l'OCP car il est présent quand les phycobilisomes sont purifiés (avec du Triton 1%) et non l'OCP. Si la structure des phycobilisomes est viable dans un mutant sans ce L_C, l'étude de son phénotype en terme de capacité à réaliser le mécanisme qE_{cya} permettrait de déterminer si plus d'OCP se fixe ou non quand le L_C^{10} est absent. Une autre possibilité pour étudier l'interaction des phycobilisomes avec l'OCP serait d'identifier le site de transfert de l'énergie

en réalisant des mutants au niveau des chromophores des émetteurs terminaux des cœurs des phycobilisomes. L'allophycocyanine transfère l'énergie à des sous-unités particulières, soit la sous-unité $\alpha^{APC\text{-}B}$, soit la sous unité $\beta^{18.3}$, soit au peptide de liaison L_{CM} (voir partie 3.3 de l'introduction et figure I.17) (Glazer 1989; Gindt *et al.* 1994). Ces sous-unités possèdent au moins un chromophore situé sur une cystéine encodée dans les gènes *apc*E, *apc*D et *apc*F pour le L_{CM}, $\alpha^{APC\text{-}B}$ et $\beta^{18.3}$, respectivement. Des mutants, où cette cystéine liant les chromophores est remplacée par un autre acide aminé par mutagenèse dirigée, permettraient de déterminer si le mécanisme qE_{cya} a toujours lieu ou pas quand le transfert de l'énergie peut avoir lieu ou pas dans ces différentes sous-unités.

D'un autre côté, *Synechococcus elongatus* PCC7942 (PCC6301) est la seule souche d'eau douce qui ne contient pas l'OCP et est aussi la seule souche d'eau douce à avoir un cœur de phycobilisome composé de 2 cylindres d'allophycocyanine (comme je l'ai déjà remarqué dans la discussion des chapitres I et II). Il se pourrait que le mécanisme qE_{cya} requière la présence d'un cœur à 3 cylindres d'allophycocyanine pour fonctionner soit pour une question de structure/site d'interaction avec l'OCP, soit pour une question de possibilité de transfert de l'énergie à l'OCP. Afin d'infirmer ou confirmer cette hypothèse, il faudrait vérifier si le mécanisme qE_{cya} est toujours présent dans un mutant muté au niveau du L_{CM} d'une cyanobactérie, qui contient normalement un cœur composé de 3 cylindres d'allophycocyanine et l'OCP, par exemple chez *Synechocystis*. La mutation au niveau du L_{CM} devra être telle que ce mutant ait un cœur composé de 2 cylindres d'allophycocyanine (Capuano *et al.* 1993).

Chapitre IV : Découverte d'un nouvel acteur impliqué dans le mécanisme de photo-protection qE_{cya} : la « Fluorescence Recovery Protein » (FRP)

Avant le commencement de ma thèse seulement deux éléments, les phycobilisomes et l'OCP, semblaient être essentiels pour le mécanisme de photo-protection qE_{cya}. C'est dans une optique de recherche de nouveaux acteurs impliqués dans les interactions OCP-phycobilisomes, dans la dissipation d'énergie, dans le quenching de fluorescence et/ou sa récupération et dans la régulation de l'expression de l'OCP, que je me suis intéressée au gène *slr*1964. Chez *Synechocystis*, ce gène se trouve juste en aval du gène codant pour l'OCP (*slr*1963). *slr*1963 et *slr*1964 sont séparés par seulement 60 nucléotides, ce qui fait penser à l'existence d'un opéron incluant ces deux gènes et à une implication possible dans le même mécanisme. De plus, C. Kerfeld avait déjà signalé la présence de ce gène dans d'autres souches de cyanobactéries, aussi en aval de leurs homologues du gène de l'OCP (Kerfeld 2004a). Avant le commencement de ma thèse, rien n'était connu sur ce gène *slr*1964, ainsi que sur le rôle de la protéine qui pourrait en être issue.

Dans ce chapitre IV, je présente le travail concernant la protéine encodée par le gène *slr*1964 et son rôle dans le mécanisme qE_{cya} chez *Synechocystis*. Tout d'abord, je parlerai de la conservation du gène *slr*1964 dans d'autres souches de cyanobactéries, puis des phénotypes de différents mutants construits pour identifier son rôle. Ensuite, je décrirai la caractérisation de cette protéine au niveau de la transcription de son gène, de sa traduction, de sa localisation et de son interaction avec l'OCP. Ce travail a abouti à la réalisation d'un article actuellement en cours de rédaction (Boulay *et al.*, en préparation).

1. Le gène *slr*1964 est conservé en aval de celui de l'OCP (*slr*1963) chez les cyanobactéries

Jusqu'à maintenant le génome de 39 souches de cyanobactéries à phycobilisomes a été séquencé. De ces 39 souches, 26 contiennent au moins un gène qui a une haute identité (50-80%) avec le gène *slr*1963, encodant l'OCP chez *Synechocystis* (tableau 5, figure I.3 et I.4) (Boulay *et al.* 2008b). 23 de ces souches contiennent un gène homologue au gène *slr*1964 de *Synechocystis* en aval de leur gène OCP-like (tableau 7). La séquence prédite de la protéine issue de ces gènes est conservée entre 50 et 30% d'identité par rapport à celle de *Synechocystis*. *Nodularia spumigena*, *'Nostoc azollae'* 0708 et *Gloeobacter violaceus* possèdent un gène OCP-like mais ne possèdent pas de gène homologue à *slr*1964. La séquence des OCP prédites à partir de ces gènes chez ces trois cyanobactéries sont celles avec

Tableau 7 : Présence du gène encodant Slr1964 dans les différentes souches cyanobactériennes et son identité par rapport à celui de *Synechocystis*

Souche[1]	Nom du gène	Identité[2] (%)	En aval du gène *slr*1963
Synechocystis PCC 6803	*slr*1964	100	Oui
Lyngbya sp. PCC 8106	L8106_29205	52	Oui
Microcystis aeruginosa NIES-843	MAE_18920	50	Oui
Microcystis aeruginosa PCC 7806	IPF_5685	52	Oui
Anabaena sp. PCC 7120	*all*3148	50	Oui
Anabaena variabilis ATCC 29413	Ava_3842	49	Oui
Synechococcus sp. PCC 7335	S7335_121	45	Oui
	S7335_1726	44	Oui
Cyanothece sp. PCC 7424	PCC7424_4468	50	Oui
Microcoleus chthonoplastes PCC 7420	MC7420_3635	50	Oui
Arthrospira maxima CS-328	AmaxDRAFT_3432	48	Oui
Cyanothece sp. CCY 0110	CY0110_09682	42	Oui
Synechococcus PCC 7002	SYNPCC7002_A2808	44	Oui +K[3]
Cyanothece ATCC 51142	cce_1648	42	Oui
Synechococcus sp. WH 5701	WH5701_04000	42	Oui +K
Cyanobium sp. PCC 7001	CPCC7001_233	38	Oui +K
Synechococcus sp. RS9917	RS9917_00682	35	Oui +K
Synechococcus sp. CC9902	Syncc9902_0971	34	Oui +K
Synechococcus sp. CC9311	sync_1805	32	Oui +K
Synechococcus sp. BL107	BL107_14115	33	Oui +K
Synechococcus sp. WH8102	SYNW1369	32	Oui +K
Synechococcus sp. WH7805	WH7805_01192	31	Oui +K
Synechococcus sp. WH7803	SynWH7803_0927	31	Oui +K
Synechococcus sp. RCC307	SynRCC307_1994	26	Oui +K

[1] L'ordre du classement des souches (du plus au moins proche par rapport à leur homologue de Slr1964 de *Synechocystis*) est celui du programme NCBI BLASTP 2.2.16 [Mar-25-2007], qui prend en compte l'identité (acides aminés identiques), la similarité (acides aminés proches) et les « gaps»

[2] Pourcentage d'identité (acides aminés identiques) obtenu pour le BLASTP entre le premier et dernier acide aminé du blast

[3] +K indique qu'un gène codant pour une β-carotène cétolase se trouve entre les gènes homologues de *slr*1963 et *slr*1964

l'homologie la plus faible par rapport à l'OCP de *Synechocystis*, 56, 54 et 50, respectivement (tableau 5). Comme le gène *slr1964* est moins conservé que celui de l'OCP, il est possible que le pourcentage d'identité de la séquence prédite de la protéine Slr1964 de ces cyanobactéries soit trop faible pour être considéré comme significatif par le logiciel de blast. Les 12 cyanobactéries ne contenant pas de gène homologue à *slr*1963 entier (tableau 5) ne contiennent pas de gène homologue à *slr*1964 sauf *Cyanobium* PCC 7001 (qui est la seule cyanobactérie actuellement séquencée à contenir seulement un gène homologue à la partie C-terminale de celui de l'OCP). Quatre souches possèdent plusieurs gènes homologues au gène *slr*1963 entier : *Cyanothece* PCC 7424 (2 gènes), *Synechococcus* PCC 7335 (3 gènes), *Synechococcus* WH 5701 (2 gènes dont un codant pour une protéine plus courte de 219 acides animés) et *Nostoc punctiforme* (2 gènes) (tableau 5). Ces souches possèdent un seul gène homologue au gène *slr*1964 en continuité de l'un de leur gène codant pour l'OCP sauf *Synechococcus* PCC 7335 qui possède deux gènes homologues à *slr1964* en continuité de deux de ses trois gènes codant pour l'OCP (tableau 7). Ces données suggèrent que les gènes *slr1963* et *slr1964* ont co-évolué car ils sont conservés en continuité l'un de l'autre.

Il est aussi intéressant de remarquer que chez toutes les cyanobactéries marines *Synechococcus*, ainsi que *Synechococcus* WH5701 et *Cyanobium* PCC 7001 (qui peuvent vivre en eaux douce et marine), il y a toujours un gène très conservé codant pour une cétolase entre *slr*1963 et *slr*1964 (tableau 7). Comme je l'avais déjà remarqué dans le chapitre II (Boulay *et al.* 2008b), les cyanobactéries marines semblent avoir eu une évolution commune en ce qui concerne le gène de l'OCP et de son environnement. En effet, les séquences du gène de l'OCP chez les cyanobactéries marines *Synechococcus* sont très similaires entre elles (entre 95 et 77% par rapport à *Synechococcus* WH7805) et un ensemble de trois gènes codant pour l'OCP, une cétolase (peut-être intervenant dans la synthèse de l'échinénone) et Slr1964, est conservé.

90% des protéines prédites des gènes homologues à *slr*1964 ont entre 106 et 111 acides aminés. *Synechocystis* avec 134 acides aminés et *Microcystis* NIES-843 avec 126 acides aminés possèdent une séquence N-terminale d'environ 25-30 acides aminés qui n'est pas présente sur les protéines prédites des autres cyanobactéries (figure CIV.1). Chez *Synechocystis*, il y a quatre codons ATG ou GTG (positions 1, 14, 16 et 26) qui pourraient être le commencement de la traduction. Les programmes marquent le premier GTG (position 1) comme la première méthionine (Met) de la protéine chez *Synechocystis* mais les gènes homologues de *slr*1964 chez la plupart des autres cyanobactéries ne contiennent pas la séquence qui sépare la première Met de la Met26. De plus, chez la plupart des autres cyanobactéries, la protéine Slr1964 prédite commence par une Met qui s'aligne avec la Met26 de *Synechocystis*. La partie C-terminale de la protéine est très conservée (figure CIV.1). D'après les logiciels de caractérisation et de recherche de motifs des protéines, la protéine encodée par le gène *slr1964* serait soluble, et n'aurait pas d'α-hélice transmembranaire ;

```
Microcystis NIES-843      -----MSAKRVMVVQKPKIIIPKTKIMPMSEIIWSDTEQEIAQTAFQKAYQRETSTLIEH
Microcystis PCC 7806      -------------------------MPMSEIIWSDTEQEIAQTAFQKAYQRETSTLIEH
Lyngbya sp. PCC 8106      -----------------------MIPVSDIEWSTAEKEIAREAFEKAYQREITALIKV
Anabaena sp. PCC 7120     -------------------------MYVSEAEWSDIEKTIARTAFDQAYKREIEALLKQ
Anabaena ATCC 29431       -------------------------MHVSEAEWTDIEKKIARTAFDQAYKREIEALLKQ
Synechocystis PCC 6803    MGFSLQSRLTFFIMVMIITNQYHKLMLQTAEAPWSQAETQSAHALFRKAYQRELDGLLAT
Cyanothece sp. CCY0110    -------------------------MKTNTQEWSQTDQKIAYEALTKAYARETEALIAE
Cyanothece sp. ATCC 51142 -------------------------MKTNTQQWSQTDQKIAQEALGKAYARETEALVAE
Synechococcus sp. 7002    ----------------------MLTMPTANTQWSLQEKTIAKEAFELSYRREIAAVMAE
Synechococcus sp. WH5701  ------------------------MVESALITWSDDEQAIAEEAFSCAYARAVQTVIST
Synechococcus sp. WH7805  --------------------------MSAADWTHQEQSVAKHAFETGKQRSIEALIVI
Synechococcus sp. WH7803  --------------------------MSAADWTHQEQSIAKDAFETGKQRSIEALIVI
Synechococcus sp. WH8102  --------------------------MSATDWTSEEQTVARTAFELGKQRSITALIST
Synechococcus sp. RS9917  --------------------------MSATDWSQDEIVVARHAFERGNQKSIEVLIAS
Synechococcus sp. RCC307  --------------------------MSANEWTEQEKTIAEQAFESGNKKAMEVLIRS
Synechococcus sp. CC9902  --------------------------MTPADWSSQEEQVARHAFDNGRNRSIESLIST
Synechococcus sp. BL107   --------------------------MTPADWSSQEEQVARHVFDNGRRRSIESLISV
Synechococcus sp. CC9311  ----------------------MNHVMTQVDWPSAETEIARKAFQKGNERAVTVLISV
                                                    *.  :   *   :  .  :    ::
Prim.cons.                MGFSL2S2222222222222223LMMPMS2ADWSDQEQ2IAR2AFEKAYQREIEALI2T

NIES-843     IKEQSGQITVLDDIWQMHDYLSARRHQIDGKYDYRYTSLIFVFAQLLKEGWLKLEDLNGLEKDKLAKIAALSRM-
PCC 7806     IKEQSGQITVLDDIWQMHDYLSARRHQIDGKYDYRYTSLIFVFAQLLKEGWLKLEDLNGLEKDKLAKIAALSRM-
PCC 8106     VREQAGEITKLDDIWLLHDFLSARRHDIDGKYDHRDSLLIFSFAQLVKEGWLHLDELKGLDAEKISKVSVLTRM-
PCC 7120     VQKEASTLVELDELWQLHDFLSARRHEIEGKYDYQYSALLFVFAGLVKDGWLHVNELEGLSKDKLSKVSALARM-
ATCC 29431   VQKEASTLVELDGLWQLHDFLSARRHEIEGKYDYQYSALLFVFAGLVKDGWLHVNELEGLSKDKLSKVSALARM-
PCC 6803     VQAQASQITQIDDLWKLHDFLSAKRHEIDGKYDDRQSVIIFVFAQLLKEGLVQAEELTFLAADKQSKIKALARL-
CCY0110      INQKASQVNHIDEIWALNDYLSSKRYNIDGKYDFRESASVFVLAQLVKEKWLTLDELTDLTPSTKAKVAALTKMS
ATCC 51142   INQKASQITHINDIWALNDYLNSKRYHIDGKYYSSDATSMFVLAQLVKEKWLTLDELTGLTPSTRAKVAALAKMS
PCC 7002     AKRQATLAADPADLWQLNDFLSARRHYLDGKYDFSPESLVFTFAQLIKEGWLELQELDGLAAEKLSKIRILTLM-
WH5701       VRREADSINNAQSLWRLHDYLSTQRHVMEGRFDFRLEGILFVFASLVKENLLDLQELDGLDADKLAKIKAMSRF-
WH7805       LREQSALLDTPESIWKFHDFLSSERFQYEGRSEFDTANILFTLADMIKQNLINYDDLEGLEKTKLSKIKAMAMF-
WH7803       LRKQSALLDTPESIWRYHDFLSSERYQYEGRAEFDTANILFNLADMIKQNLITYEDLEGLDTTKLSKIKAMAMF-
WH8102       LQEQSSTLDTPESVWKLHDHLSTERYLYEGRAEFDEGNVLFVLADMIKQRLIALDDLQGLDQTKVSKVKAMSMF-
RS9917       LQEQVNSLNTAESIWKLHDFLSTERFDYEGRSEFDDAKILFILADMVKRKLISRQDLVGLSDKKISKIKAMAMF-
RCC307       LQELSLRLDSPESVWKFHDYLSSERYAYEGRSAFDEANALFSLAEMVKLKLIVLENLQGL DQSKIGKIKAMSMF-
CC9902       LQAKCQELNTDESVWNMHDYLSTERHLFEGRSEFDYGNILFTLAELLKQQLITLDELNGLDPKKLAKIKAMSMF-
BL107        LQTKCQELSTDESVWSMHDYLSTERHIFEGRSEFDYNNILFTLADLLKQQLITLEELEGLDPKKLAKIKAMSMF-
CC9311       IQNMSQSLSTLESVCSLHDYLSTERFEIEGRMEFNHDTILFSLAEMMKRNLIEANDLQGLDPKKVSKIKAMSLF-
              .           :   :*.*.:.*.  :*:       :* :* ::*   :  ::*  *   . .*:  :: :
Prim.cons.   LQEQASQLTTLESIW2LHDYLSAERH2IEG2YDFDY2NILFVLAQLVKEGLLTL2ELEGLD2DKLSKIKA2S2FS
```

Figure CIV.1: Alignements de 18 séquences de la protéine prédite encodée par les gènes homologues à *slr*1964 chez les cyanobactéries réalisés avec Clustal W

Prim. cons = séquence consensus, "." et bleu = acide aminé faiblement similaire, ":" et vert = acide aminé fortement similaire, "*" et rouge = acide aminé identique.

aucun motif connu n'est formellement identifié et sa masse moléculaire prédite est de 15372 $g.mol^{-1}$. Lors du blast pour identifier les protéines homologues à celles encodées par le gène *slr1964* chez les autres cyanobactéries, le domaine GGDEF d'une dizaine de protéines présentes chez différentes espèces de *Vibrio cholerae* apparaît avec une homologie très faible (identité 26%, similarité 41% et gaps 14%). Un domaine GGDEF contient environ 160 acides aminés et est un domaine récemment identifié comme impliqué dans la transduction du signal chez les bactéries (voir la discussion de ce chapitre pour plus de détails) (D'Argenio et Miller 2004; Römling *et al.* 2005).

2. Les mutants du gène *slr1964* chez *Synechocystis*

2.1 Description de la construction des mutants

La description détaillée de la construction des mutants utilisés dans cette étude se trouve dans les matériels et méthodes. Ici, je ferai seulement un rappel et une brève description de leur construction.

Premièrement, nous avons construit un mutant où le gène *slr1964* a été interrompu par une cassette de résistance à l'antibiotique kanamycine. Cette souche est nommée Δ*slr1964* dans ce travail (tableau 2). Puis, j'ai construit des mutants surexprimant les gènes *slr1963* et *slr1964* ou seulement le gène *slr1964* en mettant ces gènes sous le contrôle du promoteur fort du gène *psbAII*, un des gènes codant pour la protéine D1 (voir les matériels et méthodes pour les détails des constructions, tableau 3, figures MM.4, MM.5, MM.6 et MM.7). Ce promoteur fort a déjà été utilisé pour surexprimer une hydrolase (Lagarde *et al.* 2000) et l'OCP (Wilson *et al.* 2008a). J'ai utilisé la souche sauvage (WT) et la souche Δ*slr1964* comme souches réceptrices.

En me basant sur l'hypothèse que les gènes *slr1963* et *slr1964* pouvaient faire partie d'un même opéron et qu'ils pourraient être co-transcrits, j'ai commencé par la construction des souches où le gène *slr1963* (suivi du gène *slr1964*) était sous le contrôle du promoteur de *psbAII*. De plus, le plasmide nécessaire à cette construction venait d'être construit au labo par A. Wilson pour la surproduction de l'OCP. J'ai seulement ajouté les His-tag aux côtés 5' et 3'-terminales du gène *slr1964* par mutagenèse dirigée et une cassette antibiotique (figures MM.4 et MM.5). Si le gène *slr1964* est bien transcrit dans cette souche, la quantité de protéines qui en est issue est relativement faible (voir plus bas). Le codon « start » de *slr*1964 est un GTG (moins fort que ATG) chez *Synechocystis*, dans le but de jouer sur la quantité de Slr1964 produite, j'ai ensuite construit des mutants qui surexpriment le gène *slr*1963 suivi du gène *slr*1964 dont le codon GTG a été remplacé par un ATG (figure MM.4). La quantité de protéines Slr1964 dans ces mutants avec un codon « start » GTG ou ATG était similaire

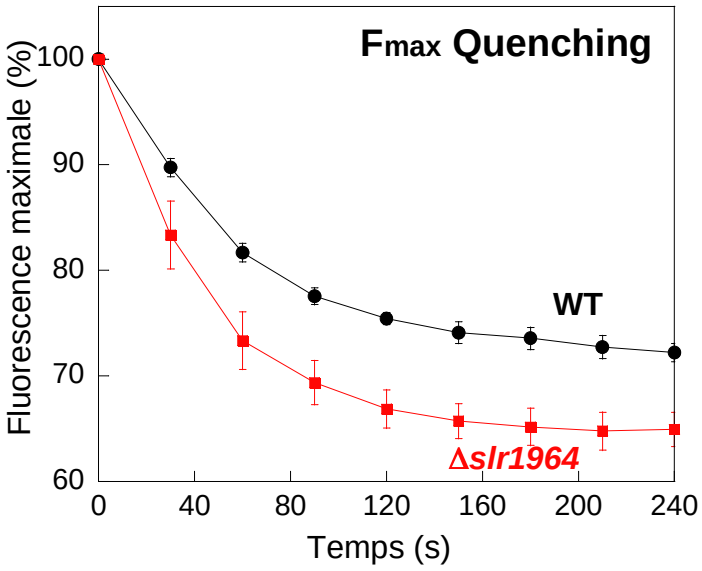


Figure CIV.2: L'induction du quenching de fluorescence du mécanisme qE_{cya} a toujours lieu quand le gène *slr*1964 est inactivé

Les mesures du rendement de fluorescence ont été réalisées avec un fluorimètre PAM sur des cellules du mutant Δ*slr*1964 (rouge) et de la souche sauvage (noir) de *Synechocystis* (voir tableau 2). Les cellules, diluées à 3 µgChl.mL^{-1}, ont été adaptées à une lumière bleue-verte faible (400-550nm, 30 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) (Fluorescence maximale, Fmax = 100%), puis illuminées avec une lumière bleue-verte forte (1050 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}). Le temps t = 0s du graphique commence au moment où les cellules sont mises sous lumière forte. Les courbes montrées sont représentatives d'au moins trois expériences similaires. La barre d'erreur représente l'écart type des mesures.

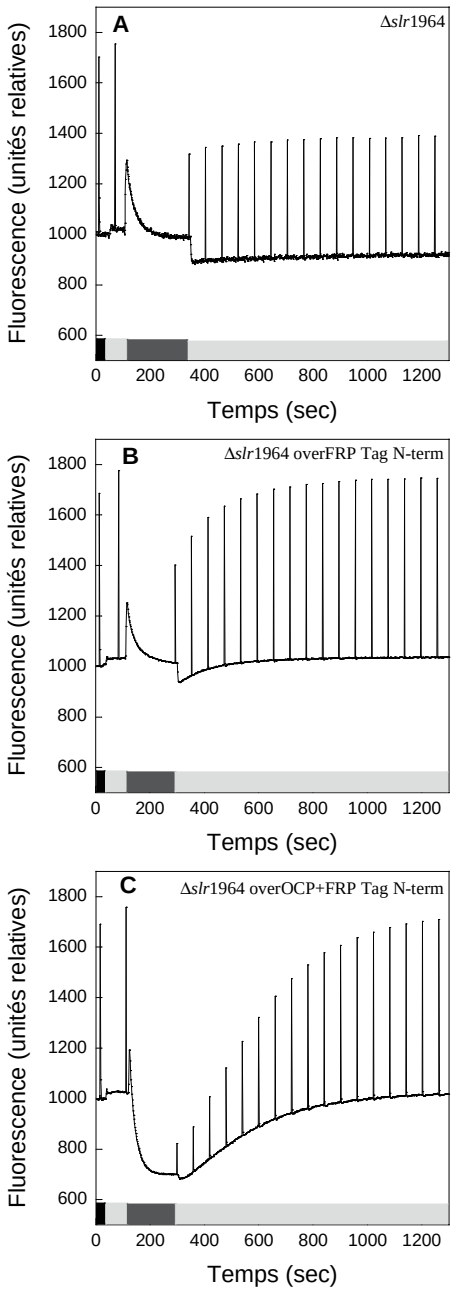


Figure CIV.3: La FRP est impliquée dans la récupération de la fluorescence aprés une forte illumination

Les mesures du rendement de fluorescence ont été réalisées avec par un fluorimètre PAM sur des cellules du mutant Δ*slr*1964 (**A**), du mutant Δ*64*CB19 (**B**) et du mutant Δ*64*CB14 (**C**) chez *Synechocystis* (voir tableau 2 ainsi que les figures MM.4 et MM.6 pour le détail des constructions). Les cellules, diluées à 3 µgChl.mL^{-1}, ont été adaptées à l'obscurité (noir), puis illuminées successivement par une lumière bleue-verte faible (400-550nm, 30 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}, gris clair) et une lumière bleue-verte forte (1050 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}, gris foncé). Ensuite, les cellules ont été re-illuminées avec une lumière bleue-verte faible. Des pulses saturants ont été appliqués pour mesurer les niveaux maximaux de fluorescence (Fm'). Les spectres montrés sont représentatifs d'au moins 3 expériences identiques.

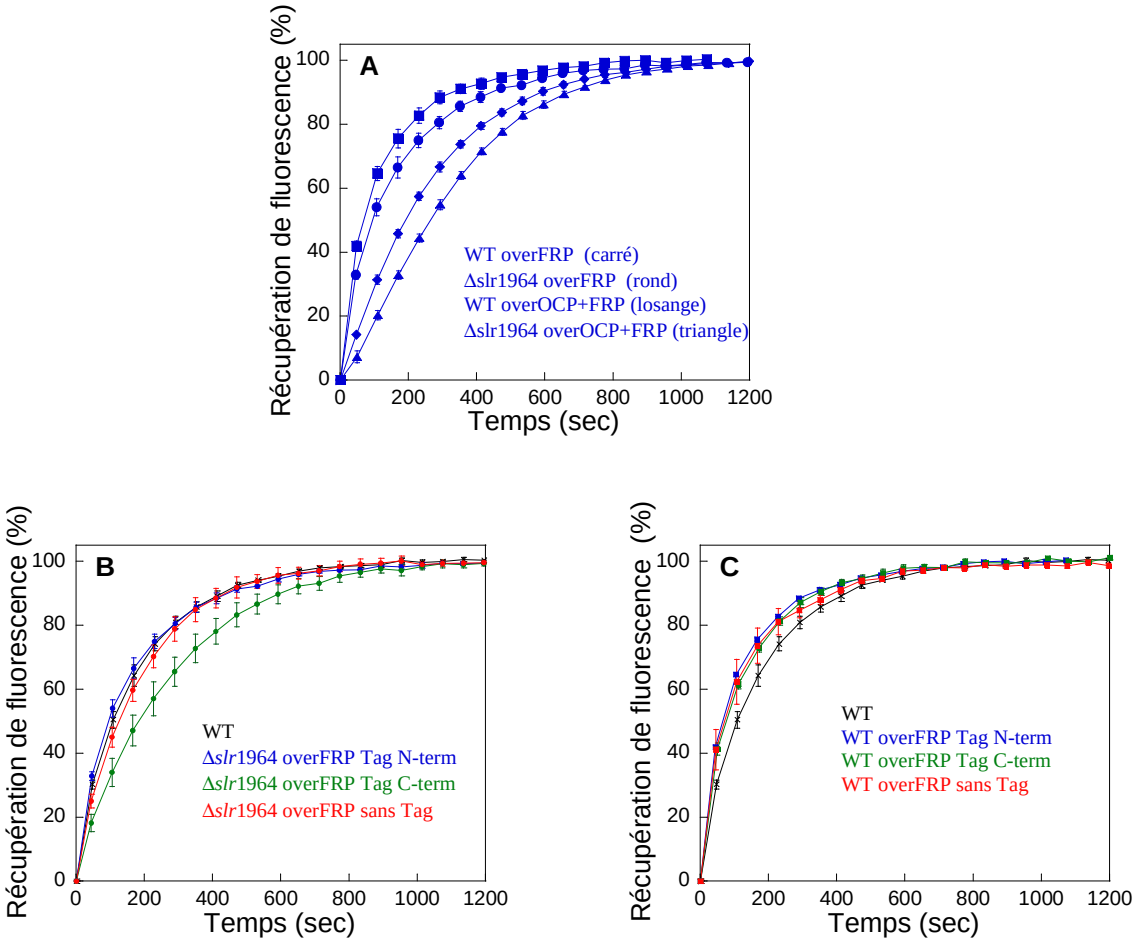


Figure CIV.4: Mesures de la cinétique de récupération de la fluorescence aprés une forte illumination dans les mutants de la FRP chez *Synechocystis*

Les cellules de *Synechocystis* ont été diluées à 3 µgChl.mL^{-1}. Les cellules ont été adaptées à l'obscurité, puis illuminées successivement par une lumière bleue-verte faible (400-550nm, 30 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}) et une lumière bleue-verte forte (1050 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}). Ensuite, la mesure (temps = 0s) de la récupération a été effectuée lors de la re-illumation des cellules avec une lumière bleue-verte faible. Les mutants avec un HisTag en N-terminal, en C-terminal et sans Tag sont représentés en bleu, vert et rouge, respectivement. Les cinétiques montrées sont la moyenne de trois expériences similaires. La barre d'erreur représente l'écart type des mesures.

En **A**, les cinétiques des mutants avec un Tag en N-terminal sont montrées : WTCB19 (bleu, carré), Δ*64*CB19 (bleu, rond), WTCB14 (bleu, losange) et Δ*64*CB14 (bleu, triangle).

En **B**, les cinétiques des mutants surexprimant la FRP dans la souche Δ*slr*1964 sont montrées : sauvage (trait noir, croix), Δ*64*CB19 (bleu, rond), Δ*64*CB20 (vert, rond) et Δ*64*CB21 (rouge, rond). En **C**, les cinétiques des mutants surexprimant la FRP dans le sauvage sont montrées : sauvage (trait noir, croix), de WTCB19 (bleu, carré), de WTCB20 (vert, carré) et de WTCB21 (rouge, carré).

ainsi que leurs phénotypes (données non montrées). C'est pourquoi, j'ai ensuite construit trois mutants où le gène *slr*1964, contenant un His-tag ou sans His-tag, est directement sous le contrôle du promoteur du gène *psb*AII (figure MM.6). L'ajout d'une séquence nucléotidique qui code pour un Tag de six histidines (noté « HisTag ») par mutagenèse dirigée dans le gène *slr*1964 a été réalisée afin de pourvoir purifier Slr1964. Parfois la position du Tag modifie, voir inhibe, la fonction d'une protéine, c'est pourquoi j'ai fait des constructions avec l'HisTag en N-terminal, en C-terminal et un contrôle sans Tag (tableau 3, figures MM.4 et MM.6).

2.2 Phénotype des mutants de la FRP

Premièrement, j'ai testé si l'interruption du gène *slr*1964 par insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine affectait l'induction du quenching de fluorescence en illuminant des cellules du mutant Δ*slr1964* avec une forte intensité de lumière bleue-verte. La figure CIV.2 montre que l'interruption de ce gène ne diminue pas le quenching, ni ne ralentit la cinétique de décroissance de la fluorescence. Au contraire, une même intensité lumineuse induit un quenching de fluorescence légèrement plus prononcé que dans le sauvage. Cependant, cette souche Δ*slr1964* présente une récupération quasi nulle de la fluorescence quand les cellules sont ré-illuminées avec une lumière bleue-verte faible (figure CIV.3A). La protéine Slr1964 semblait donc avoir un rôle dans la récupération de la fluorescence. Pour cette raison, nous l'avons nommée « Fluorescence Recovery Protein » (FRP).

Pour confirmer l'implication de la FRP dans la récupération de la fluorescence, j'ai complémenté le mutant Δ*slr1964*. La figure CIV.3B montre que la souche Δ*slr*1964 complémentée par l'ajout de la construction pCB19 qui surproduit la FRP (figure CIV.3A et B) retrouve sa capacité de récupération de la fluorescence lorsque les cellules exposées à une lumière bleue-verte forte sont de nouveau placées sous une illumination faible. L'ajout de la construction pCB14 qui surproduit à la fois l'OCP et la FRP dans Δ*slr*1964 permet aussi la récupération de la fluorescence. Dans cette souche, nous observons une augmentation du quenching de fluorescence induit par une forte lumière bleue-verte à cause de la surproduction de l'OCP (figure CIV.3C). Ce résultat est en accord avec le phénotype des mutants surproduisant l'OCP déjà construit dans notre équipe (Wilson *et al.* 2008a; Punginelli *et al.* 2009). Ces résultats confirment que la FRP est essentielle pour la récupération de fluorescence dans le mécanisme qE_{cya}.

La figure CIV.4 compare les cinétiques de récupération de la fluorescence dans les différents mutants construits dans *Synechocystis* pour cette étude. Tous les mutants surexprimant uniquement la FRP ou surexprimant à la fois l'OCP et la FRP récupèrent 100% de leur fluorescence initiale entre 10 et 20 minutes après l'arrêt de la forte illumination quand on laisse les cellules récupérer sous une lumière bleue-verte faible. Leur vitesse de récupération varie en fonction des constructions. La figure CIV.4A compare les cinétiques de

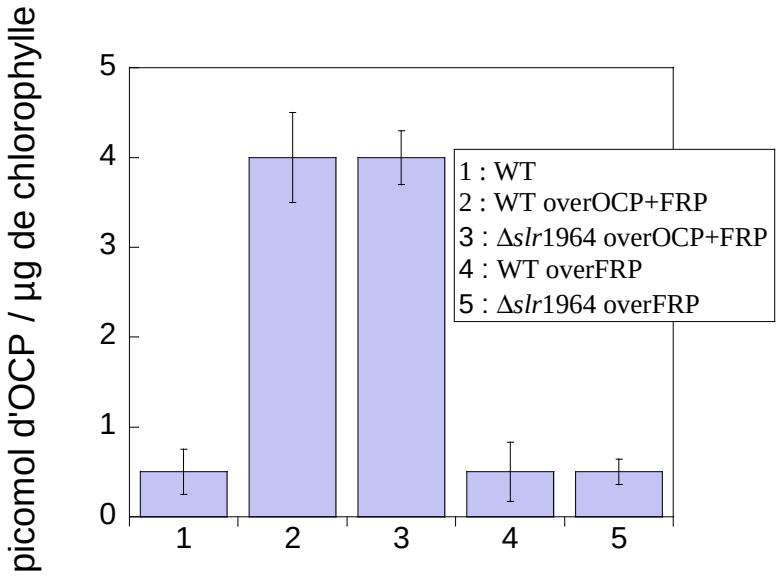


Figure CIV.5 : Estimation de la quantité de l'Orange Carotenoid Protein dans le sauvage et les mutants de la FRP chez *Synechocystis*

Des membranes de western blots contenant une gamme étalon et les 5 souches (sauvage, Δ*64*CB14, WTCB14, Δ*64*CB19 et WTCB19) ont été scannées et la densité des bandes a été mesurée en utilisant le logiciel Image Mastertotal Lab v1.11 (Amersham Pharmacia). La quantité en picomoles d'OCP par µg de chlorophylle a été déduite de cette mesure. Cette expérience est une expérience représentative de 3 réplicats. Les barres d'erreur indiquent l'écart type.

récupération de la fluorescence de tous les mutants avec un HisTag en N-terminal de la FRP. Les souches surexprimant uniquement la FRP, WTCB19 et Δ*64*CB19, récupèrent 50% de la fluorescence au bout de respectivement 60 et 100 secondes ($t_{1/2}$) après l'arrêt de la forte illumination ; alors que les souches surexprimant l'OCP et la FRP, WTCB14 et Δ*64*CB14, ont un $t_{1/2}$ de 200 et 260 secondes, respectivement (figure CIV.4 A). Les souches surexprimant uniquement la FRP ont donc une cinétique de récupération de fluorescence plus rapide que celles qui surexpriment l'OCP et la FRP. Et les souches qui contiennent la FRP sauvage (transformations dans le sauvage) ont une cinétique plus rapide que les souches qui ne la contiennent pas (transformations dans la souche Δ*slr*1964). Ces résultats suggèrent que le ratio FRP/OCP influence la cinétique de récupération dans le sens où plus il est élevé, plus la récupération est rapide.

La figure CIV.4B montre la cinétique de récupération de fluorescence des mutants où la FRP surexprimée avec différentes configurations de l'HisTag (en N-terminal, en C-terminal et sans Tag) a été introduite dans la souche Δ*slr*1964. La cinétique de ces mutants avec un HisTag en N-terminal (Δ*64*CB19) ou sans l'HisTag (Δ*64*CB21) est similaire au sauvage : ils récupèrent 50% de leur fluorescence initiale au bout d'une centaine de secondes après l'arrêt de la forte illumination. Le Tag en N-terminal ne semble pas affecter la cinétique de la FRP car le mutant qui le contient (Δ*64*CB19) a le même phénotype que celui sans Tag (Δ*64*CB21). L'HisTag en C-terminal de la protéine FRP ralentit la cinétique de récupération de fluorescence car le mutant Δ*64*CB20 (avec l'HisTag en C-terminal) récupère 50% de sa fluorescence initiale seulement au bout de 200 secondes. La partie C-terminale de la FRP, qui est la partie la plus conservée de cette protéine, semble donc être importante pour le mécanisme de la FRP.

La figure CIV.4C montre la cinétique de récupération de la fluorescence des mutants où la FRP surexprimée avec différentes configurations de l'HisTag (en N-terminal, en C-terminal et sans Tag) a été introduite dans le sauvage. La cinétique de ces mutants (WTCB19, WTCB20 et WTCB21) est plus rapide que celle du sauvage : ils récupèrent 50% de leur fluorescence initiale au bout d'environ 60 secondes après l'arrêt de la forte illumination, alors que le sauvage a besoin d'environ 100 secondes.

L'étude du phénotype des mutants surexprimant la FRP ou surexprimant à la fois l'OCP et la FRP, nous a permis de prouver que la FRP est impliquée dans la récupération de fluorescence du mécanisme qE_{cya} après une forte illumination (figure CIV.3). La partie C-terminale conservée de la FRP semble aussi être importante pour son mécanisme car un HisTag en C-terminal ralentit sa cinétique (figure CIV.4B).

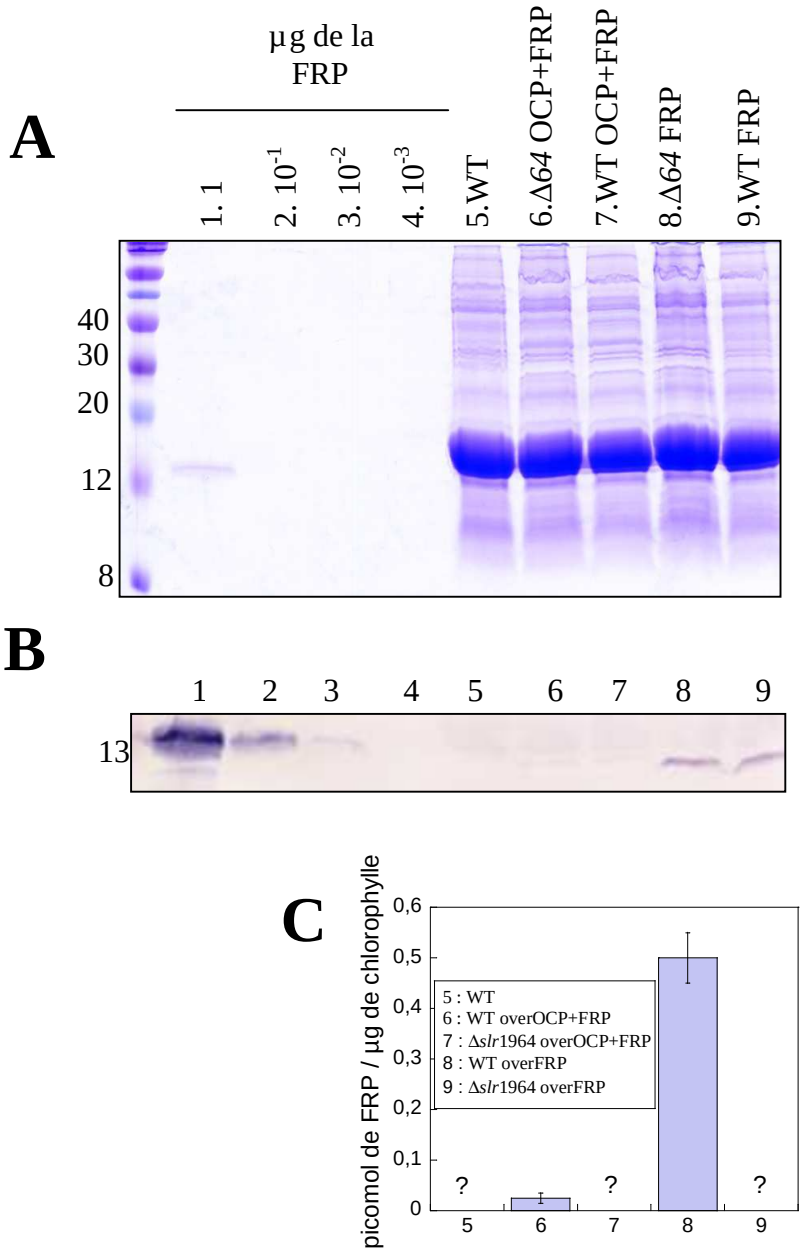


Figure CIV.6 : Estimation de la quantité de la Fluorescence Recovery Protein dans les mutants FRP chez *Synechocystis*

Le gel coloré au bleu de coomassie **(A)** et le western blot anti-FRP (dilution de l'anticorps 1/1000) **(B)** sont montrés. Les puits 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 contiennent respectivement 1µg de la FRP (recombinante, voir chapitre V), 10^{-1}µg de la FRP, 10^{-2}µg de la FRP, 10^{-3}µg de la FRP, des cellules à 4µg de chlorophylle (par puits) du sauvage, du mutant Δ*64*CB14, WTCB14, Δ*64*CB19 et WTCB19. Le marqueur coloré (à gauche) est exprimé en kDa. **(C)** La membrane de western blot a ensuite été scannée et la densité des bandes a été mesurée en utilisant le logiciel Image Mastertotal Lab v1.11 (Amersham Pharmacia). La quantité en picomoles de FRP par µg de chlorophylle a été déduite de cette mesure dans les mutants qui contiennent la FRP avec un HisTag en N-terminal uniquement reconnue par l'anticorps. Cette expérience est une expérience représentative de 3 réplicats. Les barres d'erreur indiquent l'écart type.

3. Estimation de la quantité de FRP et d'OCP dans les mutants

Pour savoir si il y a un rapport entre les cinétiques de récupération de fluorescence et la quantité de FRP (par rapport à l'OCP), la FRP et l'OCP ont été quantifiées (approximativement) dans les différents mutants (figures CIV.5 et CIV.6).

La figure CIV.5 montre la quantification de l'OCP par western blot avec un anticorps anti-OCP. Elle montre la quantité d'OCP présente dans chaque souche calculée en picomoles d'OCP par µg de chlorophylle. La souche sauvage et les souches surexprimant seulement la FRP contiennent environ 0,5 picomoles d'OCP par µg de chlorophylle suggérant que la quantité de FRP présente dans les cellules n'influe pas sur la production de l'OCP. Les mutants Δ*64*CB14 et WTCB14 surexprimant à la fois l'OCP et la FRP contiennent environ 4 picomoles de l'OCP par µg de chlorophylle (figure CIV.5C).

La figure CIV.6 montre la quantification de la FRP chez les souches surexprimant la FRP avec un HisTag en N-terminal par western blot avec l'anticorps anti-FRP. Les puits 1 à 4 contiennent une gamme étalon de concentrations décroissantes de la FRP recombinante purifiée dans *E.coli* (de 1µg à 1 10^{-4}µg par puits) (voir le chapitre V pour le travail sur la surproduction de la FRP dans *E.coli*). Et les puits 5 à 9 contiennent le sauvage et les mutants avec la FRP taggée en N-terminal à une concentration de 4µg de chlorophylle par puits. L'anticorps anti-FRP reconnaît un polypeptide de 13 kDa (figure CIV.6B). Cet anticorps a été réalisé en utilisant une protéine FRP contenant un HisTag en position N-terminale surproduite dans *E.coli* (voir les détails dans le chapitre V). Malheureusement, la zone antigénique de cet anticorps se trouve au niveau de l'HisTag et de la partie N-terminal de la FRP. Cet anticorps reconnaît uniquement la FRP avec un HisTag en N-terminal, il ne reconnaît ni la FRP sauvage (figure CIV.6B, puits 5), ni la FRP avec un HisTag en C-terminal (figure CV.7). La quantification de la FRP n'est donc possible que dans les mutants qui contiennent uniquement la FRP HisTaggée en N-terminal (mutants dans la souche Δ*slr*1964). En prenant cette caractéristique de l'anticorps anti-FRP en compte, il apparaît que le mutant Δ*64*CB14 surexprimant l'OCP et la FRP HisTaggée en N-terminale contient environ 0.025 picomoles de FRP par µg de chlorophylle, et que le mutant Δ*64*CB19 surexprimant uniquement la FRP HisTaggée en N-terminale contient environ 0.5 picomoles de la FRP N-ter HisTaggée par µg de chlorophylle (figure CIV.6C).

En accord avec les observations des phénotypes des mutants, il apparaît clairement que lorsque le ratio FRP/OCP est d'environ 0.01 (comme dans le mutant *Δ*64CB14), celle-ci est toujours capable de permettre 100% de la récupération de fluorescence et que plus le ratio FRP/OCP est élevé, plus la récupération est rapide. Les données des figures CIV.5 et CIV.6 indiquent aussi que la quantité de FRP est plus importante dans les mutants où le gène *slr*1964 est directement sous le contrôle du promoteur fort par rapport aux mutants où le gène de l'OCP (*slr*1963) suivi par le gène de la FRP (*slr*1964) sont mis sous le contrôle du promoteur fort. Il faut aussi remarquer que la quantité de FRP semble être la même dans les souches sauvages et Δ*slr*1964 (figure CIV.6B), cependant, cela n'est probablement pas le cas à cause du fait que notre anticorps anti-FRP ne reconnaît pas la FRP sauvage. En se basant sur la comparaison des cinétiques de récupération, nous pouvons supposer que la quantité de FRP chez le sauvage est du même ordre de grandeur que celle dans le mutant surexprimant uniquement la FRP (Δ*64*CB19). En effet, leurs cinétiques de récupération de fluorescence sont similaires (figure CIV.4B). Cependant, il existe un problème avec cette hypothèse : dans la souche surexprimant l'OCP et la FRP (WTCB14), la position des gènes *slr*1963 et *slr*1964 par rapport au promoteur fort est la même que celle de ces gènes *slr*1963 et *slr*1964 par rapport au promoteur normal dans le sauvage. Nous pourrions nous attendre à ce que le ratio OCP/FRP soit égal dans les deux souches. Cependant, cela ne semble pas être le cas car la récupération dans le mutant (WTCB14) est beaucoup plus lente que dans le sauvage. Il se pourrait que le sauvage ait une régulation de la transcription de FRP différente ou qu'un autre élément (limitant) soit impliqué dans le mécanisme (voir la discussion pour plus de détails). De plus, il se pourrait que la méthionine de départ de la FRP soit la méthionine 26 (voir la partie 1 de ce chapitre et la discussion). Si c'est le cas, la traduction pourrait avoir lieu avant l'HisTag et au niveau de cette méthionine 26 (située après l'HisTag). Les quantités dédéctés sont donc peut-être sous estimées (voir discussion).

Il convient de remarquer ici que la nomenclature utilisée pour nommer les souches dans les figures et le texte (par exemple « Δ*slr*1964 overFRP, la souche surexprimant la FRP » ou « Δ*slr*1964 overOCP+FRP, la souche surexprimant l'OCP et la FRP ») n'est pas exacte d'après les résultats décrits ci-dessus. Les souches avaient été nommées ainsi d'après leur construction avec le promoteur fort du gène *psb*AII. Pour garder une cohérence, les mêmes noms seront utilisés dans la suite de la description de ce travail tout en sachant que les constructions « overFRP » (pCB19, pCB20 et pCB21, voir matériels et méthodes) produisent environ la même quantité de FRP que la souche sauvage. Et que les constructions « overOCP+FRP » (pCB14 et pCB15, voir matériels et méthodes) produisent 20 fois moins de FRP et 4 fois plus de l'OCP que la souche sauvage de *Synechocystis*.

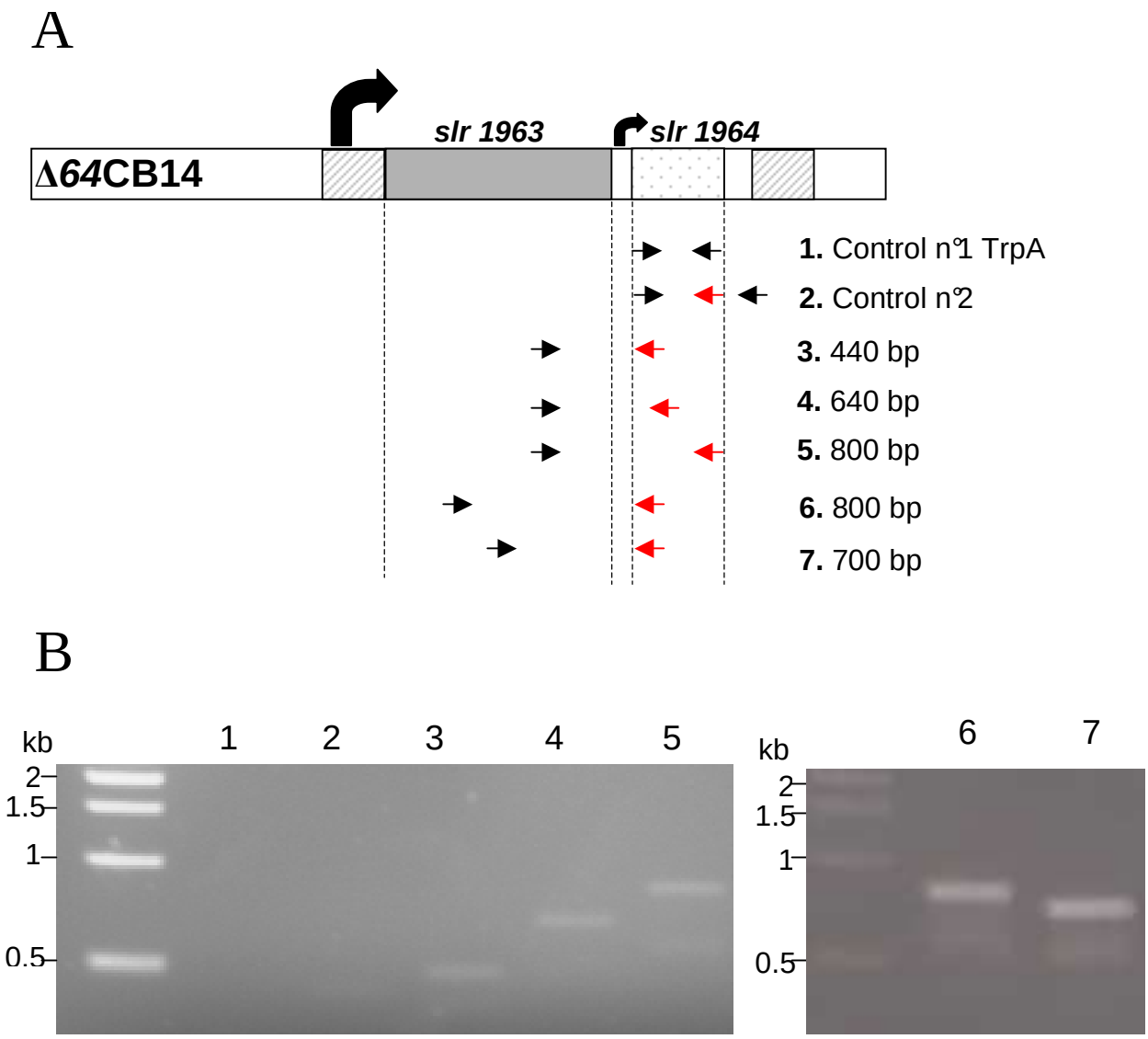


Figure CIV.7 : *slr*1963 et *slr*1964 sont co-transcrits quand ils sont placés sous le contrôle d'un promoteur fort chez *Synechocystis*

En **A**, schéma de la construction du mutant Δ*64*CB14 (pour plus de détails voir tableau 2) où les gènes codant pour l'OCP et la FRP ont été mis sous le contrôle du promoteur fort du gène de la protéine D1 (*psb*AII). 1µg d'ARN purifié a été mis dans la réaction de transcription réverse avec l'oligopeptide reverse (flèche rouge et voir tableau 4) : TrpA-569R, 64-394R, 64-33R, 64-232R, 64-394R, 64-33R et 64-33R pour les numéros 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7, respectivement. Ensuite une PCR a été réalisée sur l'ADNc de la transcription réserve avec les oligopeptides (en noir ou rouge et noir quand il y a seulement deux flèches) : 64F/64R, 64F/psbA2HPAI, 63-612F/64-33R, 63-612F/64-232R, 63-612F/64-394R, 63-241F/64-33R et 63-334F/64-33R pour les numéros 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7, respectivement. Les contrôles (négatifs) sont indiqués (n°1 et 2) ainsi que la taille des bandes attendues.

En **B**, gel d'agarose 1.5% après électrophorèse. Les puits contiennent les produits de PCR décrites ci-dessus.

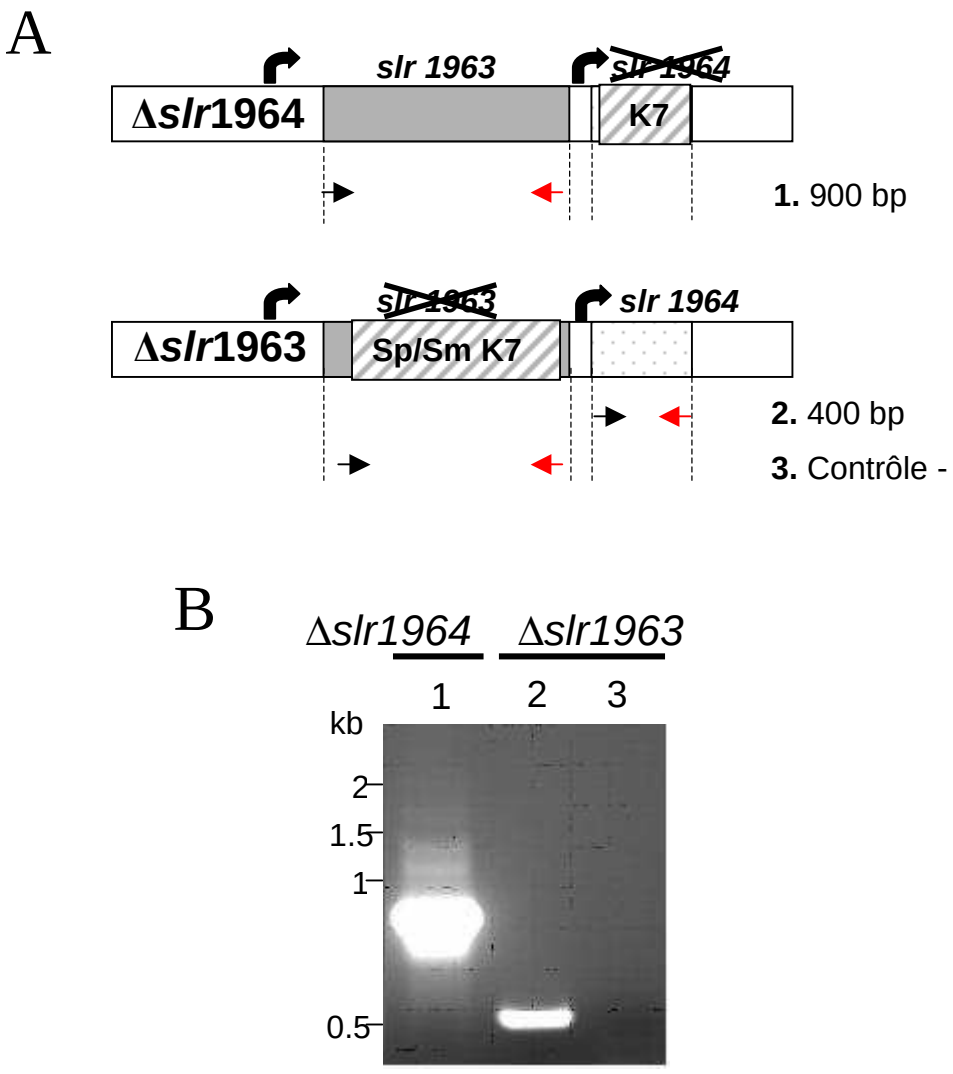


Figure CIV.8 : *slr*1963 et *slr*1964 peuvent aussi être transcrits indépendamment dans *Synechocystis*

En **A**, schéma de l'organisation des gènes *slr*1963 et *slr*1964 dans les mutants Δ*slr*1964 (ΔFRP) et Δ*slr*1963 (ΔOCP) où le gène codant pour la FRP et pour l'OCP a été stoppé par l'insertion d'une cassette de résistance à la spectinomycine et la streptomycine, respectivement (pour plus de détails voir tableau 2). 1µg d'ARN purifié issu du mutant Δ*slr*1964 (n°1) et du mutant Δ*slr*1963 (n°2 et 3) a été utilisé dans la réaction de transcription réverse avec l'oligopeptide réverse (flèche rouge) : CarR, 64R et CarR pour les numéros 1, 2 et 3, respectivement (voir tableau 4). Ensuite une PCR a été réalisée sur l'ADNc de la transcription réserve avec les oligopeptides (flèches rouge et noire) : CarF/CarR, 64F/64R, et CarF/CarR pour les numéros 1, 2 et 3, respectivement. Un des contrôles (négatif) est indiqué (n°3) ainsi que la taille approximative des bandes attendues (900 pb et 400 pb, pour n°1 et 2, respectivement).

En **B**, gel d'agarose 1.5% après électrophorèse. Les puits contiennent les produits de PCR décrites ci-dessus.

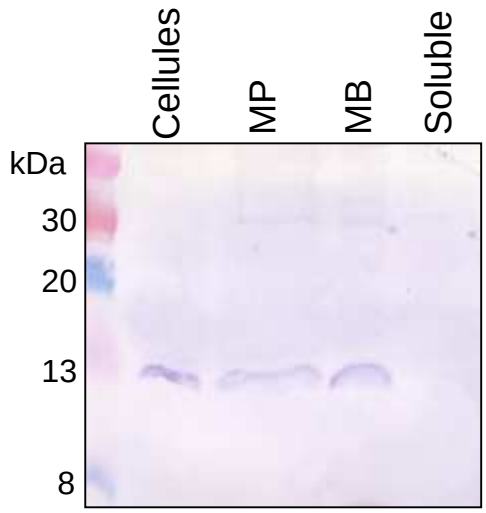


Figure CIV.9 : La FRP n'est pas une protéine soluble chez *Synechocystis*
La figure montre un western blot anti-FRP (dilution de l'anticorps 1/1000). Des cellules du mutant Δ*64*CB19 (surexprimant la FRP) en phase exponentielle de croissance (DO_{800nm} = 0.8) ont été collectées. Ensuite, les cellules ont été cassées soit dans un tampon 100mM TrisHCl pH 8, soit dans un tampon 0.7M K-phosphate et 0.3M Na-Citrate (pH 6.8) pour aboutir après centrigugation à l'extraction des membrances (« MB ») et des membranes+phycobilisomes (« MP ») dans le culot, respectivement. La fraction « soluble » correspond au surnageant qui contient les protéines solubles dans l'expérience où les membranes (tampon 100mM TrisHCl pH 8) ont été collectées dans le culot. 40µg de protéines totales (= 4 µg Chl pour les fractions qui contiennent de la chlorophylle) ont été chargées sur le gel qui a servi pour le western blot. Le marqueur coloré (à gauche) est exprimé en kDa. Cette expérience est une expérience représentative de 3 réplicats.

4. Les gènes *slr*1963 et *slr*1964 sont-ils co-transcrits ?

La quantité de la FRP dans les mutants surexprimant l'OCP et la FRP est plus faible que celle retrouvée dans les mutants surexprimant uniquement la FRP (figure CIV.6). Le fait que les gènes homologues à *slr*1963 et *slr*1964 soit conservés en continuité chez les cyanobactéries supporte l'idée que ces gènes sont co-transcrits, cependant le résultat cité précédemment est un argument contre cette proposition à moins que la FRP et/ou son ARN messager ne soit dégradé(s) plus rapidement dans les mutants qui surexpriment aussi l'OCP. Afin d'apporter des réponses à ce questionnement, l'ARN messager issu du gène de l'OCP (*slr*1963) et du gène le la FRP (*slr*1964) a été étudié par RT-PCR dans un mutant surexprimant à la fois l'OCP et la FRP (Δ*64*CB14) de *Synechocystis*. La figure CIV.7 démontre que *slr*1963 et *slr*1964 sont co-transcrits dans ce mutant, les puits 3 à 7 montrent que différents produits de PCR correspondant à différentes parties de l'ARN messager co-transcrit sont détectés. Cependant, la figure CV.9 montre que les gènes codant pour l'OCP et la FRP, *slr*1963 et *slr*1964, peuvent aussi être transcrits indépendamment. En effet, la figure CV.9B montre que *slr*1963 est transcrit quand le gène *slr*1964 est inactivé (puits 1) et, à l'inverse, *slr*1964 peut aussi être transcrit quand le gène *slr*1963 est inactivé (puits 2). Ces résultats indiquent que les gènes codant pour la FRP et l'OCP peuvent être à la fois transcrits indépendamment et co-transcrits. La co-transcription a aussi été vérifiée dans la souche sauvage de *Synechocystis* (données non montrées), certains produits de PCR courts correspondant à un ARN messager co-transcrit ont été détectés mais pas l'ensemble des produits décrits dans la figure CV.9. Cette donnée indique que soit l'ARN messager des deux gènes co-transcrits est moins stable, soit qu'il est produit en plus faibles quantités dans le sauvage. L'ensemble de ces données, notamment la présence des deux modes de transcription, supporte l'idée d'une régulation des gènes *slr*1963 et *slr*1964 (voir la discussion pour plus de détails).

5. Isolement de la FRP et étude de l'interaction entre la FRP et l'OCP chez *Synechocystis*

5.1 Localisation de la FRP

Afin de pourvoir isoler la FRP et étudier sa possible interaction avec l'OCP, je devais d'abord connaître les caractéristiques de la FRP comme sa taille et sa localisation *in vivo*. La figure CIV.9 montre que la FRP surexprimée dans le mutant Δ*64*CB19 de *Synechocystis* à une taille apparente d'environ 13kDa après migration sur un gel SDS-PAGE contenant 17% d'acrylamide. D'après les données des logiciels de prédiction des caractéristiques des

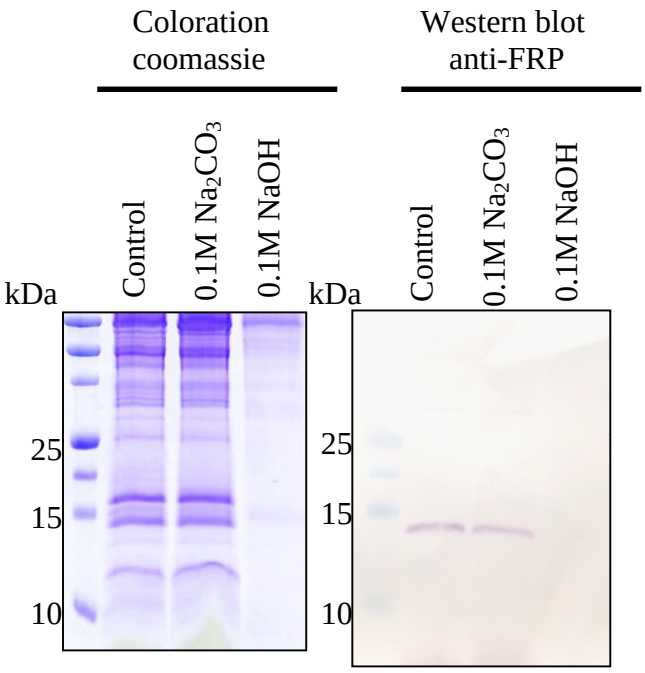


Figure CIV.10 : La FRP est une protéine attachée à la membrane chez *Synechocystis*
La figure montre un gel coloré au bleu de coomassie (à gauche) et un western blot anti-FRP (dilution de l'anticorps 1/1000) (à droite). Des membranes (MB) à 5 µg Chl.mL^{-1} du mutant Δ*64*CB19 (surexprimant la FRP) purifiées comme décrit dans les matériels et méthodes et la figure CIV.9 ont été incubées pendant 5 heures sous agitation et à température ambiante dans du tampon 100mM TrisHCl pH 8 (« Control »), avec soit 0.1M de carbonate de sodium (« 0.1M Na_2CO3 »), et soit 0.1M de soude (« 0.1M NaOH »). Les membranes ont ensuite été centrifugées, resuspendues dans 15µl de tampon 100mM TrisHCl pH 8 et chargées sur le gel. Le marqueur coloré est exprimé en kDa. Cette expérience est une expérience représentative de 3 réplicats.

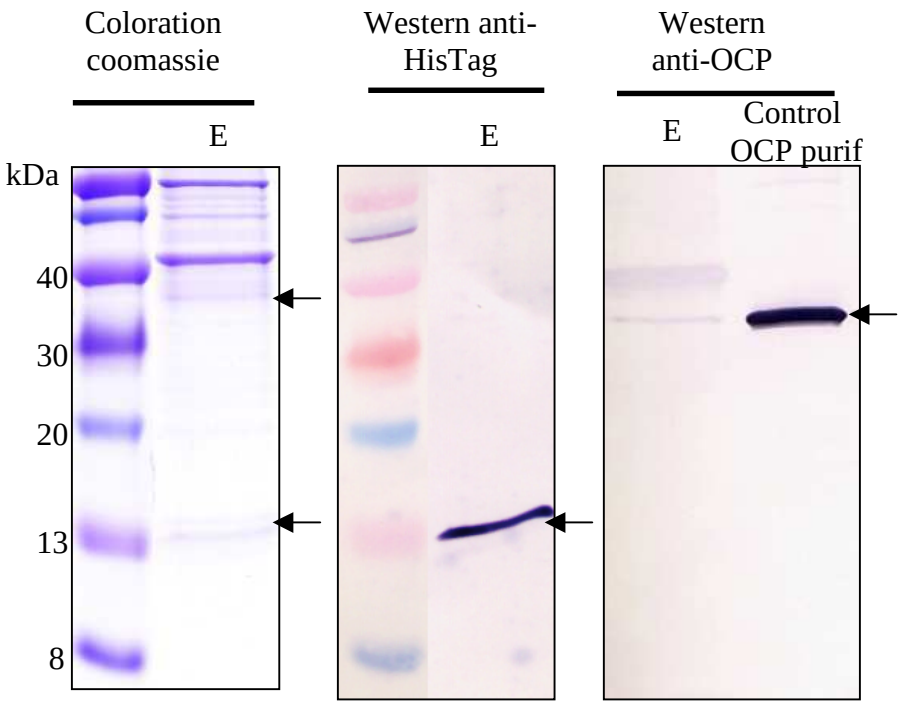


Figure CIV.11 : L'OCP co-purifie sur une colonne d'affinité HisTag avec la FRP marquée avec un HisTag chez *Synechocystis*

La figure montre, de gauche à droite, un gel coloré au bleu de coomassie, un western blot anti-HisTag (dilution de l'anticorps 1/500) et un western blot anti-OCP (dilution de l'anticorps 1/1000). 12L de cellules du mutant Δ*64*CB19 (surexprimant la FRP avec un HisTag en N-terminal) ont été concentrés à 1 mgChl.mL-1, cassés dans un tampon 100mM Tris HCl pH 8, puis incubés pendant 1 heure à 4°C en présence de 1% de β-DM et ultracentrigugés. Le surnageant contenant les protéines solubles et les protéines membranaires solubilisées a été chargé sur une colonne d'affinité HisTag. « E » correspond à la fraction éluée avec 160mM d'imidazole. « Control OCP purif » correspond à environ 1µg de l'OCP purifiée. Le marqueur coloré (à gauche) est exprimé en kDa. Les flèches indiquent la FRP à 13kDa et l'OCP à 35kDa. Cette expérience est une expérience représentative de 3 réplicats.

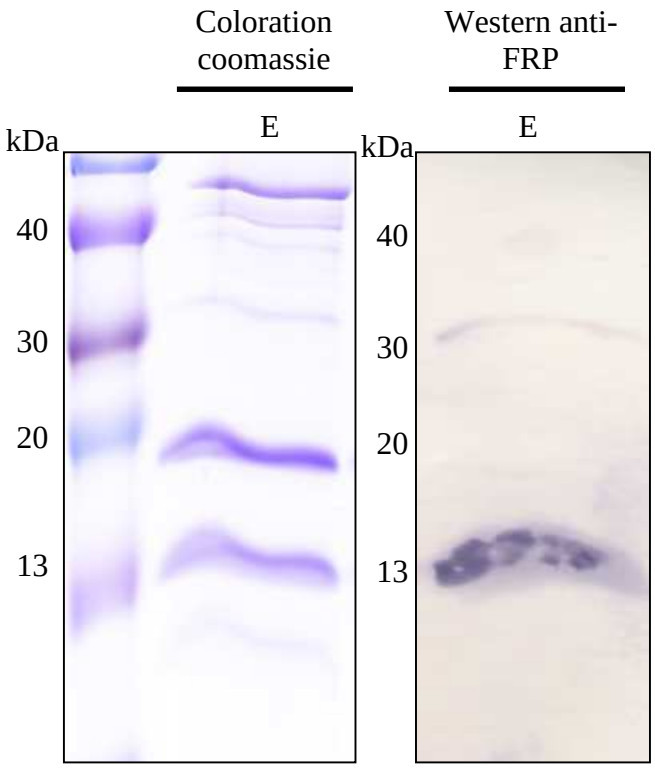


Figure CIV.12: Amélioration de la purification de la FRP marquée avec un HisTag chez *Synechocystis*

La figure montre un gel coloré au bleu de coomassie (à gauche) et un western blot anti-HisTag (dilution de l'anticorps 1/500) (à droite). 30L de cellules du mutant Δ*64*CB19 (surexprimant la FRP avec un HisTag en N-terminal) ont été concentrés à 1 mg Chl.mL^{-1}, cassés dans un tampon 100mM Tris-HCl pH 8, 1mM d'acide caproïque, 1mM de benzamidine et de la DNAase (50 µg.ml^{-1} de DNase I). Les cellules non cassées ont été ôtées par centrifugation et le surnageant a été ultracentrifugé. Les membranes culottées ont ensuite été resuspendues à 0.8 mg Chl.mL^{-1} puis incubées pendant 20 minutes à température ambiante dans un tampon 40mM de Tris-HCl pH 8, 150mM de tampon K-phosphate pH 8, 500mM de NaCl et 10% de glycérol en présence de 1.2% de β-DM et ultracentrigugés. Le surnageant contenant les protéines membranaires solubilisées a été mélangé dans un bécher contenant 20mL de résine Ni-ProBond (Invitrogen) préalablement équilibrée avec 40mM de Tris-HCl pH 8, 150mM de tampon K-phosphate pH 8, 500mM de NaCl, 0.03% de β-DM et 10% de glycérol. La résine a été chargée sur une colonne puis lavée. La FRP a ensuite été éluée avec 160mM d'imidazole dans le tampon d'équilibration. L'éluat a été concentré et dialysé contre 40mM de Tris-HCl pH 8 + 0.03% de β-DM à 4°C pendant 12h. « E » correspond à 15µl de la fraction éluée avec 160mM d'imidazole après dialyse et concentration (volume total : environ 1mL). Le marqueur coloré (à gauche) est exprimé en kDa.

protéines, la FRP est une protéine soluble. Et étant donné que nous supposions une interaction entre la FRP et l'OCP et/ou les phycobilisomes, nous nous attendions à trouver la FRP dans la fraction des protéines solubles. Cependant, la figure CIV.9 montre qu'elle est retrouvée dans les fractions de membranes (MB) et de membranes purifiées avec les phycobilisomes (MP) mais qu'elle n'est pas présente dans la fraction soluble. J'ai ensuite incubé les membranes avec différentes solutions afin d'avoir une première idée sur la qualité de la liaison de la FRP avec la membrane (figure CIV.10). La FRP n'est pas sous forme de corps d'inclusion car elle est absente du culot après incubation de MB avec 0.1M de soude qui détruit la membrane. De plus, il apparaît qu'elle est assez fortement liée à la membrane car l'ajout de 0.1M de carbonate de sodium ne suffit pas à la décrocher (ou en décroche très peu) (figure CIV.10). Des expériences complémentaires sont nécessaires pour juger de la force de l'attachement de la FRP à la membrane, par exemple une incubation avec 1M de chlorure de calcium ou avec 0.5-1M de thiocyanate (Lagoutte et Vallon 1992).

5.2 Isolement de la FRP chez *Synechocystis* et premières données sur l'interaction OCP-FRP

J'ai commencé par isoler la FRP sur une colonne d'affinité grâce à son HisTag en utilisant les protéines totales (membranaires + solubles) du mutant Δ*64*CB19 (surexprimant uniquement la FRP avec un HisTag en N-terminal). Dans ces expériences, les cellules (12L) ont été cassées, concentrées à 1mg Chl.mL^{-1} et incubées pendant 1 heure à 4°C en présence de 1% de β-DM avant d'être chargées sur la colonne d'affinité (voir les matériels et méthodes pour les détails). Les protéines contenues dans la fraction d'élution sont montrées sur la figure CIV.11. Cette fraction d'élution contenait la FRP (bande à 13kDa) mais elle contenait aussi des complexes membranaires de haut poids moléculaires de couleur vert-jaune et d'autres protéines (gel coomassie de la figure CIV.11). Un western blot avec l'anticorps anti-HisTag sur cette fraction d'élution confirme la présence de la FRP à 13kDa. Une purification de la fraction d'élution obtenue après la chromatographie d'affinité a été testée en réalisant une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne contenant du DEAE-52 cellulose, même en travaillant sur une petite colonne, toute la FRP a été perdue.

Afin d'améliorer la purification de la FRP, plusieurs séries d'expériences ont été réalisées à partir des cellules de *Synechocysis*. La FRP a seulement été isolée avec succès dans les mutants contenant un HisTag en N-terminal et le rendement était meilleur avec le mutant Δ*64*CB19 (données non montrées). Ce résultat est en accord avec la figure CIV.6 qui montre que ce mutant est celui qui produit la plus grande quantité de FRP avec un HisTag en N-terminal. Le fait que la purification avec l'HisTag en C-terminal soit impossible suggère que cette partie conservée de la protéine n'est pas accessible, la partie C-terminale de la FRP se trouverait donc à l'intérieur de la protéine. J'ai aussi tenté de purifier la FRP sans les protéines de haut poids moléculaire, plusieurs détergents ont été testés (triton, β-DM),

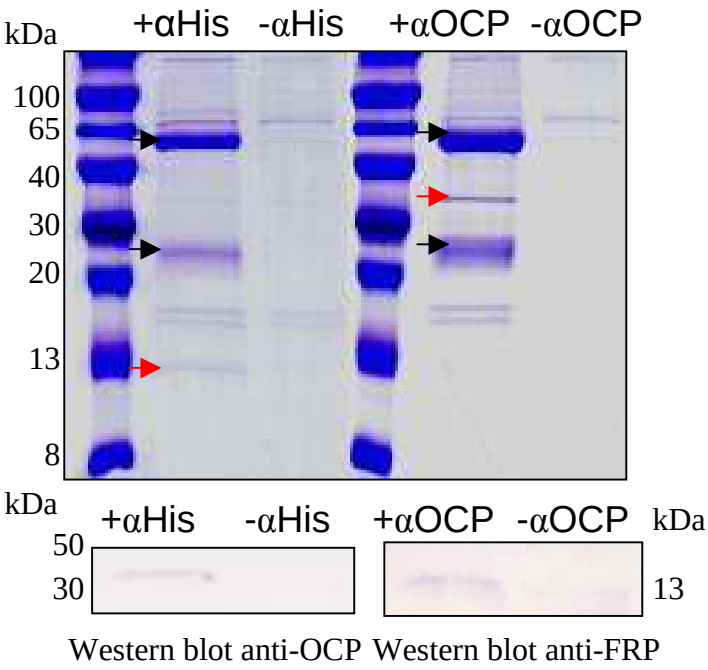


Figure CIV.13 : La FRP et l'OCP intéragissent chez *Synechocystis*
La figure montre une expérience de co-immunoprécipitation. 4 x 500µg de protéines totales de cellules du mutant Δ*64*CB19 (surexprimant la FRP avec un HisTag en N-terminal et exprimant l'OCP comme le sauvage) ont été solubilisées pendant 1h à 4°C dans un tampon 50mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 5mM d'EDTA, 1% de β-DM et 0.5% de triton. Elles ont ensuite été incubées pendant 12h à 4°C après ajout de 10µl d'anticorps anti-HisTag (« +αHis »), sans anticorps (« -αHis », contrôle), après ajout de 10µl d'anticorps anti-OCP (« +αOCP ») et sans anti-corps (« -αOCP », contrôle). Puis, une incubation pendant 5h avec 5mg de billes de protéine A sépharose a permis aux protéines accrochées aux anticorps de précipiter avec les billes. Les billes ont ensuite été lavées, et les protéines accrochées à la protéine A ont été éluées par le tampon de chargement du gel SDS-PAGE. Les expériences («+αHis , -αHis, +αOCP, -αOCP ») ont été chargées sur un gel SDS-PAGE (en haut de la figure, voir le gel coloré au bleu de coomasssie). Un western blot anti-OCP (dilution des anticorps 1/1000) a été réalisé sur «+αHis » et « -αHis ». Et un western blot anti-FRP (dilution des anticorps 1/1000) a été réalisé sur «+αOCP » et « -αOCP ». Le marqueur coloré (à gauche) est exprimé en kDa. Les flèches rouges indiquent la FRP à 13kDa et l'OCP à 35kDa ; et les flèches noires indiquent les grandes sous-unités (environ 50kDa) et les petites sous-unités (environ 25kDa) des IgG des anticorps.

à différentes concentrations (0.5%, 1% et 2%), avec différents temps (1h, 2h, 5h) et températures d'incubation (4°C et température ambiante). Le meilleur résultat est celui montré dans la figure CIV.12. Pour éliminer au maximum les complexes de protéines membranaires de haut poids moléculaires, les principaux paramètres modifiés par rapport à ceux décrits dans le premier paragraphe de cette partie sont les 3 suivants (voir aussi les matériels et méthodes). (1) Seule la fraction membranaire (insoluble) a été utilisée. (2) L'incubation des protéines insolubles a eu lieu à 0.8mg Chl.mL^{-1} dans 1.2% de β-DM à température ambiante pendant 20 minutes. (3) Après ultracentrifugation, les protéines solubilisées ont été mélangées dans un bécher avec la résine puis chargées sur une colonne. Cependant, la figure CIV.12 montre que la FRP n'est pas encore totalement purifiée. Des efforts concernant sa purification dans *Synechocystis* sont encore nécessaires.

Les premières données suggérant une interaction OCP-FRP ont été obtenues lors des premiers essais d'isolement de la protéine FRP chez *Synechocystis*. Le western blot avec l'anticorps anti-HisTag sur la fraction d'élution décrit dans la figure CIV.11 indique la présence de la FRP à 13kDa. Et un western-blot avec des anticorps anti-OCP sur cette même fraction d'élution indique que l'OCP co-purifie avec la FRP dans nos conditions expérimentales (figure CIV.11). Ce résultat suggère que l'OCP et la FRP interagissent.

5.3 Etude de l'interaction OCP-FRP par co-immunoprécipitation

Afin de confirmer l'interaction OCP-FRP, des expériences de co-immunoprécipitation (figure CIV.13) ont été réalisées. Dans ces expériences, des anti-corps anti-HisTag (souris, Sigma) ou anti-OCP (lapin, Covalab) ont été incubés avec les protéines totales (membranaires + solubles, voir la légende de la figure CIV.13 et les matériels et méthodes) du mutant Δ*64*CB19 contenant l'OCP sauvage et la FRP surexprimée avec un HisTag en N-terminal. Les anticorps ont été précipités avec les protéines qu'ils accrochent par l'ajout de billes de sépharose liées à de la protéine A. Les protéines précipitées ont ensuite été analysées par western blot avec des anticorps anti-OCP et anti-FRP (lapin, Covalab), respectivement (voir des matériels et méthodes pour plus de détails) (figure CIV.13). La figure CV.14 montre premièrement que la FRP avec un HisTag en N-terminal est bien accrochée par l'anticorps anti-HisTag, et que l'OCP est bien accrochée par l'anticorps anti-OCP car une bande à 13kDa (puit « +αHis ») et une bande à 35kDa (puit « +αOCP ») sont respectivement observées sur le gel coloré au bleu de coomassie. Deuxièmement, la figure CIV.13 montre que la FRP co-précipite avec l'anticorps anti-OCP et que l'OCP co-précipite avec l'anticorps anti-HisTag. Ces expériences ont été répétées et la détection des bandes par western blot après co-immunoprécipitacion est parfois faible, cela est probablement dû au fait que peu de FRP est présente par rapport à l'OCP (voir discussion). Cependant ces résultats cumulés avec les

expériences de co-purification sur colonne d'affinité suggèrent fortement que l'OCP et la FRP interagissent.

6. Conclusion du chapitre IV

Ce chapitre IV qui décrit le travail sur la FRP dans *Synechocystis* aura une discussion commune avec le chapitre V qui décrit le travail sur la FRP recombinante dans *E.coli*. Le projet « FRP » est le travail le plus important de mon doctorat. J'ai participé à la découverte d'une nouvelle protéine impliquée dans le mécanisme de photo-protection qE_{cya} et à sa caractérisation. Avant la réalisation de ce travail rien n'était connu sur la FRP.

Désormais, grâce aux résultats décrits dans ce chapitre IV, il est connu que le gène homologue à *slr*1964 (codant pour la FRP) a co-évolué avec le gène homologue à *slr*1963 (codant pour l'OCP) chez les cyanobactéries car ils sont retrouvés en continuité l'un de l'autre. L'étude de l'ARN messager de ces gènes a montré que *slr*1963 et *slr*1964 sont co-transcrits (au moins quand ils sont surexprimés) et que *slr*1964 peut aussi être transcrit indépendamment. L'étude du phénotype de mutants taggés surexprimant la FRP ou surexprimant à la fois l'OCP et la FRP, a permis de montrer que la FRP est une protéine de 13kDa liée à la membrane et impliquée dans la récupération de fluorescence du mécanisme qE_{cya} après une forte illumination. La partie C-terminale très conservée de la FRP est importante pour son mécanisme car un Tag en C-terminal ralentit la cinétique de récupération. J'ai aussi montré que peu de FRP est nécessaire par rapport à l'OCP pour permettre 100% de la récupération de fluorescence et que la cinétique de récupération de fluorescence est plus rapide quand le ratio FRP/OCP augmente. De plus, des expériences de co-purification de la FRP et de l'OCP par chromatographie d'affinité ainsi que des expériences de co-immunoprécipitation suggèrent fortement que l'OCP et la FRP interagissent.

Chapitre V : Purification et utilisations de la Fluorescence Recovery Protein (FRP) recombinante produite dans *E.coli*

En parallèle, au travail sur la FRP dans *Synechocystis,* j'ai construit des souches pour la surproduire dans *E. coli*. Ces constructions avaient pour but de produire de la FRP recombinante au cas où la purification de la protéine FRP native dans *Synechocystis* serait difficile. La protéine recombinante pouvait ainsi servir à produire des anticorps anti-FRP, à faire des expériences d'interaction OCP-FRP *in vitro* et à réaliser la structure de cette protéine.

Les difficultés rencontrées pour la surexpression de la FRP chez *E. coli*, sa purification et l'obtention des anticorps actifs ainsi que les faibles quantités de FRP présentes dans les différentes souches de *Synechocystis* ont fait que ce travail a duré plus de temps que prévu initialement. La caractérisation de la FRP n'est donc pas complètement terminée même si elle est très avancée.

Ce chapitre V est un chapitre de résultats axé sur la mise au point de méthodes. Il décrit la mise au point de la méthode de purification de la FRP recombinante produite sous forme de corps d'inclusion dans *E.coli*, ainsi que les différentes utilisations qui ont pu en être faites avant la fin de mon doctorat.

1. Purification de la FRP recombinante dans *E.coli*

1.1 Constructions réalisées dans *E.coli* pour surproduire la FRP

Comme décrit dans le paragraphe d'introduction ci-dessus, des souches *E.coli* surexprimant la FRP ont été construites. Premièrement, j'ai construit des souches avec un vecteur (pASK-IBA) surexprimant la FRP avec un StrepTag en N et C-terminal, BL21pCB7 et BL21pCB8, respectivement (figure MM.1, MM.2 et CV.1A, tableaux 2 et 3). La figure CV.1B montre que la FRP est faiblement exprimée dans les souches la « surexprimant » avec un StrepTag. De plus, la FRP recombinante obtenue n'est pas soluble mais est sous forme de corps d'inclusion. Plusieurs conditions d'expression ont été testées : la température de croissance (18°C, 25°C, 37°C), le temps de croissance des cellules après induction (2h, 6h, 12h, 48h), la qualité du milieu de culture (Luria-Bertani Broth « LB », Terrific Broth « TB ») ; cependant les souches BL21pCB7 et BL21pCB8 produisent toujours une protéine recombinante sous forme de corps d'inclusion en faible quantité. Face à ce problème, nous avons construit une nouvelle souche, nommée BL21pCB9, contenant un autre

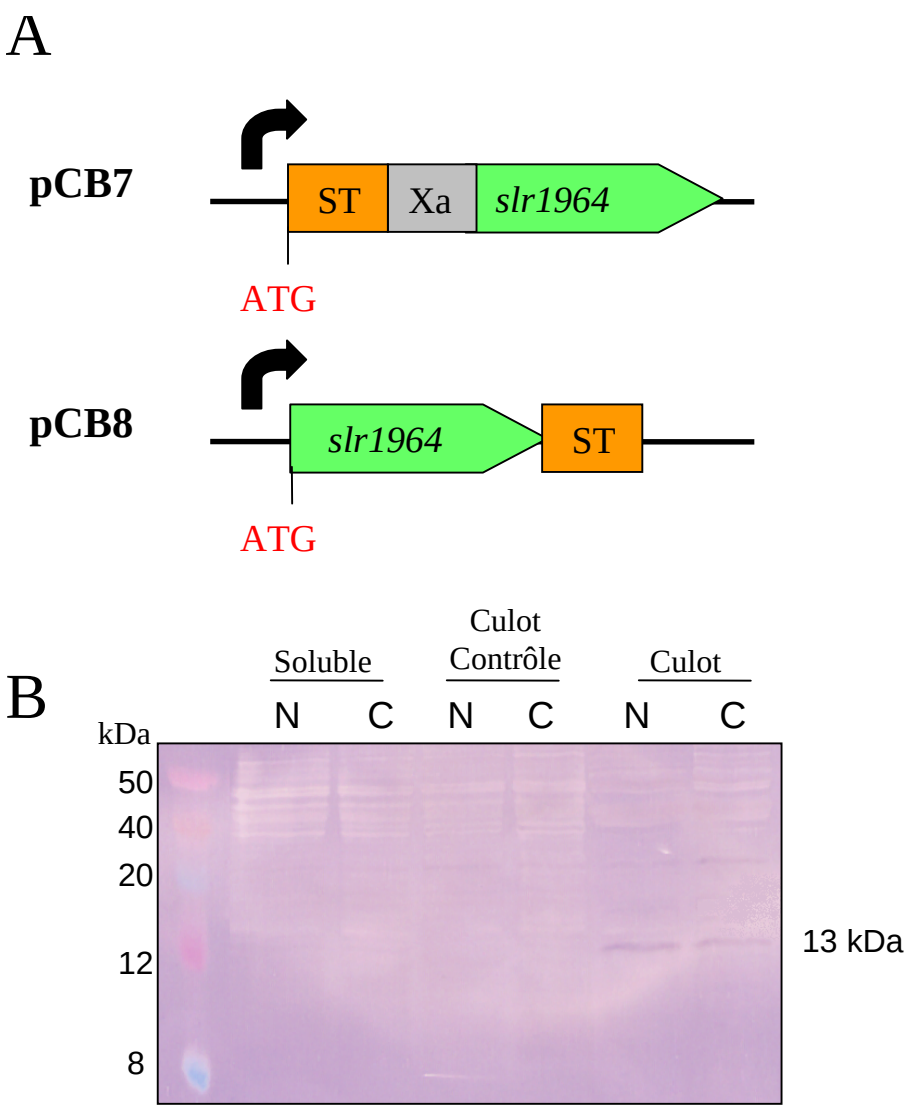


Figure CV.1: Purification de la FRP surproduite avec un StrepTag chez *E. coli*
En **A**, les constructions pCB7 (Tag en N-terminal) et pCB8 (Tag en C-terminal) sont représentées (pour plus de détails voir tableau 2). ST correspond à StrepTag et Xa au facteur de coupure Xa.
En **B**, un western blot anti-StrepTag est montré. Des cellules de *E. coli* BL21 (souche adaptée pour la surproduction de protéines) ont été transformées avec les plasmides pCB7 et pCB8. Les cellules ont été cultivées (200mL) à 37°C et la surexpression a été induite à DO_{600nm}= 1 avec 200µg.mL^{-1} d'anhydrotétracycline. Après leur incubation pendant 12h, les cellules ont été cassées par sonication (dans un tampon 100mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 1mM d'EDTA, 1mM d'acide caproïque, 1mM de benzamidine et de la DNAase) et centrifugées pour séparer les protéines solubles (« Soluble ») des membranes et corps d'inclusion («Culot »). « Culot contrôle » sont les protéines contenues dans le culot, après le traitement décrit ci-dessus, de cellules avec les plasmides contrôles « N » (pASK-IBA7^{+}) et « C » (pASK-IBA3^{+}) sans le gène *slr*1964. N fait référence à Tag en N-terminal et C en C-terminal. Les chiffres à gauche sont les poids moléculaires en kDa du marqueur. 40µg de protéines ont été chargées par puits. La FRP est détéctée à 13kDa dans la fraction insoluble.

vecteur d'expression (pET-15b) où la protéine est surexprimée avec un HisTag en N-terminal (tableau 2, figure MM.1, MM.3 et CV.2A). Cette nouvelle souche produit toujours la FRP sous forme de corps d'inclusion (plusieurs conditions d'expression ont aussi été testées) mais en quantité beaucoup plus importante que la souche avec le StrepTag. En effet, une bande importante est observée à 14kDa sur un gel contenant les protéines totales de la souche BL21pCB9 colorées au bleu de coomassie (figure CV.2B, 1er puit) et réagit avec l'anticorps anti-HisTag (donnée non montrée). La protéine FRP recombinante obtenue avec cette construction migre donc un peu différemment que la protéine native sur un gel SDS-PAGE 17% car les bandes observées migrent à 14kDa et 13kDa, respectivement (figure CIV.11 et CV.2B). Le repliement est peut-être différent dans la protéine recombinante à cause de l'ajout du Tag et du site de coupure de la thrombine (figure CV.1A).

1.2 Solubilisation et purification de la FRP surproduite sous forme de corps d'inclusion

La mise au point du protocole de solubilisation et de purification de la FRP sous forme de corps d'inclusion produite par la souche BL21pCB9 a duré longtemps. En effet, la FRP sous forme de corps d'inclusion ne se solubilise pas avec les produits classiques utilisés pour la solubilisation des corps d'inclusion, c'est à dire de l'urée à 8M ou du guanidinium-HCl à 4M. Plusieurs méthodes pour purifier la FRP ont été testées : avec des lavages plus ou moins forts des corps d'inclusion, avec des concentrations d'urée et de guanidinium-HCl différentes, en chauffant ou pas, à différent pH, ainsi qu'une purification dénaturante sur colonne d'affinité HisTag (tampon de solubilisation contenant 8M d'urée puis tampons avec des concentrations d'urée et des pH décroissants). Le résultat de ces expériences étant peu concluant, un détergent fort a été utilisé : du lithium dodécylsulfate (LiDS). Je me suis inspirée des méthodes décrites dans des travaux sur l'isolement et la reconstitution de différents LHC des plantes supérieures (Paulsen *et al.* 1990; Giuffra *et al.* 1996; Schmid *et al.* 1997). Dans ces travaux, ce détergent a été utilisé avec succès pour solubiliser des protéines membranaires recombinantes du LHC. Le protocole de purification de la FRP décrit dans les matériels et méthodes est celui mis au point en utilisant ce détergent. La méthode commence par la purification (le lavage) des corps d'inclusion par une série de sonication/centrifugation/resuspension en présence de triton décrite dans les figures CV.2B et CV.3. Le but de ce traitement est de détruire au maximum les fragments de membrane qui pourraient contaminer le culot qui contient les corps d'inclusion. Les corps d'inclusion sont ensuite solubilisés en utilisant 1 à 2% de LiDS, les figures CV.4 et CV.5 comparent l'efficacité de solubilisation du LiDS par rapport à 8M d'urée. La FRP solubilisée a ensuite été dialysée O/N contre un tampon Tris-HCl pour ôter un maximun de LiDS et chargée sur une colonne contenant une résine d'affinité HisTag.

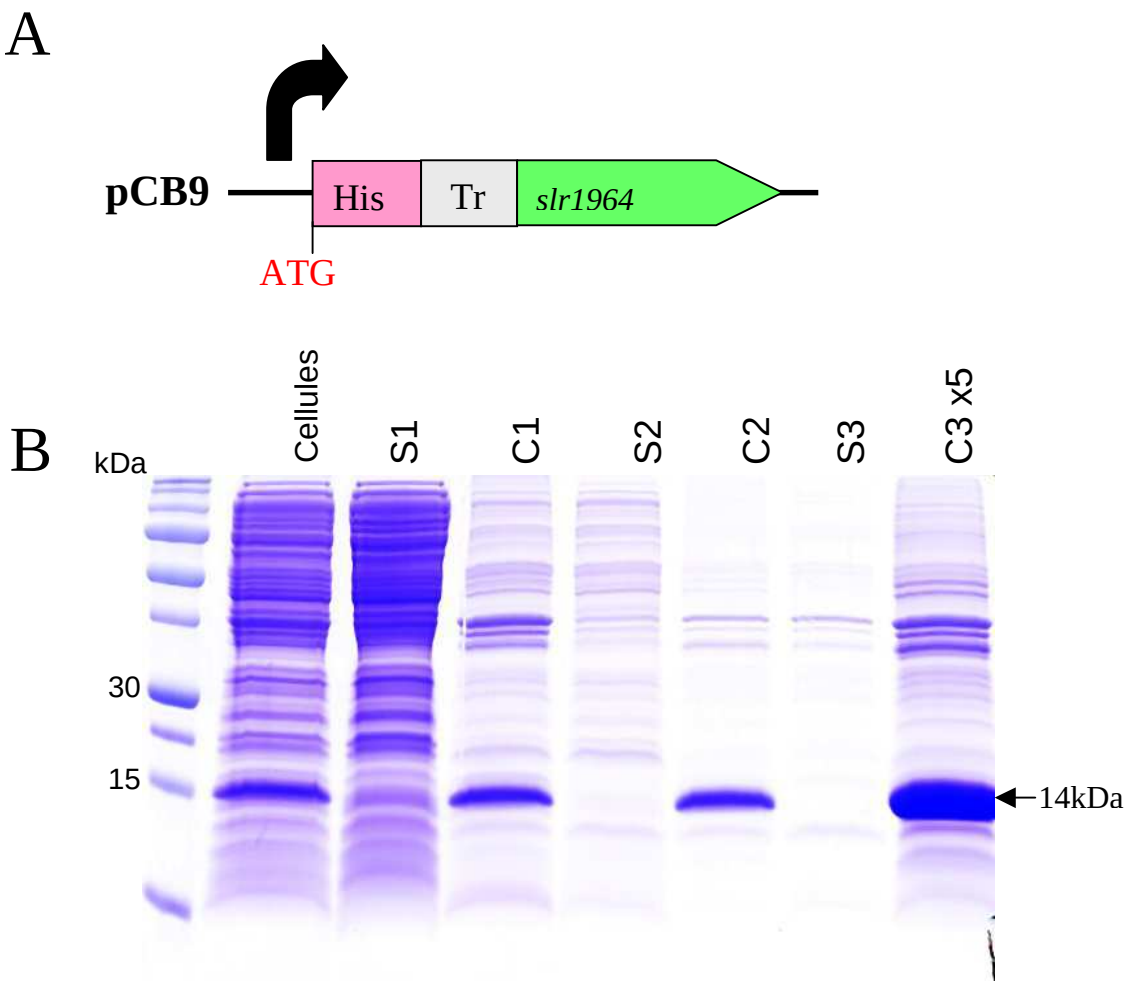


Figure CV.2 : Suivi du lavage des corps d'inclusion de la FRP avec un HisTag chez *E. coli*

Des cellules de *E. coli* BL21 (souche adaptée pour la surproduction de protéines) ont été transformées avec le plasmide pCB9 qui permet la surproduction de la FRP (**A**) (pour plus de détails voir tableau 2 et figure CV.3). His correspond à HisTag et Tr au site de coupure « thrombine ». Les cellules ont été cultivées (375mL) à 37°C et la surexpression a été induite à DO_{600nm}= 0.5 avec 0.8M d'IPTG. Après leur incubation pendant 12h, les cellules ont été centrifugées et resuspendues dans 50mL de tampon 20mM Tris-HCl pH 8, 100mM NaCl, 5mM d'acide caproïque, 5mM de benzamidine, 2mM de $MgCl_2$, 0.5% de triton et de la DNAase. Puis les cellules ont été cassées et les corps d'inclusion purifiés dans le culot par 3 étapes successives de sonication/centrifugation/resuspension dans 50mL de tampon (figure CV.3). **B** montre le suivi de cette expérience de purification des corps d'inclusion. 5µl des 50mL (du surneagant S1 après centifugation et du culot C1 resuspendu après le cycle n°1…etc) ont été chargés par puits, le dernier culot a été resuspendu dans 10mL, il est donc 5 fois plus concentré, et l'on voit clairement que la FRP a été concentrée par rapport aux cellules du départ. Les chiffres à gauche sont les poids moléculaires en kDa du marqueur. La FRP est détéctée à 14kDa dans la fraction insoluble.

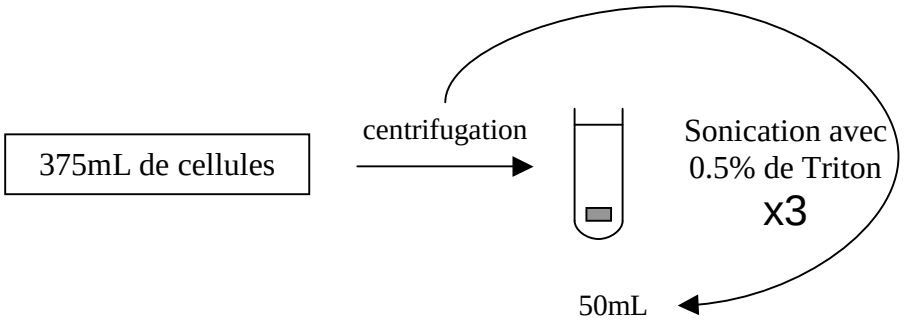


Figure CV.3 : Schéma du lavage des corps d'inclusion de la FRP avec un HisTag chez *E. coli*

Les cellules ont été cultivées (375mL) à 37°C et la surexpression a été induite à DO_{600nm}= 0.5 avec 0.8M d'IPTG. Après leur incubation pendant 12h, les cellules ont été centrifugées et resuspendues dans 50mL de tampon 20mM Tris-HCl pH 8, 100mM NaCl, 5mM d'acide caproïque, 5mM de benzamidine, 2mM de $MgCl_2$, 0.5% de triton et de la DNAase. Puis les cellules ont été cassées et les corps d'inclusion purifiés dans le culot par 3 étapes successives de sonication/centrifugation/resuspension dans 50mL de tampon (voir figure CV.2B pour le suivi de l'expérience).

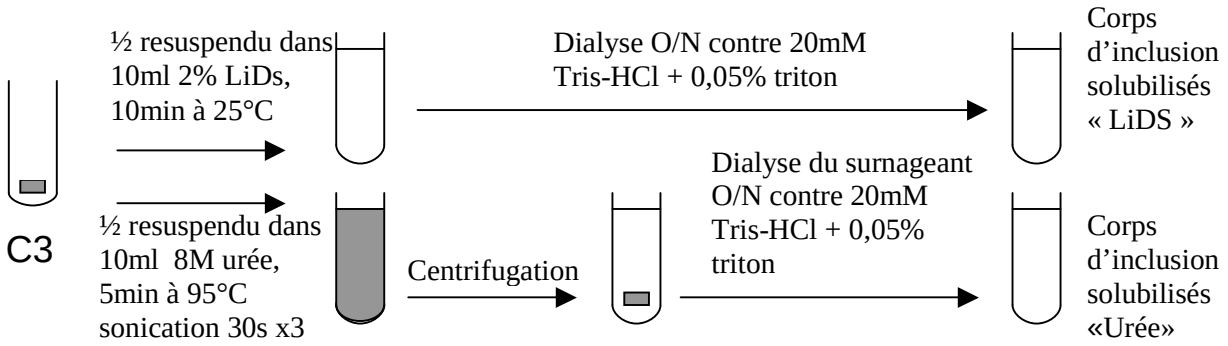


Figure CV.4 : Tests de solubilisation de la FRP avec de l'urée et du LiDs
La figure montre deux expériences de solubilisation de la FRP purifiée sous forme de corps d'inclusion, l'une en utilisant du Lithium Dodecyl Sulfate (LiDS), l'autre en utilisant de l'urée. Le culot contenant les corps d'inclusion purifiés (culot C3 de la figure CV.2) a été resuspendu dans 10mL de tampon 100mM Tris-HCl pH 8, 12.5% de saccharose, 5mM de benzamidine et 5mM d'acide caproïque avec soit 8M d'urée soit 2% de LiDS. Après 10min d'agitation à 25°C la solution contenant le LiDS est limpide, elle a ensuite été dialysée O/N contre un tampon 40mM Tris-HCl pH 8 et 0,03% de β-DM, et les 12mL de corps d'inclusion solubilisés « LiDS » ont été conservés à 4°C. Après 5min à 95°C la solution contenant l'urée est trouble, elle a ensuite été centrifugée, puis le surnageant a été dialysé O/N contre un tampon 40mM TrisHCl pH 8 et 0,03% de β-DM, et les 12mL de corps d'inclusion solubilisés « urée » ont été conservés à 4°C.

Pour avoir un repliement de la meilleure qualité possible, deux méthodes ont été testées pour ôter le LiDS. Le LiDS a été précipité soit grâce à l'ajout de KCl, soit grâce à l'ajout de cyclodextrine (voir des détails dans les matériels et méthodes). Le KCl était utilisé pour ôter le LiDS dans un article de Giuffra *et al.* où ce détergent a été utilisé pour solubiliser avec succès une protéine membranaire recombinante (Giuffra *et al.* 1996). La cyclodextrine est une sorte de chaperone capable de séquestrer le LiDS (Rozema et Gellman 1996; Otzen et Oliveberg 2001) qui a tendance à entourer une protéine solubilisée et à gêner son bon repliement. L'utilisation de la cyclodextrine devait donc permettre un meilleur repliement de la FRP en ôtant le LiDS qui se trouvait autour. Après avoir fait ces expériences pour ôter le LiDS, la FRP recombinante solubilisée a été dialysée, purifiée sur colonne d'affinité HisTag et re-dialysée comme décrits dans les matériels et méthodes. La figure CV.6 montre que la FRP purifiée dans la fraction d'élution obtenue après cette chromatographie d'affinité est pure. En effet les uniques bandes à 14kDa (bande importante) et à environ 30kDa (bande plus faible) observées sur le gel coloré au bleu de coomassie réagissent avec l'anticorps anti-FRP. Le fait qu'une bande à 30kDa (environ 2 fois 14kDa) soit observée sur un gel SDS-PAGE suggère que la FRP recombinante purifiée forme des dimères qui interagissent fortement car ils sont visibles sur un gel dénaturant.

2. Obtention d'anticorps anti-FRP

Plusieurs microgrammes de la FRP ont été purifiés avec la méthode décrite précédemment. Cette FRP purifiée a servi à fabriquer les anticorps anti-FRP utilisés pour les western blot et la co-immunoprécipitation anti-FRP décrits dans le chapitre IV. Nous avons commandé les anticorps à un sous-traitant (COVALAB), deux lapins ont été inoculés avec de la FRP recombinante. Les deux sérums d'anticorps obtenus ont été testés : l'un ne présentait aucune réaction avec la FRP et l'autre une réaction spécifique à la FRP avec un Tag en N-terminal (figure CV.7). Cet anticorps ne reconnaît ni la FRP sauvage, ni la FRP avec un Tag en C-terminal, sa zone antigénique se trouve vraisemblablement à cheval sur le Tag et la partie N-terminale de la protéine (figure CV.7). Une autre méthode a aussi été testée pour obtenir un anticorps contre la FRP, des peptides de la FRP prédits pour être antigéniques ont été synthétisés et inoculés dans deux lapins (COVALAB). L'un des peptides correspondait à une séquence sur la partie N-terminale de la protéine, l'autre à une séquence sur la partie C-terminale. Les sérums d'anticorps obtenus par cette méthode « anti-peptide » ont été testés et aucun des anticorps n'a présenté une réaction contre la FRP. Ces résultats indiquent que la FRP est une protéine peu antigénique.

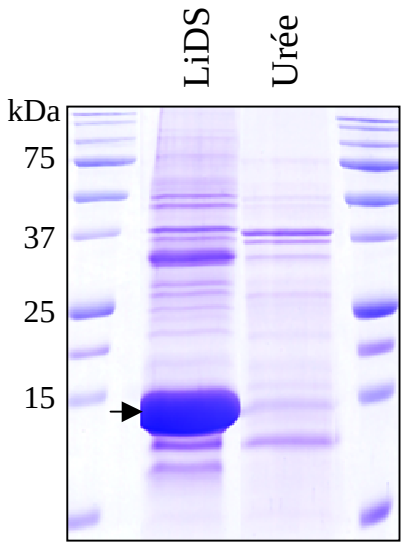


Figure CV.5 : Le LiDS permet la solubilisation de la FRP
La figure montre que le traitement à l'urée 8M ne solubilise pas la FRP sous forme de corps d'inclusion contrairement à un traitement avec 2% de Lithium Dodecyl Sulfate (LiDs). 20µl des 12mL des corps d'inclusion solubilisés avec du LiDS et de l'urée selon la méthode décrite dans la figure CV.4 ont été chargés sur un gel 17% d'acrylamide et celui-ci a été coloré au bleu de coomassie. La FRP très concentrée est observée à 14kDa (flèche) dans le puits où la fraction solubilisée au LiDS a été chargée.

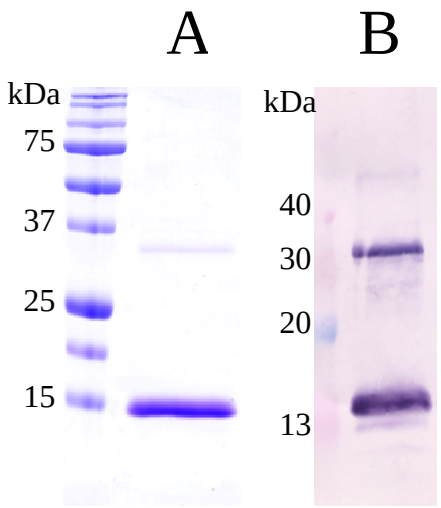


Figure CV.6 : Vérification de la pureté de la FRP recombinante purifiée
La figure montre un gel coloré au bleu de coomassie **(A)** et un western blot anti-FRP **(B)** contenant la FRP recombinante purifiée à partir de corps d'inclusion (voir les détails dans les matériels et méthodes). Après précipitation du LiDS avec de la cyclodextrine ou du chlorure de potassium et aprés dialyse, la FRP solubilisée avec du LiDS a été purifiée sur une colonne d'affinité HisTag, puis re-dialysée O/N contre un tampon 40mM Tris-HCl pH 8 et 0,03% de β-DM (voir les détails dans les matériels et méthodes). 10µg de la protéine FRP ainsi purifiée ont été chargés dans le gel coloré au bleu de coomassie **(A)** et 1µg dans le gel qui a été utilisé pour le western blot **(B)**.

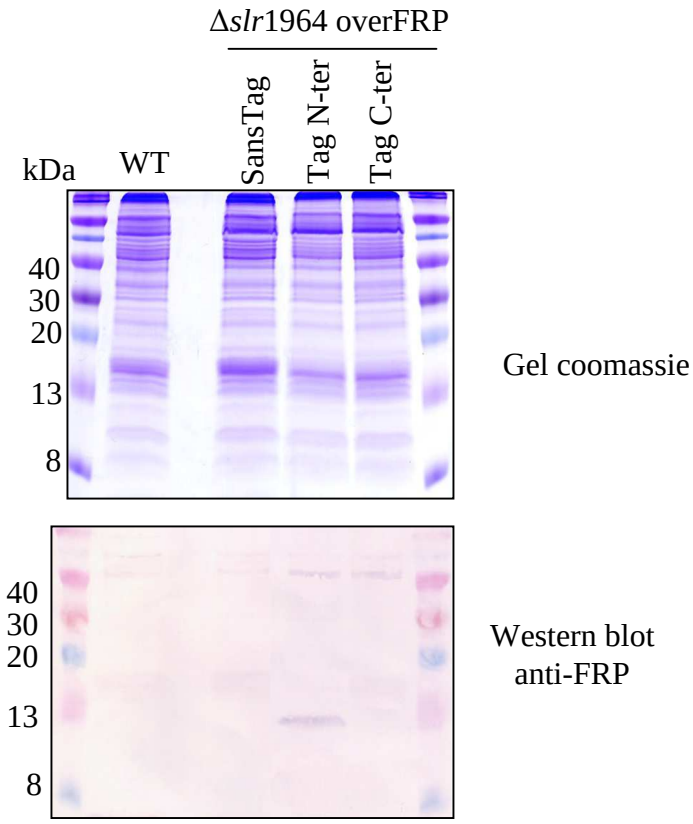


Figure CV.7 : L'anticorps anti-FRP est spécifique à la partie N-terminale de la FRP contenant un HisTag

La figure montre un gel coomassie (en haut) et un western blot anti-FRP (en bas). Les puits contiennent, de gauche à droite, des cellules à 2µg de chlorophylle du sauvage, du mutant Δ*64*CB21 surexprimant la FRP sans Tag, du mutant Δ*64*CB19 surexprimant la FRP avec un HisTag à son extrémité N-terminale et du mutant Δ*64*CB20 surexprimant la FRP avec un HisTag à son extrémité C-terminale. Cette expérience est une expérience représentative de 3 réplicats.

3. Vérification du repliement de la protéine FRP recombinante obtenue

Afin d'estimer la qualité du repliement de la FRP recombinante obtenue avec les différentes méthodes utilisant soit la cyclodextrine soit le KCl pour précipiter le LiDS (voir partie 1.2), sa fluorescence intrinsèque (après excitation à 297nm) a été mesurée. Une protéine correctement repliée a une fluorescence maximale spécifique quand le cycle aromatique de ses tryptophanes est excité à 297nm (Lakowicz 2006). La FRP de *Synechocystis* contient 2 tryptophanes (W34 et W75, figure CIV.1) donc cette technique d'analyse de la qualité du repliement d'une protéine peut être appliquée à la FRP. Le cycle aromatique des tryptophanes est dans une conformation particulière qui, quand la protéine perd sa conformation native, entraîne un shift du pic de fluorescence de la protéine. Par exemple, l'environnement apolaire dû à la présence de micelles de LiDS (ou de SDS) induit un shift vers le bleu (Otzen et Oliveberg 2001) et l'environnement plus polaire dû à l'ajout d'urée entraîne un shift vers le rouge (Walters *et al.* 2009). A priori, la FRP a été purifiée de façon à ne plus contenir ni de LiDS (soit avec la méthode de précipitation au KCl, soit avec celle de la cyclodextrine), ni d'urée et autres molécules telles que l'imidazole grâce aux dialyses contre un tampon Tris HCl 40mM pH 8 + 0,03% de β-DM. La figure CV.8 montre que la FRP recombinante obtenue dans ce tampon Tris avec la méthode de précipitation du LiDS avec du KCl ou avec de la cyclodextrine présente un pic de fluorescence à 345nm quand on excite les tryptophanes à 297nm. Dans les deux cas, l'ajout de 8M d'urée et de 2% de SDS induit un shift de la fluorescence vers le rouge et vers le bleu, respectivement (figure CV.8). De plus, l'intensité de fluorescence de la FRP recombinante (obtenue avec les deux méthodes) dans un tampon Tris est plus importante qu'après ajout d'urée ou de SDS (figure CV.8). Ces données, comparées avec les résultats de Otzen *et al.* (2001) et Walters *et al*. (2009), indiquent que la FRP recombinante obtenue est au moins partiellement repliée. En particulier, Otzen *et al.* 2001 montrent que l'état natif d'une protéine peut être observé en présence de cyclodextrine mais que des états intermédiaires (protéines partiellement repliées) peuvent aussi être observés avec une fluorescence de même maximun (345nm) mais avec une intensité plus faible. Pour affirmer à 100% que la FRP recombinante obtenue est correctement repliée, il faudrait comparer sa fluorescence (Ex297nm) à celle de la FRP purifiée dans *Synechocystis*. Cependant, malgré les efforts réalisés pour purifier la FRP surproduite dans *Synechocystis* (voir chapitre IV, partie 5.2), celle-ci n'a pas encore été obtenue pure.

4. Tests d'interaction de l'OCP avec la FRP recombinante *in vitro*

Après avoir vérifié la qualité du repliement de la FRP recombinante, nous avons choisi de réaliser des tests préliminaires d'interaction de l'OCP et de la FRP *in vitro* avec la FRP

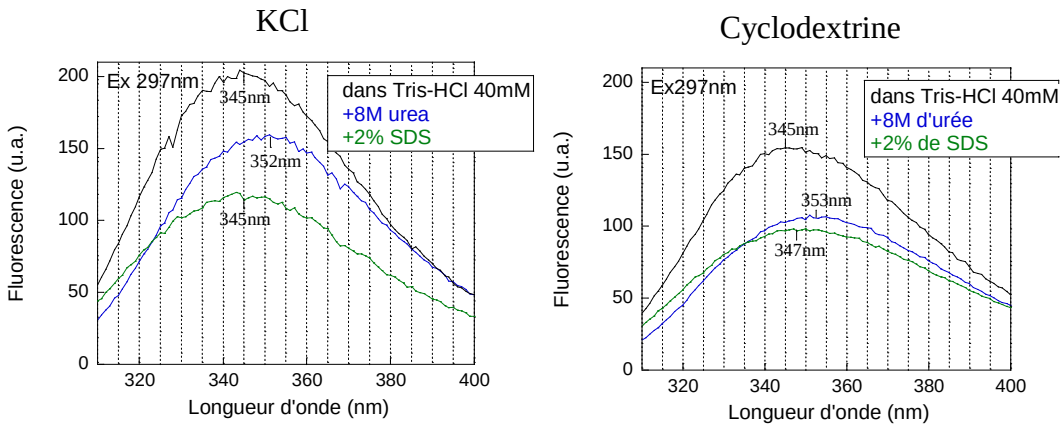


Figure CV.8 : Mesures de la fluorescence (Ex297nm) intrinsèque de la FRP recombinante dans son tampon et après ajout de différents détergents pour évaluer la qualité de son repliement

La FRP a été solubilisée avec du LiDS, un détergent fort. Deux méthodes ont été testées pour ôter le LiDS, il a été précipité avec du chlorure de potassium « KCl » ou avec de la cyclodextrine (voir les détails dans les matériels et méthodes). Après précipitation du LiDS, la FRP solubilisée a été dialysée contre un tampon Tris-HCl 40mM pH 8 + 0,05% de triton. Ensuite, la purification de la FRP solubilisée a été améliorée en passant la fraction sur une colonne d'affinité HisTag. Les fractions d'élution obtenues ont été concentrées et re-dialysées contre un tampon Tris-HCl 40mM pH 8 + 0,03% de β-DM. La qualité du repliement de ces fractions finales où le LiDS a été précipité soit avec du KCl (à gauche), soit avec de la cyclodextrine (à droite) a été évaluée en mesurant l'émission de fluorescence (excitation à 297nm) des tryptophanes (W34 et W75) de la FRP recombinante obtenue. L'échantillon mesuré des fractions a été dilué à 2µM. La fluorescence de la FRP recombinante purifiée a été mesurée dans son tampon Tris-HCl 40mM pH 8 + 0,03% de β-DM (noir), après ajout de 8M d'urée (bleu) et après ajout de 2% de SDS (vert). Les spectres montrés sont une moyenne de 3 mesures.

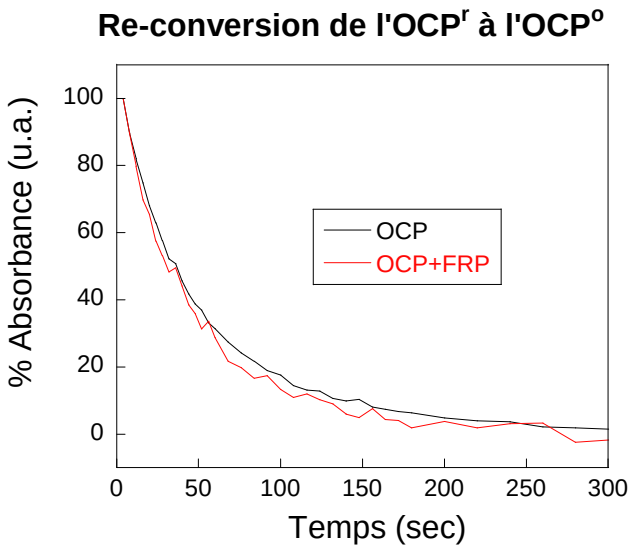


Figure CV.9 : Tests de l'influence de la FRP recombinante sur la cinétique de l'OCP *in vitro*

Le graphique montre la cinétique de reconversion de l'OCP^r à l'OCP^o à l'obscurité, aprés une forte illumination (lumière blanche, 18000 µmol photon.m^{-2}.s^{-1}), en présence (courbe rouge) ou en absence (courbe noire) de la FRP *in vitro*. Les variations d'absorbance ont été mesurées à 580nm dans le spectre de l'OCP, dans le graphique, 100% correspond à l'absorbance de la forme OCP^r (shift vers le rouge) et 0% à l'absorbance de la forme OCP^o. Les échantillons contenaient 2µM d'OCP et de FRP recombinante (quand ajoutée) lors des mesures. La FRP recombinante et l'OCP ont été purifiées à partir d'une souche les surexprimant dans *E.coli* et *Synechocystis*, respectivement (comme décrits dans les matériels et méthodes). Les mesures ont été réalisées à 21°C et les spectres sont des moyennes de 3 mesures.

recombinante issue de la méthode de purification où le LiDS a été ôté avec de la cyclodextrine.

La cinétique de photo-conversion de l'OCP, de sa forme orange inactive (OCP^o) à sa forme rouge active (OCP^r) sous une forte lumière, et la cinétique de reconversion de sa forme OCP^r à OCP^o à l'obscurité peuvent être suivies à 580nm (Wilson *et al.* 2008a; Punginelli *et al.* 2009). De plus, Wilson *et al*. 2008 ont montré que la reconversion de la forme OCP^r à OCP^o à l'obscurité est dépendante de la température, plus elle est basse, plus la cinétique de la reconversion est lente. Nous avons choisi de tester l'influence de la FRP sur la cinétique de l'OCP *in vitro* à 21°C. La cinétique de photo-convertion de la forme OCP^o à la forme OCPr sous une forte lumière (lumière blanche, 18000 µmol photon.m^{-1}.s^{-2}) n'est pas affectée par la présence de la FRP à même concentration molaire que l'OCP (donnée non montrée). Le fait que la FRP n'agit pas au niveau de la cinétique de formation de la forme active OCP^o était attendu car *in vivo* la FRP n'a pas d'action sur la formation de qEcya (voir chapitre IV, partie 2.2). La figure CV.9 montre la cinétique de reconversion à 21°C de l'OCP en présence et en absence de FRP recombinante. La reconversion de la forme active OCP^r à la forme inactive OCP^o à l'obscurité semble être légèrement augmentée en présence de FRP (figure CV.9). Comme la FRP est impliquée dans la récupération de fluorescence *in vivo* du mécanisme de photo-protection qE_{cya} (chapitre IV), nous nous attendions effectivement à observer un effet au niveau de la cinétique de reconversion de l'OCP à l'obscurité. Cependant l'effet observé est faible et il est nécessaire de reproduire ces expériences pour qu'il soit considéré comme significatif.

5. Conclusion du chapitre V

La mise au point d'un protocole de purification de la FRP surproduite sous forme de corps d'inclusion dans *E.coli* a permis d'isoler la FRP recombinante. Cette FRP recombinante a pu être utilisée pour réaliser un anticorps anti-FRP et des expériences préliminaires sur l'influence de la FRP sur la cinétique de l'OCP *in vitro*.

Mon travail de thèse se termine avec ces résultats. Il ouvre la voie vers les prochaines étapes de la caractérisation de la FRP qui commenceront par sa cristallisation pour en obtenir une structure. De plus, des études plus poussées de la cinétique de l'OCP en présence de la FRP recombinante *in vitro* seront réalisées.

Discussion des chapitres IV et V

Le travail des chapitres IV et V a permis de caractériser une nouvelle protéine, la FRP, impliquée dans la récupération de fluorescence du mécanisme qE_{cya}. Il existe un rapport entre le ratio FRP/OCP et les cinétiques de récupération ; plus le ratio est grand, plus la cinétique est rapide mais une petite quantité de FRP (ratio qui semble 100 fois plus petit que dans le sauvage) permet toujours 100% de la récupération. Le gène de la FRP, *slr*1964 est retrouvé en continuité de celui de l'OCP (*slr*1963), et il est conservé chez les cyanobactéries. Les études de transcription réverse ont montré que *slr*1963 et *slr*1964 pouvaient être à la fois transcrits indépendamment et co-transcrits. La production de la FRP contenant un His-tag chez *Synechocystis* a montré que la FRP était une protéine de 13kDa accrochée à la membrane qui interagit avec l'OCP. Et la surproduction de la FRP dans *E.coli* a permis la production d'une FRP recombinante. Cette FRP recombinante a servi à réaliser des anticorps anti-FRP et à réaliser les premiers tests de cinétique de l'OCP *in vitro* en présence de la FRP.

1. Le fait que les gènes *slr*1963 et *slr*1964 soient en continuité, l'existence de paralogues de *slr*1963 et l'étude de leur co-évolution peuvent apporter des informations sur leur(s) rôle(s)

L'étude de la position respective des homologues des gènes *slr*1963 (gène de l'OCP) et *slr*1964 (gène de la FRP) a montré qu'ils sont conservés en continuité l'un de l'autre chez beaucoup de cyanobactéries (23/39). Pour plus de clarté dans la discussion suivante, les différentes configurations de ces homologues retrouvés chez les 39 cyanobactéries dont le génome est actuellement séquencé sont listées ci-dessous (voir aussi les tableaux 5 et 7):

(1) une seule copie du gène de l'OCP entier suivie du gène de la FRP (exemple : *Synechocystis*, *Arthospira axima*) 4/39

(2) une seule copie du gène de l'OCP entier, suivie d'un gène conservé codant pour une β-cétolase, suivi du gène de la FRP (exemple : les cyanobactéries marines *Synechococcus*) 9/39

(3) une ou plusieurs copies du gène de l'OCP entier (généralement suivie(s) du gène de la FRP) + plusieurs copies de sa partie N-terminale + une seule copie de sa partie C-terminale (exemple : *Nostoc punctiforme*, *Anabaena variabilis*) 12/39

(4) une seule partie N-terminale + une seule partie C-terminale homologues de celles du gène de l'OCP (exemple : *C. watsonii*, *T. elongatus*) 4/39

(5) aucun homologue de *slr*1963 ni de *slr*1964 (exemple : *Synechococcus elongatus*, *Synechococcus* sp. CC9605) 8/39

+ *Acaryochloris marina* (homologie trés faible pour le gène de l'OCP et pas de FRP)
+ *Cyanobium* PCC 7001 (seulement une partie C-terminale homologue à celle du gène de l'OCP, suivie d'un gène conservé codant pour une β-cétolase, suivi de la FRP)

Le fait que l'homologue de *slr*1964 soit en continuité de celui de *slr*1963 dans 23 des 26 souches qui possèdent un homologue de *slr*1963 indique que ces gènes ont co-évolué et qu'ils ont un rôle dans une fonction commune (le mécanisme qE_{cya}). Le cas de la cyanobactérie *Cyanobium* PCC 7001 est intéressant, en effet, c'est la seule cyanobactérie actuellement séquencée qui contient uniquement une partie C-terminale homologue à *slr*1963 (tableau 5). De plus, un gène homologue à *slr*1964 est retrouvé en continuité (tableau 7). Cette donnée suggère que la FRP fonctionne sûrement avec la partie C-terminale de l'OCP.

Cyanobium PCC 7001 et *Synechococcus* WH5701 peuvent vivre en eaux douce et salée (Waterbury *et al.* 1986; Komarek *et al.* 1999; Fuller *et al.* 2003) et sont proposées pour être des analogues modernes de l'ancêtre commun des cyanobactéries au moment de leur adaptation au milieu marin (Komarek *et al.* 1999; Fuller *et al.* 2003; Rocap *et al.* 2003). Le fait que ces souches, ainsi que toutes les cyanobactéries *Synechococcus* marines contiennent un gène codant pour une β-carotène cétolase située entre leur gène homologue à *slr*1963 et *slr*1964 est en accord avec l'idée d'une co-évolution de cette combinaison de gènes chez les cyanobactéries marines. Cette donnée suggère que cette cétolase apporte un avantage dans le mécanisme qE_{cya} chez ces cyanobactéries marines. Il s'agit sûrement de l'enzyme qui permet la synthèse de l'echinénone et/ou de l'hydroxyechinénone, les caroténoïdes nécessaires à l'OCP pour être active (Punginelli *et al.* 2009). En effet, pendant ma thèse, C.Punginelli en post-doctorat dans l'équipe a démontré qu'il n'y avait pas d'OCP active en l'absence de ces caroténoïdes. Quand le gène de l'enzyme CrtO (une β-carotène cétolase) responsable de leur synthèse chez *Synechocystis* (Liang *et al.* 2006; Takaichi et Mochimaru 2007) est inactivé, l'OCP attache de la zéaxanthine mais elle n'est plus photoactive et elle est incapable d'induire le quenching de fluorescence (Punginelli *et al.* 2009). La β-carotène cétolase retrouvée chez les cyanobactéries marines n'est pas homologue à la CrtO de *Synechocystis*. Cependant, elle est homologue à la CrtW, une autre enzyme impliquée dans la synthèse de l'echinénone qui est absente chez *Synechocystis*, mais présente chez d'autres cyanobactéries d'eau douce comme *Anabaena variabilis*, *Anabaena* sp. PCC7120, *Nostoc punctiforme* et *Gloeobacter violaceus* (Liang *et al.* 2006; Takaichi et Mochimaru 2007). L'éloignement de cette enzyme en terme de localisation dans le génome indique une évolution différente de cette enzyme au sein des cyanobactéries marines et d'eau douce. L'étude de souches marines délestées de cette β-carotène cétolase (par exemple la souche marine transformable *Synechococcus* PCC 7002) permettrait d'en savoir plus sur sa fonction et son rôle dans la synthèse de l'échinénone. Il serait aussi intéressant de voir si une souche d'eau douce, comme *Synechocystis*, où le gène

codant pour cette β-cétolase des souches marines a été mis à la place de celui de la CrtO, a toujours le mécanisme qE_{cya} (donc une OCP active avec le bon caroténoïde).

Les souches qui possèdent plusieurs gènes homologues à *slr*1963 possèdent un seul gène homologue à *slr*1964 sauf *Synechococcus* PCC 7335 qui possède trois copies de gènes homologues à *slr*1963 dont deux sont en continuité avec un gène homologue à *slr*1964. Cette donnée suggère que les paralogues entiers de *slr*1963, qui pourraient être issus d'un événement de duplication et qui sont retrouvés dans certaines souches sans homologues de *slr*1964, ne sont pas de simples copies. Ils ont peut-être un autre rôle.

Les cyanobactéries qui possèdent plusieurs copies homologues à la partie N-terminale de *slr*1963 ont toujours une seule copie de la partie homologue C-terminale. Au moins 8 sur 19 de ces parties C-terminales se trouvent en aval d'une des parties N-terminale (d'après les numéros qui se suivent sur le nom de leur gène, voir tableau 5). Cependant le gène de la FRP n'est pas retrouvé en aval de ces combinaisons. Ces données indiquent que les gènes codant pour des parties du gène de l'OCP (motif : « parties N + C-terminales homologues du gène de l'OCP ») sont restés proches. Ils ont soit perdu leur fonction, soit ils ne l'avait pas encore acquise. De plus, d'après le tableau 5, les cyanobactéries qui possèdent de multiples copies homologues de la partie N-terminale de *slr*1963 sont des cyanobactéries fixatrices d'azote (*Anabaena variabilis*, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Nostoc punctiforme*, *Nostoc azollae*, *Lynbya* sp. PCC8106 et les *Cyanotheces* sp. PCC 7424, ATCC 51142 et PCC 7822). Ces copies de la partie N-terminale du gène de l'OCP ont peut-être un rôle dans la fixation de l'azote. Ces observations suggèrent donc un rôle différent, pour le couple « *slr*1963 entier + *slr*1964 en continuité » et les autres paralogues de *slr*1963 entiers ou non.

De plus, aucun homologue de *slr*1964 n'est présent chez les cyanobactéries *C. watsonii*, *T. elongatus*, *Cyanothece* PCC 8801 et PCC 8802. Ces cyanobactéries ne possèdent pas d'homologue du gène *slr*1963 entier mais deux gènes homologues à ses parties N et C-terminale en continuité (sauf *C. watsonii* où ils sont à deux endroits différents du génome). Donc comme pour le motif « parties N + C-terminales homologues du gène de l'OCP » chez les cyanobactéries à multiples copies du gène de l'OCP, aucun gène codant pour la FRP n'est retrouvé en continuité de ce motif chez ces cyanobactéries qui n'ont pas d'autres copies de l'OCP. Ces données, comme celles des deux paragraphes précédents, suggèrent un rôle différent pour le couple « *slr*1963 entier + *slr*1964 en continuité » et les autres copies du gène de l'OCP. Ces données sont aussi en accord avec les résultats du chapitre II (Boulay *et al.* 2008b) où le mécanisme qE_{cya} n'est pas observé dans la cyanobactérie *T.elongatus* qui ne contient ni l'OCP entier ni la FRP.

L'ensemble de ces observations m'a conduit à réfléchir sur l'évolution des gènes de l'OCP et de la FRP. La question reste ouverte sur le fait que l'ancêtre commun des

cyanobactéries possède ou non le gène entier de l'OCP suivi de la FRP. Deux hypothèses d'évolution sont décrites ci-dessous.

Une hypothèse (hypothèse n°1) est que le gène de l'OCP a pu se former à partir de la fusion des gènes homologues à ses parties N et C-terminale en continuité, et que le gène de la FRP a été rajouté à la suite de celui de l'OCP dans l'évolution. Les produits des gènes homologues aux parties N et C-terminale de l'OCP avaient une fonction différente de l'OCP actuelle et la création du couple OCP+FRP a permis l'apparition du mécanisme qE_{cya}. Les gènes de l'OCP et de la FRP ont ensuite été conservés car ils apportaient un avantage à la cellule. Cette hypothèse est en accord avec la présence des parties N et C-terminales homologues à celle du gène de l'OCP en continuité et avec le fait qu'il n'y a pas de gène de la FRP à leur suite. Le fait que les multiples copies de parties homologues du gène de l'OCP semblent avoir des fonctions différentes est aussi en accord avec cette hypothèse.

Une autre hypothèse (hypothèse n°2) est que le gène de l'OCP entier suivi de celui de la FRP est le motif original ancestral et que les autres configurations observées (plusieurs gènes codant pour des gènes homologues à la partie N-terminale de l'OCP, des gènes à la suite ou à différentes places du génome codant pour des parties N et C-terminales homologues du gène de l'OCP) sont issues de divers évènements de coupures et de duplications. Le fait que *Cyanobium* PCC 7001 soit proposée comme analogue moderne d'un ancêtre commun des cyanobactéries (voir paragraphe suivant) et qu'elle possède seulement une partie C-terminale homologue au gène de l'OCP suivie de celui de la FRP est un argument en faveur de cette hypothèse.

Nos connaissances actuelles ne permettent pas de trancher pour l'une ou l'autre de ces hypothèses. Le séquençage de plus en plus de cyanobactéries dans les années à venir nous apportera sûrement de nouvelles informations qui nous permettront de comprendre l'évolution de ces gènes.

2. Propositions sur le mécanisme de la FRP

2.1 Rôle de la FRP dans la récupération de fluorescence

Des conditions d'inhibition de la récupération de la fluorescence du mécanisme qE_{cya} ont déjà été rapportées dans des études sur la fluidité de la membrane du thylacoïde et sur des mouvements des phycobilisomes chez les cyanobactéries (El Bissati *et al.* 2000; Joshua *et al.* 2005; Scott *et al.* 2006). Il apparaît que la récupération de la fluorescence (induite quand on remet les cellules sous faible lumière) n'a plus lieu en présence de phosphate qui inhibe le mouvement des phycobilisomes et modifie l'activité et la fluorescence du photosystème II (Joshua *et al*. 2005 Plant Physiol ; Scott *et al*. 2006 Biochemstry et chapitre III). De plus, El

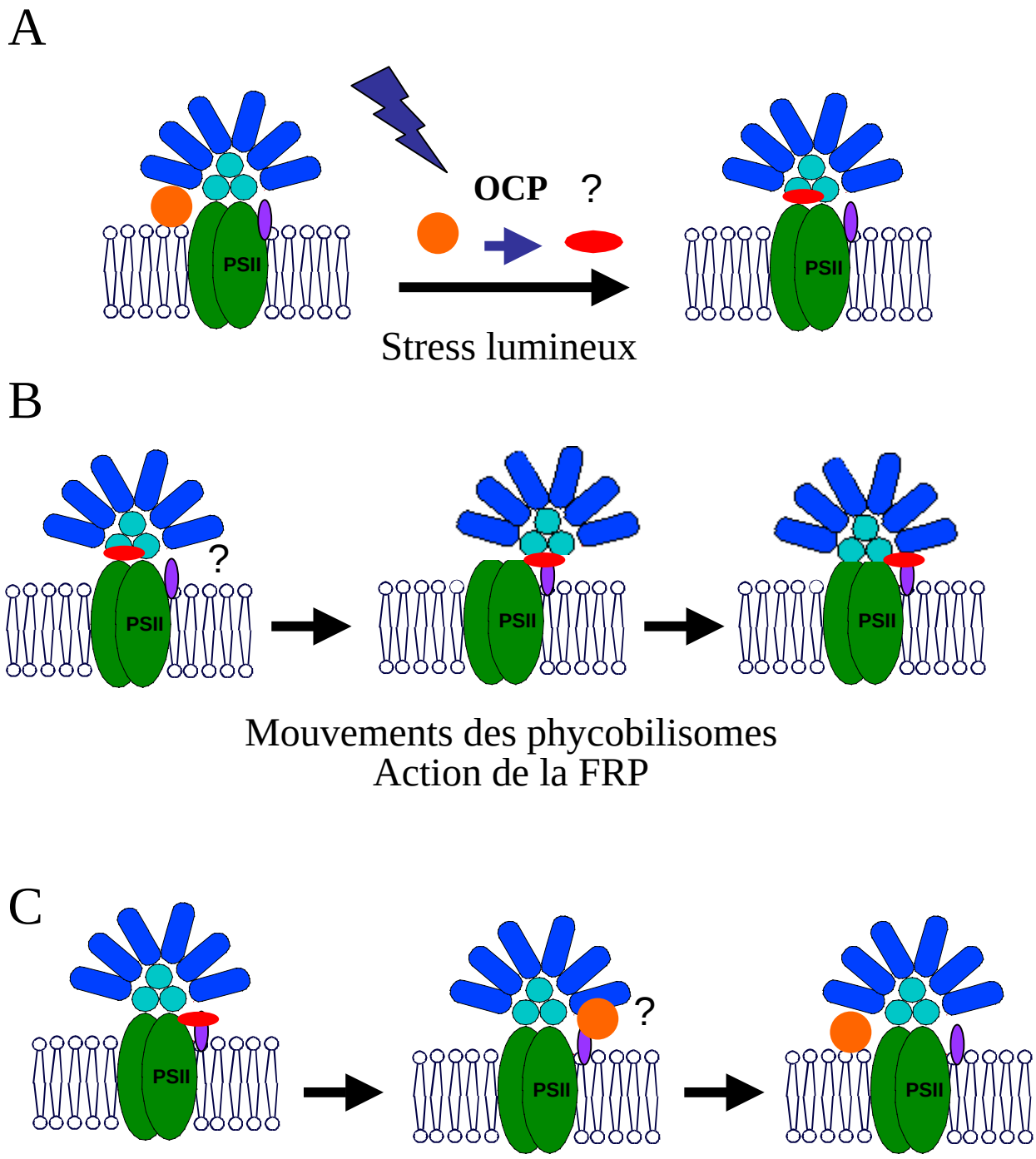


Figure D.3 : Modèle du rôle possible de la FRP
A rapelle le modèle du mécansime de l'OCP présenté sur la figure I.33 où l'OCP active rouge va se fixer au niveau des phycobilisomes et permet la dissipation de plus d'énergie sous forme de chaleur. **B** propose que les phycobilisomes mobiles peuvent donner leur OCP à la FRP (en violet). Et **C** propose que la FRP peut reconvertir l'OCP sous sa forme inactive orange. Les points d'interogation indiquent les étapes à vérifier (voir texte de la discussion du chapitre IV).

Bissati *et al*. 2000 ont étudié un mutant qui présente une fluidité de membrane modifiée (Tasaka *et al.* 1996) et ont montré que la récupération de la fluorescence (induite quand on remet les cellules sous faible lumière) est inhibée quand la membrane est rigidifiée (figure I.27). Ces données suggèrent que la récupération de la fluorescence de ce mécanisme, qui est reliée au passage de la forme rouge active de l'OCP à sa forme orange inactive (Wilson *et al.* 2008a; Punginelli *et al.* 2009), est possible seulement quand les phycobilisomes sont mobiles et la membrane fluide. L'attachement de la FRP à la membrane pourrait expliquer le fait que la récupération est inhibée quand la membrane est rigide. L'ajout de phosphate, comme décrit dans la discussion du chapitre III, inhibe les mouvements des phycobilisomes, mais pourrait aussi gêner les interactions entre l'OCP et les PBS et/ou la FRP et le transfert d'énergie en général. Dans ces conditions, l'interaction de l'OCP avec la FRP et/ou le mouvement du phycobilisome avec l'OCP vers la FRP pourraient être inhibés (voir modèle ci-dessous).

La figure D.3 propose un modèle d'action de la FRP dans le mécanisme qE_{cya} qui intègre ces données. Ce modèle reprend notre hypothèse du mécanisme de l'OCP de la figure I.33 qui propose qu'une forte illumination de lumière bleue-verte active l'OCP, sa forme rouge active va se fixer sur le phycobilisome, elle permet la dissipation de plus d'énergie sous forme de chaleur et on observe le déclin de fluorescence (figure D.3A). Ensuite, ce nouveau modèle propose que les phycobilisomes mobiles se déplacent avec l'OCP active, ils passent au-dessus d'une FRP qui capte l'OCP active (figure D.3B). Puis, quand l'OCP est capturée par la FRP, celle-ci serait capable de remettre l'OCP sous sa forme orange inactive, et la récupération de fluorescence serait possible (figure D.3C). Ce mécanisme au niveau de la FRP a toujours lieu. La diminution de fluorescence observée lors du mécanisme qE_{cya} se produirait quand l'intensité lumineuse est assez forte pour permettre la photo-conversion de la forme rouge de l'OCP plus rapidement que la reconversion de sa forme orange inactive qui se produit quand la FRP la capte sur les phycobilisomes.

En admettant que les phycobilisomes sont un minimum mobiles, beaucoup de données sont encore nécessaires pour valider ce modèle (points d'interrogation sur la figure D.3). Les questions principales sont :

(1) Quel est l'état d'oligomérisation de la FRP ?

(2) Comment capte-elle l'OCP au niveau des phycobilisomes ?

(3) Dans quel état d'oligomérisation est alors l'OCP?

Les principaux éléments de réponses et les expériences proposées pour répondre à ces questions sont :

(1) Le fait que la FRP recombinante peut au moins former des dimères n'est pas en désaccord avec ce modèle (figures CV.6 et CIV.12). La purification d'une quantité assez pure

de la FRP chez *Synechocystis* pour être étudiée sur un gel non-dénaturant et filtration sur gel permettrait d'avoir plus de données sur son état d'oligomérisation.

(2) Le fait que la FRP capte l'OCP activée sur les phycobilisomes mobiles est discutable. D'après le modèle, une saturation de la cinétique pourrait avoir lieue quand la vitesse de déplacement des phycobilisomes (par exemple à basse température) devient inférieure à la capacité de reformation de l'OCP inactive par la FRP. Cette proposition semble plausible car elle est en accord avec nos données expérimentales où la cinétique de récupération de la fluorescence (lors du passage de la forme active de l'OCP à sa forme inactive) *in vivo* est plus lente que la reconversion *in vitro* de la forme rouge à la forme orange. De plus, cette différence est plus importante à basse température (Wilson *et al.* 2008a). Il faut aussi noter que la partie C-terminale de la FRP est très conservée et qu'elle semble être impliquée dans son action car un Tag en C-terminal ralentit la cinétique de récupération de la fluorescence (figure CIV.4B). Il serait donc pertinent de faire des expériences d'interaction OCP/FRP ou FRP/PBS complémentaires, par exemple utiliser une autre technique comme le cross-linking. Même si la protéine de l'OCP sans son domaine C-terminale est inactive (données non publiées de C. Punginelli), il serait aussi intéressant de tester les interactions de cette OCP délestée de son domaine C-terminal avec la FRP. A l'inverse, il faudrait aussi tester les interactions de la FRP délestée de ses parties conservées avec l'OCP.

(3) Nous n'avons pas de données sur le fait que la FRP capte plutôt la forme active ou inactive de l'OCP sur les phycobilisomes. Des expériences de co-immunoprécipitation de la FRP avec l'OCP sous forte lumière et à l'obscurité, permettraient d'avoir plus d'informations sur ce point. De plus, les expériences préliminaires sur la cinétique de la formation des formes inactive et active de l'OCP en présence de la FRP recombinante *in vitro* décrites à la fin du chapitre V n'ont pas permis d'identifier une influence de la FRP recombinante sur la cinétique de l'OCP (figure CV.9). Cependant, il est possible que le repliement de la FRP recombinante ne soit pas fonctionnel et surtout qu'il manque des éléments très importants au système comme les phycobilisomes et la membrane du thylacoïde dans nos expériences *in vitro*. Une autre explication serait que les concentrations de l'OCP et de la FRP mises en présence étaient trop faibles pour permettre leur interaction. Leur concentration autour du PSII *in vivo* est peut-être très importante. Il serait donc intéressant de refaire ses expériences avec des concentrations très fortes de l'OCP et de la FRP.

Un autre point est que nous ne savons pas si l'OCP reste sous forme rouge en absence de la FRP. L'OCP peut-elle se reconvertir en forme inactive orange sur les phycobilisomes sans la FRP? Wilson *et al*. (2008) ont montré que la forme rouge est présente dans les cellules de *Synechocystis* "quenchés" sous une forte illumination bleue-verte. Le suivi de cette forme dans des cellules du mutant Δ*slr*1964 transférées à une faible lumière pourrait apporter des

éléments de réponse à cette question. Le suivi de la récupération de fluorescence de cette souche Δ*slr*1964 pendant une longue durée apporterait notamment des éléments de réponse sur la nécessité impérative de la FRP pour la récupération. En effet, au bout de 20min après l'arrêt de la forte illumination, les cellules de cette souche ne récupèrent quasiment pas de fluorescence (figure CV.3) mais nous ne savons pas si ces cellules sont toujours quenchées au bout de 10-15h.

Ce modèle propose aussi que l'action de la FRP est permanente, donc qu'un équilibre se créé entre la quantité de l'OCP photo-convertie par l'intensité lumineuse et la quantité de l'OCP inactive reconvertie par l'action de la FRP. Les données sur la cinétique de la FRP, où, plus il y a de FRP par rapport à l'OCP, plus la récupération de fluorescence est rapide, sont aussi en accord avec ce modèle (figures CIV.4, CIV.5 et CIV.6). Le fait que l'intensité du quenching de fluorescence soit plus forte dans la souche Δ*slr*1964 que dans le sauvage est aussi en accord avec ce modèle (figure CIV.2).

Si cet équilibre a vraiment lieu, la quantité de FRP devait logiquement être inférieure à celle de l'OCP. La partie 3 du chapitre IV a permis la quantification de l'OCP et de la FRP (figures CIV.5 et CIV.6). Je décris ci-dessous ma réflexion sur la quantité de FRP dans les cellules par rapport à l'OCP, aux phycobilisomes et au photosystème II.

Dans les thylacoïdes, il y a environ 3 PSI pour 1 PSII, sachant qu'il y a 96 chlorophylles dans le PSI et 38 chlorophylles dans le PSII cela fait un total de 326 chlorophylles. En estimant la quantité de chlorophylle par cellule à environ à 5.10^7, cela revient à 5.10^7 divisé par 326 soit environ 1.5 10^5 PSII par cellule (communication personnelle de Bernard Lagoutte). De plus, une cellule de *Synechocystis* contient entre 0.4 et 0.6 10^5 phycobilisomes par cellule, donc il y a environ 0.7-1 phycobilisome par dimère de PSII. Les résultats du chapitre IV indiquent qu'il y a environ 0.5 picomol d'OCP par µg de chlorophylle (figure CIV.5). 1µg de chlorophylle correspond à 1.12 nmol de chlorophylle (communication personnelle de Bernard Lagoutte) donc 1.12 divisé par 326 donne 3.43 picomol de PSII par µg de chlorophylle soit 0.25 OCP/PSII ou 0.5 OCP/PBS/dimère de PSII. Ce calcul approximatif indique qu'il y a environ 0.5 OCP pour un phycobilisome dans les cellules. Si l'OCP active (rouge) agit en dimère, la dissipation de l'excès d'énergie sous forme de chaleur a lieu avec un ratio d'1/4 OCP active pour un phycobilisome, si l'OCP active agit sous forme monomérique, la dissipation peut avoir lieu avec 0.5 OCP actives pour un phycobilisome dans la souche sauvage de *Synechocytsis*.

En ce qui concerne la FRP, nous n'avons pas pu mesurer directement sa quantité dans la souche sauvage de *Synechocystis* car l'anticorps anti-FRP ne reconnaît pas la FRP sauvage (figure CV.6). La quantité de FRP dans la souche sauvage de *Synechocystis* (environ 0.5 picomoles par µg de chlorophylle) a été déduite grâce au mutant « surexprimant » la FRP avec un HisTag en N-terminal qui a la même cinétique de récupération de la fluorescence et la

même quantité d'OCP que la souche sauvage (chapitre IV, partie 3). Comme l'anticorps anti-FRP reconnaît uniquement la FRP avec un HisTag en N-terminal, il faudrait faire un mutant où un HisTag est ajouté sur la partie N-terminale du gène de la FRP sur la souche sauvage. La quantité de FRP produite dans le sauvage serait ainsi théoriquement détectable. En attendant d'avoir ce mutant, il faut donc rester prudent sur la véracité de la quantité estimée de la FRP, il est possible que d'autres facteurs entrent dans le mécanisme et que la cinétique de récupération de la fluorescence ne soit pas uniquement due à la quantité de FRP par rapport à l'OCP. De plus la quantité pourrait être sous-estimée car l'anti-corps ne dédecte pas la FRP si elle n'a pas d'HisTag en N-terminal, dans les mutants et la souche sauvage, il se peut que la traduction se fasse aussi au début de la méthionine 26 après le Tag (voir partie 1 du chapitre 4 et paragraphe suivant de la discussion). Cependant, en supposant que cette hypothèse est proche de la réalité, il apparaît qu'il y a environ 0.5 picomole de FRP par µg de chlorophylle, soit autant que d'OCP, soit environ 0.5 FPR/PBS/dimère de PSII dans la souche sauvage de *Synechocystis*. Cette observation n'est pas en désaccord avec le modèle décrit dans le paragraphe précédent (figure D.3). La FRP agirait donc comme un catalyseur qui capte l'OCP active (le substrat) sur les phycobilisomes et relargue l'OCP après l'avoir convertie en forme inactive.

2.2 Comparaison avec la fonction d'autres protéines « proches »

Les résultats de ce chapitre indiquent que la FRP est une protéine de13kDa qui s'attache fortement à la membrane (figures CIV.9 et CIV.10) et qui est impliquée dans la récupération de la fluorescence du mécanisme qE_{cya} (figure CIV.3). L'action exacte de la FRP au niveau de la récupération de la fluorescence de ce mécanisme de photo-protection reste encore à élucider. Afin de réfléchir sur de possibles mécanismes à tester, j'ai recherché des protéines déjà connues qui avaient des propriétés communes avec la FRP. C'est à dire de petites protéines (8-15kDa) attachées à la membrane ou transmembranaires qui participent à des mécanismes photosynthétiques et/ou de photo-protection. J'ai ainsi identifié trois petites protéines présentes dans la membrane du thylacoïde : PufX, TSP9 et RpaC (Cogdell *et al.* 1996; Emlyn-Jones *et al.* 1999; Hansson *et al.* 2007). PufX est une protéine de 9kDa contenant une seule hélice transmembranaire, avec une partie N-terminale cytoplasmique, retrouvée chez les bactéries photosynthétiques de type *Rhodobacter* (Pugh *et al.* 1998). Il a été proposé qu'elle fasse partie de l'anneau du LHCI et qu'elle joue un rôle de portail dans l'exportation de quinones (Cogdell *et al.* 1996). TSP9 est une phosphoprotéine mobile de la membrane du thylacoïde de 9kDa qui interagit avec le LHCII et la périphérie des deux photosystèmes (Hansson *et al.* 2007). Cette protéine est présente uniquement chez les plantes (Carlberg *et al.* 2003) et il a été proposé qu'elle est impliquée dans la régulation du LHC (Cogdell *et al.* 1996). RpaC est une protéine de 9kDa qui est sûrement localisée dans la

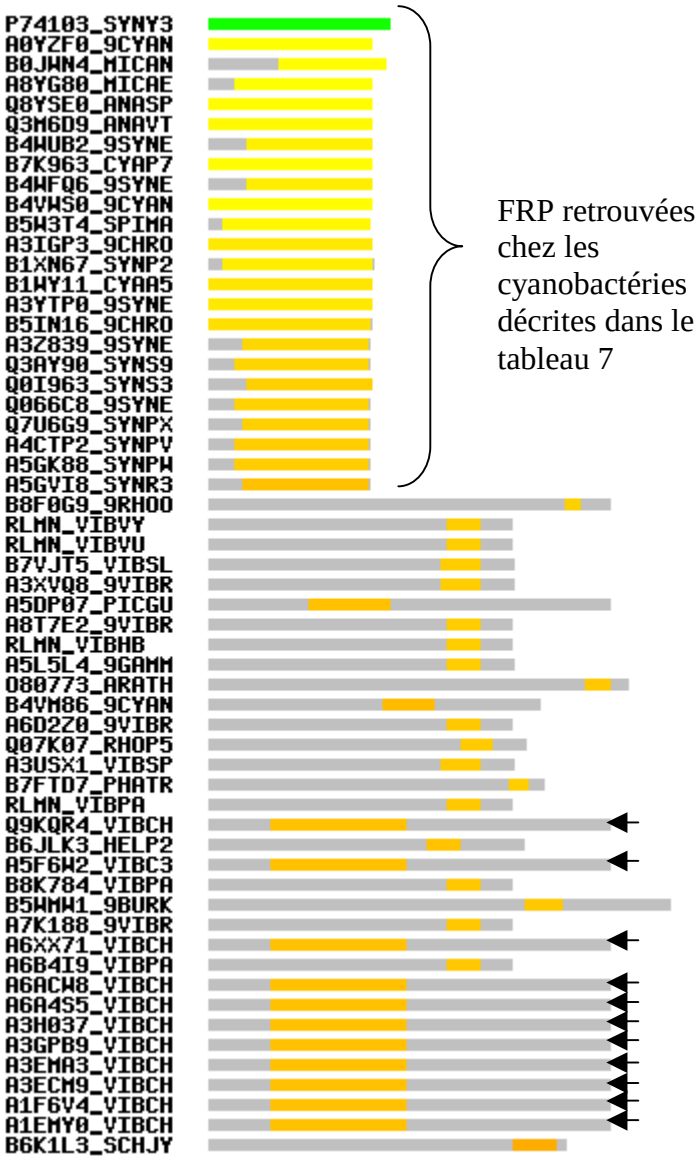


Figure D.4 : Résultat du blast de la séquence de la FRP

La figure montre le schéma obtenu aprés le blast de la séquence de la FRP de *Synechocystis*. Les couleurs vont du vert au rouge pour les séquences avec le plus d'identité vers celles qui en ont le moins. Les protéines qui ont seulement une partie de leur séquence identique à la séquence de la FRP ont cette séquence en couleur et le reste en gris. Les protéines (prédites d'après la séquence de leur gène) sont classées par odre de ressemblance qui prend en compte leur identité (acide aminé identique), leur similarité (acide aminé proche) et les trous (gaps). Le nom des protéines, à gauche, est composé du nom de la séquence prédite et du code de l'organisme (par exemple VIBCH pour *Vibrio cholerae*). Les flèches noires indiquent les 11 protéines retrouvées dans différentes espèces de *Vibrio cholerae* qui ont un domaine GGDEF (environ 160 acides aminés) qui blast avec la quasi totalité de la FRP.

membrane du thylacoïde, son ORF prédit une protéine de 14kDa avec un domaine N-terminal fortement hydrophobique peu conservé (Emlyn-Jones *et al.* 1999; Mullineaux et Emlyn-Jones 2005). RpaC, qui est fortement conservée chez les cyanobactéries (même dans la branche *Prochlorococcus*), est exprimée préférentiellement à basse intensité lumineuse et semble être impliquée dans le mécanisme des transitions d'état (Mullineaux et Emlyn-Jones 2005). Aucune de ces protéines n'a d'homologie de séquence avec la FRP, cependant la connaissance de leurs mécanismes et de leurs caractéristiques m'a, comme indiqué au début de ce paragraphe, donner des idées d'expériences. Par exemple, il serait intéressant de tester si la FRP peut-être phosphorilée au niveau de ces thréonines comme TSP9 (T46, T53 et T60) (Carlberg *et al.* 2003). Les protéines des procaryotes sont plutôt phosphorylées sur des histidines donc il faudrait aussi vérifier la phosphorylation de ces acides aminés sur la FRP. De plus, le fait que la traduction de RpaC donne un produit plus petit que celui annoncé par la séquence prédite, m'a conduit à réfléchir sur le cas de la FRP chez *Synechocystis* et *Microcystis NIES-843*. La traduction pourrait aussi débuter plus tard (au niveau de la méthionine 26) sur leur séquence car la partie N-terminale de la FRP est très peu conservée et plusieurs méthionines y sont présentes (met14, 16 et 26) (figure CIV.1). On pourrait aussi avoir deux sites possibles de début de la traduction comme cela a déjà été observé pour la FNR chez *Synechocystis* (Thomas *et al.* 2006). Pour en savoir plus, il faudrait faire des mutants de la FRP (avec un HisTag en N-terminal pour être capable de détecter la protéine) en commençant la séquence soit avec la méthionine 14, soit avec la méthionine 16, soit avec la méthionine 26 de la FRP de *Synechocystis*.

2.3 Un système de transduction du signal à deux composants chez les cyanobactéries ?

Dans les recherches de gènes homologues à celui de la FRP, il apparaît que la séquence de *slr*1964 a une faible ressemblance avec un domaine GGDEF (figure D.4). Un domaine GGDEF contient environ 160 acides aminés et est un domaine récemment identifié comme impliqué dans la transduction du signal chez les bactéries (D'Argenio et Miller 2004; Römling *et al.* 2005). Le nom GGDEF vient de l'enchaînement d'un motif de 5 acides aminés conservés « GGDEF » dans les premiers domaines GGDEF identifiés, d'autres protéines avec ce motif plus ou moins conservé (voir non conservé) ont ensuite été identifiées. La famille de ces protéines a gardé le nom même si la suite d'acide aminés GGDEF n'était plus toujours présente. Le domaine GGDEF est homologue au domaine catalytique de l'adénylate cyclase (Pei et Grishin 2001) et a une activité diguanylate cyclase (Paul *et al.* 2004). La figure D.4 montre que la séquence de la FRP ressemble à un domaine d'environ 160 acides aminés retrouvés sur 11 protéines (taille totale : 665 acides aminés) présentes dans différentes espèces de *Vibrio cholerae*. Ce domaine est identifié comme un domaine GGDEF dans les bases de données. La séquence entière de la FRP, entre 106 et 126 acides aminées selon les

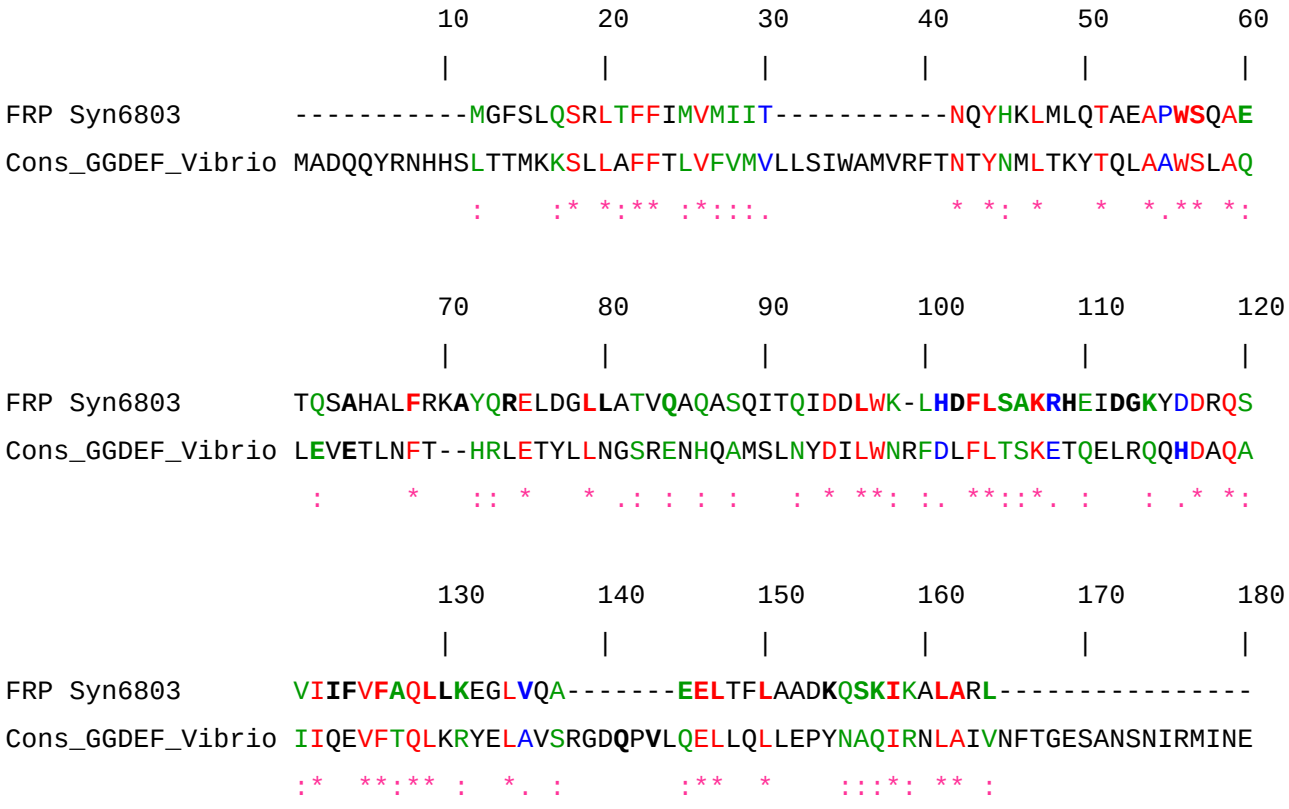


Figure D.5 : Alignement de la séquence de la FRP de *Synechocystis* avec la séquence concensus du domaine GGDEF des 11 protéines de *Vibrio cholerae* montrées sur la figure D.4

Le logiciel utilisé est Clustal W (code pour l'alignement : "." et bleu = acide aminé faiblement similaire, ":" et vert = acide aminé fortement similaire, "*" et rouge = acide animé identique). "FRP Syn6803" correspond à la séquence de la FRP de *Synechocystis* et "Cons_GGDEF_Vibrio" à la séquence consensus du domaine GGDEF des 11 protéines de *Vibrio cholerae* fléchées sur la figure D.4. Les acides aminés en gras sur la séquence "FRP Syn6803" sont les acides aminés conservés de la séqence consensus de la FRP chez les cyanobactéries (voir la figure CIV.1). Les acides aminés en gras sur la séquence "Cons_GGDEF_Vibrio" sont les acides aminées conservés du domaine GGDEF (d'aprés la séquence consensus des 49 domaines GGDEF "seed" de la base de donnée Pfam).

cyanobactéries, semble donc être proche d'un domaine GGDEF entier. La figure D.5 montre l'alignement de la séquence de la FRP de *Synechocystis* et de la séquence consensus du domaine GGDEF de ces protéines de *V. cholerae*. Les acides aminés conservés d'après la séquence consensus de la FRP des cyanobactéries (figure CIV.1) et d'après la séquence consensus du domaine GGDEF sont indiqués en gras sur leurs séquences respectives. Les acides aminés conservés dans la séquence consensus du domaine GGDEF ont été obtenus avec le blast de ses séquences les plus représentatives (les 49 séquences « seeds » indiquées dans la base de donnée Pfam). De façon générale, le domaine GGDEF apparaît peu conservé au niveau de sa séquence car seulement 5 acides aminés (en gras sur la figure D.5) sont conservés sur les 49 séquences seed. Ces acides aminés conservés (en gras) d'après la séquence consensus du domaine GGDEF sont trop peu nombreux pour identifier la FRP comme un domaine GGDEF (figure D.5). De plus, le rôle de la protéine contenant ce domaine GGDEF dans *V. cholerae* semble être encore inconnu. L'ensemble de ces données ne permet pas d'affirmer que la FRP est un domaine GGDEF, cependant il suggère que la FRP ressemble à un domaine impliqué dans la transduction du signal. Pour vérifier si la FRP a une fonction similaire à celle d'un domaine GGDEF, il serait intéressant de tester l'activité diguanylate cyclase (production de c-di-GMP (Paul *et al.* 2004)) de la FRP recombinante purifiée.

La première analyse de la séquence en acides aminés de l'OCP réalisée par Wu et Krogmann (Wu et Krogmann 1997) a aussi révélé qu'un site de liaison ATP/GTP est présent au niveau des résidus 43-50 de sa partie N-terminale. Hors, comme montré sur la figure I.6 (Montgomery 2007), le domaine GGDEF utilise un GTP pour catalyser la formation du c-di-GMP. Cette donnée suggère que l'OCP qui interagit avec la FRP pourrait apporter le GTP à la FRP. Une autre information est donnée par l'étude des gènes de l'OCP et de la FRP : la FRP pourrait agir avec la partie C-terminale de l'OCP car cette combinaison est retrouvée dans *Cyanobium* PCC 7001. De plus, la partie C-teminale de l'OCP ressemble à un domaine NTF-2 (pour « Nuclear Transport Factor 2 » en anglais) (Kerfeld *et al.* 2003). Ce domaine forme une poche hydrophobe qui est occupée par la partie cétone du caroténoïde (Kerfeld *et al.* 2003). Ce domaine a été observé dans diverses protéines comme le complexe NTF2-GDP-Ran, qui a un rôle dans l'importation nucléaire (Stewart *et al.* 1998), le facteur d'exportation TAP/p15-mRNA (Fribourg *et al.* 2001) et d'autres enzymes (Cho *et al.* 1998; Kauppi *et al.* 1998). NTF-2 est un facteur cytosolique qui interagit avec un complexe protéique qui forme un pore sur la membrane nucléaire chez les eucaryotes (Paschal et Gerace 1995). De plus, nous savons que la FRP a une ressemblance avec un motif impliqué dans la transduction du signal, que la FRP est liée à la membrane, que l'OCP est soluble et qu'elle interagit sûrement avec la FRP. Ces données cumulées suggèrent que le couple OCP-FRP pourrait être un système à deux composantes impliqué dans la transduction d'un signal. L'OCP serait le photosenseur, composant n°1 s oluble, contenant une partie photo-senseur avec le

chromophore à caroténoïde et une partie de signalisation (le domaine NTF-2-like de la partie C-terminale) qui interagirait avec le composant n°2, la FRP. Lors de l'interaction au niveau de la partie C-terminal, le GTP porté par la partie N-terminale de l'OCP serait assez proche pour être utilisé par la FRP pour catalyser du c-di-GMP. La FRP, petite protéine de 13kDa liée à la membrane, serait alors impliquée dans un mécanisme de réponse cellulaire encore inconnu.

Ces propositions restent cependant très spéculatives. Les résultats du chapitre IV suggèrent que la quantité de l'OCP et de la FRP dans les cellules de la souche sauvage est la même que dans les cellules qui surproduisent la FRP (souche Δ*64*CB19) sous la même quantité de lumière et dans un milieu de culture normal (voir la partie 2.1 de cette discussion). En plus des études de qRT-PCR proposées dans la partie suivante de cette discussion, il serait intéressant d'étudier l'expression de la FRP dans les mutants Δ*64*CB14 (surproduction de l'OCP et de la FRP) et Δ*64*CB19 (surproduction de la FRP) sous différentes conditions d'éclairement et en carence en fer afin d'avoir plus de données sur « le signal » possiblement induit par l'OCP et la FRP. Une autre explication au fait que l'on retrouve une ressemblance avec des motifs de transduction du signal serait que l'évolution a donné naissance au couple « OCP + FRP » à partir de protéines initialement impliquées dans la transduction du signal (voir hypothèse n°1 à la fin de la partie 1 de cette discussion). Ces protéines auraient ensuite évolué et été conservées car elles apportent un avantage au niveau de la récupération de la fluorescence dans le mécanisme de photo-protection qE_{cya}.

3. Régulation de l'expression de l'OCP et de la FRP

Les résultats des expériences de RT-PCR du chapitre IV (figures CIV.7 et CIV.8) suggèrent que le gène *slr*1964 codant pour la FRP peut être transcrit indépendamment de *slr*1963 ou co-transcrit avec ce gène dans le sauvage de *Synechocystis*. Les produits correspondant à des ARN messagers co-transcrits ont été clairement observés dans un mutant sur-exprimant l'OCP suivi de la FRP sous le contrôle du promoteur du gène *psb*AII (Δ*64*CB14). Mais ils ont été difficiles à observer dans le sauvage de *Synechocystis* (voir partie 4 du chapitre IV). Des fragments d'ARN messager issus de la co-tanscription des gènes *slr*1963 et *slr*1964 ont bien été identifiés mais seulement des fragments courts. C'est à dire les fragments qui correspondent à la séquence de l'OCP plus le début du gène de la FRP qui n'ont pas encore été dégradé car la dégradation de l'ARN messager commence par son extrémité 3'. Ces observations indiquent que la quantité d'ARN co-transcrit détectable était plus faible dans la souche sauvage de *Synechocystis* que dans le mutant surexprimant l'OCP suivi de la FRP. Ces données sont en accord avec les résultats de transcriptomique de Hihara *et al*. 2001. En effet ceux-ci n'ont pas détecté de relation entre la transcription du gène de

l'OCP et de la FRP, sûrement à cause du fait que peu d'ARN messager de la FRP est présent dans les cellules du sauvage de *Synechocystis*.
De plus, les résultats des chapitre I et II ont indiqué que la quantité de l'OCP est régulée sous carence en fer (Wilson *et al.* 2007; Boulay *et al.* 2008b). Ces données cumulées à celle du paragraphe précédent indiquent que les quantités de l'OCP et la FRP pourraient être co-régulées en condition de carence. L'un ou l'autre des modes de transcription (indépendant ou co-transcrit) pourrait être induit et/ou diminué en fonction des conditions de carence. Des expériences de PCR quantitative sur la quantité d'ARN messager de l'OCP et de la FRP dans des cellules de la souche sauvage de *Synechocystis* cultivées normalement ou sous carence en fer apporteraient des informations sur l'expression de leurs gènes.

Dans la souche surexprimant l'OCP et la FRP (WTCB14), la position des gènes *slr*1963 et *slr*1964 par rapport au promoteur fort est la même que celle de ces gènes par rapport au promoteur normal dans le sauvage. Nous pourrions nous attendre à ce que le ratio OCP/FRP soit égal dans les deux souches. Cependant, cela ne semble pas être le cas car la récupération dans le mutant (WTCB14) est beaucoup plus lente que dans le sauvage. L'information sur l'intensité de la transcription se trouve sûrement au niveau du promoteur. Des expériences de qRT-PCR sur les mutants Δ*slr*1964 et ΔOCP permettraient d'évaluer la transcription indépendante du gène de l'OCP et de la FRP, respectivement. Des expériences de qRT-PCR sur les mutants Δ*64*CB14 (production de l'OCP sauvage et surproduction à la fois de l'OCP et de la FRP) et Δ*64*CB19 (production de l'OCP sauvage et surproduction de la FRP) permettraient de comparer la quantité d'ARN messager de l'OCP transcrit dans deux souches qui le gène *slr*1964 à deux positions différntes. D'une façon générale, la quantité d'ARN messager transcrit et co-transcrit pourrait être estimée par qRT-PCR dans les différents mutants construits dans ce travail de thèse. Les résultats de cette quantification comparés aux cinétiques de récupération et aux quantités d'OCP et de FRP effectivement présente (estimation par western blot) pourraient servir à mettre en évidence une éventuelle régulation de la quantité de FRP présente sur l'intensité de la transcription de l'OCP ou inversement.

La découverte et la caractérisation de la FRP décrites dans les chapitre IV et V de cette thèse apportent des éléments essentiels concernant la compréhension du fascinant mécanisme de photo-protection qE_{cya} impliquant l'OCP, la FRP et les phycobilisomes chez les cyanobactéries. Comme nous venons de le voir dans cette discussion, elles ouvrent la voie vers de nombreuses expériences.

Conclusion générale et perspectives

Il y a en encore 10 ans, le mécanisme de photo-protection qE_{cya}, où l'excès d'énergie absorbée par les phycobilisomes est dissipé sous forme de chaleur grâce à l'OCP, était encore inconnu chez les cyanobactéries. En 2000, mon équipe a décrit les premiers résultats suggérant qu'un tel mécanisme existait chez *Synechocystis* (El Bissati *et al.* 2000). Les résultats de Rakhimberdieva *et al.* 2004 ont appuyé l'existence d'un mécanisme qui implique le quenching de fluorescence des phycobilisomes et suggèrent l'implication d'un caroténoïde (Rakhimberdieva *et al.* 2004). En 2006, mon équipe a démontré que ce mécanisme induit par une forte lumière bleue-verte est photo-protecteur et implique l'Orange Carotenoid Protein, ainsi que les phycobilisomes (et non les antennes chlorophyliennes) chez *Synechocystis*. Entre 2002 et 2005, plusieurs études ont rapporté l'existence d'autres molécules impliquées dans la dissipation de l'énergie chez *Synechocystis* comme les HLIPs et la protéine IsiA (Havaux *et al.* 2003; Yeremenko *et al.* 2004; Ihalainen *et al.* 2005). C'est dans ce contexte que j'ai débuté mon doctorat.

La première étude à laquelle j'ai participé (chapitre I) a démontré, qu'en carence en fer, la diminution de fluorescence induite par la lumière bleue-verte est reliée à la diminution de l'émission des phycobilisomes impliquant l'OCP et non à des modifications de la protéine IsiA comme cela avait été proposé par le passé (Cadoret *et al.* 2004; Joshua *et al.* 2005). La présence de la protéine IsiA protège les cellules du stress mais cette protéine n'est pas impliquée dans le quenching de fluorescence relié au mécanisme qE_{cya} induit par une forte lumière. Nous avons aussi montré que la carence en fer induit la production de plus d'OCP et une augmentation de son mécanisme de photo-protection associé. Je me suis ensuite intéressée à la présence de l'OCP et de son mécanisme associé chez les cyanobactéries en général car jusqu'ici le mécanisme avait uniquement été caractérisé chez la cyanobactérie d'eau douce *Synechocystis*. Ce travail, décrit dans le chapitre II, montre que la plupart des cyanobactéries se protège des fluctuations de lumière en utilisant le mécanisme de dissipation de l'énergie sous forme de chaleur impliquant l'OCP et les phycobilisomes déjà observé chez *Synechocystis*. L'augmentation du mécanisme qE_{cya} a aussi été observée sous carence en fer chez d'autres cyanobactéries contenant l'OCP. Les quelques souches ne contenant pas l'OCP se sont avérées incapables de réaliser ce mécanisme. De plus, elles sont plus sensibles aux conditions de photoinhibition et ont adopté une stratégie physiologique différente, basée sur une dégradation rapide des phycobilisomes, pour endurer un stress tel que celui de la carence en fer. Le travail dans cette partie de ma thèse a permis de généraliser la présence de l'OCP et du mécanisme qE_{cya}, ainsi que leur induction en conditions de stress chez les cyanobactéries.

L'autre partie de mon doctorat a été consacrée à la caractérisation des acteurs du mécanisme qE_{cya} autres que l'OCP. J'ai premièrement travaillé sur l'interaction des phycobilisomes avec l'OCP (chapitre III). Mes résultats suggèrent fortement qu'il existe une

relation entre les phycobilisomes et l'OCP car ils co-migrent dans un gradient de saccharose. Cependant, bien que l'OCP et les phycobilisomes soient associés, aucun déclin de fluorescence induit par une forte lumière n'a été observé. Nos conditions d'études *in vitro* étaient trop éloignées de celles *in vivo*. L'étude de l'interaction OCP-phycobilisomes a encore beaucoup de perspectives notamment au niveau des études en biologie moléculaire. La construction de mutants qui ne contiennent pas un linker du phycobilisome qui ressemble à la partie C-terminale de l'OCP et de mutants mutés au niveau des émetteurs de l'énergie des phycobilisomes permettraient d'avoir plus d'information sur le lieu de l'interaction et du transfert de l'énergie entre l'OCP et les phycobilisomes.

Enfin, la plus grande contribution de cette thèse à la caractérisation du mécanisme qE_{cya} est la découverte d'une nouvelle protéine impliquée dans ce mécanisme de photo-protection (chapitre IV). Nous avons nommé cette protéine la Fluorescence Recovery Protein, FRP, car elle est impliquée dans la récupération de la fluorescence sous faible lumière après l'induction du déclin de la fluorescence par une forte lumière bleue-verte. D'un côté l'absence de cette protéine inhibe la récupération de fluorescence, et de l'autre côté, plus la quantité de la FRP est élevée par rapport à l'OCP, plus la récupération de la fluorescence est rapide. L'étude du gène codant pour la FRP, *slr*1964, a montré qu'il est conservé en aval du gène de l'OCP chez les cyanobactéries. J'ai ensuite montré que ce gène de la FRP peut à la fois être transcrit indépendamment et co-transcrit avec le gène de l'OCP. Et l'étude de l'interaction de l'OCP avec la protéine de 13kDa liée à la membrane qu'est la FRP suggère fortement que ces deux protéines interagissent. Enfin, j'ai mis au point un protocole de purification de la FRP recombinante surproduite sous forme de corps d'inclusion chez *E.coli* (chapitre V). Cette protéine recombinante a servi à faire des anti-corps anti-FRP et pourra être utilisée pour des études structurales sur la FRP. La découverte de cette nouvelle protéine ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension de ce mécanisme de photo-protection. De plus, en parallèle à la découverte de la FRP, mon équipe a démontré que l'OCP est une molécule photo-active (Wilson *et al.* 2008a; Punginelli *et al.* 2009). L'OCP inactive est orange, une forte lumière bleue-verte induit la formation de la forme active rouge de l'OCP qui va pouvoir dissiper l'excès d'énergie sous forme de chaleur. Ces données ajoutées à celles concernant la FRP nous ont entraîné vers d'autres interrogations :

- L'OCP est-elle dimérique *in vivo* ? Y a-t-il une importance de l'état d'oligomérisation de l'OCP dans sa fonction ?
- Avec quoi la FRP interagit-elle pour permettre la récupération de fluorescence ? La partie C-terminale de l'OCP ? L'OCP active ou inactive ? Les phycobilisomes ?
- Quel est le quencher ?
- Le couple OCP-FRP est-il impliqué dans un mécanisme de transduction du signal ?

Notre modèle actuel (figure D.4) stipule qu'une forte lumière bleue-verte induit la formation de la forme active rouge de l'OCP. Cette OCP rouge active, qui va se lier aux phycobilisomes, est le quencher capable de dissiper l'excès d'énergie sous forme de chaleur et une diminution de fluorescence est observée. Quand les conditions lumineuses reviennent à une illumination non excessive, la récupération de cette fluorescence est observée grâce à l'action de la FRP qui capte l'OCP rouge active sur les phycobilisomes. La FRP maintient ensuite l'OCP et lorsqu'elle s'est reconvertie sous sa forme orange inactive, la FRP la libère (figure D.4). Ce mécanisme de récupération est permanent mais à basse lumière, il n'y a plus de formation de la forme rouge et peu à peu toute l'OCP devient orange (inactive).
Les points à démontrer dans les prochaines années pour élucider ce fascinant mécanisme de photo-protection propre aux cyanobactéries sont les suivants :

(1) L'OCP interagit avec le cœur de l'allophycocyanine des phycobilisomes. Les changements induits dans le domaine C-terminal sont essentiels pour le quenching d'énergie et de fluorescence
(2) L'état oligomérique de l'OCP est fonctionnellement important
(3) La FRP permet la récupération de fluorescence. Soit, la FRP décroche spécifiquement la forme orange inactive des phycobilisomes. Soit, elle capte la forme active rouge de l'OCP sur les phycobilisomes, lui permet de repasser dans un état oligomérique orange inactif et la relâche sous cette forme.

L'étude de l'OCP et des protéines associées à son mécanisme apporte des connaissances fondamentales sur l'influence des protéines, sur les propriétés des caroténoïdes et sur un mécanisme de photo-protection impliquant un nouveau type de protéine photo-active. Mais les protéines OCP et FRP impliquées dans ce mécanisme peuvent aussi servir à des applications dans la production de biomasse par les cyanobactéries. L'importance de la protection du stress chez les cyanobactéries utilisées pour les bio-fiouls, l'alimentaire ou la production de molécules d'intérêt est devenue apparente pour les industries en biotechnologies. La lumière est connue pour être le principal facteur limitant l'efficacité des photo-bioréacteurs, il est trop bas ou quasi nul dans le fond de la culture, et trop fort à proximité de la source de lumière. La culture de souches avec des modifications de l'antenne ou du mécanisme de photo-protection associé aux antennes peut potentiellement augmenter l'efficacité des biotechnologies basées sur les photo-bioréacteurs. La confluence des études structurales, spectroscopiques et fonctionnelles de la photo-protection chez les cyanobactéries présentées dans cette thèse a été très productive en terme d'apport de nouveaux éléments dans la compréhension de ce mécanisme de photo-protection. Ces nouveaux éléments pourront conduire à des applications importantes en bio-engineering.

Annexes

Ci-après les annexes dans l'ordre cité ci-dessous :

Annexe A1 : Séquence 1766900-1769250 du génome de *Synechocystis* contenant les gènes *slr*1963 et *slr*1964.
Les brins matrice et complémentaire (sens « Forward » et « Reverse ») sont en noir, la séquence en acides aminés des cadres ouverts de lecture est en vert (les codons « stop » sont indiqués avec un «* »). Les nombres à droite et à gauche correspondent au nombre de base. Les oligopeptides, dont les noms sont inscrits en bleu, utilisés pour la transcription réverse et la PCR quantitative en temps réel (voir tableau 4 et les matériels et méthodes) sont indiqués avec des flèches. (2 pages)

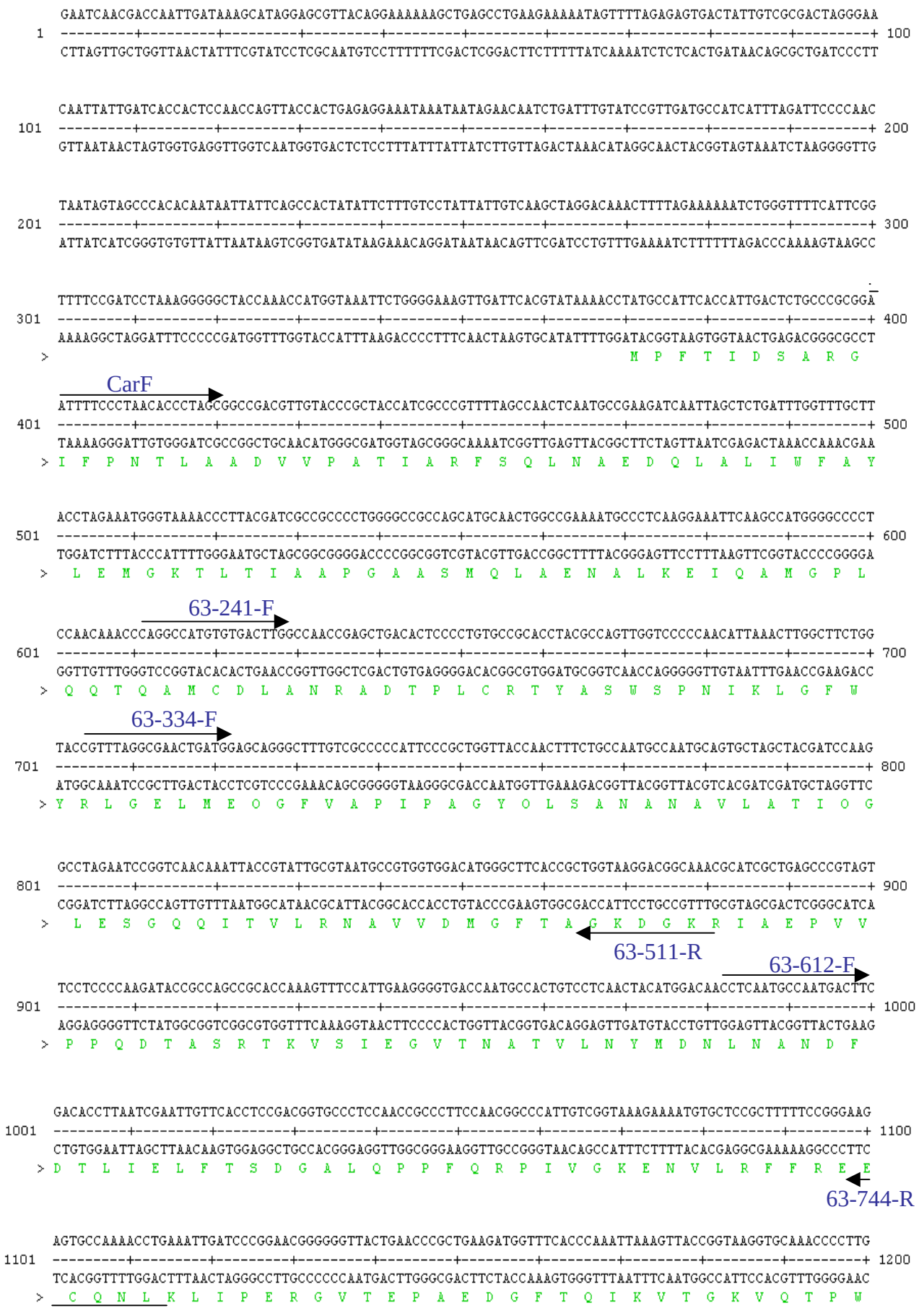
Annexe A2 : Notice du plasmide pET-15b (Novagène) utilisé pour surproduire Slr1964 avec un HisTag au niveau de son extrémité N-terminale chez *E.coli*. (1 page)

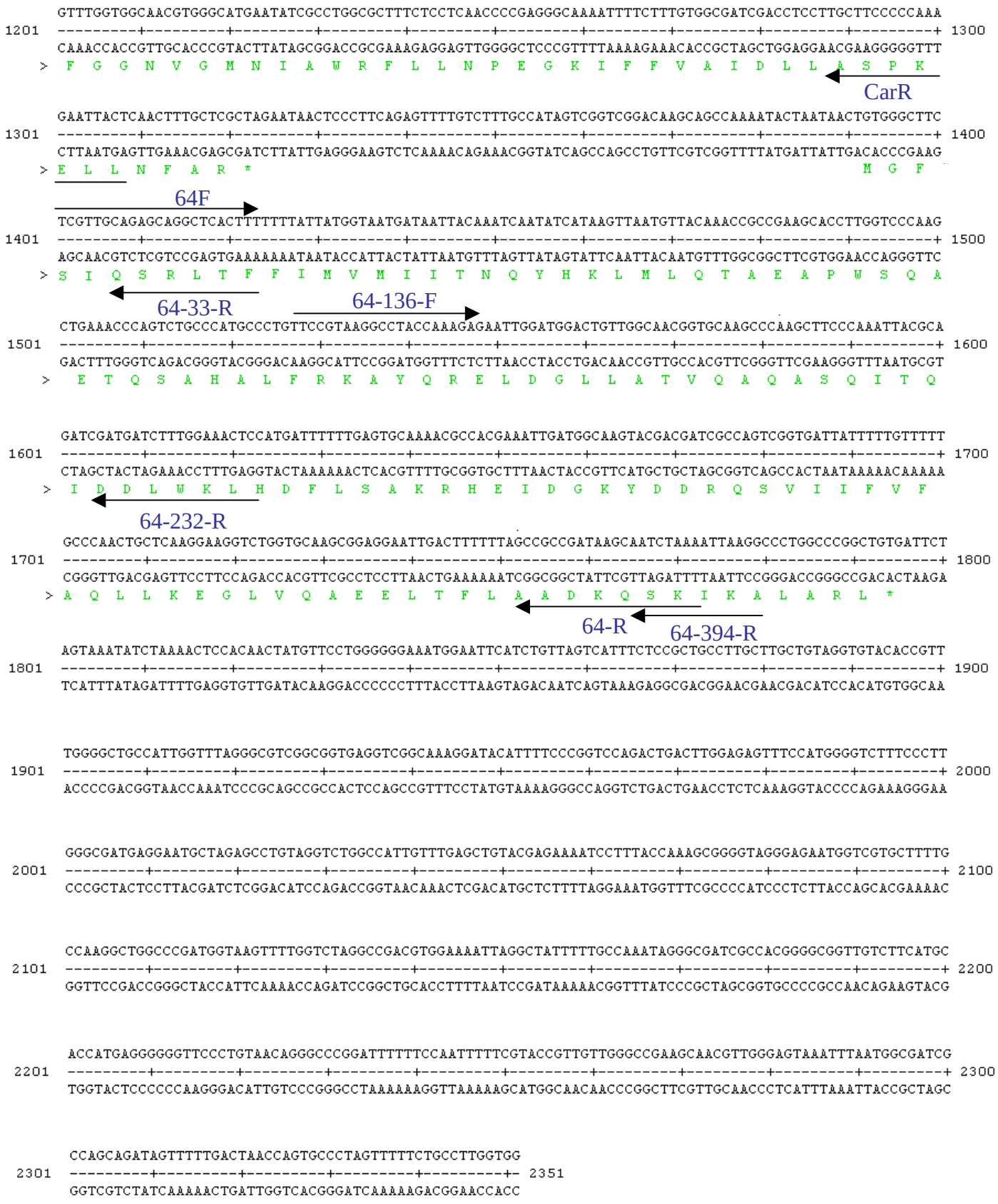
Annexe A3 : Notice du plasmide pASK-IBA7+ (IBA) utilisé pour surproduire Slr1964 avec un StrepTag au niveau de son extrémité N-terminale chez *E.coli*. (2 pages)

Annexe A4 : **Notice du plasmide pASK-IBA3+ (IBA) utilisé pour surproduire Slr1964 avec un StrepTag au niveau de son extrémité C-terminale chez *E.coli*.** (2 pages)

Annexe A5 : Clé taxonomique des sous-sections des cyanobactéries (1 page)

Annexe A6 : **Formes des cyanobactéries présentées suivant la classification de Bergey's** (1 page)


CarF
63-241-F
63-334-F
63-511-R
63-612-F
63-744-R

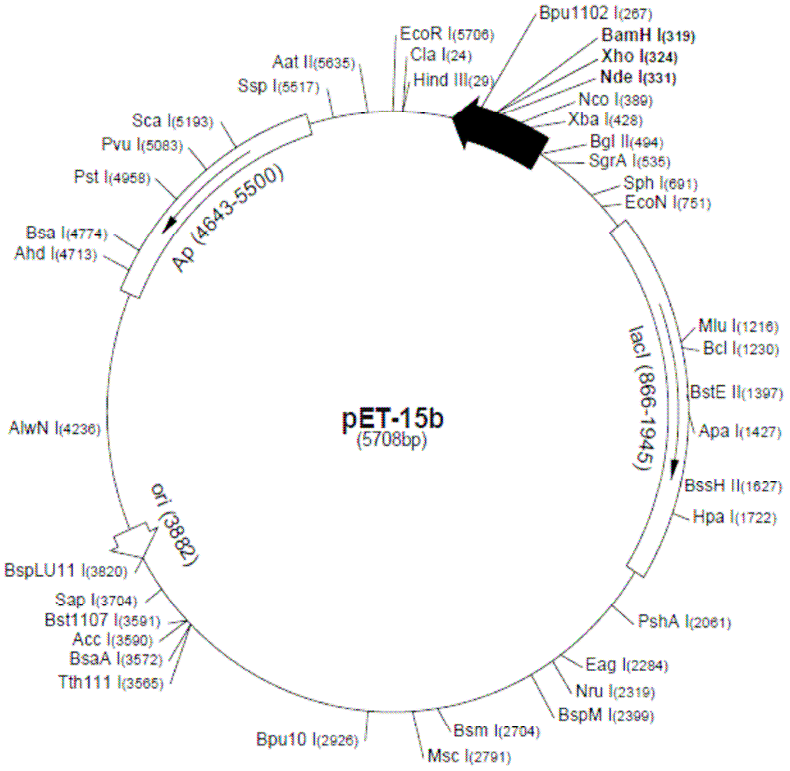

CarR
64F
64-33-R
64-136-F
64-232-R
64-R
64-394-R

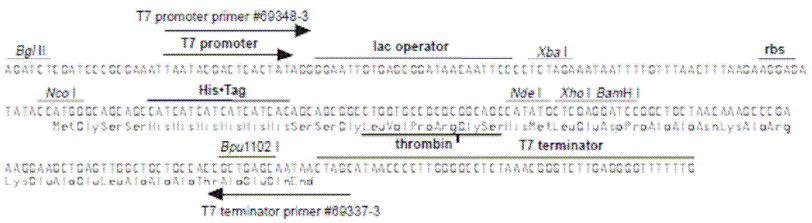
pET-15b Vector

TB045 12/98

The pET-15b vector (Cat. No. 69661-3) carries an N-terminal His•Tag® sequence followed by a thrombin site and three cloning sites. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below.

pET-15b sequence landmarks	
T7 promoter	453-469
T7 transcription start	452
His•Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites	
(*Nde* I - *Bam*H I)	319-335
T7 terminator	213-259
lacI coding sequence	(866-1945)
pBR322 origin	3882
bla coding sequence	4643-5500





pET-15b cloning/expression region

Data Sheet

IBA Headquarters
IBA GmbH
Rudolf-Wissell-Str. 28
D-37079 Göttingen
Germany
Tel. +49 (0) 551-5 06 72-0
Fax +49 (0) 551-5 06 72-181
E-mail info@iba-go.com
http://www.iba-go.com

IBA US Distribution Center
10748 Indianhead Industrial Blvd.
St. Louis, MO 63132
USA
Tel. 1-877-IBA-GmbH
(1-877-422-4624)
Fax 1-888-531-6813
E-mail info@iba-go.com
http://www.iba-go.com

Last date of revision
July 05

Version 1406-6

pASK-IBA7plus

Cat. no. : 2-1406-000

Lot no.: 1406-

Description	Expression plasmid. The expression cassette is under transcriptional control of the tetracycline promoter/operator. The expressed recombinant protein will be localized in the cytoplasm.
Affinity tag	*Strep*-Tactin affinity tag (*Strep*-tag II) for the purification of recombinant protein. The affinity tag is fused to the N-terminus of the recombinant protein and can be removed by cleavage with factor Xa.
Bacterial Expression	Expression is induced upon addition of 200 µg anhydrotetracycline (order no.: 2-0401-001; 2-0401-002) per 1 liter *E. coli* shaking culture (A_{550} = 0.5).
Expression strain	Any *E. coli* strain. The *tet*-promoter works independently from the genetic background of *E. coli*.
Resistance	Ampicillin
Form	5 µg, dissolved in 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA; 20 µl
Concentration	250 ng/µl
Storage	4 °C for frequent usage, -20 °C for long-term storage

For research use only

Strep-tag® technology for protein purification and detection is covered by US patent 5,506,121, UK patent 2272698 and French patent 93 13 066, the tetracycline promoter based expression system is covered by US patent 5,849,576 and *Strep*-Tactin® is covered by US patent 6,103,493. Further patent applications are pending world-wide. Purchase of reagents related to these technologies from IBA provides a license for non-profit and in-house research use only. Expression or purification or other applications of above mentioned technologies for commercial use require a separate license from IBA. A license may be granted by IBA on a case-by-case basis, and is entirely at IBA's discretion. Please contact IBA for further information on licenses for commercial use. *Strep*-tag® and *Strep*-Tactin® are registered trademarks of IBA GmbH.

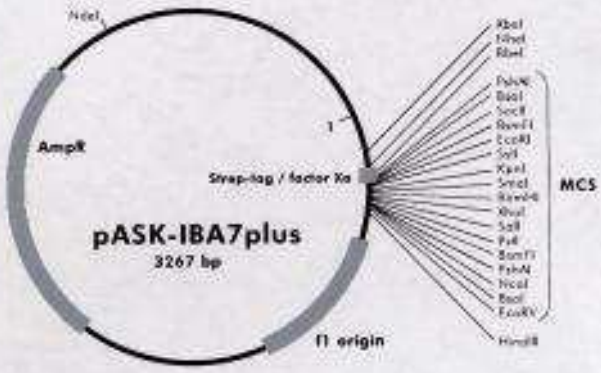
Multiple Cloning Site of pASK-IBA7plus

```
1       CCATCGAATGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCACTCCCTATC   79
                                                                  forward primer

80      AGTGATAGAGAAAAGTGAAATGAATAGTTCGACAAAAATCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAA   159
                                                 XbaI

                                                          R  P  R  S  R  I  R  A  R  Y  P
          link        Strep-tag            factorXa      S  T  A  V  P  N  S  S  S  V  P
        M  A  S  W  S  H  P  Q  F  E  K  I  E  G  R  R  D  R  G  P  E  F  E  L  G  T  R

160     ATGGCTAGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAATCGAAGGgcgcCGAGACCGCGGTCCCGAATTCGAGCTCGGTACCCG   239
          NheI                                   BbeI  BsaI      BsmFI      SstI  KpnI
                                                 EheI    PshAI       EcoRI           SmaI
                                                 KasI      SacII
                                                 NarI

        G  I  P  R  G  R  P  A  G  G  P  W  S  L  I  S  N  *
       G  D  P  S  R  S  T  C  R  G  T  M  V  S  D  I  *
         G  S  L  E  V  D  L  Q  G  D  H  G  L  *

240     GGGATCCCTCGAGGTCGACCTGCAGGGGGACCATGGTCTCTgataTCTAACTAAGCTTGACCTGTGAAGTGAAAAATGGC   319
        BamHI       SalI  PstI   BsmFI   BsaI   EcoRV      HindIII
             XhoI                 PshAI
                                   NcoI

320     GCACATTGTGCGACATTTTTTTTGTCTGCCGTTTACCGCTACTGCGTCACGGATCTCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATT   399
                                   reverse primer
```

Please note: Restriction enzymes in bold cut twice. The *BsaI* sites (isoschizomer of *Eco31I*) at each end of the multiple cloning site are useful for precise and oriented insertion of the recombinant gene by one cleavage reaction only. The "link" contains a restriction site which can be used e.g. for subcloning the recombinant gene into pEXPR-IBA vectors for mammalian expression.

Features of pASK-IBA7plus

	from bp	to bp
promoter	37	72
forward primer binding site	57	76
Strep-tag	160	192
factor Xa cleavage site	193	204
multiple cloning site	205	281
reverse primer binding site	349	365
f1 origin	378	816
AmpR resistance gene	965	1825
Tet-repressor	1835	2458



Cloning primers for the precise cloning using *BsaI* or *Eco31I*	Sequencing primers:
Forward: 5'- NNNNNNGGTCTCNG CGC (N_{20}) NNN NNN...	Forward: 5'- GAGTTATTTTACCACTCCCT -3'
Reverse: 5'- NNNNNNGGTCTCNTA TCA (N_{20}) NNN NNN...	Reverse: 5'- CGCAGTAGCGGTAAACG -3'

Data Sheet

IBA Headquarters
IBA GmbH
Rudolf-Wissell-Str. 28
D-37079 Göttingen
Germany
Tel. +49 (0) 551-5 06 72-0
Fax +49 (0) 551-5 06 72-181
E-mail info@iba-go.com
http://www.iba-go.com

IBA US Distribution Center
10748 Indianhead Industrial Blvd
St. Louis, MO 63132
USA
Tel. 1-877-IBA-GmbH
(1-877-422-4624)
Fax 1-888-531-6813
E-mail info@iba-go.com
http://www.iba-go.com

Last date of revision
July 05
Version 1402-6

pASK-IBA3plus

Cat. no. : 2-1402-000

Lot no.: 1402-

Description	Expression plasmid. The expression cassette is under transcriptional control of the tetracycline promoter/operator. The expressed recombinant protein will be localized in the cytoplasm.
Affinity tag	*Strep*-Tactin affinity tag (*Strep*-tag II) for the purification of recombinant protein. The affinity tag is fused to the C-terminus of the recombinant protein.
Bacterial Expression	Expression is induced upon addition of 200 µg anhydrotetracycline (order no.: 2-0401-001; 2-0401-002) per 1 liter *E. coli* shaking culture (A_{550} = 0.5).
Expression strain	Any *E. coli* strain. The *tet*-promoter works independently from the genetic background of *E. coli*.
Resistance	Ampicillin
Form	5 µg, dissolved in 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA; 20 µl
Concentration	250 ng/µl
Storage	4 °C for frequent usage, -20 °C for long-term storage

For research use only

Strep-tag® technology for protein purification and detection is covered by US patent 5,506,121, UK patent 2272698 and French patent 93 13 066; the tetracycline promoter based expression system is covered by US patent 5,849,576 and *Strep*-Tactin® is covered by US patent 6,103,493. Further patent applications are pending world-wide. Purchase of reagents related to these technologies from IBA provides a license for non-profit and in-house research use only. Expression or purification or other applications of above mentioned technologies for commercial use require a separate license from IBA. A license may be granted by IBA on a case-by-case basis, and is entirely at IBA's discretion. Please contact IBA for further information on licenses for commercial use. *Strep*-tag® and *Strep*-Tactin® are registered trademarks of IBA GmbH.

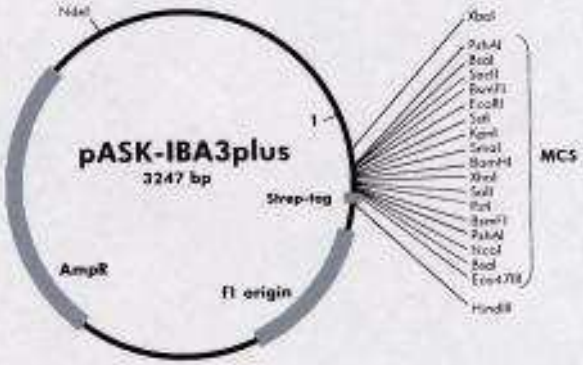
Multiple Cloning Site of pASK-IBA3plus

```
1        CCATCGAATGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCACTCCCTA   77
                                                                  forward primer

78       TCAGTGATAGAGAAAAGTGAAATGAATAGTTCGACAAAAATCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAC   157
                                                  XbaI

           M  G  D  R  G  P  E  F  K  L  G  T  R  G  S  L  E  V  D  L  Q  G  D  H  G  L
158      AaatgGGAGACCGCGGTCCCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCCTCGAGGTCGACCTGCAGGGGGACCATGGTCTC   237
              BsaI      BamFI      SstI  KpnI      BamHI       SalI  PstI   BsmFI   BsaI
                PshAI       EcoRI            SmaI       XhoI                  PshAI
                  SacII                                                        NcoI

         link       Strep-tag
         S  A  W  S  H  P  Q  F  E  K  *
238      AgcgcTTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATAATAAGCTTGACCTGTGAAGTGAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTT   317
         Eco47III                          HindIII

318      TTTTTGTCTGCCGTTTACCGCTACTGCGTCACGGATCTCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGT   397
                     reverse primer
```

Please note: Restriction enzymes in bold cut twice. The *BsaI* sites (isoschizomer of *Eco31I*) at each end of the multiple cloning site are useful for precise and oriented insertion of the recombinant gene by one cleavage reaction only.

Features of pASK-IBA3plus

	from bp	to bp
promoter	37	72
forward primer binding site	57	76
multiple cloning site	160	243
Strep-tag	244	273
reverse primer binding site	329	345
f1 origin	358	796
AmpR resistance gene	945	1805
Tet-repressor	1815	2438



Cloning primers for the precise cloning using *BsaI* or *Eco31I*	Sequencing primers:
Forward: 5'- NNNNNNGGTCTCNA ATG NNN NNN... (N_{12})*	Forward: 5'- GAGTTATTTTACCACTCCCT -3'
Reverse: 5'- NNNNNNGGTCTCNGC GCT NNN NNN... (N_{26})	Reverse: 5'- CGCAGTAGCGGTAAACG -3'

* The ATG start codon is already included

Annexe A5

Clé taxonomique des sous-sections des cyanobactéries

D'après le Manuel de Bergey (Garrity *et al.* 2001)

A
1. Formes unicellulaires ou agrégats non filamenteux maintenus par les parois externes ou une matrice gélatineuse (coccogonophycidées)
---> B
2. Formes filamenteuses. Trichomes ramifiés ou non ramifiés, uni- ou plurisériés (hormogonophycidées)
----> C

B
1. Reproduction par division binaire suivant 1, 2 ou 3 plans symétriques ou non , ou par bourgeonnement
----> Sous-section I
2. Reproduction par fissions multiples internes avec production de cellules filles plus petites que les cellules parentales ou par fissions multiples et binaires
----> Sous-section II

C
1. Reproduction par fission binaire dans un seul plan produisant des trichomes unisériés sans ramifications vraies (de fausses ramifications peuvent se former)
----> D
2. Reproduction par fission binaire , parfois ou fréquemment suivant plusieurs plans , donnant naissance à des trichomes multisériés et (ou) à des trichomes présentant différents types de ramifications vraies
---->Sous-section V

D
1. Trichomes composés de cellules ne se différentiant pas en hétérocystes ou en akinètes
----> Sous-section III
2. Une ou plusieurs cellules du trichome se différencient en hétérocystes, au moins lorsque le milieu est carencé en ammonium ou en nitrate; certaines cellules peuvent aussi former des akinètes
----> Sous-section IV

Annexe A6

Formes des cyanobactéries présentées suivant la classification de Bergey's
(Garrity *et al.* 2001)

Sous-section I:
Chamaesiphon, Chroococcus, Cyanobacterium, Cyanobium, Cyanothece, Dactylococcopsis, Gloeobacter, Gloeocapsa, Gloeothece, Microcystis, Prochlorococcus, Prochloron, Synechococcus, Synechocystis.

Sous-section II:
- Sous-groupe I: *Cyanocystis, Dermocarpella, Stanieria, Xenococcus*.
- Sous-groupe II: *Chroococcidiopsis, Myxosarcina, Pleurocapsa*.

Sous-section III:
Arthrospira, Borzia, Crinalium, Geitlerinema, Leptolyngbya, Limnothrix, Lyngbya, Microcoleus, Oscillatoria, Planktothrix, Prochlorothrix, Pseudanabaena,Spirulina, Starria, Symploca, Trichodesmium, Tychonema.

Sous-section IV:
- Sous-groupe I:
Anabaena, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Cyanospira, Cylindrospermopsis, Cylindrospermum, Nodularia, Nostoc, Scytonema.
- Sous-groupe II:
Calothrix, Gloeotrichia, Microchaete, Rivularia, Tolypothrix.

Sous-section V:
Chlorogloeopsis, Doliocatella, Fischerella, Geitleria, Iyengariella, Mastigocladopsis, Mastigocoleus, Nostochopsis, Stigonema, Westiella.

Bibliographie

Abasova, L., C. Boulay, I. Vass and D. Kirilovsky (2008). Non-photochemical-quenching mechanisms in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. Photosynthesis. Energy from the sun. Proceedings of the 14th congress on photosynthesis 2007. J. F. Allen, E. Gantt, J. H. Golbeck and B. Osmond. Heidelberg, Springer-Verlag**:** 993.

Adamska, I. (1997). "ELIPs - Light-induced stress proteins." Physiol Plant **100**(4): 794-805.

Adir, N. (2005). "Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant." Photosynth Res **85**(1): 15-32.

Ahmad, M. and A. R. Cashmore (1993). "HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor." Nature **366**(6451): 162-6.

Ahn, T. K., T. J. Avenson, M. Ballottari, Y. C. Cheng, K. K. Niyogi, R. Bassi and G. R. Fleming (2008). "Architecture of a charge-transfer state regulating light harvesting in a plant antenna protein." Science **320**(5877): 794-7.

Ajlani, G. and C. Vernotte (1998). "Construction and characterization of a phycobiliprotein-less mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803." Plant Mol Biol **37**(3): 577-80.

Ajlani, G., C. Vernotte, L. DiMagno and R. Haselkorn (1995). "Phycobilisome core mutants of *Synechocystis* PCC 6803." Biochim Biophys Acta **1231**: 189-196.

Allen, J. F. (1992). "Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis." Biochim Biophys Acta **1098**(3): 275-335.

Allen, J. F. (2003). "State transitions, a question of balance." Science **299**(5612): 1530-2.

Allen, J. F., J. Bennett and K. E. Steinback (1981). "Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems." Nature **291**: 25-29.

Allen, J. F. and J. Forsberg (2001). "Molecular recognition in thylakoid structure and function." Trends Plant Sci **6**(7): 317-26.

Allen, J. F. and N. G. Holmes (1986). "A general model for regulation of photosynthetic unit fonction by protein phosphorylation." FEBS Lett **202**: 175-181.

Anandan, S., D. T. Morishige and J. P. Thornber (1993). "Light-induced biogenesis of light-harvesting complex I (LHC I) during chloroplast development in barley (*hordeum vulgare*). Studies using cDNA clones of the 21- and 20-kilodalton LHC I apoproteins." Plant Physiol **101**(1): 227-36.

Anderson, D. C., E. L. Campbell and J. C. Meeks (2006). "A soluble 3D LC/MS/MS proteome of the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme*." J Proteome Res **5**(11): 3096-104.

Andrizhiyevskaya, E. G., T. M. Schwabe, M. Germano, S. D'Haene, J. Kruip, R. van Grondelle and J. P. Dekker (2002). "Spectroscopic properties of PSI-IsiA supercomplexes from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942." Biochim Biophys Acta **1556**(2-3): 265-72.

Apel, K. and K. Kloppstech (1978). "The plastid membranes of barley (*Hordeum vulgare*). Light-induced appearance of mRNA coding for the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll *a*/*b* protein." Eur J Biochem **85**(2): 581-8.

Aravind, L. and C. P. Ponting (1997). "The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins." Trends Biochem Sci **22**(12): 458-9.

Armstrong, G. A. (1997). "Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale." Annu Rev Microbiol **51**: 629-59.

Aro, E. M., I. Virgin and B. Andersson (1993). "Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover." Biochim Biophys Acta **1143**(2): 113-34.

Arteni, A. A., G. Ajlani and E. J. Boekema (2009). "Structural organisation of phycobilisomes from *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and their interaction with the membrane." Biochim Biophys Acta **1787**(4): 272-9.

Ashby, M. K. and C. W. Mullineaux (1999). "The role of ApcD and ApcF in energy transfer from phycobilisomes to PSI and PSII in a cyanobacterium." Photosynth Res **61**: 169-179.

Aspinall-O'Dea, M., M. Wentworth, A. Pascal, B. Robert, A. Ruban and P. Horton (2002). "*In vitro* reconstitution of the activated zeaxanthin state associated with energy dissipation in plants." PNAS **99**(25): 16331-5.

Avenson, T. J., T. K. Ahn, K. K. Niyogi, M. Ballottari, R. Bassi and G. R. Fleming (2009). "Lutein can act as a switchable charge transfer quencher in the CP26 light-harvesting complex." J Biol Chem **284**(5): 2830-5.

Baca, M., G. E. Borgstahl, M. Boissinot, P. M. Burke, D. R. Williams, K. A. Slater and E. D. Getzoff (1994). "Complete chemical structure of photoactive yellow protein: novel thioester-linked 4-hydroxycinnamyl chromophore and photocycle chemistry." Biochemistry **33**(48): 14369-77.

Bailey, S. and A. Grossman (2008). "Photoprotection in cyanobacteria: regulation of light harvesting." Photochem Photobiol **84**(6): 1410-20.

Bailey, S., N. H. Mann, C. Robinson and D. J. Scanlan (2005). "The occurrence of rapidly reversible non-photochemical quenching of chlorophyll *a* fluorescence in cyanobacteria." FEBS Lett **579**(1): 275-80.

Banerjee, R. and A. Batschauer (2005). "Plant blue-light receptors." Planta **220**(3): 498-502.

Banerjee, R., E. Schleicher, S. Meier, R. M. Viana, R. Pokorny, M. Ahmad, R. Bittl and A. Batschauer (2007). "The signaling state of *Arabidopsis* cryptochrome 2 contains flavin semiquinone." J Biol Chem **282**(20): 14916-22.

Bassi, R. and S. Caffarri (2000). "Lhc proteins and the regulation of photosynthetic light harvesting function by xanthophylls." Photosynth Res **64**(2-3): 243-56.

Bassi, R., G. Hoyer-Hansen, R. Barbato, G. M. Giacometti and D. J. Simpson (1987). "Chlorophyll-proteins of the photosystem II antenna system." J Biol Chem **262**(27): 13333-41.

Bebout, B. M. and F. Garcia-Pichel (1995). "UV B-Induced Vertical Migrations of Cyanobacteria in a Microbial Mat." Appl Environ Microbiol **61**(12): 4215-4222.

Bellafiore, S., F. Barneche, G. Peltier and J. D. Rochaix (2005). "State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7." Nature **433**(7028): 892-5.

Bendall, D. S. and R. S. Manasse (1995). "Cyclic photophosphorylation and electron transport." Biochim Biophys Acta **1229**(1): 23-38.

Bennett, A. and L. Bogorad (1973). "Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga." J Cell Biol **58**(2): 419-35.

Bennett, J. (1977). "Phosphorylation of chloroplast membrane polypeptides." Nature **269**: 344-346.

Ben-Shem, A., F. Frolow and N. Nelson (2003). "Crystal structure of plant photosystem I." Nature **426**(6967): 630-5.

Betterle, N., M. Ballottari, S. Zorzan, S. de Bianchi, S. Cazzaniga, L. Dall'osto, T. Morosinotto and R. Bassi (2009). "Light-induced dissociation of an antenna hetero-oligomer is needed for non-photochemical quenching induction." J Biol Chem **284**(22): 15255-66.

Bibby, T. S., J. Nield and J. Barber (2001). "Iron deficiency induces the formation of an antenna ring around trimeric photosystem I in cyanobacteria." Nature **412**(6848): 743-5.

Biggins, J. and D. Bruce (1989). "Regulation of excitation energy transfer in organisms containing phycobilins." Photosynth Res **20**: 1-34.

Boekema, E. J., A. Hifney, A. E. Yakushevska, M. Piotrowski, W. Keegstra, S. Berry, K. P. Michel, E. K. Pistorius and J. Kruip (2001). "A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria." Nature **412**(6848): 745-8.

Boekema, E. J., J. F. van Breemen, H. van Roon and J. P. Dekker (2000). "Arrangement of photosystem II supercomplexes in crystalline macrodomains within the thylakoid membrane of green plant chloroplasts." J Mol Biol **301**(5): 1123-33.

Boekema, E. J., H. van Roon, F. Calkoen, R. Bassi and J. P. Dekker (1999). "Multiple types of association of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes." Biochemistry **38**(8): 2233-9.

Bonente, G., B. D. Howes, S. Caffarri, G. Smulevich and R. Bassi (2008). "Interactions between the photosystem II subunit PsbS and xanthophylls studied *in vivo* and *in vitro*." J Biol Chem **283**(13): 8434-45.

Boulay, C., L. Abasova, C. Six, I. Vass and D. Kirilovsky (2008b). "Occurrence and function of the orange carotenoid protein in photoprotective mechanisms in various cyanobacteria." Biochim Biophys Acta **1777**(10): 1344-54.

Boulay, C., S. D'Haene, A. Wilson and D. Kirilovsky (en préparation). "The FRP, a new protein involved in the fluorescence recovery of the OCP-related photoprotective mechanism in cyanobacteria." En préparation.

Boulay, C., A. Wilson and D. Kirilovsky (2008a). Orange carotenoïd protein (OCP) related NPQ in *Synechocystis* PCC 6803 OCP-phycobilisomes interactions. Photosynthesis. Energy from the sun. Proceedings of the 14th congress on photosynthesis 2007. J. F. Allen, E. Gantt, J. H. Golbeck and B. Osmond. Heidelberg, Springer-Verlag**:** 997-1001.

Bouly, J. P., E. Schleicher, M. Dionisio-Sese, F. Vandenbussche, D. Van Der Straeten, N. Bakrim, S. Meier, A. Batschauer, P. Galland, R. Bittl and M. Ahmad (2007). "Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states." J Biol Chem **282**(13): 9383-91.

Braatsch, S. and G. Klug (2004). "Blue light perception in bacteria." Photosynth Res **79**(1): 45-57.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.

Bramley, P. M. and G. Sandmann (1985). "*In vitro* and *in vivo* biosynthesis of xanthophylls by the cyanobacterium *Aphanocapsa*." Photochemistry **24**: 2919-2922.

Brejc, K., R. Ficner, R. Huber and S. Steinbacher (1995). "Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of allophycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina platensis* at 2.3 A resolution." J Mol Biol **249**(2): 424-40.

Breton, J., E. Nabedryk and W. Leibl (1999). "FTIR study of the primary electron donor of photosystem I (P700) revealing delocalization of the charge in P700(+) and localization of the triplet character in (3)P700." Biochemistry **38**(36): 11585-92.

Brettel, K. and W. Leibl (2001). "Electron transfer in photosystem I." Biochim Biophys Acta **1507**(1-3): 100-14.

Bruce, D., S. Brimble and D. A. Bryant (1989). "State transitions in a phycobilisome-less mutant of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002." Biochim Biophys Acta **974**(1): 66-73.

Brudler, R., K. Hitomi, H. Daiyasu, H. Toh, K. Kucho, M. Ishiura, M. Kanehisa, V. A. Roberts, T. Todo, J. A. Tainer and E. D. Getzoff (2003). "Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution." Mol Cell **11**(1): 59-67.

Bryant, D. A., G. Guglielmi, N. Tandeau de Marsac, A. Castets and G. Cohen-Bazire (1979). "The structure of cyanobacterial phycobilisomes : a model." Arch Microbiol **123**: 113-127.

Burnap, R. L. and L. A. Sherman (1991). "Deletion mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC6803 indicates that the Mn-stabilizing protein of photosystem II is not essential for O2 evolution." Biochemistry **30**(2): 440-6.

Burnap, R. L., T. Troyan and L. A. Sherman (1993). "The highly abundant chlorophyll-protein complex of iron-deficient *Synechococcu*s sp. PCC7942 (CP43') is encoded by the *isi*A gene." Plant Physiol **103**(3): 893-902.

Butler, P. J. and W. Kuhlbrandt (1988). "Determination of the aggregate size in detergent solution of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex from chloroplast membranes." PNAS **85**(11): 3797-3801.

Cadoret, J. C., R. Demoulière, J. Lavaud, H. J. van Gorkom, J. Houmard and A. L. Etienne (2004). "Dissipation of excess energy triggered by blue light in cyanobacteria with CP43' (*isi*A)." Biochim Biophys Acta **1659**(1): 100-4.

Caffarri, S., S. Frigerio, E. Olivieri, P. G. Righetti and R. Bassi (2005). "Differential accumulation of Lhcb gene products in thylakoid membranes of Zea mays plants grown under contrasting light and temperature conditions." Proteomics **5**(3): 758-68.

Cai, Y. P. and C. P. Wolk (1990). "Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences." J Bacteriol **172**(6): 3138-45.

Camm, E. L. and B. R. Green (1980). "Fractionation of thylakoid membranes with the nonionic detergent octyl-beta-d-glucopyranoside: resolution of chlorophyll-protein complex II into two chlorophyll-protein complexes." Plant Physiol **66**(3): 428-432.

Campbell, D., M. J. Eriksson, G. Öquist, P. Gustafsson and A. K. Clarke (1998a). "The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins." PNAS **95**(1): 364-9.

Campbell, D., V. Hurry, A. K. Clarke, P. Gustafsson and G. Öquist (1998b). "Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation." Microbiol Mol Biol Rev **62**(3): 667-83.

Capuano, V., J. C. Thomas, N. Tandeau de Marsac and J. Houmard (1993). "An *in vivo* approach to define the role of the L_{CM}, the key polypeptide of cyanobacterial phycobilisomes." J Biol Chem **268**(11): 8277-83.

Carlberg, I., M. Hansson, T. Kieselbach, W. P. Schroder, B. Andersson and A. V. Vener (2003). "A novel plant protein undergoing light-induced phosphorylation and release from the photosynthetic thylakoid membranes." PNAS **100**(2): 757-62.

Castelletti, S., T. Morosinotto, B. Robert, S. Caffarri, R. Bassi and R. Croce (2003). "Recombinant Lhca2 and Lhca3 subunits of the photosystem I antenna system." Biochemistry **42**(14): 4226-34.

Chen, M. and T. S. Bibby (2005b). "Photosynthetic apparatus of antenna-reaction centres supercomplexes in oxyphotobacteria: insight through significance of Pcb/IsiA proteins." Photosynth Res **86**(1-2): 165-73.

Chen, M., R. G. Quinnell and A. W. Larkum (2002). "The major light-harvesting pigment protein of *Acaryochloris marina*." FEBS Lett **514**(2-3): 149-52.

Chitnis, P. R. and J. P. Thornber (1988). "The major light-harvesting complex of Photosystem II : aspects of its molecular and cell biology." Photosynth Res **16**: 41-63.

Cho, H. S., G. Choi, K. Y. Choi and B. H. Oh (1998). "Crystal structure and enzyme mechanism of Delta 5-3-ketosteroid isomerase from *Pseudomonas testosteroni*." Biochemistry **37**(23): 8325-30.

Christie, J. M. (2007). "Phototropin blue-light receptors." Annu Rev Plant Biol **58**: 21-45.

Christie, J. M., M. Salomon, K. Nozue, M. Wada and W. R. Briggs (1999). "LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide." PNAS **96**(15): 8779-83.

Cogdell, R. J., P. K. Fyfe, S. J. Barrett, S. M. Prince, A. A. Freer, N. W. Issacs, P. McGlynn and C. N. Hunter (1996). "The purple bacterial photosynthetic unit." Photosynth Res **48**: 55-63.

Croce, R., T. Morosinotto, S. Castelletti, J. Breton and R. Bassi (2002). "The Lhca antenna complexes of higher plants photosystem I." Biochim Biophys Acta **1556**(1): 29-40.

Crosson, S., S. Rajagopal and K. Moffat (2003). "The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains." Biochemistry **42**(1): 2-10.

Cusanovich, M. A. and T. E. Meyer (2003). "Photoactive yellow protein: a prototypic PAS domain sensory protein and development of a common signaling mechanism." Biochemistry **42**(17): 4759-70.

D'Argenio, D. A. and S. I. Miller (2004). "Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger." Microbiology **150**(Pt 8): 2497-502.

Dashdorj, N., W. Xu, R. O. Cohen, J. H. Golbeck and S. Savikhin (2005). "Asymmetric electron transfer in cyanobacterial Photosystem I: charge separation and secondary electron transfer dynamics of mutations near the primary electron acceptor A_0." Biophys J **88**(2): 1238-49.

Dekker, J. P. and E. J. Boekema (2005). "Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants." Biochim Biophys Acta **1706**(1-2): 12-39.

Delosme, R., J. Olive and F. A. Wollman (1996). "Changes in light energy distribution upon state transitions : an *in vivo* photoacoustic study of the wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*." Biochim Biophys Acta **1273**: 150-158.

Demmig, B., K. Winter, A. Kruger and F. C. Czygan (1987). "Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves : a possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy." Plant Physiol **84**(2): 218-224.

Demmig-Adams, B. (1990). "Carotenoïds and photoprotection in plants : a role for the xanphophyll zeaxanthin." Biochim Biophys Acta **1020**: 1-24.

Demmig-Adams, B. and W. W. Adams, 3rd (2006). "Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation." New Phytol **172**(1): 11-21.

Demmig-Adams, B., W. W. Adams, D. H. Barker, B. A. Logan, D. R. Bowling and A. S. Verhoeven (1996). "Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation." Physiol Plant **98**: 253-264.

Desamero, R. Z. B., V. Chynwat, I. Van der Hoef, F. J. Jansen, J. Lugtenburg, M. R. Wasielewski, A. Cua, D. F. Bocian and H. A. Frank (1998). "Mechanism of energy transfer from carotenoid to bacteriochlorophyll : light-harvesting by carotenoids having different extents of Π-electron conjugation incorporated within the B850 antenna complex from the carotenoidless bacterium *Rhodobacter sphaeroides* R-26." J Phys Chem B **102**: 8152-8162.

Diner, B. A. and F. Rappaport (2002). "Structure, dynamics, and energetics of the primary photochemistry of photosystem II of oxygenic photosynthesis." Annu Rev Plant Biol **53**: 551-80.

Diverse-Pierluissi, M. and D. W. Krogmann (1988). "A zeaxanthin protein form *Anacystis nidulans*." Biochim Biophys Acta **933**: 372-377.

Dolganov, N. A., D. Bhaya and A. R. Grossman (1995). "Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll *a/b* binding proteins of higher plants: evolution and regulation." PNAS **92**(2): 636-40.

Dominy, P. J. and W. P. Williams (1987). "The role of respiratory electron flow in the control of excitation energy distribution in blue-green-algae." Biochim Biophys Acta **892**: 264-274.

Dufresne, A., M. Ostrowski, D. J. Scanlan, L. Garczarek, S. Mazard, B. P. Palenik, I. T. Paulsen, N. T. de Marsac, P. Wincker, C. Dossat, S. Ferriera, J. Johnson, A. F. Post, W. R. Hess and F. Partensky (2008). "Unraveling the genomic mosaic of a ubiquitous genus of marine cyanobacteria." Genome Biol **9**(5): R90.

Dühring, U., I. M. Axmann, W. R. Hess and A. Wilde (2006). "An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isi*A." PNAS **103**(18): 7054-8.

Duysens, L. M. N. and H. E. Sweers (1963). Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. Studies on microalgae and photosynthetic bacteria. J. S. P. Physiol. Tokyo, Tokyo univ Tokyo Press**:** 353-372.

El Bissati, K., E. Delphin, N. Murata, A. L. Etienne and D. Kirilovsky (2000). "Photosystem II fluorescence quenching in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 : involvement of two different mechanisms." Biochim Biophys Acta **1457**: 229-242.

El Bissati, K. and D. Kirilovsky (2001). "Regulation of *psb*A and *psa*E expression by light quality in *Synechocystis* species PCC 6803. A redox control mechanism." Plant Physiol **125**(4): 1988-2000.

Elmorjani, K., J. C. Thomas and P. Sebban (1986). "Phycobilisomes of wild type and pigment mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803." Arch Microbiol **146**: 186-191.

Emlyn-Jones, D., M. K. Ashby and C. W. Mullineaux (1999). "A gene required for the regulation of photosynthetic light harvesting in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803." Mol Microbiol **33**(5): 1050-8.

Enami, I., M. Iwai, A. Akiyama, T. Suzuki, A. Okumura, T. Katoh, O. Tada, H. Ohta and J. R. Shen (2003). "Comparison of binding and functional properties of two extrinsic components, Cyt c_{550} and a 12 kDa protein, in cyanobacterial PSII with those in red algal PSII." Plant Cell Physiol **44**(8): 820-7.

Enami, I., A. Okumura, R. Nagao, T. Suzuki, M. Iwai and J. R. Shen (2008). "Structures and functions of the extrinsic proteins of photosystem II from different species." Photosynth Res **98**(1-3): 349-63.

Engle, J. M., W. Burkhart, D. M. Sherman and G. S. Bullerjahn (1991). "Purification and characterization of a surface-associated carotenoïd-protein from the photosynthetic prokaryote *Prochlorothrix hollandica*." Arch Microbiol **155**: 453-458.

Falk, S., G. Samson, D. Bruce, N. P. Huner and D. E. Laudenbach (1995). "Functionnal-analysis of iron-stress induced CP43' polypeptide of PSII in the cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC 7942." Photosynth Res **45**: 51-60.

Fernandez-Gonzalez, B., G. Sandmann and A. Vioque (1997). "A new type of asymmetrically acting beta-carotene ketolase is required for the synthesis of echinenone in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803." J Biol Chem **272**(15): 9728-33.

Ferreira, K. N., T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber and S. Iwata (2004). "Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center." Science **303**(5665): 1831-8.

Fiedler, B., T. Borner and A. Wilde (2005). "Phototaxis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: role of different photoreceptors." Photochem Photobiol **81**(6): 1481-8.

Finazzi, G., R. P. Barbagallo, E. Bergo, R. Barbato and G. Forti (2001). "Photoinhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* in State 1 and State 2: damages to the photosynthetic apparatus under linear and cyclic electron flow." J Biol Chem **276**(25): 22251-7.

Finazzi, G., A. Furia, R. P. Barbagallo and G. Forti (1999). "State transitions, cyclic and linear electron transport and photophosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*." Biochim Biophys Acta **1413**(3): 117-29.

Finazzi, G., G. N. Johnson, L. Dall'Osto, F. Zito, G. Bonente, R. Bassi and F. A. Wollman (2006). "Nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in *Chlamydomonas reinhardtii*." Biochemistry **45**(5): 1490-8.

Finazzi, G., F. Sommer and M. Hippler (2005). "Release of oxidized plastocyanin from photosystem I limits electron transfer between photosystem I and cytochrome b_6f complex *in vivo*." PNAS **102**(19): 7031-6.

Fleischmann, M. M., S. Ravanel, R. Delosme, J. Olive, F. Zito, F. A. Wollman and J. D. Rochaix (1999). "Isolation and characterization of photoautotrophic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in state transition." J Biol Chem **274**(43): 30987-94.

Foote, C. S., Y. C. Chang and R. W. Denny (1970). "Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection." J Am Chem Soc **92**(17): 5216-8.

Fraser, N. J., H. Hashimoto and R. J. Cogdell (2001). "Carotenoids and bacterial photosynthesis : the story so far..." Photosynth Res **70**: 249-256.

Fribourg, S., I. C. Braun, E. Izaurralde and E. Conti (2001). "Structural basis for the recognition of a nucleoporin FG repeat by the NTF2-like domain of the TAP/p15 mRNA nuclear export factor." Mol Cell **8**(3): 645-56.

Fulda, S., S. Mikkat, F. Huang, J. Huckauf, K. Marin, B. Norling and M. Hagemann (2006). "Proteome analysis of salt stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." Proteomics **6**(9): 2733-45.

Fuller, N. J., D. Marie, F. Partensky, D. Vaulot, A. F. Post and D. J. Scanlan (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." Appl Environ Microbiol **69**(5): 2430-43.

Funk, C. and W. Vermaas (1999). "A cyanobacterial gene family coding for single-helix proteins resembling part of the light-harvesting proteins from higher plants." Biochemistry **38**(29): 9397-404.

Ganeteg, U., F. Klimmek and S. Jansson (2004). "Lhca5, an LHC-type protein associated with photosystem I." Plant Mol Biol **54**(5): 641-51.

Gantt, E. (1986). Phycobilisomes. Encyclopedia of plant physiology. L. A. Staehelin and C. J. Arntzen. Berlin, Springer-Verlag. **19:** 260-268.

Gantt, E. and S. F. Conti (1966a). "Granules associated with the chloroplast lamellae of *Porphyridium cruentum*." J Cell Biol **29**(3): 423-34.

Gantt, E. and S. F. Conti (1966b). "Phycobiliprotein localization in algae." Brookhaven Symp Biol **19**: 393-405.

Gantt, E., M. R. Edwards and S. F. Conti (1968). "Utrastucture of *Porphyridium aerugineum*. A blue-green colored Rhodophytan." J Phycol **4**: 65-71.

Gantt, E., C. A. Lipschultz, J. Grabowski and B. K. Zimmerman (1979). "Phycobilisomes from blue-green and red algae: isolation criteria and dissociation characteristics." Plant Physiol **63**(4): 615-620.

Gantt, E., C. A. Lipschultz and B. Zilinskas (1976a). "Further evidence for a phycobilisome model from selective dissociation, fluorescence emission, immunoprecipitation, and electron microscopy." Biochim Biophys Acta **430**(2): 375-88.

Gantt, E., C. A. Lipschultz and B. A. Zilinskas (1976b). "Phycobilisomes in relation to the Thylakoid membranes." Brookhaven Symp Biol(28): 347-57.

Garrity, G. M., M. Winters, A. W. Kuo and D. B. Searles (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Geiss, U., J. Vinnemeier, A. Schoor and M. Hagemann (2001). "The iron-regulated *isi*A gene of *Fischerella muscicola* strain PCC 73103 is linked to a likewise regulated gene encoding a Pcb-like chlorophyll-binding protein." FEMS Microbiol Lett **197**(1): 123-9.

Gest, H. (2002). "History of the word photosynthesis and evolution of its definition." Photosynth Res **73**(1-3): 7-10.

Giddings, T. H., C. Wasmann and L. A. Staehelin (1983). "Structure of the thylakoids and envelope membranes of the cyanelles of *Cyanophora paradoxa*." Plant Physiol **71**(2): 409-419.

Gilmore, A. M. (1997). "Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves." Physiol Plant **99**: 197-209.

Gindt, Y. M., J. Zhou, D. A. Bryant and K. Sauer (1994). "Spectroscopic studies of phycobilisome subcore preparations lacking key core chromophores: assignment of excited state energies to the Lcm, beta 18 and alpha AP-B chromophores." Biochim Biophys Acta **1186**(3): 153-62.

Giovani, B., M. Byrdin, M. Ahmad and K. Brettel (2003). "Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor." Nat Struct Biol **10**(6): 489-90.

Giuffra, E., D. Cugini, R. Croce and R. Bassi (1996). "Reconstitution and pigment-binding properties of recombinant CP29." Eur J Biochem **238**(1): 112-20.

Glazer, A. N. (1984). "Phycobilisome : a macromolecular complex optimized for light energy transfer." Biochim Biophys Acta **768**: 29-51.

Glazer, A. N. (1989). "Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna." J Biol Chem **264**(1): 1-4.

Glazer, A. N. and D. A. Bryant (1975). "Allophycocyanine B (λ_{max} = 671, 618nm). A new cyanobacterial phycobiliprotein." Arch Microbiol **104**: 15-22.

Gomelsky, M. and G. Klug (2002). "BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms." Trends Biochem Sci **27**(10): 497-500.

Gomez-Lojero, C., B. Perez-Gomez, G. Shen, W. M. Schluchter and D. A. Bryant (2003). "Interaction of ferredoxin:NADP+ oxidoreductase with phycobilisomes and phycobilisome substructures of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002." Biochemistry **42**(47): 13800-11.

Gray, B. H. and E. Gantt (1975). "Spectral properties of phycobilisomes and phycobiliproteins from the blue-green alga-*nostoc* sp." Photochem Photobiol **21**(2): 121-8.

Grenn, B. R., J. M. Anderson and W. W. Parson (2003). Photosynthetic membranes and their light-harvesting antennas. Light-harvesting antennas in photosynthesis. B. Grenn and W. Parson, Printed in the Netherlands**:** 1-28.

Guan, X., S. Qin, F. Zhao, X. Zhang and X. Tang (2007). "Phycobilisomes linker family in cyanobacterial genomes: divergence and evolution." Int J Biol Sci **3**(7): 434-45.

Guikema, J. A. and L. A. Sherman (1983). "Organisation and function of chlorophyll in membranes of cyanobacteria during iron starvation." Plant Physiol **73**: 250-256.

Haldrup, A., P. E. Jensen, C. Lunde and H. V. Scheller (2001). "Balance of power: a view of the mechanism of photosynthetic state transitions." Trends Plant Sci **6**(7): 301-5.

Hankamer, B., E. Morris, J. Nield, A. Carne and J. Barber (2001). "Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II." FEBS Lett **504**(3): 142-51.

Hansson, M., T. Dupuis, R. Stromquist, B. Andersson, A. V. Vener and I. Carlberg (2007). "The mobile thylakoid phosphoprotein TSP9 interacts with the light-harvesting complex II and the peripheries of both photosystems." J Biol Chem **282**(22): 16214-22.

Havaux, M., G. Guedeney, M. Hagemann, N. Yeremenko, H. C. Matthijs and R. Jeanjean (2005). "The chlorophyll-binding protein IsiA is inducible by high light and protects the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 from photooxidative stress." FEBS Lett **579**(11): 2289-93.

Havaux, M., G. Guedeney, Q. He and A. R. Grossman (2003). "Elimination of high-light-inducible polypeptides related to eukaryotic chlorophyll *a/b*-binding proteins results in aberrant photoacclimation in *Synechocystis* PCC 6803." Biochim Biophys Acta **1557**(1-3): 21-33.

Havaux, M. and K. K. Niyogi (1999). "The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism." PNAS **96**(15): 8762-7.

Haworth, P., J. L. Watson and C. J. Arntzen (1983). "The detection, isolation and characterization of a light-harvesting complex which is specifically associated with Photosystem I." Biochim Biophys Acta **724**: 151-158.

He, Q., N. Dolganov, O. Bjorkman and A. R. Grossman (2001). "The high light-inducible polypeptides in *Synechocystis* PCC 6803. Expression and function in high light." J Biol Chem **276**(1): 306-14.

Heddad, M. and I. Adamska (2002). "The evolution of light stress proteins in photosynthetic organisms." Comp Funct Genomics **3**(6): 504-10.

Herdman, M., S. F. Delaney and N. G. Carr (1973). "A new medium for the isolation and growth of auxotrophic mutants of the blue-green alga *Anacystis nidulans*." J Gen Microbiol **79**: 233-237.

Hihara, Y., A. Kamei, M. Kanehisa, A. Kaplan and M. Ikeuchi (2001). "DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light." Plant Cell **13**(4): 793-806.

Hirose, Y., T. Shimada, R. Narikawa, M. Katayama and M. Ikeuchi (2008). "Cyanobacteriochrome CcaS is the green light receptor that induces the expression of phycobilisome linker protein." PNAS **105**(28): 9528-33.

Hirschberg, J. (1994). Carotenoids in cyanobacteria. The molecular biology of cyanobateria. D. A. Bryant. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer**:** 559-579.

Hitomi, K., K. Okamoto, H. Daiyasu, H. Miyashita, S. Iwai, H. Toh, M. Ishiura and T. Todo (2000). "Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. PCC6803." Nucleic Acids Res **28**(12): 2353-62.

Hoff, W. D., I. H. van Stokkum, H. J. van Ramesdonk, M. E. van Brederode, A. M. Brouwer, J. C. Fitch, T. E. Meyer, R. van Grondelle and K. J. Hellingwerf (1994). "Measurement and global analysis of the absorbance changes in the photocycle of the photoactive yellow protein from *Ectothiorhodospira halophila*." Biophys J **67**(4): 1691-705.

Holt, N. E., G. R. Fleming and K. K. Niyogi (2004). "Toward an understanding of the mechanism of nonphotochemical quenching in green plants." Biochemistry **43**(26): 8281-9.

Holt, T. K. and D. W. Krogmann (1981). "A carotenoïd protein from cyanobacteria." Biochim Biophys Acta **637**: 408-414.

Holzwarth, A. R. (1986). "Fluorescence lifetimes in photosynthetic systems." Photochem Photobiol **43**: 707-725.

Horton, P., M. P. Johnson, M. L. Perez-Bueno, A. Z. Kiss and A. V. Ruban (2008). "Photosynthetic acclimation: does the dynamic structure and macro-organisation of photosystem II in higher plant grana membranes regulate light harvesting states?" Febs J **275**(6): 1069-79.

Hughes, J., T. Lamparter, F. Mittmann, E. Hartmann, W. Gartner, A. Wilde and T. Borner (1997). "A prokaryotic phytochrome." Nature **386**(6626): 663.

Ihalainen, J. A., S. D'Haene, N. Yeremenko, H. van Roon, A. A. Arteni, E. J. Boekema, R. van Grondelle, H. C. Matthijs and J. P. Dekker (2005). "Aggregates of the chlorophyll-binding protein IsiA (CP43') dissipate energy in cyanobacteria." Biochemistry **44**(32): 10846-53.

Ivanov, A. G., M. Krol, D. Sveshnikov, E. Selstam, S. Sandström, M. Koochek, Y. I. Park, S. Vasil'ev, D. Bruce, G. Öquist and N. P. Huner (2006). "Iron deficiency in cyanobacteria causes monomerization of photosystem I trimers and reduces the capacity for state transitions and the effective absorption cross section of photosystem I *in vivo*." Plant Physiol **141**(4): 1436-45.

Ivanov, A. G., Y. I. Park, E. Miskiewicz, J. A. Raven, N. P. Huner and G. Öquist (2000). "Iron stress restricts photosynthetic intersystem electron transport in *Synechococcus* sp. PCC 7942." FEBS Lett **485**(2-3): 173-7.

Jackowski, G., P. Olkiewicz and A. Zelisko (2003). "The acclimative response of the main light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex of photosystem II (LHCII) to elevated irradiances at the level of trimeric subunits." J Photochem Photobiol B **70**(3): 163-70.

Jahns, P., D. Latowski and K. Strzalka (2009). "Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids." Biochim Biophys Acta **1787**(1): 3-14.

Jansson, S. (1999). "A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*." Trends Plant Sci **4**(6): 236-240.

Jansson, S., J. Andersson, S. J. Kim and G. Jackowski (2000). "An *Arabidopsis thaliana* protein homologous to cyanobacterial high-light-inducible proteins." Plant Mol Biol **42**(2): 345-51.

Jansson, S., E. Pichersky, R. Bassi, B. R. Grenn, M. Ikeuchi, A. Melis, D. J. Simpson, M. Spangfort, L. A. Staehelin and J. P. Thornber (1992). "A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll *a/b* binding proteins of higher plants." Plant Mol Biol Rep **10**: 242-253.

Jeanjean, R., E. Zuther, N. Yeremenko, M. Havaux, H. C. Matthijs and M. Hagemann (2003). "A photosystem 1 *ps*aFJ-null mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 expresses the *isi*AB operon under iron replete conditions." FEBS Lett **549**(1-3): 52-6.

Jensen, P. E., R. Bassi, E. J. Boekema, J. P. Dekker, S. Jansson, D. Leister, C. Robinson and H. V. Scheller (2007). "Structure, function and regulation of plant photosystem I." Biochim Biophys Acta **1767**(5): 335-52.

Jiang, Z., L. R. Swem, B. G. Rushing, S. Devanathan, G. Tollin and C. E. Bauer (1999). "Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes." Science **285**(5426): 406-9.

Johnson, M. P., M. L. Perez-Bueno, A. Zia, P. Horton and A. V. Ruban (2009). "The zeaxanthin-independent and zeaxanthin-dependent qE components of nonphotochemical quenching involve common conformational changes within the photosystem II antenna in *Arabidopsis*." Plant Physiol **149**(2): 1061-75.

Joshua, S., S. Bailey, N. H. Mann and C. W. Mullineaux (2005). "Involvement of phycobilisome diffusion in energy quenching in cyanobacteria." Plant Physiol **138**(3): 1577-85.

Joshua, S. and C. W. Mullineaux (2004). "Phycobilisome diffusion is required for light-state transitions in cyanobacteria." Plant Physiol **135**(4): 2112-9.

Jung, K. H., V. D. Trivedi and J. L. Spudich (2003). "Demonstration of a sensory rhodopsin in eubacteria." Mol Microbiol **47**(6): 1513-22.

Kamiya, N. and J. R. Shen (2003). "Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7A resolution." PNAS **100**(1): 98-103.

Karapetyan, N. V. (2008). "Protective dissipation of excess absorbed energy by photosynthetic apparatus of cyanobacteria: role of antenna terminal emitters." Photosynth Res **97**(3): 195-204.

Kargul, J. and J. Barber (2008). "Photosynthetic acclimation: structural reorganisation of light harvesting antenna--role of redox-dependent phosphorylation of major and minor chlorophyll *a/b* binding proteins." Febs J **275**(6): 1056-68.

Kargul, J., M. V. Turkina, J. Nield, S. Benson, A. V. Vener and J. Barber (2005). "Light-harvesting complex II protein CP29 binds to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* under State 2 conditions." Febs J **272**(18): 4797-806.

Karp, G. (2004). Biologie Cellulaire et Moléculaire.

Kashino, Y., H. Koike and K. Satoh (2001). "An improved sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis system for the analysis of membrane protein complexes." Electrophoresis **22**(6): 1004-7.

Kashino, Y., T. Takahashi, N. Inoue-Kashino, A. Ban, Y. Ikeda, K. Satoh and M. Sugiura (2007). "Ycf12 is a core subunit in the photosystem II complex." Biochim Biophys Acta **1767**(11): 1269-75.

Kauppi, B., K. Lee, E. Carredano, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund and S. Ramaswamy (1998). "Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase." Structure **6**(5): 571-86.

Kaytayama, M. and M. Ikeuchi (2006). Perception and transduction of light signals by cyanobacteria. Frontiers in Life Sciences. M. Fujiwara, N. Sato and S. Ishiura. Kerala, India, Research Signpost**:** 65-90.

Kehoe, D. M. and A. R. Grossman (1996). "Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors." Science **273**(5280): 1409-12.

Keren, N., A. Berg, P. J. van Kan, H. Levanon and I. Ohad (1997). "Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow." PNAS **94**(4): 1579-84.

Kerfeld, C. A. (2004a). "Structure and function of the water-soluble carotenoid-binding proteins of cyanobacteria." Photosynth Res **81**(3): 215-25.

Kerfeld, C. A. (2004b). "Water-soluble carotenoid proteins of cyanobacteria." Arch Biochem Biophys **430**(1): 2-9.

Kerfeld, C. A., M. R. Sawaya, V. Brahmandam, D. Cascio, K. K. Ho, C. C. Trevithick-Sutton, D. W. Krogmann and T. O. Yeates (2003). "The crystal structure of a cyanobacterial water-soluble carotenoid binding protein." Structure **11**(1): 55-65.

Kirilovsky, D. (2007). "Photoprotection in cyanobacteria: the orange carotenoid protein (OCP)-related non-photochemical-quenching mechanism." Photosynth Res **93**(1-3): 7-16.

Kirilovsky, D., M. Kessel and I. Ohad (1983). "In vitro reassociation of phycobiliproteins and membranes to form functionnal membrane-bound phycobilisomes." Biochim Biophys Acta **724**: 416-426.

Kirilovsky, D. and I. Ohad (1986). "Functional assembly *in vitro* of phycobilisomes with isolated photosystem II particles of eukaryotic chloroplasts." J Biol Chem **261**(26): 12317-23.

Kok, B. (1956). "On the inhibition of photosynthesis by intense light." Biochim Biophys Acta **21**(2): 234-44.

Komarek, J., J. Kopecky and V. Cepak (1999). "Generic characters of the simplest cyanoprokaryotes *Cyanobium*, *Cyanobacterium* and *Synechococcus*." Cryptogamie algologie **20**: 209-222.

Kottke, T., A. Batschauer, M. Ahmad and J. Heberle (2006). "Blue-light-induced changes in *Arabidopsis* cryptochrome 1 probed by FTIR difference spectroscopy." Biochemistry **45**(8): 2472-9.

Koyama, Y., M. Kuki, P.-O. Anderson and T. Gillbro (1996). "Singlet excited states and the light-harvesting function of carotenoids in bacterial photosynthesis." Photochem Photobiol **63**: 243-256.

Krabben, L., E. Schlodder, R. Jordan, D. Carbonera, G. Giacometti, H. Lee, A. N. Webber and W. Lubitz (2000). "Influence of the axial ligands on the spectral properties of P700 of photosystem I: a study of site-directed mutants." Biochemistry **39**(42): 13012-25.

Krause, G. H. and E. Weiss (1991). "Chlorophyll fluorescence and photosynthesis : the basics." Annual Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **42**: 313-349.

Kühl, H., M. Rogner, J. F. Van Breemen and E. J. Boekema (1999). "Localization of cyanobacterial photosystem II donor-side subunits by electron microscopy and the supramolecular organization ofphotosystem II in the thylakoid membrane." Eur J Biochem **266**(2): 453-9.

Kühl, M., M. Chen, P. J. Ralph, U. Schreiber and A. W. Larkum (2005). "Ecology: a niche for cyanobacteria containing chlorophyll *d*." Nature **433**(7028): 820.

Kulheim, C., J. Agren and S. Jansson (2002). "Rapid regulation of light harvesting and plant fitness in the field." Science **297**(5578): 91-3.

Lagarde, D., L. Beuf and W. Vermaas (2000). "Increased production of zeaxanthin and other pigments by application of genetic engineering techniques to *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." Appl Environ Microbiol **66**(1): 64-72.

Lagoutte, B. and O. Vallon (1992). "Purification and membrane topology of PSI-D and PSI-E, two subunits of the photosystem I reaction center." Eur J Biochem **205**(3): 1175-85.

Lakowicz, J. R. (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. New York, Springer.

Lam, E., W. Ortiz and R. Malkin (1984). "Chlorophyll *a*/*b* proteins of Photosystem I." FEBS Lett **168**: 10-14.

Latifi, A., R. Jeanjean, S. Lemeille, M. Havaux and C. C. Zhang (2005). "Iron starvation leads to oxidative stress in *Anabaena* sp. strain PCC 7120." J Bacteriol **187**(18): 6596-8.

Laudenbach, D. E. and N. A. Straus (1988). "Characterization of a cyanobacterial iron stress-induced gene similar to *psb*C." J Bacteriol **170**(11): 5018-26.

Li, Q. H. and H. Q. Yang (2007). "Cryptochrome signaling in plants." Photochem Photobiol **83**(1): 94-101.

Li, X. P., O. Bjorkman, C. Shih, A. R. Grossman, M. Rosenquist, S. Jansson and K. K. Niyogi (2000). "A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting." Nature **403**(6768): 391-5.

Liang, C., F. Zhao, W. Wei, Z. Wen and S. Qin (2006). "Carotenoid biosynthesis in cyanobacteria: structural and evolutionary scenarios based on comparative genomics." Int J Biol Sci **2**(4): 197-207.

Lichtenthaler, H. K. (1987). "Chlorophylls and carotenoids - pigments of photosynthetic biomembranes." Methods Enzymol **148**: 350-382.

Lichtlé, C. and J. C. Thomas (1976). "Etude ultrastructrurale des thylacoïdes des algues à phycobiliprotéines, comparaison des résultats obtenus par fixation classique et cryodécapage." Phycologia **15**: 393-404.

Lin, C. and D. Shalitin (2003). "Cryptochrome structure and signal transduction." Annu Rev Plant Biol **54**: 469-96.

Lin, C. and T. Todo (2005). "The cryptochromes." Genome Biol **6**(5): 220.

Liu, L. N., X. L. Chen, Y. Z. Zhang and B. C. Zhou (2005). "Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: an overview." Biochim Biophys Acta **1708**(2): 133-42.

Liu, Z., H. Yan, K. Wang, T. Kuang, J. Zhang, L. Gui, X. An and W. Chang (2004). "Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 A resolution." Nature **428**(6980): 287-92.

Loll, B., J. Kern, W. Saenger, A. Zouni and J. Biesiadka (2005). "Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 A resolution structure of photosystem II." Nature **438**(7070): 1040-4.

MacColl, R. (1998). "Cyanobacterial phycobilisomes." J Struct Biol **124**(2-3): 311-34.

MacColl, R. (2004). "Allophycocyanin and energy transfer." Biochim Biophys Acta **1657**(2-3): 73-81.

MacColl, R., K. Csatorday, D. S. Berns and E. Traeger (1980). "Chromophore interactions in allophycocyanin." Biochemistry **19**(12): 2817-20.

Machold, O. and A. Meister (1979). "Resolution of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein of vicia faba chloroplasts into two different chlorophyll-protein complexes." Biochim Biophys Acta **546**(3): 472-80.

Masamoto, K., H. C. Riethman and L. A. Sherman (1987). "Isolation and characterization of a carotenoid-associated thylakoid protein from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2." Plant Physiol **84**(3): 633-639.

Matthijs, H. C., G. W. Van der Staay and L. R. Mur (1994). Prochlorophytes : the "other" cyanobacteria? The molecular biology of cyanobacteria. D. A. Bryant. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers**:** 49-64.

Maxwell, K. and G. N. Johnson (2000). "Chlorophyll fluorescence, a practical guide." J Exp Bot **51**(345): 659-68.

McConnell, M. D., R. Koop, S. Vasil'ev and D. Bruce (2002). "Regulation of the distribution of chlorophyll and phycobilin-absorbed excitation energy in cyanobacteria. A structure-based model for the light state transition." Plant Physiol **130**(3): 1201-12.

Melkozernov, A. N., T. S. Bibby, S. Lin, J. Barber and R. E. Blankenship (2003). "Time-resolved absorption and emission show that the CP43' antenna ring of iron-stressed *Synechocystis* sp. PCC 6803 is efficiently coupled to the photosystem I reaction center core." Biochemistry **42**(13): 3893-903.

Montané, M. H. and K. Kloppstech (2000). "The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLIPs): was the harvesting of light their primary function?" Gene **258**(1-2): 1-8.

Montgomery, B. L. (2007). "Sensing the light: photoreceptive systems and signal transduction in cyanobacteria." Mol Microbiol **64**(1): 16-27.

Moore, R., W. D. Clark and D. S. Vodopich (1998). Botany, Springer-Verlag.

Müh, F., T. Renger and A. Zouni (2008). "Crystal structure of cyanobacterial photosystem II at 3.0 A resolution: a closer look at the antenna system and the small membrane-intrinsic subunits." Plant Physiol Biochem **46**(3): 238-64.

Mühlenhoff, U. and F. Chauvat (1996). "Gene transfer and manipulation in the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*." Mol Gen Genet **252**(1-2): 93-100.

Mullineaux, C. W. (1993). "Inhibition by phosphate of light-state transitions in cyanobacterials cells." Photosynth Res **38**: 135-140.

Mullineaux, C. W. (1994). "Excitation energy transfer from phycobilisomes to Photosystem I in a cyanobacterial mutant lacking Photosystem II." Biochim Biophys Acta **1184**: 71-77.

Mullineaux, C. W. and J. F. Allen (1990). "State 1 - State 2 transitions in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 are controlled by the redox state of electron carriers betwenn photosystems I and II." Photosynth Res **22**: 157-166.

Mullineaux, C. W. and D. Emlyn-Jones (2005). "State transitions: an example of acclimation to low-light stress." J Exp Bot **56**(411): 389-93.

Munekage, Y., M. Hashimoto, C. Miyake, K. Tomizawa, T. Endo, M. Tasaka and T. Shikanai (2004). "Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis." Nature **429**(6991): 579-82.

Murakami, A., M. Mimuro, K. Ohki and Y. Fujita (1981). "Absorption spectrum of allophycocyanin isolated from *Anabaena cylindrica*: variation of the absorption spectrum induced by changes of the physico-chemical environment." J Biochem **89**(1): 79-86.

Murata, N., S. Takahashi, Y. Nishiyama and S. I. Allakhverdiev (2007). "Photoinhibition of photosystem II under environmental stress." Biochim Biophys Acta **1767**(6): 414-21.

Murray, J. W., J. Duncan and J. Barber (2006). "CP43-like chlorophyll binding proteins: structural and evolutionary implications." Trends Plant Sci **11**(3): 152-8.

Narikawa, R., K. Zikihara, K. Okajima, Y. Ochiai, M. Katayama, Y. Shichida, S. Tokutomi and M. Ikeuchi (2006). "Three putative photosensory light, oxygen or voltage (LOV) domains with distinct biochemical properties from the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120." Photochem Photobiol **82**(6): 1627-33.

Nelson, N. and C. F. Yocum (2006). "Structure and function of photosystems I and II." Annu Rev Plant Biol **57**: 521-65.

Neushul, M. (1971). "Uniformity of the thylacoïd structure in a red, a brown, and two blue-green algae." J Ultrastruct Res **37**: 532-543.

Niyogi, K. K., O. Bjorkman and A. R. Grossman (1997a). "*Chlamydomonas* xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching." Plant Cell **9**(8): 1369-1380.

Niyogi, K. K., O. Bjorkman and A. R. Grossman (1997b). "The roles of specific xanthophylls in photoprotection." PNAS **94**(25): 14162-7.

Niyogi, K. K., X. P. Li, V. Rosenberg and H. S. Jung (2005). "Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis?" J Exp Bot **56**(411): 375-82.

Odom, W. R., R. Hodges, P. R. Chitnis and J. A. Guikema (1993). "Characterization of *Synechocystis* sp. PCC 6803 in iron-supplied and iron-deficient media." Plant Mol Biol **23**(6): 1255-64.

Ohmori, M., M. Ikeuchi, N. Sato, P. Wolk, T. Kaneko, T. Ogawa, M. Kanehisa, S. Goto, S. Kawashima, S. Okamoto, H. Yoshimura, H. Katoh, T. Fujisawa, S. Ehira, A. Kamei, S. Yoshihara, R. Narikawa and S. Tabat (2001). "Characterization of genes encoding multi-domain proteins in the genome of the filamentous nitrogen-fixing Cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120." DNA Res **8**(6): 271-84.

Okajima, K., S. Yoshihara, Y. Fukushima, X. Geng, M. Katayama, S. Higashi, M. Watanabe, S. Sato, S. Tabata, Y. Shibata, S. Itoh and M. Ikeuchi (2005). "Biochemical and functional characterization of BLUF-type flavin-binding proteins of two species of cyanobacteria." J Biochem **137**(6): 741-50.

Ong, L. J. and A. N. Glazer (1987). "R-phycocyanin II, a new phycocyanin occurring in marine *Synechococcus* species. Identification of the terminal energy acceptor bilin in phycocyanins." J Biol Chem **262**(13): 6323-7.

Ong, L. J. and A. N. Glazer (1988). Structural studies of phycobiliproteins in unicellular marine cyanobacteria. Light-energy transduction in photosynthesis : higher plant and bacterials models. S. E. J. Stevens and D. A. Bryant. Rockville, MD : Americain Society of Plant Physiologists**:** 102-121.

Ong, L. J. and A. N. Glazer (1991). "Phycoerythrins of marine unicellular cyanobacteria. I. Bilin types and locations and energy transfer pathways in *Synechococcus* spp. phycoerythrins." J Biol Chem **266**(15): 9515-27.

Öquist, G. (1971). "Changes in pigment composition and photosynthesis induced by iron deficiency in the blue-green alga *Anacystis nidulans*." Physiol Plant **25**: 188-197.

Öquist, G. (1974a). "Iron deficiency in blue-green alga *Anacystis nidulans* - changes in pigmentation and photosynthesis." Physiol Plant **30**: 30-37.

Öquist, G. (1974b). "Iron deficiency in blue-green alga *Anacystis nidulans* - fluorescence and absorption spectra recorded at 77 degrees K." Physiol Plant **31**: 55-58.

Otzen, D. E. and M. Oliveberg (2001). "A simple way to measure protein refolding rates in water." J Mol Biol **313**(3): 479-83.

Pakrasi, H. B. and L. A. Sherman (1984). "A highly active oxygen-evolving photosystem II preparation from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*." Plant Physiol **74**(3): 742-745.

Park, C. M., J. I. Kim, S. S. Yang, J. G. Kang, J. H. Kang, J. Y. Shim, Y. H. Chung, Y. M. Park and P. S. Song (2000). "A second photochromic bacteriophytochrome from *Synechocystis* sp. PCC 6803: spectral analysis and down-regulation by light." Biochemistry **39**(35): 10840-7.

Park, Y. I., S. Sandström, P. Gustafsson and G. Öquist (1999). "Expression of the *isi*A gene is essential for the survival of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 by protecting photosystem II from excess light under iron limitation." Mol Microbiol **32**(1): 123-9.

Partch, C. L., M. W. Clarkson, S. Ozgur, A. L. Lee and A. Sancar (2005). "Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor." Biochemistry **44**(10): 3795-805.

Partensky, F., W. R. Hess and D. Vaulot (1999). "*Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance." Microbiol Mol Biol Rev **63**(1): 106-27.

Pascal, A. A., Z. Liu, K. Broess, B. van Oort, H. van Amerongen, C. Wang, P. Horton, B. Robert, W. Chang and A. Ruban (2005). "Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting." Nature **436**(7047): 134-7.

Paschal, B. M. and L. Gerace (1995). "Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore complex protein p62." J Cell Biol **129**(4): 925-37.

Paul, R., S. Weiser, N. C. Amiot, C. Chan, T. Schirmer, B. Giese and U. Jenal (2004). "Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain." Genes Dev **18**(6): 715-27.

Paulsen, H., U. Rümler and W. Rüdiger (1990). "Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein over-expressed in *E.coli*." Planta **181**: 204-211.

Pei, J. and N. V. Grishin (2001). "GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase." Proteins **42**(2): 210-6.

Polivka, T., C. A. Kerfeld, T. Pascher and V. Sundstrom (2005). "Spectroscopic properties of the carotenoid 3'-hydroxyechinenone in the orange carotenoid protein from the cyanobacterium *Arthrospira maxima*." Biochemistry **44**(10): 3994-4003.

Polivka, T. and V. Sundstrom (2004). "Ultrafast dynamics of carotenoid excited States-from solution to natural and artificial systems." Chem Rev **104**(4): 2021-71.

Portwich, A. and F. Garcia-Pichel (2000). "A novel prokaryotic UVB photoreceptor in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912." Photochem Photobiol **71**(4): 493-8.

Prasil, O., N. Adir and I. Ohad (1992). Dynamics of photosystem II : mechanism of photoinhibition and recovery processes. The photosystems : structure, function and molecular biology. J. Barber. Amsterdam, Elsevier Science Publishers**:** 295-348.

Pugh, R. J., P. McGlynn, M. R. Jones and C. N. Hunter (1998). "The LH1-RC core complex of *Rhodobacter sphaeroides*: interaction between components, time-dependent assembly, and topology of the PufX protein." Biochim Biophys Acta **1366**(3): 301-16.

Punginelli, C., A. Wilson, J. M. Routaboul and D. Kirilovsky (2009). "Influence of zeaxanthin and echinenone binding on the activity of the orange carotenoid protein." Biochim Biophys Acta **1787**(4): 280-8.

Purcell, E. B. and S. Crosson (2008). "Photoregulation in prokaryotes." Curr Opin Microbiol **11**(2): 168-78.

Qin, X., K. Wang, X. Chen, Y. Qu, L. Li and T. Kuang (2006). "Rapid purification of photosystem I chlorophyll-binding proteins by differential centrifugation and vertical rotor." Photosynth Res **90**(3): 195-204.

Rakhimberdieva, M. G., I. N. Stadnichuk, I. V. Elanskaya and N. V. Karapetyan (2004). "Carotenoid-induced quenching of the phycobilisome fluorescence in photosystem II-deficient mutant of *Synechocystis* sp." FEBS Lett **574**(1-3): 85-8.

Rakhimberdieva, M. G., D. V. Vavilin, W. F. Vermaas, I. V. Elanskaya and N. V. Karapetyan (2007). "Phycobilin/chlorophyll excitation equilibration upon carotenoid-induced non-photochemical fluorescence quenching in phycobilisomes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." Biochim Biophys Acta **1767**(6): 757-65.

Reddy, K. J., K. Masamoto, D. M. Sherman and L. A. Sherman (1989). "DNA sequence and regulation of the gene (*cbp*A) encoding the 42-kilodalton cytoplasmic membrane carotenoprotein of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942." J Bacteriol **171**(6): 3486-93.

Redlinger, T. and E. Gantt (1981). "Phycobilisome Structure of *Porphyridium cruentum*: polypeptide composition." Plant Physiol **68**(6): 1375-1379.

Redlinger, T. and E. Gantt (1982). "A M(r) 95,000 polypeptide in *Porphyridium cruentum* phycobilisomes and thylakoids: Possible function in linkage of phycobilisomes to thylakoids and in energy transfer." PNAS **79**(18): 5542-5546.

Rintamaki, E., P. Martinsuo, S. Pursiheimo and E. M. Aro (2000). "Cooperative regulation of light-harvesting complex II phosphorylation via the plastoquinol and ferredoxin-thioredoxin system in chloroplasts." PNAS **97**(21): 11644-9.

Rippka, R., T. Coursin, W. Hess, C. Lichtle, D. J. Scanlan, K. A. Palinska, I. Iteman, F. Partensky, J. Houmard and M. Herdman (2000). "*Prochlorococcus* marinus Chisholm *et al*. 1992 subsp. *pastoris* subsp. nov. strain PCC 9511, the first axenic chlorophyll a_2/b_2-containing cyanobacterium (Oxyphotobacteria)." Int J Syst Evol Microbiol **50 Pt 5**: 1833-47.

Rippka, R., J. DeReuelles, J. B. Waterbury, M. Herdman and R. Y. Stanier (1979). "Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria." J Gen Microbiol **111**: 1-61.

Rocap, G., F. W. Larimer, J. Lamerdin, S. Malfatti, P. Chain, N. A. Ahlgren, A. Arellano, M. Coleman, L. Hauser, W. R. Hess, Z. I. Johnson, M. Land, D. Lindell, A. F. Post, W. Regala, M. Shah, S. L. Shaw, C. Steglich, M. B. Sullivan, C. S. Ting, A. Tolonen, E. A. Webb, E. R. Zinser and S. W. Chisholm (2003). "Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation." Nature **424**(6952): 1042-7.

Römling, U., M. Gomelsky and M. Y. Galperin (2005). "C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system." Mol Microbiol **57**(3): 629-39.

Rouag, D. and P. Dominy (1994). "State adaptations in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 (PCC) : dependence on light intensity or spectral composition." Photosynth Res **40**: 107-117.

Rozema, D. and S. H. Gellman (1996). "Artificial chaperone-assisted refolding of carbonic anhydrase B." J Biol Chem **271**(7): 3478-87.

Ruban, A. V., R. Berera, C. Ilioaia, I. H. van Stokkum, J. T. Kennis, A. A. Pascal, H. van Amerongen, B. Robert, P. Horton and R. van Grondelle (2007). "Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants." Nature **450**(7169): 575-8.

Salares, V. R., N. M. Young, H. J. Bernstein and P. R. Carey (1979). "Mechanisms of spectral shifts in lobster carotenoproteins. The resonance Raman spectra of ovoverdin and the crustacyanins." Biochim Biophys Acta **576**(1): 176-91.

Salomon, M., J. M. Christie, E. Knieb, U. Lempert and W. R. Briggs (2000). "Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin." Biochemistry **39**(31): 9401-10.

Samsonoff, W. A. and R. MacColl (2001). "Biliproteins and phycobilisomes from cyanobacteria and red algae at the extremes of habitat." Arch Microbiol **176**(6): 400-5.

Sancar, A. (2003). "Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors." Chem Rev **103**(6): 2203-37.

Sandmann, G. (1985). "Consequences of iron deficiency on photosynthetic and respiratory electron transport in blue-green algae." Photosynth Res **6**: 261-271.

Sandström, S., Y. I. Park, G. Öquist and P. Gustafsson (2001). "CP43', the *isi*A gene product, functions as an excitation energy dissipator in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942." Photochem Photobiol **74**(3): 431-7.

Sashima, T., H. Nagae, M. Kuki and Y. Koyama (1999). "A new single-excited state of all-trans-spheroidene as detected by Raman excitation profiles." Chem Phys Lett **299**: 187-194.

Schatz, G. H. and H. T. Witt (1984). "Extraction and characterization of oxygen-evolving photosystem II complexes from a thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* spec." Photobiochem Photobiophys **7**: 1-14.

Schirmer, T., R. Huber, M. Schneider, W. Bode, M. Miller and M. L. Hackert (1986). "Crystal structure analysis and refinement at 2.5 A of hexameric C-phycocyanin from the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. The molecular model and its implications for light-harvesting." J Mol Biol **188**(4): 651-76.

Schluchter, W. M. and D. A. Bryant (1992). "Molecular characterization of ferredoxin-NADP+ oxidoreductase in cyanobacteria: cloning and sequence of the *pet*H gene of *Synechococcus* sp. PCC 7002 and studies on the gene product." Biochemistry **31**(12): 3092-102.

Schmid, V. H. (2008). "Light-harvesting complexes of vascular plants." Cell Mol Life Sci **65**(22): 3619-39.

Schmid, V. H., K. V. Cammarata, B. U. Bruns and G. W. Schmidt (1997). "*In vitro* reconstitution of the photosystem I light-harvesting complex LHCI-730: heterodimerization is required for antenna pigment organization." PNAS **94**(14): 7667-72.

Schmid, V. H., S. Potthast, M. Wiener, V. Bergauer, H. Paulsen and S. Storf (2002). "Pigment binding of photosystem I light-harvesting proteins." J Biol Chem **277**(40): 37307-14.

Scott, M., C. McCollum, S. Vasil'ev, C. Crozier, G. S. Espie, M. Krol, N. P. Huner and D. Bruce (2006). "Mechanism of the down regulation of photosynthesis by blue light in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." Biochemistry **45**(29): 8952-8.

Shen, J. R., T. Henmi and N. Kamiya (2008). Structure and function of photosystem II. In : Fromme F. (ed) Photosynthetic protein complexes, a structural approach. Wiley-VCH, Weinheim.

Shen, J. R. and Y. Inoue (1993). "Binding and functional properties of two new extrinsic components, cytochrome c_{550} and a 12-kDa protein, in cyanobacterial photosystem II." Biochemistry **32**(7): 1825-32.

Sherman, D. M. and L. A. Sherman (1983). "Effect of iron deficiency and iron restoration on ultrastructure of *Anacystis nidulans*." J Bacteriol **156**(1): 393-401.

Shikanai, T. (2007). "Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches." Annu Rev Plant Biol **58**: 199-217.

Sidler, W. A. (1994). Phycobilisome and phycobiliprotein structure. The molecular biology of cyanobacteria. D. A. Bryant. Netherlands, Kluwer Academic Publishers**:** 139-216.

Sidler, W. A. (1994). Phycobilisome and phycobiliprotein structure. The molecular biology of cyanobacteria. D. A. Bryant. Dordrecht, Kluwer Academic Publisher**:** 158-160.

Siefermann-Harms, D. (1988). Fluorescence properties of isolated chlorophyll-protein complexes. Application of chlorophyll fluorescence. H. K. Lichtenthaler. Dordrecht, Kluwer Academic Publisher**:** 45-54.

Singh, A. K., H. Li, L. Bono and L. A. Sherman (2005). "Novel adaptive responses revealed by transcription profiling of a *Synechocystis* sp. PCC 6803 delta-*isi*A mutant in the presence and absence of hydrogen peroxide." Photosynth Res **84**(1-3): 65-70.

Six, C., J. C. Thomas, L. Garczarek, M. Ostrowski, A. Dufresne, N. Blot, D. J. Scanlan and F. Partensky (2007). "Diversity and evolution of phycobilisomes in marine *Synechococcus* spp.: a comparative genomics study." Genome Biol **8**(12): R259.

Six, C., J. C. Thomas, L. Thion, Y. Lemoine, F. Zal and F. Partensky (2005). "Two novel phycoerythrin-associated linker proteins in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain WH8102." J Bacteriol **187**(5): 1685-94.

Spiller, S. and N. Terry (1980). "Limiting factors in photosynthesis: II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units." Plant Physiol **65**(1): 121-125.

Spudich, J. L. (2006). "The multitalented microbial sensory rhodopsins." Trends Microbiol **14**(11): 480-7.

Staehelin, L. A. (1986). Chloroplast structure and supramolecular organization of photosynthetic membranes. Encyclopedia of plant physiology. C. J. Arntzen and L. A. Staehelin, Springer-Verlag. **19:** 1-84.

Standfuss, J. and W. Kuhlbrandt (2004). "The three isoforms of the light-harvesting complex II: spectroscopic features, trimer formation, and functional roles." J Biol Chem **279**(35): 36884-91.

Standfuss, J., A. C. Terwisscha van Scheltinga, M. Lamborghini and W. Kuhlbrandt (2005). "Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 A resolution." Embo J **24**(5): 919-28.

Stewart, M., H. M. Kent and A. J. McCoy (1998). "Structural basis for molecular recognition between nuclear transport factor 2 (NTF2) and the GDP-bound form of the Ras-family GTPase Ran." J Mol Biol **277**(3): 635-46.

Stockel, J., E. A. Welsh, M. Liberton, R. Kunnvakkam, R. Aurora and H. B. Pakrasi (2008). "Global transcriptomic analysis of *Cyanothece* 51142 reveals robust diurnal oscillation of central metabolic processes." PNAS **105**(16): 6156-61.

Storf, S., S. Jansson and V. H. Schmid (2005). "Pigment binding, fluorescence properties, and oligomerization behavior of Lhca5, a novel light-harvesting protein." J Biol Chem **280**(7): 5163-8.

Strauss, H. M., P. Schmieder and J. Hughes (2005). "Light-dependent dimerisation in the N-terminal sensory module of cyanobacterial phytochrome 1." FEBS Lett **579**(18): 3970-4.

Swartz, T. E., S. B. Corchnoy, J. M. Christie, J. W. Lewis, I. Szundi, W. R. Briggs and R. A. Bogomolni (2001). "The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin." J Biol Chem **276**(39): 36493-500.

Swingley, W. D., R. E. Blankenship and J. Raymond (2008). Insights into cyanobacterial evolution from comparative genomics. The cyanobacteria : molecular biology, genomics, and evolution. A. Herrero and E. Flores, Caister Academic Press**:** 21-43.

Takaichi, S. and M. Mochimaru (2007). "Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides." Cell Mol Life Sci **64**(19-20): 2607-19.

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." Bull de L'Inst Pasteur **81**: 201-254.

Tandeau de Marsac, N. (2003). "Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations." Photosynth Res **76**(1-3): 193-205.

Tandeau de Marsac, N. and G. Cohen-Bazire (1977). "Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes." PNAS **74**: 1635-1639.

Tasaka, Y., Z. Gombos, Y. Nishiyama, P. Mohanty, T. Ohba, K. Ohki and N. Murata (1996). "Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis." Embo J **15**(23): 6416-25.

Taylor, B. L. and I. B. Zhulin (1999). "PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light." Microbiol Mol Biol Rev **63**(2): 479-506.

Thomas, J. C., B. Ughy, B. Lagoutte and G. Ajlani (2006). "A second isoform of the ferredoxin:NADP oxidoreductase generated by an in-frame initiation of translation." PNAS **103**(48): 18368-73.

Tyystjärvi, E. (2008). "Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster." Coord Chem Rev.

Vallon, O., L. Bulte, P. Dainese, J. Olive, R. Bassi and F. A. Wollman (1991). "Lateral redistribution of cytochrome b_6/f complexes along thylakoid membranes upon state transitions." PNAS **88**(18): 8262-6.

van Thor, J. J., O. W. Gruters, H. C. Matthijs and K. J. Hellingwerf (1999). "Localization and function of ferredoxin:NADP(+) reductase bound to the phycobilisomes of *Synechocystis*." Embo J **18**(15): 4128-36.

van Thor, J. J., C. W. Mullineaux, H. C. Matthijs and K. J. Hellingwerf (1998). "Light harvesting and state transitions in cyanobacteria." Botanica Acta **111**: 430-443.

Vandorssen, R. J., J. J. Plijter, J. P. Dekker, A. Denouden, J. Amesz and H. J. Vangorkom (1987). "Spectroscopic properties of chloroplast grana membranes and of the core of photosystem II." Biochim Biophys Acta **890**: 134-143.

Vass, I. and E. M. Aro (2007). Photoinhibition of photosystem II electron transport. Primary processes of photosynthesis : basic principles and apparatus. G. Renger. Cambridge, Roy Soc Chem**:** 393-411.

Vass, I., S. Styring, T. Hundal, A. Koivuniemi, E. Aro and B. Andersson (1992). "Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced Q_A species promote chlorophyll triplet formation." PNAS **89**(4): 1408-12.

Vernotte, C. (1990). "State 1 - State 2 adaptation in the cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6714 wild type and *Synechocystis* PCC 6803." Photosynth Res **26**: 203-212.

Walters, J., S. L. Milam and A. C. Clark (2009). "Practical approaches to protein folding and assembly: spectroscopic strategies in thermodynamics and kinetics." Methods Enzymol **455**: 1-39.

Waterbury, J. B., S. W. Watson, F. W. Valois and D. G. Franks (1986). Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. Photosynthetic Picoplankton. W. K. W. Li, Can Bull Fish Aquat Sci**:** 71.

Webber, A. N., H. Su, S. E. Bingham, H. Kass, L. Krabben, M. Kuhn, R. Jordan, E. Schlodder and W. Lubitz (1996). "Site-directed mutations affecting the spectroscopic characteristics and midpoint potential of the primary donor in photosystem I." Biochemistry **35**(39): 12857-63.

Weber, S. (2005). "Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase." Biochim Biophys Acta **1707**(1): 1-23.

West, A. H. and A. M. Stock (2001). "Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems." Trends Biochem Sci **26**(6): 369-76.

Wilde, A., Y. Churin, H. Schubert and T. Borner (1997). "Disruption of a *Synechocystis* sp. PCC 6803 gene with partial similarity to phytochrome genes alters growth under changing light qualities." FEBS Lett **406**(1-2): 89-92.

Wilson, A., G. Ajlani, J. M. Verbavatz, I. Vass, C. A. Kerfeld and D. Kirilovsky (2006). "A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria." Plant Cell **18**(4): 992-1007.

Wilson, A., C. Boulay, A. Wilde, C. A. Kerfeld and D. Kirilovsky (2007). "Light-induced energy dissipation in iron-starved cyanobacteria: roles of OCP and IsiA proteins." Plant Cell **19**(2): 656-72.

Wilson, A., C. Punginelli, A. Gall, C. Bonetti, M. Alexandre, J. M. Routaboul, C. A. Kerfeld, R. van Grondelle, B. Robert, J. T. Kennis and D. Kirilovsky (2008a). "A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor." PNAS **105**(33): 12075-80.

Wollman, F. A. (1979). "Ultrastructural comparison of *Cyanidium caldarium* wild type and III-C mutant lacking phycobilisomes." Plant Physiol **63**(2): 375-381.

Wollman, F. A. (2001). "State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus." Embo J **20**(14): 3623-30.

Wu, Y. P. and D. W. Krogmann (1997). "The orange carotenoid protein of *Synechocystis* PCC 6803." Biochim Biophys Acta **1322**(1): 1-7.

Yamanaka, G., D. J. Lundell and A. N. Glazer (1982). "Molecular architecture of a light-harvesting antenna. Isolation and characterization of phycobilisome subassembly particles." J Biol Chem **257**(8): 4077-86.

Yeh, K. C., S. H. Wu, J. T. Murphy and J. C. Lagarias (1997). "A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system." Science **277**(5331): 1505-8.

Yeremenko, N., R. Jeanjean, P. Prommeenate, V. Krasikov, P. J. Nixon, W. F. Vermaas, M. Havaux and H. C. Matthijs (2005). "Open reading frame *ssr*2016 is required for antimycin A-sensitive photosystem I-driven cyclic electron flow in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." Plant Cell Physiol **46**(8): 1433-6.

Yeremenko, N., R. Kouril, J. A. Ihalainen, S. D'Haene, N. van Oosterwijk, E. G. Andrizhiyevskaya, W. Keegstra, H. L. Dekker, M. Hagemann, E. J. Boekema, H. C. Matthijs and J. P. Dekker (2004).

"Supramolecular organization and dual function of the IsiA chlorophyll-binding protein in cyanobacteria." Biochemistry **43**(32): 10308-13.

Yoshihara, S., M. Katayama, X. Geng and M. Ikeuchi (2004). "Cyanobacterial phytochrome-like PixJ1 holoprotein shows novel reversible photoconversion between blue- and green-absorbing forms." Plant Cell Physiol **45**(12): 1729-37.

Yousef, N., E. K. Pistorius and K. P. Michel (2003). "Comparative analysis of *idi*A and *isi*A transcription under iron starvation and oxidative stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 wild-type and selected mutants." Arch Microbiol **180**(6): 471-83.

Zeugner, A., M. Byrdin, J. P. Bouly, N. Bakrim, B. Giovani, K. Brettel and M. Ahmad (2005). "Light-induced electron transfer in *Arabidopsis* cryptochrome-1 correlates with *in vivo* function." J Biol Chem **280**(20): 19437-40.

Zhang, S. and H. V. Scheller (2004). "Light-harvesting complex II binds to several small subunits of photosystem I." J Biol Chem **279**(5): 3180-7.

Zilinskas, B. A. and L. S. Greenwald (1986). "Phycobilisome structure and function." Photosynth Res **10**: 7-35.

Articles

Ci-après se trouvent les 2 articles (chapitre I et II) et le proceeding (chapitre III) déjà publiés dont le travail est décrit dans cette thèse.

Dans l'ordre :

- Wilson *et al*. 2007
-
- Boulay *et al*. 2008a
-
- Boulay *et al*. 2008b

The Plant Cell, Vol. 19: 656–672, February 2007, www.plantcell.org © 2007 American Society of Plant Biologists

Light-Induced Energy Dissipation in Iron-Starved Cyanobacteria: Roles of OCP and IsiA Proteins [W]

Adjélé Wilson,[a] Clémence Boulay,[a] Annegret Wilde,[b] Cheryl A. Kerfeld,[c] and Diana Kirilovsky[a,1]

[a] Unité de Recherche Associée 2096, Centre National de la Recherche Scientifique, Service de Bioénergétique, Commissariat à l'Energie Atomique Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France

[b] Institute of Biology, Humboldt University, 10115 Berlin, Germany

[c] Molecular Biology Institute, University of California, Los Angeles, California 90095-1570

In response to iron deficiency, cyanobacteria synthesize the iron stress–induced chlorophyll binding protein IsiA. This protein protects cyanobacterial cells against iron stress. It has been proposed that the protective role of IsiA is related to a blue light–induced nonphotochemical fluorescence quenching (NPQ) mechanism. In iron-replete cyanobacterial cell cultures, strong blue light is known to induce a mechanism that dissipates excess absorbed energy in the phycobilisome, the extramembranal antenna of cyanobacteria. In this photoprotective mechanism, the soluble Orange Carotenoid Protein (OCP) plays an essential role. Here, we demonstrate that in iron-starved cells, blue light is unable to quench fluorescence in the absence of the phycobilisomes or the OCP. By contrast, the absence of IsiA does not affect the induction of fluorescence quenching or its recovery. We conclude that in cyanobacteria grown under iron starvation conditions, the blue light–induced nonphotochemical quenching involves the phycobilisome OCP–related energy dissipation mechanism and not IsiA. IsiA, however, does seem to protect the cells from the stress generated by iron starvation, initially by increasing the size of the photosystem I antenna. Subsequently, the IsiA converts the excess energy absorbed by the phycobilisomes into heat through a mechanism different from the dynamic and reversible light-induced NPQ processes.

INTRODUCTION

Excess light can be lethal for photosynthetic organisms because harmful reactive oxygen species are generated in the photochemical reaction centers when energy absorption exceeds the rate of carbon fixation. To survive, photosynthetic organisms have evolved several protective processes. One such mechanism is the dissipation of the excess absorbed energy as heat in the light-collecting pigment/protein complexes, the so-called antenna. In plants, this process involves the chlorophyll-containing light-harvesting complex (LHCII) of photosystem II (PSII) and is triggered by acidification of the thylakoid lumen under saturating light conditions (reviewed in Demmig-Adams, 1990; Horton et al., 1996; Niyogi, 1999; Müller et al., 2001). A drop in the thylakoid lumen pH activates the formation of the carotenoid zeaxanthin from violaxanthin as part of the xanthophyll cycle (Yamamoto, 1979; Gilmore and Yamamoto, 1993) and induces the protonation of PsbS, a PSII subunit that belongs to the LHC superfamily (Li et al., 2000, 2004). This process also involves conformational changes in LHCII, modifying the interaction between chlorophylls and carotenoids (Ruban et al., 1992; Pascal et al., 2005). Thermal energy dissipation is accompanied by a decrease of PSII-related fluorescence emission, known as high-energy quenching (qE), one of the nonphotochemical quenching (NPQ) processes. The qE is a dynamic, rapidly reversible process that is induced seconds after the plant is exposed to high light intensities.

Several recent studies have shown that cyanobacteria, which do not have the integral membrane chlorophyll-containing LHCII, also use a light-induced antenna-related NPQ mechanism to decrease the amount of energy funneled to the PSII reaction center (El Bissati et al., 2000; Rakhimberdieva et al., 2004; Scott et al., 2006; Wilson et al., 2006). In cyanobacteria, light is captured by a membrane extrinsic complex, the phycobilisome, which is attached to the outer surface of thylakoid membranes. These large complexes consist of phycobiliproteins with covalently bound bilin pigments and linker peptides that are required for the organization of the phycobilisomes (reviewed in MacColl, 1998; Adir, 2005). Phycobilisomes are composed of a core from which rods (usually six) radiate. The major core protein is allophycocyanin (APC), while the rods contain phycocyanin (PC) and, in some species, phycoerythrin or phycoerythrocyanin (in the distal end of the rod). The phycobilisomes are bound to the thylakoids via the core membrane linker protein Lcm, which also serves as the terminal energy acceptor. Harvested light energy is transferred from Lcm to the chlorophylls of PSII and photosystem I (PSI) (Mullineaux, 1992; Rakhimberdieva et al., 2001).

Results revealing the existence of a blue light–induced NPQ mechanism proposed to be associated with the phycobilisomes were first described in 2000 (El Bissati et al., 2000). Subsequently, spectral and kinetics data were presented suggesting that blue light–activated carotenoids induce quenching of

[1] To whom correspondence should be addressed. E-mail diana.kirilovsky@cea.fr; fax 33-1-69088717.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Diana Kirilovsky (diana.kirilovsky@cea.fr).

[W] Online version contains Web-only data.

www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.106.045351

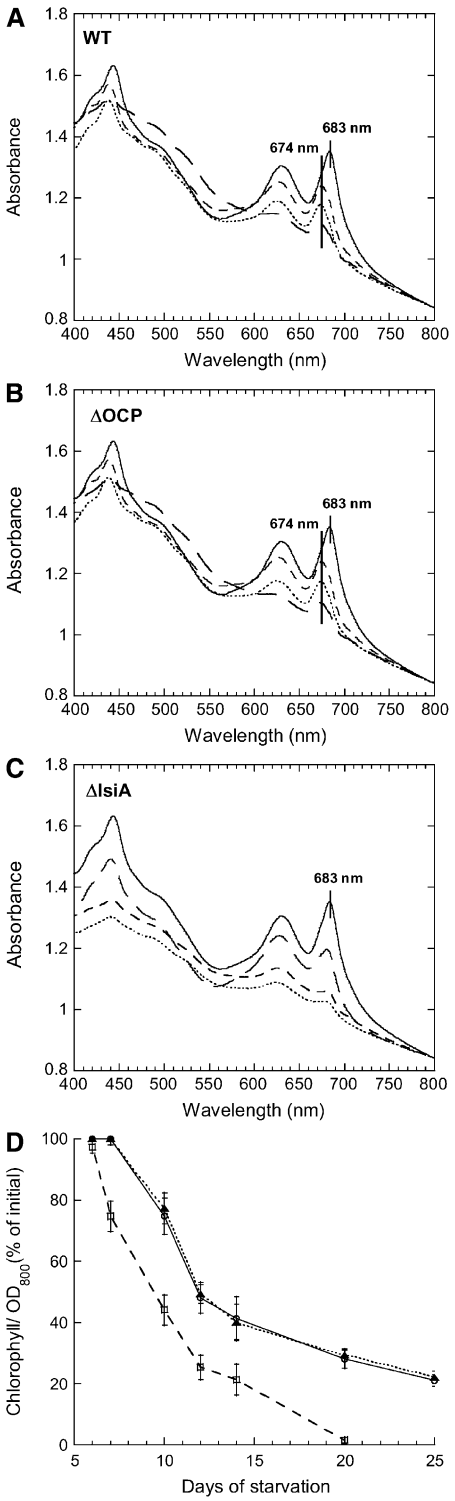


Figure 1. Changes in Absorption Spectra and Chlorophyll Content Induced by Iron Starvation in Wild-Type, ΔOCP, and ΔIsiA Cells.

(A) and **(B)** Absorption spectra of wild-type **(A)** and ΔOCP **(B)** cells grown in iron-containing medium (solid line) or in iron-depleted medium for 12 (small dashed line), 14 (dotted line), or 20 (large dashed line) d.

(C) Absorption spectra of ΔIsiA cells grown in iron-containing medium (solid line) or in iron-free medium for 7 (large dashed line), 12 (small dashed line), or 14 (dotted line) d. The spectra were normalized at OD_{800}.

(D) Decrease of chlorophyll content in iron-starved wild-type (circles), ΔOCP (triangles), and ΔIsiA (squares) cells. The results are the average of seven independent experiments. Error bars show the maximum and minimum chlorophyll/OD_{800} values for each point. 100% of chlorophyll/OD_{800} = 7.5, corresponding to ~5.8 μg chlorophyll/mL for a culture at OD_{800} = 0.78.

phycobilisome fluorescence emission (Rakhimberdieva et al., 2004). Wilson et al. (2006) demonstrated that a soluble carotenoid binding protein, the Orange Carotenoid Protein (OCP), is specifically involved in a phycobilisome-related NPQ that appears to be associated with a photoprotective energy dissipation mechanism. OCP, a 35-kD protein that contains a single noncovalently bound carotenoid, is encoded by the *slr1963* open reading frame in *Synechocystis* PCC 6803 (Holt and Krogmann, 1981; Wu and Krogmann, 1997; for review, see Kerfeld, 2004a, 2004b). Highly conserved homologs of OCP are found in the genomes of all cyanobacteria, with the exception of the *Prochlorococcus* strains, for which genomic data are available (Kerfeld, 2004a, 2004b).

In the absence of OCP, the NPQ induced by strong white or blue-green light in *Synechocystis* PCC 6803 cells is completely inhibited, and the cells are more sensitive to high light intensities (Wilson et al., 2006). The observation that the effective antenna size was smaller in the cells in the quenched state strongly supports the hypothesis that the OCP-related mechanism dissipates the excess absorbed energy, thereby decreasing the amount of energy arriving at the photochemical centers. The OCP phycobilisome–associated NPQ is not dependent on the presence of a transthylakoid ΔpH, on the excitation pressure on PSII, or on changes in the redox state of the plastoquinone pool (El Bissati et al., 2000; Scott et al., 2006; Wilson et al., 2006). Instead, OCP seems to act as a photoreceptor that responds to blue-green light and induces energy dissipation (and fluorescence quenching) through interaction with the phycobilisome core.

Under iron starvation conditions, blue light causes a large reversible quenching of Fo and Fm levels (Cadoret et al., 2004; Bailey et al., 2005; Joshua et al., 2005). It was proposed that the iron stress–induced protein IsiA was essential in this NPQ process. Two mechanisms were proposed: (1) blue light converts the IsiA protein from one form that is efficient in harvesting light energy for photosynthesis into another form that converts excess energy into heat (Cadoret et al., 2004); and (2) strong light induces a change in IsiA, increasing the affinity of IsiA for the phycobilisomes and diminishing the high fluorescence of free phycobilisomes (Joshua et al., 2005).

The expression of the IsiA protein, which belongs to the core complex family of chlorophyll binding proteins, is induced by iron starvation (Laudenbach and Straus, 1988; Burnap et al., 1993) and other stress conditions (such as salt stress, oxidative stress, and high-light stress) (Jeanjean et al., 2003; Yousef et al., 2003; Havaux et al., 2005). IsiA encircles the PSI reaction center, forming complexes consisting of a trimeric PSI and 18 IsiA molecules (Bibby et al., 2001; Boekema et al., 2001). Larger

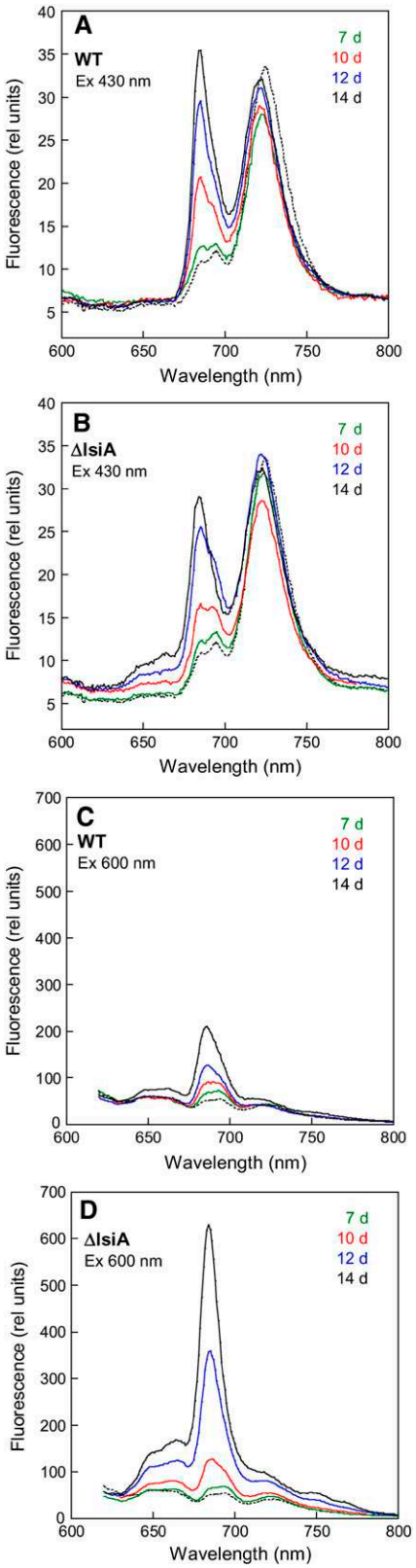


Figure 2. Changes in 77K Fluorescence Emission Spectra Induced by Iron Starvation in Wild-Type and ΔIsiA Mutant Cells.

The 77K fluorescence spectra of wild-type (**[A]** and **[C]**) and ΔIsiA (**[B]** and **[D]**) cells grown in iron-containing medium (dotted line) or in iron-lacking medium for 7 (green), 10 (red), 12 (blue), and 14 (black) d. The excitation wavelength was 430 (**[A]** and **[B]**) or 600 nm (**[C]** and **[D]**). Each spectrum shown is the mean of four spectra. The 77K fluorescence spectra were normalized to the fluorescence emitted at 800 nm. The figure shows a representative iron starvation experiment; the experiments consistently showed similar fluorescence changes and kinetics. The cells were at 3 μg chlorophyll/mL.

amounts of IsiA are bound to PSI during prolonged iron starvation (Yeremenko et al., 2004). IsiA increases the absorptional cross section of PSI, acting as an additional and efficient LHC for PSI (Andrizhiyevskaya et al., 2002; Melkozernov et al., 2003). IsiA aggregates, forming empty multimeric rings (without PSI), also accumulate and are very abundant in long-term iron-depleted cells (Yeremenko et al., 2004). These IsiA aggregates, in vitro, are in a strongly quenched state, suggesting that they are responsible for thermal dissipation of absorbed energy (Ihalainen et al., 2005). In cells grown under high light conditions, IsiA is also synthesized to protect the cyanobacterial cells from photodestruction (Havaux et al., 2005).

In addition to IsiA, the high-light-inducible proteins (HLIPs; also called SCPs) seem to protect the cells by heat dissipation of the absorbed energy, and mutants lacking these proteins are more sensitive to high light conditions (He et al., 2001; Havaux et al., 2003). The HLIPS that are synthesized in cyanobacterial cells grown under high-light conditions and other stress conditions (Dolganov et al., 1995; Funk and Vermaas, 1999; He et al., 2001) are chlorophyll binding single-helix polypeptides related to the LHC proteins and to the early-light-inducible proteins (Adamska, 1997, 2001).

Our recent results demonstrating the existence of the phycobilisome OCP–related NPQ mechanism in cyanobacteria grown in the presence of iron (Wilson et al., 2006) led us to consider the possibility that this mechanism could also play a role in the (blue) light-induced fluorescence quenching observed under iron starvation conditions. To date, only IsiA had been implicated in mediating this process. To test this idea, we studied light-induced fluorescence quenching in several iron-starved *Synechocystis* PCC 6803 mutants: a mutant without IsiA (ΔIsiA), a mutant without OCP (ΔOCP), and a mutant without phycobilisomes (PAL). Indeed, our results demonstrate that under iron starvation the blue-green light–induced NPQ mechanism is related to the OCP-mediated quenching of the phycobilisome emission and not to modifications of IsiA. Even though the presence of the IsiA protein protects the cells from stress, this protein is not involved in the light-induced NPQ mechanism.

RESULTS

Pigment Changes during Iron Starvation in Wild-Type, ΔIsiA, and ΔOCP Mutant Cells

Cyanobacteria grown under iron-deficient conditions exhibit decreased chlorophyll and PC content (Öquist, 1971, 1974a;

Guikema and Sherman, 1983; Sandmann, 1985). These changes are systemic; the levels of PSI, PSII (Spiller and Terry, 1980; Guikema and Sherman, 1983), and thylakoid (Sherman and Sherman, 1983) all decrease during iron starvation, with the decrease in PSI being the most marked (Guikema and Sherman, 1983; Sandmann, 1985). The presence of IsiA causes a blue shift in the room temperature chlorophyll *a* absorbance peak (680 to 673 nm), and the chlorophyll *a* fluorescence at 77K becomes dominated by a high emission at 685 nm (Öquist, 1974b; Burnap et al., 1993; Falk et al., 1995; Park et al., 1999). Odom et al. (1993) were the first to describe these changes in iron-starved *Synechocystis* PCC 6803.

Under experimental conditions of iron starvation and low-light intensities (see Methods), during the first 6 d, the content of chlorophyll per cell and the PC/chlorophyll ratio remained similar to those in unstarved wild-type, ΔOCP, and ΔIsiA *Synechocystis* PCC 6803 cells (Figure 1). Subsequently, the chlorophyll content of the wild-type and ΔOCP cells decreased; the maximum of the chlorophyll absorbance peak at 683 nm down-shifted until it reached 674 nm after 10 d of starvation (Figures 1A and 1B). In ΔIsiA cells, no shift of the chlorophyll-related peak was observed, and the chlorophyll content per cell decreased faster than in wild-type cells (Figures 1C and 1D). Even though the PC content per cell also decreased, an increase of the PC/chlorophyll ratio was observed in ΔIsiA cells (Figure 1C), while in wild-type and ΔOCP cells, the PC/chlorophyll ratio remained almost constant (Figures 1A and 1B). After 20 d of iron starvation, the ΔIsiA contained almost no chlorophyll and the cells were dead (Figure 1D). By contrast, wild-type and ΔOCP cells containing a low content of chlorophyll and a high content of carotenoids continued to survive and were still alive after 50 d of iron starvation (see Supplemental Figure 4 online).

Fluorescence Changes during Iron Starvation in Wild-Type and ΔIsiA Cells

Figure 2 shows the 77K fluorescence emission spectra of wild-type and ΔIsiA cells grown in complete medium or medium lacking iron for 7, 10, 12, and 14 d. Fluorescence excitation experiments using 430-nm light, which is preferentially absorbed by chlorophyll, and 600-nm light, which is preferentially absorbed by the phycobilisomes, were used to monitor the changes in the photosynthetic apparatus induced by iron starvation. When wild-type and ΔIsiA cells grown in iron-containing medium were excited at 430 nm, the 77K fluorescence spectra showed bands at 685 and 695 nm (related to the CP43 and the CP47 chlorophyll antenna of PSII, respectively; Van Dorssen et al., 1987; Siefermann-Harms, 1988), and a large PSI chlorophyll-related band at 725 nm (Figures 2A and 2B). In the early phases of iron starvation, wild-type and ΔIsiA cells showed an increase in the ratio of PSII fluorescence (685- and 695-nm peaks) to PSI fluorescence, suggesting an increased PSII/PSI ratio (Figures 2A and 2B). This is in accordance with the observation that the content of PSI, which contains three 4Fe-4S centers, decreases faster than that of PSII, which contains only three iron sulfur centers (Guikema and Sherman, 1983; Sandmann, 1985; Falk et al., 1995; Ivanov et al., 2000).

After prolonged (10 to 14 d) iron starvation, both strains showed a more rapid increase in the emission at 685 nm relative to that at 695 nm (Figures 2A and 2B). This was particularly marked in wild-type cells in which the 685-nm fluorescence emission reflects the presence of PSI-less IsiA aggregates (Yeremenko et al., 2004). PSI-IsiA supercomplexes have a very small 686-nm emission that makes a negligible contribution to this band (Andrizhiyevskaya et al., 2002; Yeremenko et al., 2004). The presence of IsiA and IsiA aggregates was confirmed by protein gel blot experiments (Figure 3). IsiA was present in 10 d iron-starved wild-type cells, but it was absent in wild-type cells grown in the presence of iron and in iron-starved ΔIsiA cells. The amount of CP47 (a measure of PSII) was increased in cells under iron-starved conditions relative to cells grown in the presence of iron (Figure 3). In iron-starved ΔIsiA cells, the amount of CP47 was even slightly higher than in wild-type cells. These results were in accordance with the increased PSII/PSI ratio deduced

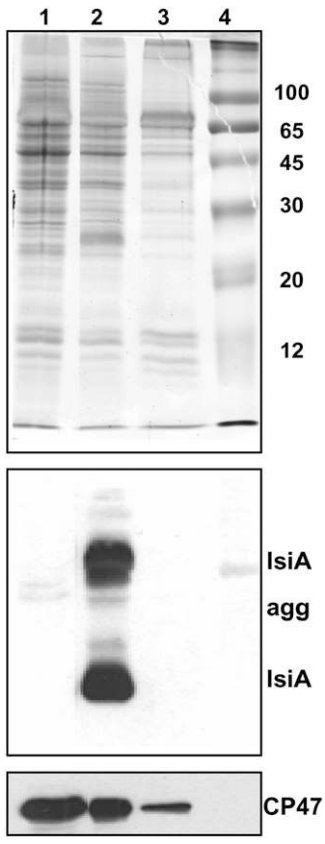


Figure 3. Immunodetection of IsiA and CP47 in Membranes Isolated from Nonstarved and Starved *Synechocystis* Wild-Type and Mutant Cells.

Coomassie blue–stained gel electrophoresis and immunoblot detection of IsiA and CP47 in the membrane fractions isolated from 10 d iron-starved ΔIsiA (lane 1) and wild-type (lane 2) cells and nonstarved wild-type cells (lane 3). The IsiA antibody also reacts with IsiA aggregates (IsiA agg). Lane 4, molecular mass markers (in kilodaltons). Each sample contained 1 μg of chlorophyll.

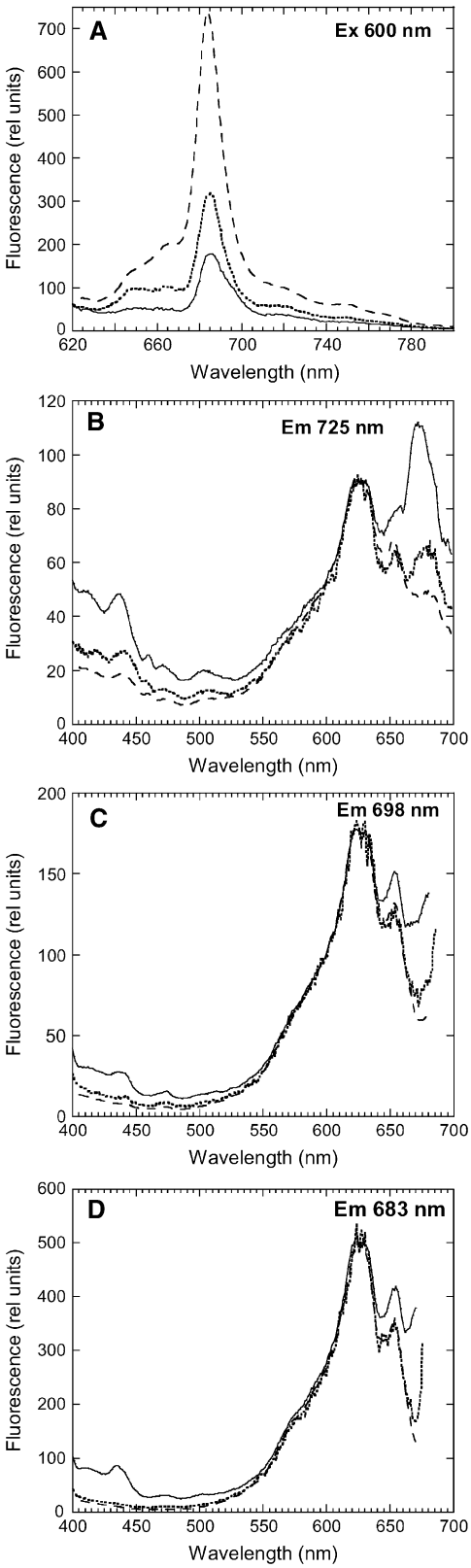


Figure 4. The 77K Excitation Fluorescence Spectra of Iron-Starved Wild-Type and ΔIsiA Cells.

The 77K fluorescence emission spectra (Ex 600 nm) of 11 d iron-starved wild-type cells (solid line) and 11 d (dotted line) and 15 d (dashed line) iron-starved ΔIsiA cells **(A)**. The 77K fluorescence excitation spectra for an emission at 725 **(B)**, 698 **(C)**, and 683 nm **(D)** of 11 d iron-starved wild-type cells (solid line) and 11 d (dotted line) and 15 d (dashed line) iron-starved ΔIsiA cells. The cells were at 2 μg chlorophyll/mL.

from fluorescence spectra and variable fluorescence measurements (see below). Dühring et al. (2006), using Blue-Native PAGE gels, has also shown that in ΔIsiA iron-starved cells there is a higher concentration of PSII dimer and monomer than in wild-type iron-starved cells.

In iron-starved ΔIsiA cells, the increase of the 685-nm emission is evidently not associated with IsiA; instead, the source of this emission may be the phycobilisome terminal emitter, the Lcm, in disconnected phycobilisomes (see Supplemental Figure 1 online). In long-term iron-starved wild-type cells, a contribution of the emission from Lcm of uncoupled phycobilisomes may also be present.

In cyanobacteria, the fluorescence spectrum generated at 77K by 600-nm excitation contains emission bands related to PC (650 nm), APC (660 nm), PSII (685 and 695 nm), and PSI (725 nm) (Figures 2C and 2D). The peak at 695 nm derives from the chlorophyll *a* emission of the PSII antenna CP47 and the reaction center. The emission at 685 nm is principally related to the phycobilisome terminal emitter, but fluorescence emission from the CP43 PSII antenna also contributes to this peak. When empty (without PSI) IsiA complexes are present, their fluorescence emission significantly contributes to the 685-nm peak. In the fluorescence spectra, the first manifestation of iron starvation in wild-type and ΔIsiA cells was an increase in the ratio of PSII fluorescence (685- and 695-nm peaks) to PSI fluorescence (Figures 2C and 2D). Extended iron starvation resulted in a large increase of the 685-nm peak. This increase was faster and more pronounced in ΔIsiA cells than in wild-type cells (Figures 2C and 2D). The origin of this increase was different in each strain. In ΔIsiA cells, this increase can only be related to the phycobilisome terminal emitter, reflecting an accumulation of functionally disconnected, high fluorescent phycobilisomes. In wild-type cells, the increase could be attributed to IsiA emission (Yeremenko et al., 2004) due to energy transfer from the phycobilisomes to IsiA complexes, as suggested by Joshua et al. (2005), and to a small population of uncoupled phycobilisomes in long-term iron-starved cells.

This suggestion was confirmed by comparison of 77K excitation fluorescence spectra of the emissions at 725 (PSI emission), 698 (PSII emission), and 683 nm (IsiA aggregates and phycobilisome emission) in iron-starved wild-type and iron-starved ΔIsiA cells. Isolated phycobilisomes also have a relatively high emission at 698 and 725 nm (see Supplemental Figure 2 online). In iron-starved wild-type cells, the spectra showed higher contributions from chlorophyll *a* (peaks at around 435 and 680 nm) and smaller contributions from components at 570, 620 (from PC), and 650 nm (from APC) than in iron-starved ΔIsiA cells (Figure 4). Moreover, the relative contribution of PC to the spectra increased with the increase of the 685-nm emission peak in iron-starved cells. These results indicated that in ΔIsiA cells, a large

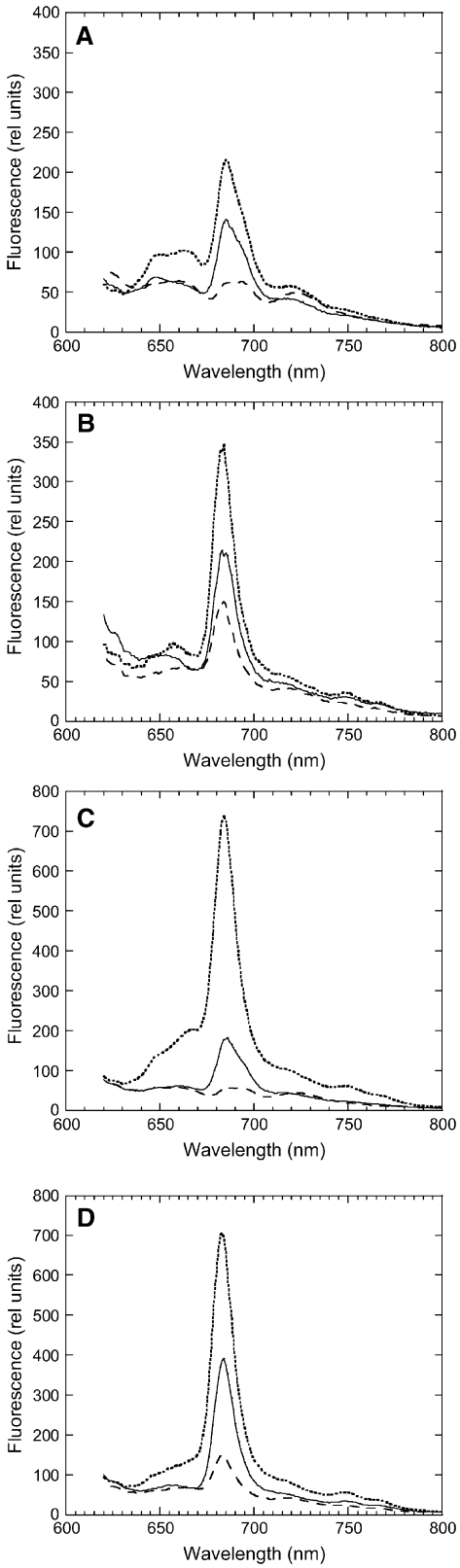


Figure 5. The 77K Fluorescence Emission Spectra of Iron-Starved Wild-Type and ΔIsiA MP Fractions.

quantity of functionally disconnected phycobilisomes was present. The spectra also strongly suggest that in iron-starved wild-type cells, most of the phycobilisomes transferred the absorbed energy not only to the photosystems but also to IsiA complexes (see Supplemental Figure 2 online).

Phycobilisome-associated membrane fractions (MPs) from nonstarved and 11 or 15 d iron-starved wild-type and ΔIsiA cells were prepared to elucidate if the functionally disconnected phycobilisomes remained associated with the thylakoids. The cells were broken in a phosphate/citrate buffer. After discarding unbroken cells, the MPs were obtained by centrifugation. In all cases, the supernatant was nearly colorless, indicating that the bulk of the phycobilisomes remained attached to the thylakoids. This was confirmed by absorption spectra (see Supplemental Figure 3 online). The PC/chlorophyll ratio was higher in ΔIsiA MP compared with that of MP from wild-type cells. Fifteen days iron-starved ΔIsiA cells and MPs showed high and similar fluorescence at 685 nm. The magnitude of this fluorescence suggested that already in whole cells a large quantity of phycobilisomes (perhaps nearly all) were functionally disconnected. The rest of the MP preparations produced a larger emission at 685 nm than whole cells, suggesting a compromised connection between the phycobilisomes and the thylakoids in vitro (Figure 5). Nevertheless, as in whole cells, ΔIsiA MPs presented a larger 685-nm emission than wild-type MPs (Figures 5B and 5D). Thus, we conclude that in ΔIsiA iron-starved cells, all the phycobilisomes were attached to the thylakoids as in wild-type cells, but a larger number were functionally disconnected; they did not transfer energy to any chlorophyll complex.

Fluorescence Quenching in Iron-Starved Wild-Type and ΔIsiA Cells

The induction of the blue light–induced fluorescence quenching was monitored using a pulse-amplitude modulated fluorimeter (PAM). In cyanobacteria, the fluorescence detected by a PAM fluorometer is emitted from chlorophyll and phycobiliproteins (Campbell et al., 1998). In the PAM fluorometer, the measuring light has a maximum of excitation at 650 nm, and the fluorescence is detected at wavelengths beyond 700 nm. In cyanobacteria, which lack chlorophyll *b*, most of the measuring light is absorbed by the phycobilisomes. Thus, Fo, the minimal fluorescence level in dark-adapted cells, varies according to the cellular phycobiliprotein concentration (e.g., very low in mutants without phycobiliproteins) (Campbell et al., 1998; El Bissati and Kirilovsky, 2001). The Fo level also depends on the coupling of phycobilisomes: energetically coupled phycobilisomes show

The 77K fluorescence spectra of nonstarved (dashed line), 12 d iron-starved wild-type (solid line; **[A]**), and iron-starved ΔIsiA (dotted line; **[A]**) cells, 15 d iron-starved wild-type cells (solid line; **[C]**), and iron-starved ΔIsiA (dotted line; **[C]**) cells and of the corresponding MP fractions (**[B]**, wild-type; **[D]**, ΔIsiA). The 77K fluorescence emission spectra were normalized to the fluorescence emitted at 800 nm. The cells were at 2 μg chlorophyll/mL.

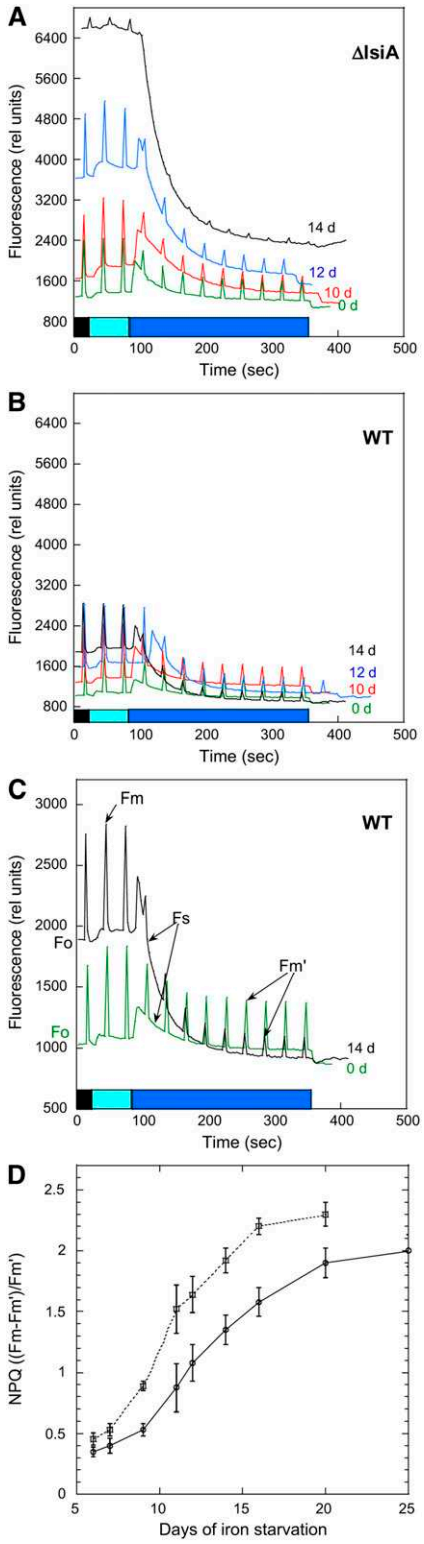


Figure 6. Blue-Green Light–Induced Fluorescence Quenching in Iron-Starved Wild-Type and ΔisiA Cells.

(A) to **(C)** The 0 d (green), 7 d (data not shown; similar to 0 d), 10 d (red), 12 d (blue), and 14 d (black) iron-starved ΔIsiA **(A)** and wild-type (**[B]** and **[C]**) cells (at 3 μg chlorophyll/mL) were dark-adapted and then illuminated successively with low-intensity blue-green light (400 to 550 nm, 80 μmol photons m^{-2} s^{-1}) and high-intensity blue-green light (740 μmol photons m^{-2} s^{-1}). Saturating pulses were applied to measure maximal fluorescence levels. Fm, maximal fluorescence under low intensities of blue light; Fm′, maximal fluorescence under high intensities of blue light; Fs, steady state fluorescence; Fo, minimal fluorescence (see **[C]**). In **(C)**, the changes of fluorescence traces in 7 and 14 d iron-starved wild-type cells are shown with a different scale than **(A)** and **(B)** to clarify the differences in fluorescence quenching.

(D) Increase of NPQ [(Fm − Fm′)/Fm′] during iron starvation of wild-type (circles and solid line) and ΔIsiA (squares and dotted line) cells. The graph is the average of four independent experiments. Error bars show the maximum and minimum NPQ values for each point.

low-yield fluorescence emission, while uncoupled phycobilisomes show high-yield fluorescence emission. Figures 6A to 6C compare the room temperature fluorescence traces measured with a PAM fluorometer after 0, 7, 10, 12, and 14 d of iron starvation from wild-type and ΔIsiA cells. Dark-adapted cells were successively illuminated by dim and strong blue-green light. The cells under dim blue-green light, which preferentially excites PSI, showed a high level of fluorescence characteristic of State 1, which is induced by oxidation of the plastoquinone pool upon illumination of dark-adapted cells. Subsequently, exposure of cells to strong blue-green light induced the quenching of all levels of fluorescence (Fm′, Fs, and Fo) in both wild-type and ΔIsiA cells. The fluorescence quenching increased as iron starvation was prolonged. Figure 6D shows the increase of NPQ [(Fm − Fm′)/Fm′] values during iron starvation in wild-type and ΔIsiA cells. This increase was faster and more marked in ΔIsiA cells.

We also observed that after 6 to 7 d of iron starvation, differences in Fo values and Fv/Fo or Fv/Fm ratios appeared. First, in both strains at equimolar chlorophyll concentrations, Fo and Fv increased in parallel, and the ratios Fv/Fo and Fv/Fm remained high (even slightly higher than in nonstarved cells) (Figure 6, Table 1), suggesting that the increase of Fo and Fv was due to an increase in the PSII/PSI ratio, in agreement with the 77K fluorescence spectra and the observation that the per cell PSI content decreased faster than PSII content. With prolonged iron starvation, Fv began to decrease while Fo continued to increase, indicating a loss of active PSII (Figure 6, Table 1). In ΔIsiA cells, this process was faster. After 14 d of Fe starvation, Fv was very small, while it was still relatively large in wild-type cells (Figure 6, Table 1). Wild-type cells were still alive after 48 d of iron starvation and had partially recovered the lost Fv, while ΔIsiA cells died after 18 d of iron starvation (see Supplemental Figure 4 online).

In ΔIsiA cells, the large increase of Fo can be explained by a rapid increase of a population of energetically uncoupled phycobilisomes detected in 77K fluorescence spectra. In wild-type cells, the increase of Fo could be related not only to an increase of fluorescence emitted by the uncoupled phycobilisome population but also to fluorescence emitted by IsiA complexes. In wild-type cells, the presence of IsiA protects the cell (previously shown in Park et al., 1999; Sandström et al., 2001; Havaux et al., 2005) from the stress generated by iron starvation (Havaux et al.,

Table 1. Changes in Fluorescence Levels during Iron Starvation in Wild-Type and ΔIsiA Cells

	0 d Wild-Type/ΔIsiA	7 d Wild-Type/ΔIsiA	10 d Wild-Type/ΔIsiA	12 d Wild-Type/ΔIsiA	14 d Wild-Type/ΔIsiA	19 d Wild-Type/ΔIsiA
Fo (% ± 10%)	100/100	100/105	125/160	154/350	180/642	260/–
Fv (% ± 10%)	100/100	100/147	140/187	148/183	120/27	30/–
Fv/Fo (±0.05)	0.78/0.78	0.76/1.1	0.80/0.95	0.74/0.4	0.5/0.035	0.09/–
Fv/Fm (±0.05)	0.44/0.44	0.43/0.50	0.47/0.47	0.43/0.3	0.33/0.03	0.085/–

Each result is the average of four independent iron starvation experiments.

2005; Latifi et al., 2005). Alone, in ΔIsiA cells, the blue light–induced NPQ mechanism seems to be insufficient protection from this specific stress.

When the iron-starved, quenched, wild-type, and ΔIsiA cells were exposed to dim blue-green light in the presence of chloramphenicol, an inhibitor of protein synthesis, they recovered their maximal level of Fm′ (Figure 7). These results confirmed that the blue-green light–induced fluorescence quenching (in both iron-starved strains) was not related to photoinhibition/D1 damage. Similar effects were seen in comparable experiments in wild-type cells grown in the presence of iron (El Bissati et al., 2000; Wilson et al., 2006).

Phycobilisome or Chlorophyll Emission Quenching?

As stated above, a decrease in the fluorescence levels observed in a PAM fluorometer could be a result of (1) a diminution of the phycobilisome emission, (2) a decrease in the chlorophyll antenna emission, or (3) a decrease of energy transfer from the phycobilisomes to PSII. We have already demonstrated that in *Synechocystis* PCC 6803 grown in iron-containing medium, the blue-green light–induced fluorescence decrease observed in the PAM fluorometer is due to the quenching of the phycobilisome fluorescence emission and a concomitant decrease in the energy transfer from the phycobilisomes to the photosystems (Wilson et al., 2006).

Room temperature fluorescence spectra were used to elucidate the origin of the fluorescence quenching in iron-starved cells. When cells iron-starved for 12 d were excited at 600 nm (light principally absorbed by phycobilisomes), the peak at 660 nm (phycobilisome-related) was more pronounced in iron-starved ΔIsiA cells than in iron-starved wild-type cells (Figures 8A and 8B). The large 660-nm fluorescence in ΔIsiA cells is most probably the result of disconnected phycobilisomes (see also Figure 2D). In iron-starved wild-type cells, an increase of the shoulder at 680 nm (chlorophyll related) compared with non-starved cells was observed (see Supplemental Figure 5 online). This was attributed to the presence of IsiA and to energy transfer from the phycobilisomes to IsiA. In iron-starved wild-type and ΔIsiA cells that were illuminated with strong blue-green light for 5 min (quenched cells), a very large decrease of the 660-nm band was observed (Figures 8A and 8B). Figure 8C shows that in wild-type cells iron-starved for an extended period (48 d), the 660-nm fluorescence emission increased and the fluorescence quenching was larger.

When iron-starved wild-type cells were excited at 430 nm (light principally absorbed by chlorophyll), a large band at 680 nm was observed, corresponding to the accumulation of IsiA complexes. This chlorophyll-related band was not decreased after illumination of iron-starved wild-type cells with strong blue light (Figures 8D, 12 d, and 8F, 48 d). In iron-starved ΔIsiA cells, even when the cells were excited at 430 nm, a relatively large emission at 660 nm (a phycobilisome related band) was observed (Figure 8E; see Supplemental Figure 5 online). A decrease of this emission was induced by strong blue-green light illumination. In conclusion, room temperature fluorescence spectra of unquenched and quenched iron-starved wild-type and ΔIsiA cells strongly suggested that under iron starvation conditions the blue-green-induced fluorescence quenching was attributable to a decrease of phycobilisome fluorescence emission and a concomitant decrease in the energy transfer from the phycobilisome to the photosystems and to IsiA (in the wild type).

To elucidate if there was a relationship between the larger NPQ in iron-starved cells relative to nonstarved cells and to the quantity of OCP present, protein gel blot analyses were undertaken. Total cellular proteins or MP proteins were separated by SDS-PAGE, and the OCP was detected by an anti-OCP antibody (Figure 9). The comparison was done on a per chlorophyll basis because all the fluorescence experiments were performed at the same chlorophyll concentration. The antibody reacts with a 35-kD polypeptide absent in the ΔOCP mutant. The immunoreaction was more pronounced in iron-starved cells and their MP fractions than in non-iron-starved cells and their MP fractions (per chlorophyll). Moreover, there was more OCP in ΔIsiA iron-starved cells and MP fractions (per chlorophyll) than in wild-type iron-starved cells and MP fractions (Figure 9).

Mutant Strains Lacking Phycobilisomes or OCP

To further characterize the light-induced NPQ generated under iron starvation conditions, two additional mutants were studied: one lacking phycobilisomes (PAL mutant, Δ*apcAB*, Δ*apcE*, and PC^-) (Ajlani and Vernotte, 1998) and a second lacking the OCP, the protein essential for the induction of the phycobilisome-related NPQ under normal growth conditions (ΔOCP mutant) (Wilson et al., 2006).

In the PAL mutant, the PSII/PSI ratio is higher than in wild-type cells (Ajlani and Vernotte, 1998). This is reflected in the 77K fluorescence emission spectra obtained by 430-nm excitation: the 685- and 695-nm fluorescence emission bands are larger in PAL than in wild-type cells (cf. Figures 10A and 2A). After only 7 d of starvation, an increase of the 685-nm emission was observed; after 10 d of iron starvation, a sharp peak at 685 nm, characteristic of IsiA, dominates the 77K fluorescence spectra (Figure 10A).

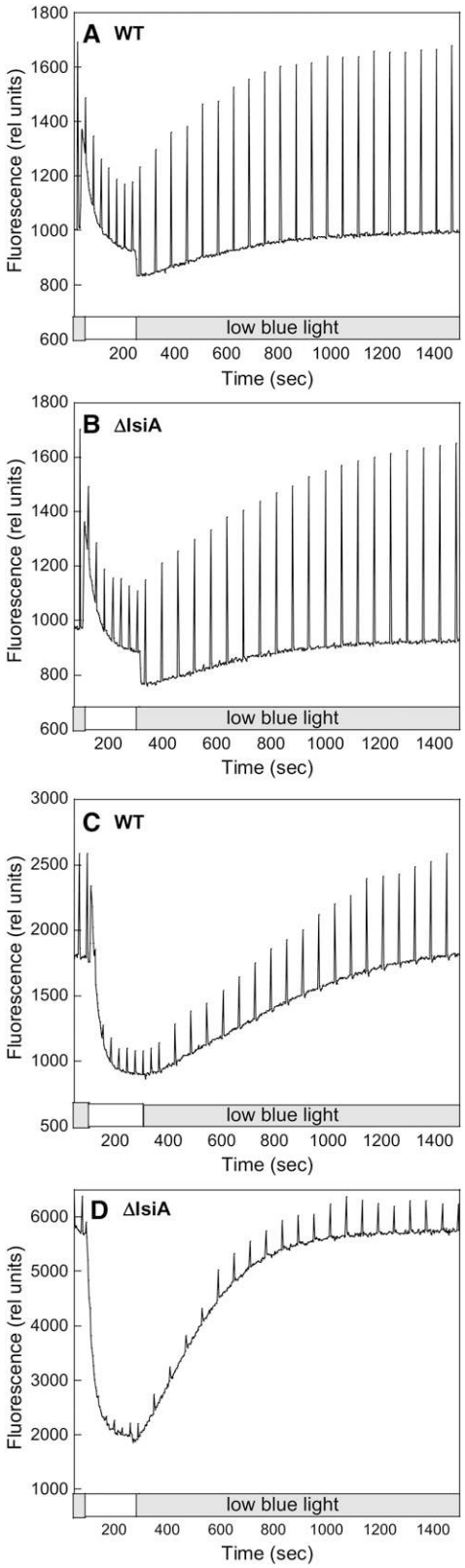


Figure 7. Blue Light–Induced Quenching in Iron-Starved Wild-Type and ΔIsiA Cells Is Reversible without Protein Synthesis.

Measurements of fluorescence yield by a PAM fluorometer in iron-starved wild-type (**[A]** and **[C]**) and ΔIsiA (**[B]** and **[D]**) cells for 7 (**[A]** and **[B]**) and 14 d (**[C]** and **[D]**) at 3 μg chlorophyll/mL illuminated successively with low-intensity blue-green light (400 to 550 nm; 80 μmol photons m^{-2} s^{-1}) and high-intensity blue-green light (740 μmol photons m^{-2} s^{-1}) and then again with dim blue-green light. Chloramphenicol was present during all experiments. The figure shows a representative experiment.

In PAL cells grown in iron-containing medium, high intensities of blue-green light were unable to induce any fluorescence quenching (Wilson et al., 2006; Figure 10B). Figure 10B shows that this is also the case with PAL cells grown under iron starvation conditions. Since OCP is present in the PAL mutant (Figure 9), the lack of fluorescence quenching is due to the lack of phycobilisomes.

As with iron-starved wild-type cells, PAL cells showed changes in chlorophyll content and Fo and Fv values during iron starvation. During the first days of iron starvation, the chlorophyll content decreased to 60% of that of nonstarved cells and then it remained constant. During this time, Fv increased 1.5 times compared with nonstarved PAL cells, suggesting a larger number of active PSII centers on a chlorophyll basis (Figures 10B and 10C). The increase of Fo was higher (2.2 times), suggesting that part of the Fo increase was due to fluorescence emitted by IsiA complexes. As the duration of iron starvation increased, Fo remained almost constant and Fv slowly decreased to a slightly slower value than that in nonstarved cells (Figure 10C). The cells were still alive after 1 month of iron starvation.

The chlorophyll content and the PC/chlorophyll ratio of ΔOCP cells under iron starvation conditions were similar to that of wild-type cells (Figures 1A and 1B). Likewise, Fo and Fv values were similar in wild-type and ΔOCP cells grown in iron-containing medium. However, in general, the Fo level was higher in the wild-type than in ΔOCP iron-starved cells, while the Fv value was larger in ΔOCP than in wild-type cells (Figures 11A and 11B; see Supplemental Figure 4 online).

When the cells were excited at 600 nm, the emission peak at 685 nm was consistently smaller in ΔOCP relative to wild-type cells, suggesting a smaller quantity of uncoupled phycobilisomes in the ΔOCP iron-starved cells (Figure 11E). This was confirmed by comparison of 77K excitation fluorescence spectra of the emission at 685 nm in iron-starved wild-type and iron-starved ΔOCP cells. In iron-starved ΔOCP cells, the spectrum showed higher contributions from chlorophyll *a* (peaks at ~435 nm) and smaller contributions from components at 570, 620 (from PC), and 650 nm (from APC) than in iron-starved wild-type cells (Figure 11F). In iron-starved PAL cells, as expected, the major contribution to the excitation spectrum came from chlorophyll *a* (435 nm) (Figure 11F).

In general, fluorescence emission spectra at 77K using 430-nm excitation showed a larger 685-nm peak, suggesting a larger population of IsiA complexes in ΔOCP than in wild-type cells (Figure 12A). This was confirmed by protein gel blot experiments (Figure 12B). The iron-starved ΔOCP cells contained ~1.4 to 1.6 times more IsiA than iron-starved wild-type cells.

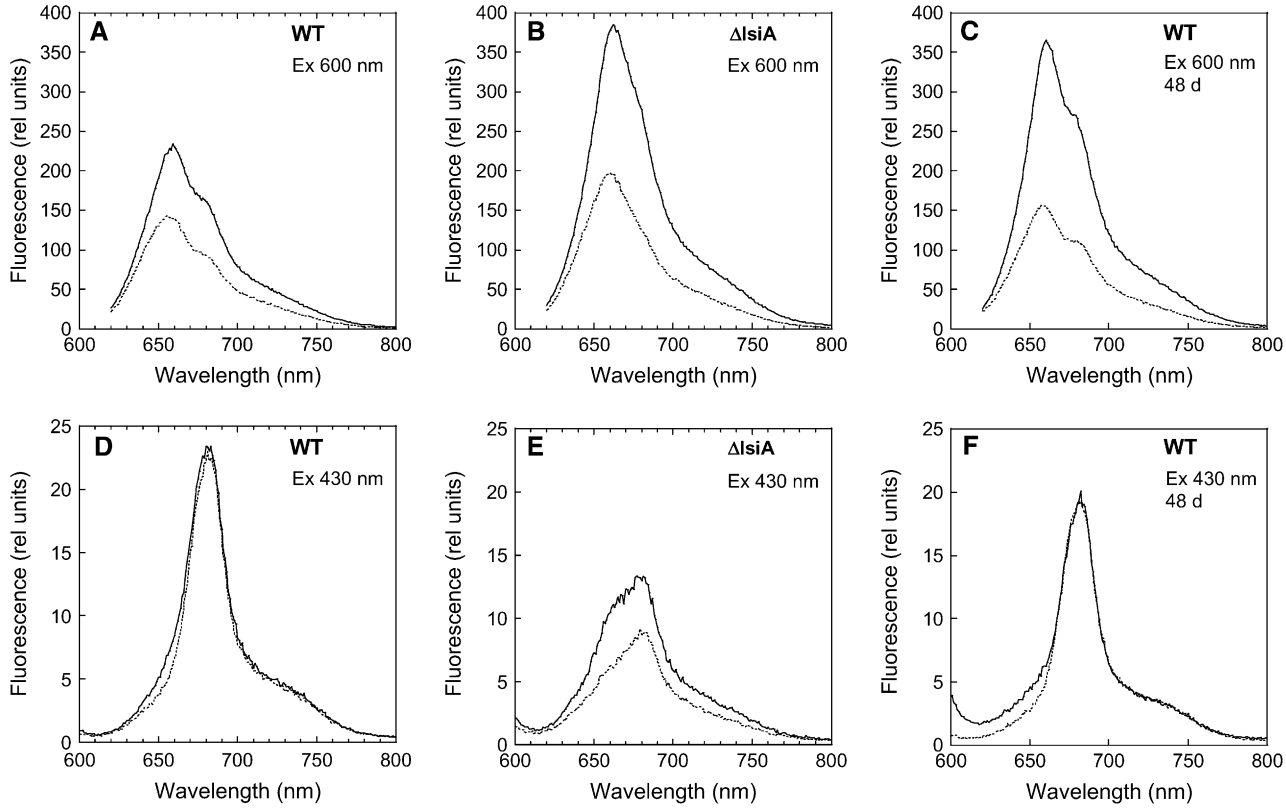


Figure 8. Room Temperature Fluorescence Spectra of Iron-Starved Unquenched and Quenched Cells.

Room temperature fluorescence spectra of dark-adapted (solid line) 12 d iron-starved wild-type cells (**[A]** and **[D]**), 48 d iron-starved wild-type cells (**[C]** and **[F]**), and 12 d iron-starved ΔIsiA cells (**[B]** and **[E]**) and after 5 min of high-intensity blue-green light illumination (740 μmol photons m^{-2} s^{-1}) (dotted line) at 3 μg chlorophyll/mL. Excitation was performed at 600 nm (**[A]** to **[C]**) and at 430 nm (**[D]** to **[F]**).

Figures 11A and 11B show the fluorescence traces in 14 d iron-starved wild-type and ΔOCP cells. In the absence of the OCP, blue-green light did not induce any fluorescence quenching (Figure 11B). Room temperature fluorescence spectra confirmed the absence of blue-green light–induced fluorescence quenching (Figures 11C and 11D). Figure 11D clearly demonstrates that blue light did not induce any quenching of chlorophyll fluorescence, which in the iron-starved ΔOCP cells is principally related to IsiA aggregates. In conclusion, under low light growth conditions, the presence of IsiA was sufficient to protect the ΔOCP cells, despite the absence of the blue light–induced NPQ mechanism.

DISCUSSION

When cyanobacteria grow under iron-limited conditions, the expression of IsiA, encoded by the *isiA* gene (Laudenbach and Straus, 1988), is synthesized in abundance. IsiA, which is a chlorophyll binding protein closely related to CP43, acts as an LHC of PSI under iron-deficient conditions (Bibby et al., 2001; Boekema et al., 2001). On the basis of results with a ΔIsiA of *Synechococcus elongatus* 7942 and a mutant of *Synechococcus elongatus* 7942 overproducing IsiA, a protective function of IsiA against photoinduced damage was suggested with IsiA acting as a dissipator of energy (Park et al., 1999; Sandström et al., 2001). Subsequent experiments using isolated IsiA complexes showed that these complexes are indeed efficient energy dissipators (Ihalainen et al., 2005).

It was proposed that this protection was associated with a strong blue (or white) light-induced NPQ mechanism: strong light could induce conformational changes of IsiA that transform IsiA complexes into energy dissipators (Cadoret et al., 2004) or modify the affinity of IsiA for phycobilisomes (Joshua et al., 2005). Our results clearly demonstrate that IsiA is not involved in a light-induced NPQ mechanism. In iron-starved cells (just as in iron-containing cells), the blue light–induced fluorescence quenching is associated with the phycobilisomes and with the OCP and not with IsiA. In the ΔIsiA mutant, a large reversible fluorescence quenching was always induced by blue light. By contrast, in mutants lacking phycobilisomes (PAL mutant) or OCP (ΔOCP mutant), blue light was unable to induce fluorescence quenching, even after very long periods of iron starvation. In addition, in iron-starved wild-type and ΔIsiA cells, fluorescence emission spectra showed that no chlorophyll-related fluorescence quenching was induced, while a large decrease of the fluorescence emitted by phycobilisomes and of the energy transfer from phycobilisomes to chlorophyll complexes was detected.

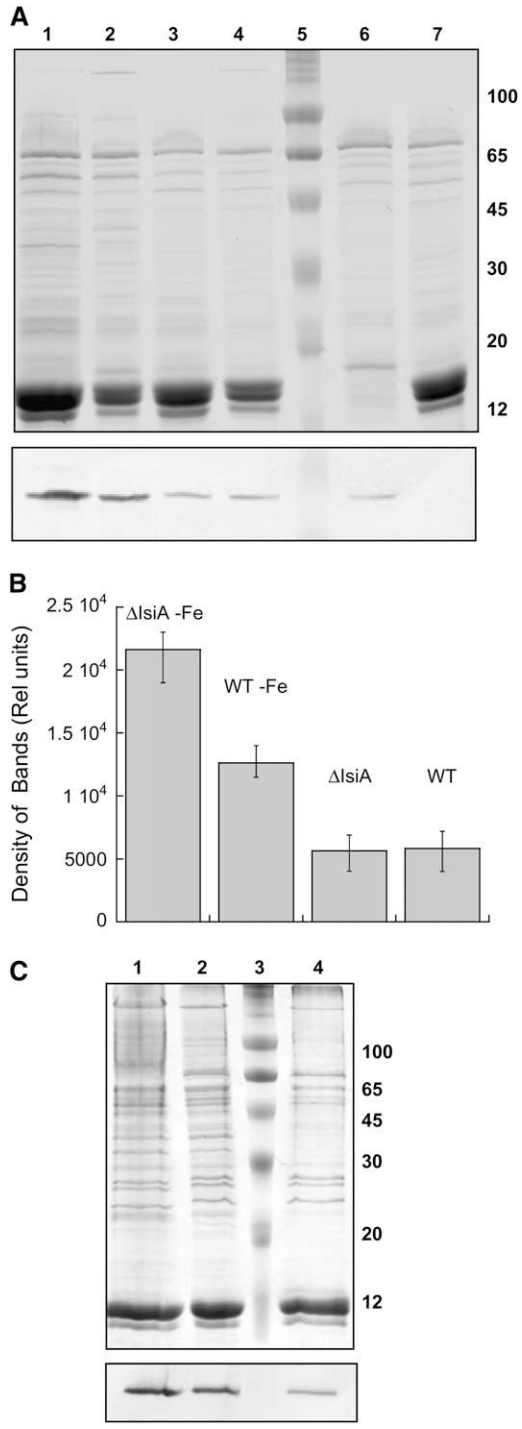


Figure 9. OCP Detection in Whole Cells and MP Fractions from Nonstarved and Starved Wild Type and Mutants.

(A) Coomassie blue–stained gel electrophoresis and immunoblot detection (bottom panel) of OCP in 12 d iron-starved ΔIsiA (lane 1) and wild-type (lane 2) cells and nonstarved ΔIsiA (lane 3), wild-type (lane 4), PAL (lane 6), and ΔOCP (lane 7) cells. Lane 5 shows molecular mass markers. Each lane contained 1.5 μg of chlorophyll.

(B) Comparative densitometry of OCP bands in nonstarved and iron-starved wild-type and ΔIsiA whole cells. The results represent the average of four independent experiments. Error bars show the maximum and minimum density of band values for each point.

(C) Coomassie blue–stained gel electrophoresis and immunoblot detection (bottom panel) of the OCP in MP fractions isolated from 12 d iron-starved ΔIsiA (lane 1) and wild-type (lane 2) cells and nonstarved wild-type cells (lane 4). Lane 3 shows molecular mass markers. Each lane contained 1 μg of chlorophyll.

Blue light–induced quenching was observed in wild-type and ΔIsiA iron-containing cells (El Bissati et al., 2000; Wilson et al., 2006) but was more marked in iron-starved cells (Cadoret et al., 2004; this article). Moreover, during iron starvation, the increase in fluorescence quenching was faster in ΔIsiA cells than in wild-type cells. In iron-starved ΔIsiA cells, a rapid increase of the 685-nm peak in 77K fluorescence emission spectra, of the 660-nm peak in room temperature fluorescence spectra, and of the Fo level indicated a very fast increase of a population of functionally disconnected highly fluorescent phycobilisomes. In wild-type cells, the number of disconnected phycobilisomes also increased, but more slowly than in ΔIsiA cells. Thus, our results clearly reveal a relationship between the increase of fluorescence quenching and the number of functionally disconnected phycobilisomes. Cells containing a higher number of disconnected phycobilisomes showed a higher level of thermal energy dissipation (NPQ), thereby protecting themselves by diminishing the energy arriving at the photosystems and the thylakoids. The increased NPQ is associated with a higher concentration of the OCP: a higher concentration of the OCP was observed in iron-starved cells compared with nonstarved cells. The abundance of OCP is even greater in iron-starved ΔIsiA cells. The transcription of the *slr1963* gene is known to be increased under other stress conditions: high white light illumination (Hihara et al., 2001), UV-B light (I. Vass, personal communication), and saline stress (Fulda et al., 2006). It is possible that other stresses also upregulate the expression of this gene. It may be that the OCP-related NPQ mechanism plays a significant protective role under a range of stress conditions.

In ΔOCP cells under prolonged iron starvation, blue light was unable to induce any fluorescence quenching even in the presence of functionally disconnected phycobilisomes and empty IsiA complexes. Thus, the OCP is essential for the NPQ occurring under iron starvation conditions. Interestingly, in iron-starved ΔOCP cells, the increase in the amount of uncoupled phycobilisomes and the decrease of Fv were slower than in wild-type cells. This appears to be the result of a higher concentration of IsiA. Increased IsiA concentration could be explained by the fact that ΔOCP cells, being more sensitive to light, are permanently under a greater oxidative stress than wild-type cells. It has already been demonstrated that oxidative stress induces *isiA* transcript accumulation (Jeanjean et al., 2003; Yousef et al., 2003). Singh et al. (2005) have shown that ΔIsiA cells were slightly more resistant to the presence of H_2O_2 than wild-type cells. They proposed that this higher resistance is related to the greater transcription induction of a gene cluster, including a gene encoding a peroxiredoxin that is involved in the detoxification of

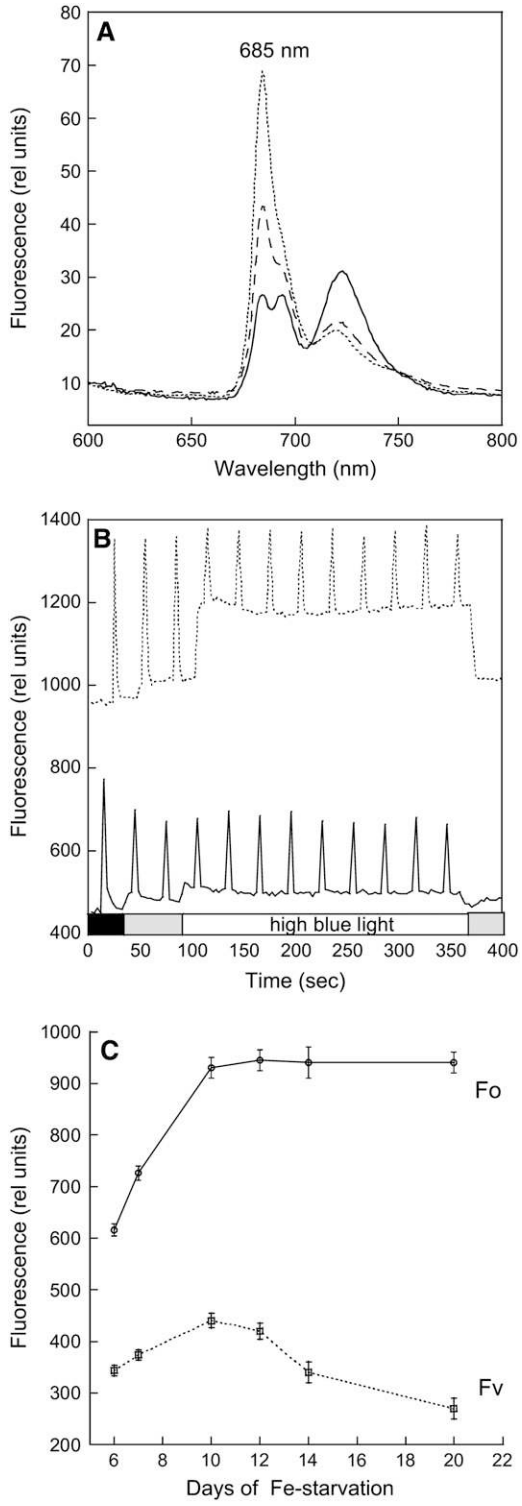


Figure 10. Fluorescence Changes in Iron-Starved PAL Cells.

(A) The 77K fluorescence spectra of iron-containing (solid line) and iron-starved PAL cells for 7 (dashed line) and 10 d (dotted line). The excitation wavelength was 430 nm.

(B) Dark-adapted iron-containing (solid line) and 12 d iron-starved PAL (dotted line) cells were illuminated successively with low-intensity blue-green light (400 to 550 nm; 80 μmol photons m^{-2} s^{-1}) and high-intensity blue-green light (740 μmol photons m^{-2} s^{-1}).

(C) Changes in Fo and Fv in PAL cells during iron starvation. Fluorescence yield changes were detected in a PAM fluorometer. The cells were at 2 μg chlorophyll/mL. The results represent the average of three independent experiments. Error bars show the maximum and minimum chlorophyll/OD_{800} values for each point.

peroxide. Thus, under stress conditions, ΔOCP cells can synthesize not only IsiA but also other proteins (e.g., HLIPs, catalases, and peroxidases) to try to compensate for the lack of the phycobilisome-related NPQ mechanism. This could explain why ΔOCP cells were slightly more resistant to iron starvation than wild-type cells.

By comparing the effect of iron starvation in ΔIsiA cells to that in ΔOCP cells, we conclude that even though the phycobilisome-related NPQ mechanism is an important photoprotective process under high light conditions, under iron starvation (under low light conditions), the IsiA-related mechanism provides more effective protection of the cells. Under low light growth conditions, the phycobilisome-related NPQ mechanism is not induced. We have already shown that this mechanism is only induced by high intensities of blue or white light (Wilson et al., 2006). Thus, even if the capacity of induction of the phycobilisome-related NPQ mechanism is increased during iron starvation, this will not protect the cells from the iron starvation stress. However, in the iron-starved cells that are more sensitive to photoinhibition, the synthesis of OCP and the capacity of quenching are increased, providing greater photoprotective capacity under high light.

The blue light–induced fluorescence quenching is clearly not associated with the binding of free phycobilisomes to IsiA or to conformational changes in the IsiA protein that might cause the protein to become a more efficient thermal energy dissipator. Since the absence of IsiA renders *Synechocystis* cells more sensitive to the stress generated by iron starvation and high light (Park et al., 1999; Havaux et al., 2005; Latifi et al., 2005; this article) but does not inhibit the NPQ process, IsiA protects the cells via other mechanism(s). Combining our observations with results presented in the literature, we posit that during the first days of iron starvation, IsiA protects the cells by acting as the LHC of PSI, increasing the cross section of the PSI antenna (Andrizhiyevskaya et al., 2002; Melkozernov et al., 2003). In this way, a higher activity of PSI is maintained and a balance between PSII and PSI activities, decreasing the excitation pressure on PSII and, hence, the oxidative stress. During prolonged iron starvation, empty IsiA complexes may receive the energy coming from phycobilisomes and convert it into heat, thereby decreasing the energy arriving at the PSII reactions centers and at the thylakoids. Isolated IsiA aggregates, which accumulate upon chronic iron starvation, show very short fluorescence lifetimes, indicating that they are good energy dissipators (Ihalainen et al., 2005).

We observed that the increase of the population of highly fluorescent phycobilisomes was inversely proportional to the concentration of empty IsiA complexes (very high in ΔIsiA cells and

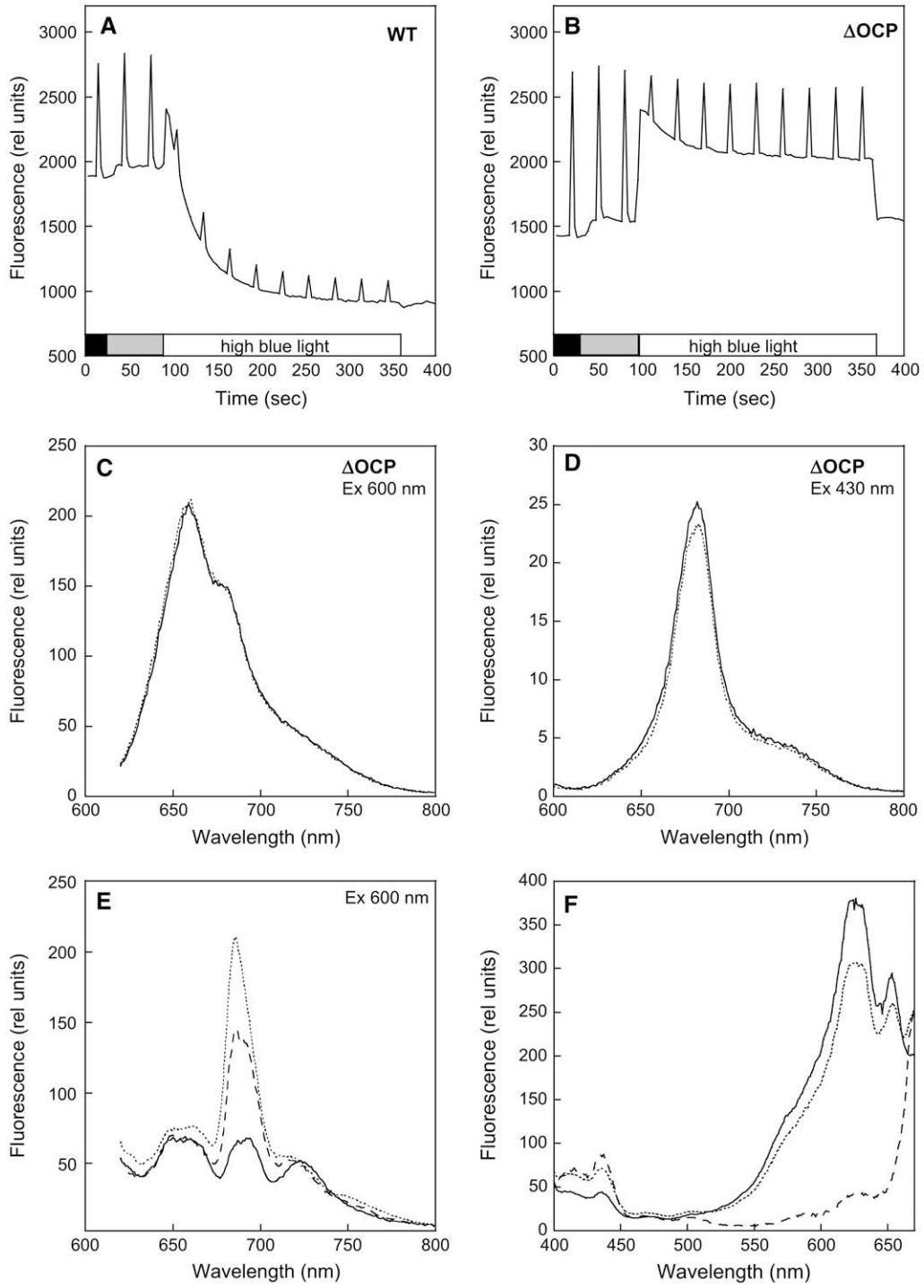


Figure 11. No Blue Light–Induced NPQ in Iron-Stressed ΔOCP Cells.

(A) and **(B)** Fluorescence changes in iron-starved ΔOCP cells. Dark-adapted 14 d iron-starved wild-type **(A)** and ΔOCP **(B)** cells were illuminated successively with low-intensity blue-green light (400 to 550 nm; 80 μmol photons m^{-2} s^{-1}) and high-intensity blue-green light (740 μmol photons m^{-2} s^{-1}). Fluorescence yield changes were detected in a PAM fluorometer. The cells were at 3 μg chlorophyll/mL.

(C) and **(D)** Room temperature fluorescence spectra of ΔOCP cells adapted to low light intensities of blue-green light (solid line) and after 5 min of high intensities of blue-green light illumination (dotted line). Excitation was done at 600 nm **(C)** and at 430 nm **(D)**.

(E) The 77K fluorescence emission spectra of iron-containing (solid line), 14 d iron-starved (dotted line) wild-type cells, and 14 d iron-starved ΔOCP cells (dashed line). Excitation was done at 600 nm.

(F) The 77K fluorescence excitation spectra of 14 d iron-starved wild-type (solid line) and ΔOCP (dotted line) and PAL cells (dashed line). Emission was monitored at 685 nm. The cells were at 3 μg chlorophyll/mL.

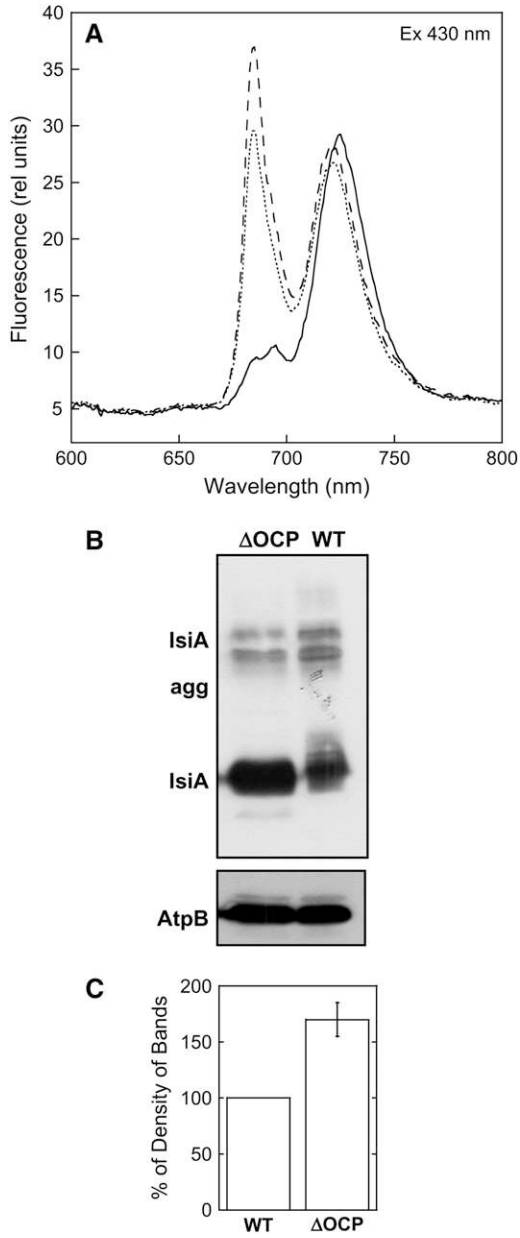


Figure 12. IsiA Presence in Iron-Starved ΔOCP Cells.

(A) The 77K fluorescence emission spectra of iron-containing (solid line) and 14 d iron-starved (dotted line) wild-type cells and of 14 d iron-starved ΔOCP cells (dashed line). Excitation was done at 430 nm. The cells were at 3 μg chlorophyll/mL.

(B) Immunoblot detection of IsiA of the membrane fraction isolated from 13 d iron-starved ΔOCP (lane 1) and wild-type (lane 2) cells. An antibody against the subunit AtpB of the ATP synthase was used as internal standard (bottom panel). Each sample contained 2 μg of chlorophyll.

(C) Comparative densitometry of IsiA levels in iron-starved wild-type and ΔOCP thylakoids. The results represent the average of three independent experiments. Each error bar shows the maximum and minimum density of band values for each point.

lower in wild-type cells), suggesting that, indeed, the phycobilisomes transferred the absorbed energy to the IsiA complexes. This was supported by the fluorescence emission and excitation spectra of wild-type cells. The peak at 685 nm observed in fluorescence emission spectra (77K) with excitation at 600 nm was largely related to IsiA emission, indicating energy transfer from phycobilisomes to IsiA. Park et al. (1999) and Sandström et al. (2001) have already reported that the PSII antenna size was inversely proportional to the concentration of IsiA: the more IsiA present, the smaller the antenna size. Thus, IsiA complexes could protect PSII by competing for the energy coming from the phycobilisomes, diminishing the effective antenna size.

We suggest that the energy absorbed by the phycobilisomes that is not used for photochemistry could also be responsible for oxidative damage (e.g., by peroxidation of lipids). For example, Havaux et al. (2005) have already demonstrated that in ΔIsiA mutants, there is more lipid peroxidation and higher concentrations of reactive oxygen species are produced than in wild-type cells. This can be caused by a higher production of oxygen radicals in the chlorophyll antenna but also by production of carbon-centered radicals in other proteins of the membrane that by reacting with oxygen will make peroxyl radicals. Our results demonstrate that a mutant lacking phycobilisomes (PAL) seemed to be less affected by iron starvation conditions. In PAL cells, IsiA was accumulated and the PSII/PSI ratio increased, indicating a faster degradation of PSI complexes relative to PSII. However, a high concentration of active PSII complexes remained after a long period of iron starvation. These results support the idea that the presence of functionally disconnected phycobilisomes is deleterious to the cell.

Conclusions

The recently described light-induced photoprotective phycobilisome OCP–mediated NPQ mechanism also occurs under iron starvation conditions, where it is solely responsible for the light-induced fluorescence quenching observed in iron-starved cyanobacteria. In our working model for this process, blue-green light absorbed by the carotenoid of the OCP induces changes in the carotenoid and/or the protein that facilitates the interaction between the OCP and the phycobilisome core and renders the OCP capable of absorbing the energy arriving from the phycobilisomes and dissipates it as heat. Under iron starvation conditions, conditions in which the phycobilisomes become disconnected from the photosystems, energy dissipation in phycobilisomes increases (increased NPQ) to better protect the cells by diminishing the energy arriving to the thylakoids.

The empty IsiA complexes that accumulate during iron starvation could be responsible for a permanent form of thermal energy dissipation. However, this IsiA-based mechanism is not modulated by light. Ihalainen et al. (2005) have shown that the quenched state of the IsiA complexes was independent of the quality or intensity of light, at least in vitro. Under our experimental conditions, cells lacking IsiA were more sensitive to iron starvation than cells unable to activate blue light–induced NPQ. Thus, under iron starvation and low light conditions, IsiA complexes provide better protection than the phycobilisome OCP–related NPQ mechanism. The absence of IsiA and HLIPs, like the

absence of the OCP, renders *Synechocystis* PCC 6803 cells more sensitive to high light intensities. In wild-type cells, IsiA and HLIPs are present only under prolonged high light conditions, whereas the OCP is always present, suggesting that the IsiA- and HLIP-related mechanisms appear when the OCP-related NPQ mechanism is insufficient to protect the cell. A comparative study of the role and effectiveness in photoprotection of these proteins under high light conditions will increase our understanding of the different NPQ mechanisms existing in cyanobacteria.

METHODS

Culture Conditions

Wild-type and mutant *Synechocystis* PCC 6803 cells were grown photoautotrophically in a modified BG11 medium described by Herdman et al. (1973) containing twice the concentration of sodium nitrate. Cells were shaken in a rotary shaker (120 rpm) at 30°C and illuminated by fluorescent white lamps giving a total intensity of ~30 to 40 μmol photons m^{-2} s^{-1} under a CO_2-enriched atmosphere. The ΔOCP, ΔIsiA, and PAL mutants were grown in the presence of 25 μg/mL spectinomycin and 10 μg/mL streptinomycin. The cells were maintained in the logarithmic phase of growth and were collected at $OD_{800} = 0.6$ to 0.8. The construction of the ΔOCP and ΔIsiA mutants in which the *slr1963* gene and the *isiA* gene are interrupted by a spectinomycin/streptinomycin resistance cassette was described by Wilson et al. (2006). Construction of the PAL mutant, lacking PC, APC, and the phycobilisome linker protein Lcm, was described by Ajlani and Vernotte (1998).

Iron Starvation

Wild-type and mutant *Synechocystis* PCC 6803 cells were collected at the logarithmic phase of growth, precipitated, resuspended ($OD_{800} = 0.6$) in modified BG11 medium (Herdman et al., 1973) lacking Fe, and grown under low light (30 to 40 μmol photons m^{-2} s^{-1}). During the first week, the cells were diluted each day to maintain the same cell concentration (OD_{800} ranging from 0.6 in the morning to 1.2 to 0.9 the next morning). When the chlorophyll concentration per cell decreased, the cells were diluted once every 2 d, then once every 3 d, and finally undiluted. The PAL mutant was diluted only every 3 d consistently. When the cell concentration was maintained at less than $OD_{800} = 0.5$, the phenotype of protractedly iron-starved cells was reached faster (in 6 to 7 d) (data not shown). This facilitated study of the different stages of iron starvation.

Fluorescence Measurements

The yield of chlorophyll fluorescence was monitored in a modulated fluorometer (PAM; Walz) adapted to a Hansatech oxygen electrode as previously described (El Bissati et al., 2000). All NPQ induction and recovery experiments were performed in a stirred cuvette of 1 cm diameter (32°C) at a chlorophyll concentration of 3 μg chlorophyll/mL (with the exception of the PAL mutant, 2 μg chlorophyll/mL) and in the presence of chloramphenicol (30 μg/mL) to inhibit protein synthesis. Recovery was realized under 50 to 80 μmol photons m^{-2} s^{-1} of blue-green light. Fluorescence quenching was induced by a blue-green light (400 to 550 nm) at 740 μmol photons m^{-2} s^{-1} of light intensity. Nomenclature used is as follows: Fo, minimal fluorescence level, the fluorescence emitted by open reaction centers in dark-adapted cells; Fm, the maximal fluorescence level in samples adapted to dim blue-green light; Fm′, maximum fluorescence under strong blue-green illumination, corresponding to the fluorescence emitted by the maximum concentration of closed reaction centers; and Fs, the steady state fluorescence level. The Fo level was determined by illuminating dark-adapted cells with a low intensity of red-modulated light (pulses of 1 μs, 1.6 kHZ, and 0.024 μmol photons m^{-2} s^{-1}). For PAL measurements, the measuring light was 2.5 times more intense. Saturating pulses (2000 μmol photons m^{-2} s^{-1}, 1 s) were applied to measure Fm and Fm′ levels. Application of such pulses that transiently close all the PSII centers serves to distinguish between photochemical quenching (*q*p) and NPQ.

Fluorescence emission and excitation spectra at room temperature and at 77K were done in a CARY Eclipse fluorescence spectrophotometer fluorometer (Varian). All samples were at a concentration of 2 to 3 μg chlorophyll/mL. For 77K spectra, samples in nuclear magnetic resonance tubes (5-mm ratio) were quickly frozen by immersion in a mixture of ice, CO_2, and ethanol and then in liquid nitrogen.

MP, MP-Free, and Phycobilisome Preparations

Cells (at a 1 mg chlorophyll/mL concentration) were resuspended in a 0.7 M K-phosphate/0.3 M Na-citrate, pH 6.8, buffer to obtain MP or in a 20 mM MES, pH 6.8, buffer to obtain MP-free (M) and broken in a mini-bead-beater in the presence of glass beads. The M and MP fractions were collected by centrifugation and frozen at –80°C until used for gel electrophoresis. For fluorescence spectra, the MP fraction was immediately used without freezing. The PC/chlorophyll absorption ratio was similar in MP fractions and in whole cells.

Entire phycobilisomes were isolated as described by Ajlani et al. (1995). Cells were broken in a buffer containing 0.75 M K-phosphate, pH 7.5, and treated with Triton 2% during 1 h. The nonsolubilized material was separated by centrifugation, and the supernatant was applied to a sucrose gradient and centrifuged. The blue band (in the interface between 1.5 M sucrose and 0.75 M sucrose) contained intact phycobilisomes used in fluorescence spectra.

Gel Electrophoresis and Protein Gel Blot Analysis

Total cell protein and MP and M fractions were analyzed by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide/2 M urea (Figures 9A and 12B) or on a 12% polyacrilamide/6M urea (Figures 3 and 9C) in a TRIS/MES system (Kashino et al., 2001). The IsiA protein was detected by a polyclonal antibody against the IsiA protein (Dühring et al., 2006), and the OCP protein was detected by a polyclonal antibody against OCP. Anti-OCP polyclonal rabbit antisera was made (CoVance) using recombinant *Synechocystis* PCC6803 OCP (1.4 mg/mL in 20 mM Tris, pH 8.0, and 30% sucrose). Anti-OCP was purified from the sera using Affi-Gel 15 (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions. Binding of OCP antibody was monitored by an alkaline phosphatase colorimetric reaction. The blots were scanned and the density of bands was measured using the Image Mastertotal Lab v1.11 software (Amersham Pharmacia). Binding of IsiA, CP47, and ATPase antibodies was visualized with a goat anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate and SuperSignal West Pico as chemiluminescent substrate (Pierce).

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under accession numbers NP_441508 (*slr1963*) and NP_441268 (*isiA*; *sll0247*).

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure 1. The 77K Emission Fluorescence Spectra of Iron-Starved ΔIsiA Cells and Isolated Phycobilisomes.

Supplemental Figure 2. The 77K Emission and Excitation Fluorescence Spectra of Nonstarved Wild-Type Cells, the MP Fraction, and Isolated Phycobilisomes.

Supplemental Figure 3. Absorption Spectra of Wild-Type and ΔIsiA Cells and MP Fractions Corresponding to the Samples Used in Figure 5.

Supplemental Figure 4. Blue-Green Light–Induced Fluorescence Quenching in Long-Term, Iron-Starved, Wild-Type, ΔOCP, and ΔIsiA Cells.

Supplemental Figure 5. Comparison of Room Temperature Fluorescence Spectra of Nonstarved and Iron-Starved Wild-Type and ΔIsiA Cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ghada Ajlani for the PAL mutant and Shiho Tanaka for assistance in the preparation of the anti-OCP antibody. We also thank A. William Rutherford for stimulating discussions and critical reading of this manuscript and Anja Liszkay-Krieger for her critical reading of the manuscript. The research was partially supported by European Union network INTRO2.

Received June 27, 2006; revised January 5, 2007; accepted January 26, 2007; published February 16, 2007.

REFERENCES

Adamska, I. (1997). Elips: Light-induced stress proteins. Physiol. Plant **100:** 794–805.

Adamska, I. (2001). The Elip family of stress proteins in the thylakoids membranes of pro- and eukaryota. In Advances in Photosynthesis and Respiration-Regulation of Photosynthesis, Vol. 11, E.M. Aro and B. Andersson, eds (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp. 487–505.

Adir, N. (2005). Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: Reconstructing a giant. Photosynth. Res. **85:** 15–32.

Ajlani, G., and Vernotte, C. (1998). Construction and characterization of a phycobiliprotein-less mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Plant Mol. Biol. **37:** 577–580.

Ajlani, G., Vernotte, C., DiMagno, L., and Haselkorn, R. (1995). Phycobilisome core mutants of *Synechocystis* PCC 6803. Biochim. Biophys. Acta **1231:** 189–196.

Andrizhiyevskaya, E.G., Schwabe, T.M., Germano, M., D'Haene, S., Kruip, J., van Grondelle, R., and Dekker, J.P. (2002). Spectroscopic properties of PSI-IsiA supercomplexes of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. Biochim. Biophys. Acta **1556:** 265–272.

Bailey, S., Mann, N., Robinson, C., and Scanlan, D.J. (2005). The occurrence of rapidly reversible non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence in cyanobacteria. FEBS Lett. **579:** 275–280.

Bibby, T.S., Nield, J., and Barber, J. (2001). Iron deficiency induces the formation of an antenna ring around trimeric Photosystem I in cyanobacteria. Nature **412:** 743–745.

Boekema, E.J., Hifney, A., Yakushevska, A.E., Piotrowski, M., Keegstra, W., Berry, S., Michel, K.P., Pistorius, E.K., and Kruip, J. (2001). A giant chlorophyll-protein complex induced by iron-deficiency in cyanobacteria. Nature **412:** 745–748.

Burnap, R., Troyan, T., and Sherman, L. (1993). The highly abundant chlorophyll-protein of iron-deficient *Synechococcus* sp PCC 7942 (CP43') is encoded by the *isiA* gene. Plant Physiol. **103:** 893–902.

Cadoret, J.-C., Demoulière, R., Lavaud, J., van Gorkom, H., Houmard, J., and Etienne, A.-L. (2004). Dissipation of excess energy triggered by blue light in cyanobacteria with CP43' (*isiA*). Biochim. Biophys. Acta **1659:** 100–104.

Campbell, D., Hurry, V., Clarke, A., Gustafsson, P., and Öquist, G. (1998). Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62:** 667–683.

Demmig-Adams, B. (1990). Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. Biochim. Biophys. Acta **1020:** 1–24.

Dolganov, N.A., Bhaya, D., and Grossman, A.R. (1995). Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll a/b-binding proteins of higher plants: Evolution and regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92:** 636–640.

Dühring, U., Axmann, I., Hess, W., and Wilde, A. (2006). An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isiA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103:** 7054–7058.

El Bissati, K., Delphin, E., Murata, N., Etienne, A.-L., and Kirilovsky, D. (2000). Photosystem II fluorescence quenching in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: Involvement of two different mechanisms. Biochim. Biophys. Acta **1457:** 229–242.

El Bissati, K., and Kirilovsky, D. (2001). Regulation of *psbA* and *psaE* expression by light quality in *Synechocystis* species PCC 6803. A redox control mechanism. Plant Physiol. **125:** 1988–2000.

Falk, S., Samson, G., Bruce, D., Huner, N.P.A., and Laudenbach, D.E. (1995). Functional analysis of the iron-stress induced CP43' polypeptide of PSII in the cyanobacterium *Synechococcus sp*. PC 7942. Photosynth. Res. **45:** 51–60.

Fulda, S., Mikkat, S., Huang, F., Huckauf, J., Marin, K., Norling, B., and Hagemann, M. (2006). Proteome analysis of salt stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Proteomics **6:** 2733–2745.

Funk, C., and Vermaas, W. (1999). A cyanobacterial gene family coding for single helix proteins resembling part of the light-harvesting proteins from higher plants. Biochemistry **38:** 9397–9404.

Gilmore, A., and Yamamoto, H. (1993). Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explains zeaxanthin-independent quenching. Photosynth. Res. **35:** 67–68.

Guikema, J.A., and Sherman, L.A. (1983). Organization and function of chlorophyll in membranes of cyanobacteria during iron starvation. Plant Physiol. **73:** 250–256.

Havaux, M., Guedeney, G., Hagemann, M., Yeremenko, N., Matthijs, H., and Jeanjean, R. (2005). The chlorophyll-binding protein IsiA is inducible by high light and protects the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 from photooxidative stress. FEBS Lett. **579:** 2289–2293.

Havaux, M., Guedeney, G., He, Q., and Grossman, A. (2003). Elimination of high-light-inducible polypeptides related to eukaryotic chlorophyll *a*/*b*-binding proteins results in aberrant photoacclimation in *Synechocystis* PCC6803. Biochim. Biophys. Acta **1557:** 21–33.

He, Q., Dolganov, N., Björkman, O., and Grossman, A.R. (2001). The high light-inducible polypeptides in *Synechocystis* PCC 6803. Expression and function in high light. J. Biol. Chem. **276:** 306–314.

Herdman, M., Delaney, S.F., and Carr, N.G. (1973). A new medium for the isolation and growth of auxotrophic mutants of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. J. Gen. Microbiol. **79:** 233–237.

Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A., and Ikeuchi, M. (2001). DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. Plant Cell **13:** 793–806.

Holt, T.K., and Krogmann, D.W. (1981). A carotenoid protein from cyanobacteria. Biochim. Biophys. Acta **637:** 408–414.

Horton, P., Ruban, A.V., and Walters, R.G. (1996). Regulation of light harvesting in green plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **47:** 655–684.

Ihalainen, J., D'Haene, S., Yeremenko, N., van Roon, H., Arteni, A., Boekema, E., van Grondelle, R., Matthijs, H., and Dekker, J. (2005). Aggregates of the chlorophyll-binding protein IsiA (CP43') dissipate energy in cyanobacteria. Biochemistry **44:** 10846–10853.

Ivanov, A.G., Park, Y.-I., Miskiewicz, E., Raven, J.A., Huner, N.P.A., and Öquist, G. (2000). Iron stress restricts photosynthetic intersystem electron transport in *Synechococcus* sp PCC 7942. FEBS Lett. **485:** 173–177.

Jeanjean, R., Zuther, E., Yeremenko, N., Havaux, M., Matthijs, H., and Hagemann, M. (2003). A photosystem I psaFJ-null mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 expresses the *isiAB* operon under iron replete conditions. FEBS Lett. **549:** 52–56.

Joshua, S., Bailey, S., Mann, N., and Mullineaux, C. (2005). Involvement of phycobilisome diffusion in energy quenching in cyanobacteria. Plant Physiol. **138:** 1577–1585.

Kashino, Y., Koike, K., and Satoh, K. (2001). An improved SDS-PAGE system for the analysis of membrane protein complexes. Electrophoresis **22:** 1004–1007.

Kerfeld, C.A. (2004a). Structure and function of the water-soluble carotenoid-binding proteins in cyanobacteria. Photosynth. Res. **81:** 215–225.

Kerfeld, C.A. (2004b). Water-soluble carotenoid proteins of cyanobacteria. Arch. Biochem. Biophys. **430:** 2–9.

Latifi, A., Jeanjean, R., Lemeille, S., Havaux, M., and Zhang, C.-C. (2005). Iron starvation leads to oxidative stress in *Anabaena* sp strain PCC 7120. J. Bacteriol. **187:** 6596–6598.

Laudenbach, D., and Straus, N. (1988). Characterization of a cyanobacterial iron stress-induced gene similar to *psbC*. J. Bacteriol. **170:** 5018–5026.

Li, X.-P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S., and Niyogi, K.K. (2000). A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. Nature **403:** 391–395.

Li, X.-P., Gilmore, A.M., Caffarri, S., Bassi, R., Golan, T., Kramer, D., and Niyogi, K.K. (2004). Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. J. Biol. Chem. **279:** 22866–22874.

MacColl, R. (1998). Cyanobacterial phycobilisomes. J. Struct. Biol. **124:** 311–334.

Melkozernov, A.N., Bibby, T.S., Lin, S., Barber, J., and Blankenship, R.E. (2003). Time-resolved absorption and emission show that the CP43' antenna ring of iron-stressed *Synechocystis sp* PCC 6803 is efficiently coupled to the photosystem I reaction center core. Biochemistry **42:** 3893–3903.

Müller, P., Li, X.-P., and Niyogi, K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. Plant Physiol. **125:** 1558–1566.

Mullineaux, C.K. (1992). Excitation energy transfer from phycobilisomes to Photosystem I in a cyanobacterium. Biochim. Biophys. Acta **1100:** 285–292.

Niyogi, K. (1999). Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **50:** 333–359.

Odom, W.R., Hodges, R., Chitnis, P.R., and Guikema, J.A. (1993). Characterization of *Synechocystis* sp PCC 6803, in iron-supplied and iron deficient media. Plant Mol. Biol. **23:** 1255–1264.

Öquist, G. (1971). Changes in pigment composition and photosynthesis induced by iron-deficiency in the blue-green alga *Anacystis nidulans*. Physiol. Plant **25:** 188–191.

Öquist, G. (1974a). Iron deficiency in the blue-green alga *Anacystis nidulans*: Changes in pigmentation and photosynthesis. Physiol. Plant **30:** 30–37.

Öquist, G. (1974b). Iron deficiency in the blue-green alga *Anacystis nidulans*: Fluorescence and absorption spectra recorded at 77K. Physiol. Plant **31:** 55–58.

Park, Y., Sandström, P., Gustafsson, P., and Öquist, G. (1999). Expression of the *isiA* gene is essential for the survival of the cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC 7942 by protecting photosystem II from excess light under iron limitation. Mol. Microbiol. **32:** 123–129.

Pascal, A., Liu, Z., Broess, K., van Oort, B., van Amerongen, H., Wang, C., Horton, P., Robert, B., Chang, W., and Ruban, A. (2005). Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light harvesting. Nature **436:** 134–137.

Rakhimberdieva, M., Boichenko, V.A., Karapetyan, N., and Stadnichuk, I. (2001). Interaction of phycobilisomes with Photosystem II dimers and Photosystem I monomers and trimers in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. Biochemistry **40:** 15780–15788.

Rakhimberdieva, M., Stadnichuk, I., Elanskaya, I., and Karapetyan, N. (2004). Carotenoid-induced quenching of the phycobilisome fluorescence in photosystem II-deficient mutant of *Synechocystis* sp. FEBS Lett. **574:** 85–88.

Ruban, A.V., Ress, D., Pascal, A.A., and Horton, P. (1992). Mechanism of ΔpH-dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membranes. II. The relationship between LHCII aggregation and QE in isolated thylakoids. Biochim. Biophys. Acta **1102:** 39–44.

Sandmann, G. (1985). Consequences of iron deficiency on photosynthetic and respiratory electron transport in blue-green algae. Photosynth. Res. **6:** 261–271.

Sandström, S., Park, Y., Öquist, G., and Gustafsson, P. (2001). CP43' the *isiA* gene product, functions as an excitation energy dissipator in the cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC 7942. Photochem. Photobiol. **74:** 431–437.

Scott, M., McCollum, S., Vasil'ev, C., Crozier, C., Espie, G., Krol, M., Huner, N., and Bruce, D. (2006). Mechanism of the down regulation of photosynthesis by blue light in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. Biochemistry **45:** 8952–8958.

Sherman, D.M., and Sherman, L.A. (1983). Effect of iron deficiency and iron restoration on ultrastucture of *Anacystis nidulans*. J. Bacteriol. **156:** 393–401.

Siefermann-Harms, D. (1988). Fluorescence properties of isolated chlorophyll-protein complexes. In Application of Chlorophyll Fluorescence, H.K. Lichtenthaler, ed (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp. 45–54.

Singh, A., Li, H., Bono, L., and Sherman, L. (2005). Novel adaptative responses revealed by transcription profiling of a *Synechocystis* sp PCC 6803 ΔisiA mutant in the presence and absence of hydrogen peroxide. Photosynth. Res. **84:** 65–70.

Spiller, S., and Terry, N. (1980). Limiting factors in photosynthesis. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. Plant Physiol. **65:** 121–125.

Van Dorssen, R.J., Plijter, J.J., Decker, J., den Ouden, A., Amesz, J., and van Gorkom, H.J. (1987). Spectroscopic properties of chloroplast grana membranes and of the core of photosystem II. Biochim. Biophys. Acta **890:** 134–143.

Wilson, A., Ajlani, G., Verbavatz, J.-M., Vass, I., Kerfeld, C., and Kirilovsky, D. (2006). A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria. Plant Cell **18:** 992–1007.

Wu, Y.P., and Krogmann, D.W. (1997). The orange carotenoid protein of *Synechocystis* PCC 6803. Biochim. Biophys. Acta **1322:** 1–7.

Yamamoto, H. (1979). Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. Pure Appl. Chem. **51:** 639–648.

Yeremenko, N., Kouril, R., Ihalainem, J., D'Haene, S., van Oosterwijk, N., Andrizhiyevkaya, E., Keegstra, W., Dekker, H., Hagemann, M., Boekema, E., Matthijs, H., and Dekker, J. (2004). Supramolecular organization and dual function of the IsiA chlorophyll-binding protein in cyanobacteria. Biochemistry **43:** 10308–10313.

Yousef, N., Pistorius, E.K., and Michel, K.-P. (2003). Comparative analysis of *idiA* and *isiA* transcription under iron starvation and oxidative stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 wild-type and selected mutants. Arch. Microbiol. **180:** 471–483.

CHAPTER TWO

Orange carotenoid protein (OCP) related NPQ in *Synechocystis* PCC 6803 OCP-phycobilisomes interactions

Clémence Boulay, Adjélé Wilson, and Diana Kirilovsky

Abstract The Orange-carotenoid-protein (OCP) is essential for a photoprotective non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) mechanism in cyanobacteria. This mechanism decreases the energy arriving from the phycobilisomes (PBS), at the reaction centres of Photosystem II under strong illumination. Studies were performed to elucidate the interactions between the OCP and the phycobilisomes. We first determined that OCP did not co-isolate with phycobilisomes. Then, purified OCP was incubated with whole phycobilisomes from the WT or from a mutant lacking phycocyanin. The phycobilisomes were also dissociated and then reconstructed in the presence of OCP. In both cases, the OCP co-migrates with the phycobilisomes in a sucrose gradient suggesting a relationship between the OCP and the PBS. The OCP-PBS fractions presented a lower fluorescence level than the PBS fractions without OCP.

iBiTecS, URA2096, CNRS, CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France

J.F. Allen, E. Gantt, J.H. Golbeck & B. Osmond (eds.), *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis,* 1003–1006. © 2008 *Springer.*

Keywords Cyanobacteria, non-photochemical-quenching, phycobilisomes, orange-carotenoid-protein, *Synechocystis* PCC 6803

Introduction

A blue light induced non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) mechanism has been first described to occur in cyanobacteria in 2000 (El Bissati et al. 2000). This mechanism converts into heat the excess energy absorbed by the cyanobacterial light harvesting pigment/protein complexes, the stromal projecting antennae: the phycobilisomes. They are composed in *Synechocystis* PCC 6803 of a core from which six rods radiate. The major core protein is allophycocyanin, whereas the rods contain phycocyanin (Glazer 1989).

We have recently demonstrated that the orange carotenoid protein (OCP) is specifically involved in this phycobilisome (PBS) associated blue-light induced NPQ in *Synechocystis* PCC 6803 cells grown under Fe-replete or Fe-starvation conditions (Wilson et al. 2006, 2007). OCP is a soluble 35 kDa protein which binds non-covalently a carotenoid (3′-hydroxyechinenone) (Kerfeld 2004).

Allen_Sec15_Ch02.indd 1003 1/18/2008 8:25:31 PM

Almost all the OCP is present in the membrane-phycobilisome fraction and OCP is mainly associated to the stromal side (phycobilisomes side) of the thylakoids (Wilson et al. 2006). A direct interaction between OCP and the phycobilisomes has not yet been shown and the exact role of OCP remains to be elucidated. We performed here studies on the interaction between the OCP and the phycobilisomes purified from wild type (WT) and from the CK mutant which lacks phycocyanin (Thomas et al. 2006). In the CK mutant, the phycobilisome only contains the allophycocyanin containing three cylindrical core.

Materials and methods

OCP purification. OCP was purified from a mutant containing His-tagged OCP presenting blue light induced NPQ (Wilson et al. 2006). Affinity Ni-chromatography and DEAE cellulose column were used.

PBS purification. Cells were broken by vortexing with glass beads. Phycobilisomes were prepared as described by Ajlani et al. (1995).

PBS reconstitution and incubation conditions. PBS were dissociated by incubating them for 20 min in ice in 0.04 M phosphate buffer (pH 7). Then, they were reconstituted (by dialysing during 2 h against a 0.8 M phosphate buffer, pH 7) in the presence of OCP. The mixed quantities have been adjusted to have a ratio 2/1 OCP to PBS. The OCP was also incubated 2 h in the presence of PBS in a 0.8 M phosphate buffer. Reconstituted and incubated fractions have been loaded on a non-linear sucrose gradient and ultracentrifugated.

Immunoblot analysis. PBS and mixed OCP-PBS fractions were analysed by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide/2 M urea in a TRIS/MES system (Kashino et al. 2001). The OCP protein was detected by a polyclonal antibody against OCP (Wilson et al. 2007). Binding of OCP antibody was monitored by an alkaline phosphatase colorimetric reaction.

Fluorescence measurements. Fluorescence emission spectra at room temperature and 10°C were done in a CARY Eclipse fluorescence spectrophotometer fluorometer (Varian). The WT PBS were diluted at 0.06 $OD_{622\,nm}$ and the CK mutant PBS at 0.06 $OD_{655\,nm}$ for spectra measurements.

Results

We first checked whether OCP could be co-isolated with phycobilisomes. PBS from the WT and from the CK mutant were isolated. Blue-light induced NPQ is still observed in this mutant lacking phycocyanin (Thomas et al. 2006) where only the core of the PBS is present. Profiles of the sucrose gradients containing the PBS of both strains is shown in Fig. 1A. WT PBS were collected from the 0.75/1.5 M sucrose interface and CK PBS were collected from the 0.5 M sucrose layer. The proteins present in both phycobilisome preparations were resolved by SDS-PAGE electrophoresis. The presence of the OCP was tested by western blot analysis. It appeared that OCP did not co-isolate with phycobilisomes, indeed no trace of OCP was observed on the immunoblot despite of the high concentration of PBS (Fig. 1C, only the results of the WT PBSs are shown).

To further study the possible interaction between the OCP and PBS, the isolated OCP was incubated with PBS for 2 h. In addition, the phycobilisomes isolated from the WT and the CK mutant were dissociated and reconstituted in the presence of the isolated OCP. For dissociation, the PBSs were incubated (at 4°C) in a buffer containing a low concentration of phosphate. Then, we reconstituted the PBS in the presence of OCP by dialysing the dissociated phycobilisomes against a 0.8 M phosphate buffer. The reconstituted phycobilisomes and the phycobilisomes incubated in the presence of OCP were re-purified in a sucrose gradient (Fig. 1B, 1 and 2 respectively). The immunoblot analysis revealed the presence of OCP in the fraction containing the whole phycobilisomes (Fig. 1D, 1 and 2, respectively; only the results of WT PBS is shown). Thus, OCP co-migrated with the phycobilisomes in the 0.75–1.5 M sucrose gradient fraction. A fraction of no

Allen_Sec15_Ch02.indd 1004 1/18/2008 8:25:31 PM

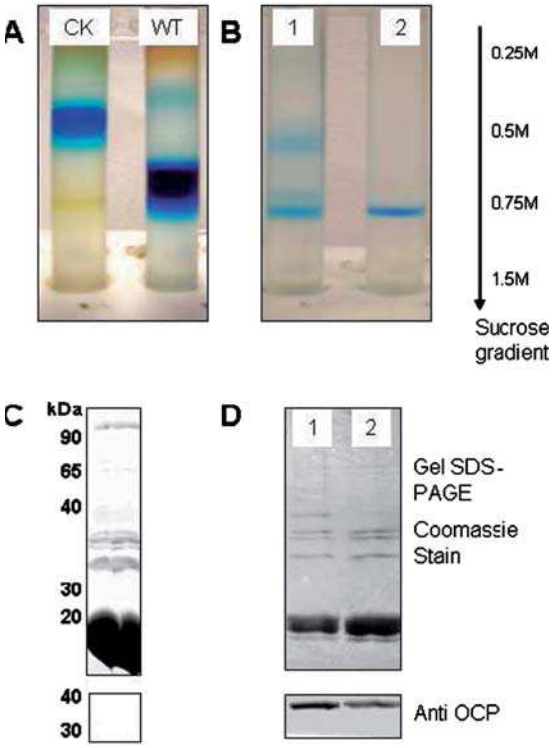


Fig. 1 (**A** and **B**) Phycobilisomes in a non-linear sucrose gradient. (A) 2% Triton-X treated broken cells of WT (tube on the right) and CK mutant (tube on the left) *Synechocystis* cells have been loaded on a non-linear sucrose gradient. (**B**) Reconstituted PBS in the presence of OCP (1) and PBS incubation in the presence of OCP (2). The gradient sucrose concentrations are 0.25, 0.5, 0.75 and 1.5 M from up to bottom. (**C** and **D**) SDS-PAGE pattern of phycobilisome fraction and OCP immuno-blot detection. (**C**) Concentrated purified whole PBS from WT. (**D**) Reconstituted PBS (1) and incubated PBS (2) in the presence of OCP

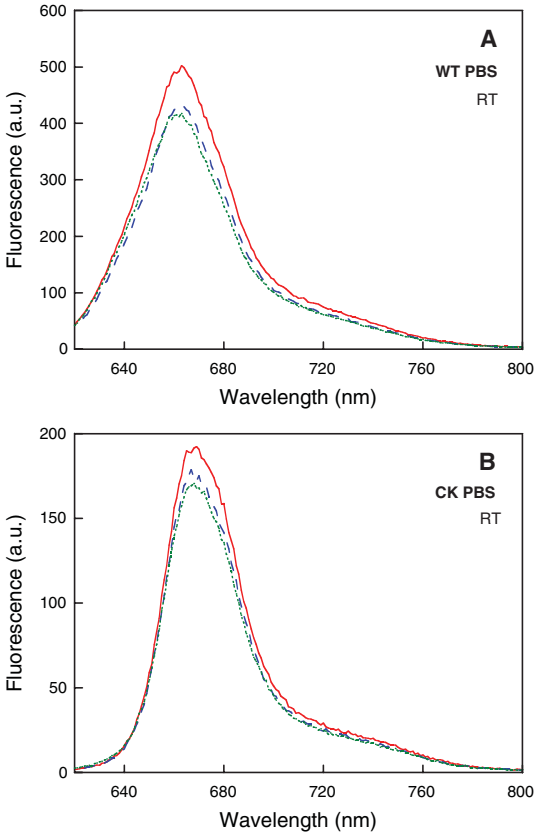


Fig. 2 Fluorescence emission spectra of incubated PBS in the presence of OCP. Room temperature fluorescence spectra of whole PBS from WT (**A**) and heart of PBS (composed of allophycocyanin, APC) from the CK mutant (**B**) which have been incubated in the presence of OCP in a 0.8 M phosphate buffer. Measurements have been done on dark-adapted fractions (dashed blue line), on 5 min white light illuminated (1,500 ∝mol m^{-2} s^{-1}) fractions (dotted green line) and on control fractions (solid red line) which have been dark-adapted and where OCP has not been add to the PBS. Excitation was performed at 600 nm. Each spectrum is a mean of four experiment spectra

bound OCP migrated in the 0.25–0.5 M gradient fraction (data not shown).

Finally, we tested whether fluorescence quenching could be induced by blue or white light in the OCP containing phycobilisomes. We measured the fluorescence emission spectra with excitation at 600 nm (principally absorbed by the PBS), before and after strong blue (data not shown) or white light illumination. The fluorescence level of the phycobilisomes was weaker when OCP was present (Fig. 2B, C), however illumination of the phycobilisomes induced almost no further fluorescence quenching.

Conclusions

Our results strongly suggest that there is a relationship between the phycobilisomes and the OCP: OCP co-migrated with the phycobilisomes in a

Allen_Sec15_Ch02.indd 1005 1/18/2008 8:25:31 PM

sucrose gradient. However, although the association of the OCP to the PBS, no light induced fluorescence quenching was observed. Several hypotheses can explain this observation. It is possible that the OCP was not link as it is in *vivo* or that other proteins are needed to induce the quenching in addition to the OCP. On the other hand, the high concentration of phosphate required to maintain associated the phycobilisomes could also inhibit the light induced NPQ. *In vivo*, high concentrations of phosphate inhibits state transitions and the NPQ recovery (Joshua et al. 2005; Scott et al. 2006). The fact that the presence of OCP decreases the phycobilisome emission could suggest that under these conditions the OCP could absorb energy coming from the phycobilisomes.

Acknowledgments. Thanks to Dr. Ghada Ajlani for the CK mutant. The research was partially supported by EU network INTRO2.

References

Ajlani G, Vernotte C, DiMagno L, Haselkorn R (1995) Phycobilisome core mutants of *Synechocystis* PCC 6803. Biochim Biophys Acta 1231:189–196.

El Bissati K, Delphin E, Murata N, Etienne A, Kirilovsky D (2000) Photosystem II fluorescence quenching in the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803: Involvement of two different mechanisms. Biochim Biophys Acta 1457:229–242.

Glazer AN (1989) Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. J Biol Chem 264:1–4.

Joshua S, Bailey S, Mann NH, Mullineaux CW (2005) Involvement of phycobilisome diffusion in energy quenching in cyanobacteria. Plant Physiol 138:1577–1585.

Kashino Y, Koike H, Satoh K (2001) An improved sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis system for the analysis of membrane protein complexes. Electrophoresis 22:1004–1007.

Kerfeld CA (2004) Water-soluble carotenoid proteins of cyanobacteria. Arch Biochem Biophys 430:2–9.

Scott M, McCollum C, Vasil'ev S, Crozier C, Espie GS, Krol M, Huner NP, Bruce D (2006) Mechanism of the down regulation of photosynthesis by blue light in the Cyanobacterium synechocystis sp. PCC 6803. Biochemistry 45:8952–8958.

Thomas JC, Ughy B, Lagoutte B, Ajlani G (2006) A second isoform of the ferredoxin: NADP oxidoreductase generated by an in-frame initiation of translation. Proc Natl Acad Sci USA 103:18368–18373.

Wilson A, Ajlani G, Verbavatz JM, Vass I, Kerfeld CA, Kirilovsky D (2006) A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria. Plant Cell 18:992–1007.

Wilson A, Boulay C, Wil de A, Kerfeld CA, Kirilovsky D (2007) Light-induced energy dissipation in iron-starved cyanobacteria: Roles of OCP and IsiA proteins. Plant Cell 19:656–672.

Allen_Sec15_Ch02.indd 1006 1/18/2008 8:25:35 PM

Biochimica et Biophysica Acta 1777 (2008) 1344–1354

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbabio

Occurrence and function of the orange carotenoid protein in photoprotective mechanisms in various cyanobacteria

Clémence Boulay [a], Leyla Abasova [b], Christophe Six [c], Imre Vass [b], Diana Kirilovsky [a,*]

[a] Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut de Biologie et Technologies de Saclay (iBiTec-S) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), URA 2096, 91191 Gif sur Yvette, France
[b] Institute of Plant Biology, Biological Research Center, Szeged, Hungary
[c] Photosynthetic Molecular Ecophysiology Group, Mount Allison University, Sackville, New Brunswick, Canada

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 April 2008
Received in revised form 11 July 2008
Accepted 16 July 2008
Available online 25 July 2008

Keywords:
Cyanobacteria
Iron starvation
Non-photochemical quenching
Orange-carotenoid-protein
Photoprotection
Photosystem II

ABSTRACT

Excess light is harmful for photosynthetic organisms. The cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 protects itself by dissipating the excess of energy absorbed by the phycobilisome, the water-soluble antenna of Photosystem II, into heat decreasing the excess energy arriving to the reaction centers. Energy dissipation results in a detectable decrease of fluorescence. The soluble Orange Carotenoid Protein (OCP) is essential for this blue-green light induced mechanism. OCP genes appear to be highly conserved among phycobilisome-containing cyanobacteria with few exceptions. Here, we show that only the strains containing a whole OCP gene can perform a blue-light induced photoprotective mechanism under both iron-replete and iron-starvation conditions. In contrast, strains containing only N-terminal and/or C-terminal OCP-like genes, or no OCP-like genes at all lack this light induced photoprotective mechanism and they were more sensitive to high-light illumination. These strains must adopt a different strategy to longer survive under stress conditions. Under iron starvation, the relative decrease of phycobiliproteins was larger in these strains than in the OCP-containing strains, avoiding the appearance of a population of dangerous, functionally disconnected phycobilisomes. The OCP-containing strains protect themselves from high light, notably under conditions inducing the appearance of disconnected phycobilisomes, using the energy dissipation OCP-phycobilisome mechanism.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cyanobacteria are prokaryotes performing oxygenic photosynthesis. They are not only the major contributors to the initial oxygen evolving in the atmosphere but also the ancestors of eukaryotic algae and higher plants. To harvest light, most cyanobacteria use a large membrane extrinsic complex called the phycobilisome (PB), composed of chromophorylated phycobiliproteins and of linker peptides (for reviews, see [1–5]). The PB consists of an allophycocyanin (APC) core from which rods radiate. While in many freshwater cyanobacteria the rods contain only phycocyanin (PC) and sometimes phycoerythrin (PE) or phycoerythrocyanin (PEC) at the distal end of the rods, marine cyanobacteria are usually rich in PE. These complexes are attached to the outer surface of the thylakoid membranes [6] *via* the large, chromophorylated, core membrane linker protein L_{CM} [7], which also serves as PB terminal energy acceptor. Harvested light energy is transferred from L_{CM} to the chlorophylls (Chls) of photosystem II (PSII) and I (PSI) [8,9]. In addition to the PBs, cyanobacteria contain two Chl membrane antenna proteins, CP43 and CP47.

Cyanobacteria, like plants and algae, have developed physiological mechanisms allowing acclimation and survival in a wide range of environmental conditions. State transitions, which are induced by changes in the redox state of the plastoquinone (PQ) pool, regulate the energy distribution between the two photosystems [10–12]. Exposure of photosynthetic organisms to light absorbed predominantly by PSII causes the reduction of the PQ pool and a relative decrease of the PSII fluorescence yield (State 2) and conversely, illumination with light preferentially absorbed by PSI induces the oxidation of the PQ pool and a relative increase of the fluorescence yield (State 1).

Exposure of oxygenic photosynthetic organisms to strong light can severely damage their photosynthetic apparatus, a phenomenon known as photoinhibition due to oxidative damage induced by excessive excitation [13–16]. Energy dissipation as heat in the antennae is a process that helps decreasing the amount of energy reaching the reaction centers and then reduces the probability of photosystem photoinactivation. It has been recently demonstrated that in cyanobacteria, like in plants, there exists an energy dissipating mechanism accompanied by a diminution of PSII fluorescence

* Corresponding author. iBiTec-S, Bât 532, CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France. Tel.: +33 1 69089571; fax: +33 1 69088717.
E-mail address: diana.kirilovsky@cea.fr (D. Kirilovsky).

0005-2728/$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbabio.2008.07.002

emission [17–20]. Saturating blue-green or white light induces thermal dissipation of the energy absorbed by the PBs resulting in the decrease of the PB fluorescence emission and of the energy transfer from the PBs to the reaction centers [18–20]. This process is not affected by transthylakoidal pH variations [20], excitation pressure on PSII, or by changes in the redox state of the PQ pool [18–20]. It is however light irradiance and quality dependent [18,20]. Rakhimberdieva et al. [18] showed that the action spectrum of the PB fluorescence quenching resembled the absorption spectrum of carotenoids. Subsequently, Wilson et al. [20] demonstrated that in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (hereafter called *Synechocystis*), this energy dissipation mechanism involves the so-called orange carotenoid protein (OCP). In the absence of OCP, the fluorescence quenching induced by strong white or blue-green light is fully inhibited and *Synechocystis* cells are more sensitive to high light [21]. The water-soluble OCP is a 35kD protein containing a single non-covalently bound carotenoid [22–25] which in *Arthrospira maxima* and *Synechocystis* is a 3'-hydroxyechinenone [26,27]. The OCP contains an α-helical N-terminal domain and an α-helical/β-sheet C-terminal domain [26]. The hydroxyechinenone molecule spans both N- and C-terminal domains [26]. The fact that the action spectrum of the PB fluorescence quenching exactly matches the absorption spectrum of the carotenoid 3'-hydroxyechinenone in the OCP (compare figures in [28] and [18]) allowed Wilson et al. [20] to propose that absorption of light by the carotenoid of the OCP induces changes in the carotenoid and the protein leading to energy dissipation (and fluorescence quenching) through interaction with the PB core. It has been recently demonstrated that the OCP is indeed a photoactive protein with an "active" red form. The absorbance of light by the OCP, which appears orange under resting conditions, induces structural changes in the carotenoid and the protein; this converts the dark stable orange form, into a red relatively unstable active form. The red form accumulates under conditions in which cyanobacteria need photoprotection including high light and cold. Moreover the red OCP form was detected *in vivo* under conditions that induce the PB-related fluorescence quenching [27].

Because photosynthetic reactions rely on a number of iron-containing proteins, iron-depletion stress often causes a reorganisation of the regulation of light utilisation. For instance, in many cyanobacteria, the Chl-binding IsiA protein is induced in response to iron depletion [29,30] and other stress conditions (such as salt stress, oxidative stress, and high-light stress [31–33]) forming rings around PSI [34,35]. It has been proposed that IsiA is involved in the generation of the large blue-green light induced NPQ observed in *Synechocystis* under iron depletion [36,37]. Recent studies however demonstrated that this iron-depletion induced NPQ was OCP- but not IsiA-dependent [21,38], confirming the essential role of the OCP in the acclimation of *Synechocystis* to environmental changes.

The function of the OCP in the photoprotective PB-related thermal dissipating mechanism has been examined only in *Synechocystis* cells. It is however not known if this important OCP-related mechanism is widespread in the cyanobacterial radiation. Moreover, the question about light induced photoprotective mechanisms in cyanobacterial strains lacking the whole OCP gene remains open. In this study, we investigated whether the presence of the OCP gene is systematically associated to the ability to perform blue-green light induced fluorescence quenching in a panel of phylogenetically diverse cyanobacteria, isolated from various aquatic habitats. We then more specifically compared the effect of high light and iron starvation on the induction of NPQ and state transitions in three of these cyanobacteria showing distinct OCP gene configurations: (i) *Arthrospira maxima* containing the whole OCP as in *Synechocystis*, (ii) *Synechococcus elongatus* PCC 7942, lacking the OCP gene, and (iii) *Thermosynechococcus elongatus*, which contains two consecutive genes encoding the C- and N-terminal part of the OCP, respectively, but no whole OCP gene.

2. Materials and methods

2.1. Culture conditions

The mesophylic freshwater cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803, *Arthrospira maxima*, *Anabaena variabilis* and *Synechococcus elongatus* PCC 7942 cells were grown photoautotrophically in a modified BG11 medium [39] containing double amount of sodium nitrate. Cells were kept in a rotary shaker (120 rpm) at 30 °C, illuminated by fluorescent white lamps giving a total intensity of about 30–40 μmol photons m^{-2} s^{-1} under a CO_2-enriched atmosphere. Thermophilic *Thermosynechococcus elongatus* cells were grown under similar conditions to the other freshwater cyanobacteria but in a DTN medium [40] and at 45 °C. The cells were maintained in the logarithmic phase of growth and were collected at OD_{800}=0.6–0.8. The construction of the ΔOCP mutant, in which the *slr*1963 gene is interrupted by a spectinomycin/streptinomycin resistance cassette was described in Wilson et al. [20].

The marine picocyanobacteria *Synechococcus* strains RS9917, WH8018, RCC307 and WH8102 were grown in PCR-S11 medium [41] in polystyrene culture flasks at 22±1 °C and 25 μmol photons m^{-2} s^{-1} white light, provided by fluorescent tubes (Sylvania Daylight). Origins of the strains are described in [42].

2.2. Iron starvation

Freshwater cyanobacterial cells were collected in the logarithmic phase of growth, precipitated, resuspended (OD_{800}=0.6) in the modified BG11 medium [39] or DTN [40] lacking Fe and grown under medium light (90–120 μmol photons m^{-2} s^{-1}). During the first week, the cells were diluted every 3 days to maintain the cell concentration within an OD_{800} ranging from 0.6 to 1.2. The second week, a last dilution was done after 4 days.

2.3. Absorbance measurements

Cell absorbance was monitored with an $UVIKON_{XL}$ spectrophotometer (SECOMAN, Alès). The phycobiliprotein (PC+APC) to Chl ratio was calculated from the absorbance spectra using the following formula: $(OD_{625}-OD_{800})/(OD_{681}$ or $OD_{673}-OD_{800})$. The measurement of PC+APC at 625 nm is affected by underlying contributions from the absorbance of carotenoids and Chl. Despite this difficulty, we considered that this index gave a fair reflection of the changes in the PC to Chl ratio during iron starvation. Chl content was determined in methanol using the extinction coefficient at 665 nm of 79.24 mL mg^{-1} cm^{-1}.

2.4. Fluorescence measurements

Cell fluorescence was monitored with a pulse amplitude modulated fluorometer (101/102/103-PAM for freshwater strains or Xenon-PAM for marine strains; Walz, Effelrich, Germany). All NPQ and state transition induction measurements were carried out in a stirred cuvette of 1 cm diameter at growth temperature. After illuminating dark-adapted cells with low irradiance of blue-green light (400–550 nm, 80 μmol photons m^{-2} s^{-1}) for about 1 min, fluorescence quenching was induced by 740 μmol photons m^{-2} s^{-1} of blue-green light for about 2 min; and the cells were then shifted back to low blue-green light. For state transition measurements, after illuminating cells with low intensity blue-green light (400–550 nm, 80 μmol photons m^{-2} s^{-1}), transition to State 2 was induced by orange light (600–650 nm) at 20 μmol photons m^{-2} s^{-1} of light intensity; and then cells were re-illuminated with low blue-green light.

The minimal fluorescence level in dark-adapted sample (Fo) was determined by illuminating dark-adapted cells with a low, modulated light that preferentially excited the major phycobiliprotein (1.6 kHz,

0.024 μmol photons m^{-2} s^{-1}, 650 nm for freshwater strains and 4 Hz, 0.1 μmol photons m^{-2} s^{-1}, 520 nm for marine strains). Saturating pulses (2000 μmol photons m^{-2} s^{-1}, 1 s for freshwater cyanobacteria and 4000 μmol photons m^{-2} s^{-1}, 0.5 s for marine cyanobacteria) were applied to measure the maximal fluorescence levels Fm_d and Fm' in dark- and light-adapted samples, respectively. Application of such pulses that transiently close all the PS II centers serves to distinguish between photochemical quenching (*q*p) and NPQ.

Fluorescence emission spectra at 77 K were measured by a CARY Eclipse fluorescence spectrophotometer (Varian, USA). The cells were at a concentration of 3 μg Chl mL^{-1}. For 77K spectra, samples in NMR tubes (5 mm diameter) were quickly frozen by immersion in a mixture of ice, CO_2 and ethanol and then in liquid nitrogen.

2.5. Membrane-phycobilisome bound (MP) preparations and OCP immunodetection

Freshwater cyanobacteria cells (at a 1 mg Chl mL^{-1} concentration) were resuspended in a 0.7 M K-phosphate/0.3 M Na-Citrate (pH 6.8) buffer and broken in a mini-bead beater in the presence of glass beads. Beads and unbroken cells were discarded by mild centrifugation and the MP fractions were collected by centrifugation at 20,000 ×*g* and frozen at −80 °C until used for gel electrophoresis. MP fractions of freshwater cyanobacteria were analyzed by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide/2 M urea in a TRIS/MES system [43]. For immunodetections of the OCP in marine *Synechococcus*, a slightly different procedure was used. Briefly, cells were harvested by centrifugation and the proteins were extracted by 2 thawing-sonicating rounds in lithium dodecyl sulphate extraction buffer. Total proteins of marine *Synechococcus* were analyzed on a 4–12% gradient acrylamide precast NuPAGE gel (Invitrogen). The OCP protein was detected by a polyclonal antibody against OCP [21].

3. Results

3.1. OCP genes in different cyanobacteria strains

In *Synechocystis*, the OCP is encoded by the *slr1963* gene, which was described a decade ago [25]. Screening of the currently available cyanobacterial genomic databases showed that genes homologous to the *Synechocystis slr1963* gene are present in most PB-containing cyanobacteria (Table 1). Highly conserved homologs were indeed found in the genome of most sequenced cyanobacteria, with various gene identities relative to the *Synechocystis* OCP gene. The identity factor of OCP homologs relative to *Synechocystis* OCP varies between 50 (*Gloeobacter violaceus*) and 82% (*Arthrospira maxima*). The marine *Synechococcus* OCP sequences which present a lower similarity to the *Synechocystis* OCP than those present in freshwater cyanobacteria, are very similar among each other, with an identity factor varying from 95 to 77%. *Gloeobacter violaceous* and *Nodularia* OCPs present a low similarity to both marine and freshwater OCPs. Among PB-containing cyanobacteria, only few strains do not have an OCP gene homolog, including the freshwater *Synechococcus elongatus* PCC 7942 and PCC 6301, the thermophile *Thermosynechococcus elongatus*, *Synechococcus* sp. A and *Synechococcus* sp. B', and the marine *Synechococcus* sp. CC9605 and *Crocosphaera watsonii* WH8501. While

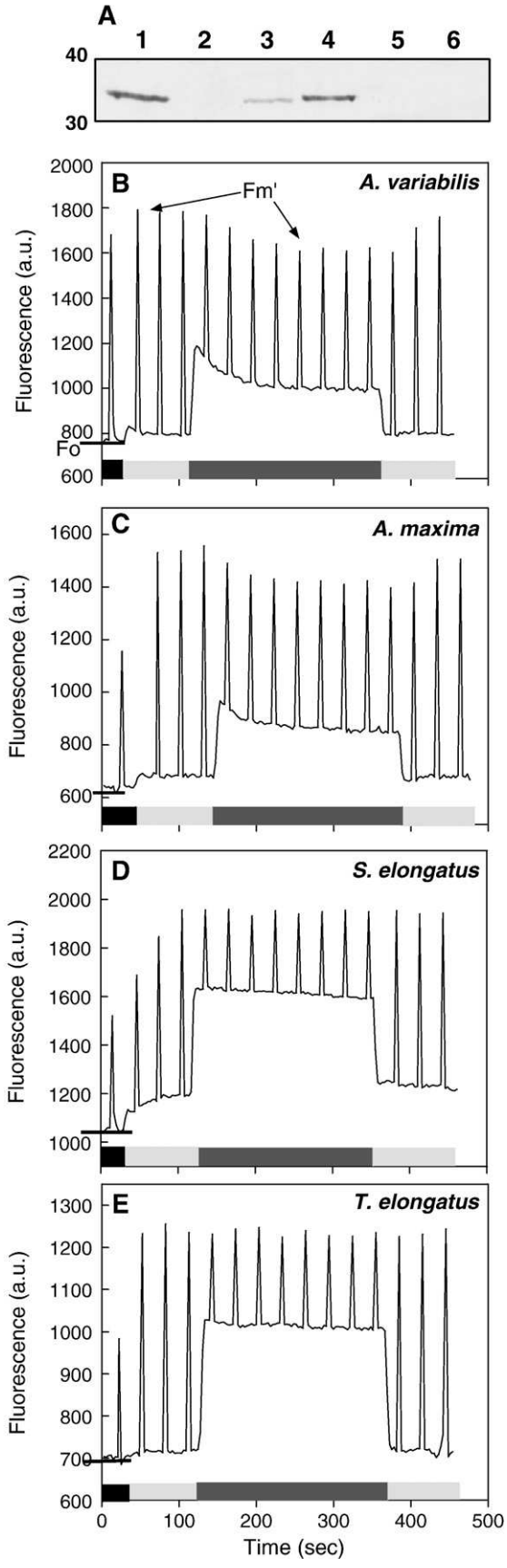
Table 1
Occurrence of OCP encoding genes and its shorter paralogs in cyanobacterial strains classified by decreasing percentage of the corresponding protein identity compared to the *Synechocystis* OCP

Strain	OCP genes	ID* (%)	OCP-Nter genes	OCP C-ter genes
Synechocystis PCC 6803	*slr1963*	100		
Arthrospira maxima	*OCP_SPIMA P83689*	82	?	?
Microcystis aeruginosa NIES-843	*MAE18910*	81		
Lyngbya sp PCC 8106	*L8106_29210*	80	*L8106_29395* *L8106_04666*	*L8106_29390*
Cyanothece sp CCY0110	*CY0110_09677*	78	*CY0110_08696*	*CY0110_08806*
Cyanothece sp ATCC51142	*cce_1649*	78	*cce_1537* *cce_1991*	*cce_0742*
Nostoc sp PCC 7120	*All3149*	75	*All1123* *Alr4783* *All4941* *All3221*	*All4940*
Anabaena varaibilis ATCC29413	*Ava_3843*	75	*Ava_2052* *Ava_2230* *Ava_4694*	*Ava_2231*
Synechococcus sp PCC 7002	*SYNPCC7002_A2810*	72		
Synechococcus sp WH5701	*WH5701_04010*	68		
	WH5701_00210	60		
	(219 a a)			
Nostoc punctiforme PCC 73102	*Npun02003015*	66	*Npun02005000*	*Npun02003027*
	Npun02000033	55	*Npun02001317* *Npun02003030* *Npun02004998*	
Synechococcus sp RCC307	*RCC307_1992*	65		
Synechococcus sp RS9917	*RS9917_00692*	64		
Synechococcus sp WH7803	*SynWH7803_0929*	64		
Synechococcus sp CC9311	*Sync_1803*	64		
Synechococcus sp BL107	*BL107_14105*	63		
Synechococcus sp WH7805	*WH7805_01202*	63		
Synechococcus sp CC9902	*syncc9902_0973*	63		
Synechococcus sp WH8102	*SYNW1367*	62		
Nodularia spumigena CCY9414	*N9414_13085*	56	*N9414_12098* *N9414_22258*	*N9414_22253*
Gloeobacter violaceus PCC 7421	*glr3935 (274aa)*	50	*gll0260 (217)*	*glr2503*
	glr0050	49	*gll0259*	
Crocosphaera watsonii WH 8501			*CwatDRAFT_0985*	*CwatDRAFT_5349*
Thermosynechococcus elongatus BP-1			*tll1269*	*tll1268*

* Protein identity (%) obtained with BLASTP (programs search protein databases using a protein query).

most of these strains have no homolog of the whole or of fragments of the OCP gene at all, *T. elongatus* and *C. watsonii* WH8501 however contain two ORFs coding for both the N- and the C-terminal part of the OCP (Table 1). In *T. elongatus*, they occur as separate but adjacent genes, whereas in *C. watsonii*, they are in different parts of the genome.

Synechocystis, *Mycrocystis aeruginosa* and all marine *Synechococcus* contain only the whole OCP gene but other cyanobacteria including *Lyngbya* sp PCC 8106, *Cyanothece* CCY0110, *Nostoc* sp. PCC 7120, *Anabaena variabilis*, *Nostoc punctiforme* PCC 73102, *Nodularia spumigena* CCY9414, and *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, have in addition multiple gene copies encoding the N-terminal domain and a single copy of the gene coding for the C-terminal domain, located in disparate parts of the genome (Table 1). Noteworthy, *Prochlorococcus* strains, a PB-lacking cyanobacteria phylum, do not contain any trace of OCP gene.



3.2. Blue-green light induced NPQ in OCP-containing and OCP-lacking cyanobacteria strains

We tested whether the presence of the OCP is associated to the ability of cells to perform blue-green light induced fluorescence quenching. We first compared the freshwater *A. maxima* and *A. variabilis* strains, containing OCP genes with high identity to the *slr1963* gene, and *T. elongatus* and *S. elongatus* PCC 7942 (hereafter called *S. elongatus*) strains lacking the entire OCP gene. The presence of the OCP protein in these cyanobacteria strains was checked by immunodetection using a polyclonal antibody obtained with a recombinant *Synechocystis* OCP (Fig 1A). We detected a 35kD OCP band in *Synechocystis* (used as control), *A. maxima* and *A. variabilis*. The antibody reacted better with *A. maxima* than with *A. variabilis* OCP in agreement with the lower similarity of the latter protein with *Synechocystis* OCP (Table 1). No bands at 35kD (or at lower molecular weight) were detected in the ΔOCP *Synechocystis* mutant (used as negative control), in *S. elongatus* (no homolog of OCP gene) and *T. elongatus* (only N- and C-terminal OCP-like genes).

Induction of the blue-light induced fluorescence quenching was monitored using a PAM fluorometer. In dark-adapted cyanobacteria cells, the PQ pool is reduced and the cells are in the low PSII fluorescent State 2 [44,45] (Fig. 1B to E). *S. elongatus* cells (Fig. 1D) presented a noticeable higher Fo level (the minimal fluorescence level in dark-adapted cells) than the other cyanobacteria strains at equal Chl concentration, probably because of a higher PC to Chl ratio content compared to the other strains, as shown by its absorbance properties (Fig. 5). In a PAM fluorometer using a 650 nm measuring light efficiently absorbed by the PBs, the Fo level of PC-rich cyanobacteria strains varies according to the cellular phycobiliprotein concentration [46,47]. Upon illumination of dark-adapted cells by low intensities of blue-green light, exciting preferentially PSI, an increase of the maximal fluorescence level (Fm') was observed in all strains and State 1 was reached. The transition to State 1 is induced by the oxidation of the PQ pool that occurs in the dark to light transition. The increase of fluorescence was always slower in *S. elongatus* cells, suggesting that the PQ pool is more reduced in darkness and/or the relative movement of the photosystems and/or the PBs is slower in *S. elongatus* compared to the other strains (Fig. 1D). Then, exposure of cells to strong blue-green light induced the quenching of the maximal fluorescence (Fm') in *A. maxima* and *A. variabilis*, the OCP-containing strains, as previously described in *Synechocystis* cells [20]. Fluorescence spectra measurements and the study of the photoprotective mechanism in PB and PSII mutants of *Synechocystis* indicated that this

Fig. 1. OCP immunodetection and blue-green light induced fluorescence quenching in *A. variabilis*, *A. maxima*, *S. elongatus* and *T. elongatus* cells. (A) OCP immunoblots of MP fractions isolated from the *Synechocystis* wild type (1), the ΔOCP *Synechocystis* mutant (2), *A. variabilis* (3), *A. maxima* (4), *S. elongatus* (5) and *T. elongatus* (6). Each lane contained 1 μg of Chl. (B to E) Measurements of fluorescence yield by PAM fluorometry in *A. variabilis* (B), *A. maxima* (C), *S. elongatus* (D) and *T. elongatus* (E) dark-adapted cells (at 3 μg Chl mL^{-1}) illuminated successively with low (400–550 nm, 80 μmol photons m^{-2} s^{-1}) and high blue-green light (740 μmol photons m^{-2} s^{-1}); and then again with dim blue-green light. Saturating pulses were applied to measure maximal fluorescence levels (Fm').

fluorescence quenching is a specific decrease of the fluorescence emission of PBs [18–20]. In contrast, exposure of *S. elongatus* and *T. elongatus*, the OCP-lacking strains, to strong blue-green light did not induce any fluorescence quenching, suggesting that the whole OCP is essential for its induction. Our results moreover suggest that the products encoded by the OCP N- and C-terminal homologs of *T. elongatus* do not participate in the blue-green induced NPQ, at least under regular growth conditions.

Marine *Synechococcus* strains also contain OCP genes but with a lower identity to the *slr1963* gene. In addition, their PBs show various structures and usually contain not only PC but also PEs, both binding various phycobilins [48]. Representative strains of the marine *Synechococcus* cluster were chosen to test the presence of blue-light induced NPQ: *Synechococcus* sp. RS9917 (containing only PC, A_{max}=620 nm), *Synechococcus* sp. WH8018 (containing PE-I, A_{max}=570 nm), *Synechococcus* sp. WH8102 and *Synechococcus* sp. RCC307 (containing PE-I and PE-II with phycoerythrobilin (A_{max}=550 nm) and phycourobilin (A_{max}=495 nm) chromophores). The OCP gene of *Synechococcus* sp. WH8018 has not been sequenced yet, but this marine cyanobacterium is very similar to *Synechococcus* sp. WH7805 [42] which does contain it. Fig. 2A shows that the OCP antibody recognized a 35 kDa polypeptide in all these strains. The antibody reacted much better with the freshwater OCPs than with the marine ones, in agreement with the lower similarity of these proteins to the *Synechocystis* OCP.

The induction of the blue-light induced fluorescence quenching was monitored using a PAM fluorometer. Exposure of dark-adapted marine *Synechococcus* cells to low intensities of blue-green light induced an increase of the maximal fluorescence level in all strains related to the transition to State 1 (data not shown); then exposure of these high fluorescent cells to strong blue-green light induced the quenching of the maximal fluorescence like in the freshwater OCP-containing strains (Fig. 2B). Although in PE-containing strains, blue-green light is absorbed not only by Chl but also by PBs, it is very unlikely that the observed fluorescence quenching, induced by strong blue-green light was related to a transition to State 2. Low intensities of blue-green light induced State 1 transition indicating that this light caused the oxidation of the PQ pool due to higher PSI than PSII activity under this light condition. When the marine *Synechococcus* were brought back to low blue-green light, NPQ relaxation was observed, i.e. Fm' increased (Fig. 2B). Thus, even in cyanobacteria strains with lower OCP gene similarity to *Synechocystis* and different PB structure and composition, high intensities of blue-green light induced NPQ while low intensities of blue-green light induced the oxidation of the PQ pool and State I transition like in PE-lacking strains.

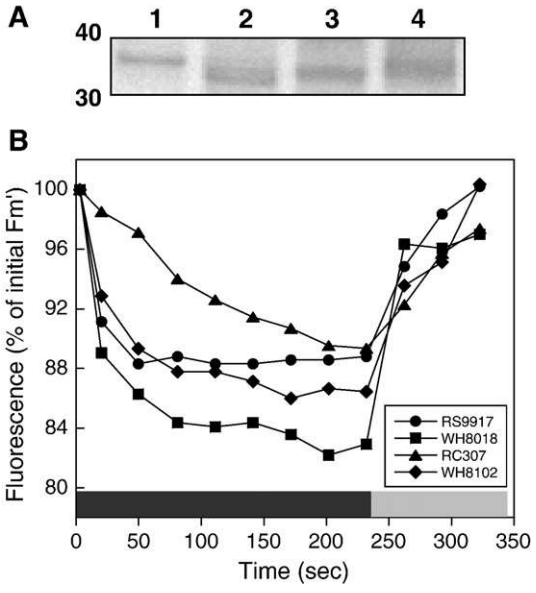


Fig. 2. OCP immunodetection and blue-green light induced fluorescence quenching in marine cyanobacteria. (A) OCP Immunoblots of total proteins isolated from the marine cyanobacteria *Synechococcus* RS9917 (1), *Synechococcus* WH8018 (2), *Synechococcus* RCC307 (3) and *Synechococcus* WH8102 (4). Each lane contained 3 μg of total proteins. (B) Changes in maximal fluorescence levels (Fm') in *Synechococcus* WH8018 (square), *Synechococcus* WH8102 (diamond), *Synechococcus* RS9917 (circle) and *Synechococcus* RCC307 (triangle) cells (at 1 μg Chl mL^{-1}) adapted to low blue-green light (400–550 nm, 80 μmol photons m^{-2} s^{-1}) and then illuminated successively with high (740 μmol photons m^{-2} s^{-1}) and low blue-green light. The variations are shown as percentages of the initial Fm' under low blue-green light, just prior to illumination with high blue-green light. Fluorescence yield changes were detected in a PAM fluorometer and saturating pulses were applied to measure maximal fluorescence levels.

3.3. Blue-green light induced NPQ in iron-starved cyanobacteria cells

Under iron starvation conditions, blue-green light causes a large reversible fluorescence quenching [21,36–38]. A larger quenching of Fo and Fm, correlated to a higher concentration of OCP per Chl is induced in iron-starved than in iron-replete wild-type *Synechocystis* cells [21]. Here, we compared the behavior of three other cyanobacteria showing different OCP gene configurations, *T. elongatus*, *A. maxima* and *S. elongatus*, grown in iron-depletion conditions. Fig. 3 shows the fluorescence traces of 10 days iron-starved cells of *A. maxima*, *T. elongatus*, and *S. elongatus*. Compared to replete cells (Fig. 1), the Fo level slightly decreased in *T. elongatus* and *S. elongatus* cells while it increased in *A. maxima*, as observed for *Synechocystis* [21]. The Fo level depends not only on the concentration of phycobiliproteins but also on the functional coupling of PBs: energetically coupled PBs show a low yield of fluorescence emission, while uncoupled PBs show a high yield. It has already been shown that the high Fo level of extended iron-starved *Synechocystis* cells is largely related to a population of functionally disconnected PBs. This seems to be also the case in *A. maxima* cells (see below). When dark-adapted cells were illuminated with dim blue-green light, no or very little changes were observed in the level of Fm' in any of the three strains (Fig. 3; see also the state transitions section). Then, illumination with high intensities of blue-green light induced fluorescence quenching only in *A. maxima* cells, the strain containing the OCP. A larger fluorescence quenching was observed in iron-starved *A. maxima* cells compared to iron-replete cells (Fig. 4). This larger fluorescence decrease corresponded to a higher OCP to Chl ratio (Fig. 4).

3.4. Characteristics of iron-starved cells: absorbance and fluorescence spectra

We further characterized the iron-starved cells to elucidate whether the strains presenting or not the OCP-related photoprotective mechanism use different physiological strategies to cope with iron starvation. Fig. 5 compares the absorption spectra of iron-replete and 10-days iron-starved cells. In all the strains after 3 days of iron starvation, we observed a shift of the Chl peak from 681 to 673 nm characteristic of the accumulation of the IsiA protein [29,30]. A large decrease of phycobiliproteins (PC and APC) and Chl was also observed in iron-starved cells as seen by the lower absorption at about 625 nm and 673–681 nm, respectively. This was described by previous studies [49–52]. The Chl per cell content decreased with similar kinetics to a similar extent in all three strains (data not shown). It is however worth noting that, under iron starvation, while in *A. maxima* and *Synechocystis* cells the phycobiliprotein to Chl ratio remained constant or slightly increased, in *T. elongatus* and *S. elongatus* this ratio decreased, indicating a faster decrease of the phycobiliprotein content compared to the Chl content in these two strains (Fig. 5D).

PSI, PSII and thylakoid content are known to decrease during iron starvation, with the decrease in PSI being the most marked [49,52–54]. Fluorescence emission spectra using excitation light at 430 nm, which is preferentially absorbed by Chl, and at 600 nm, which is

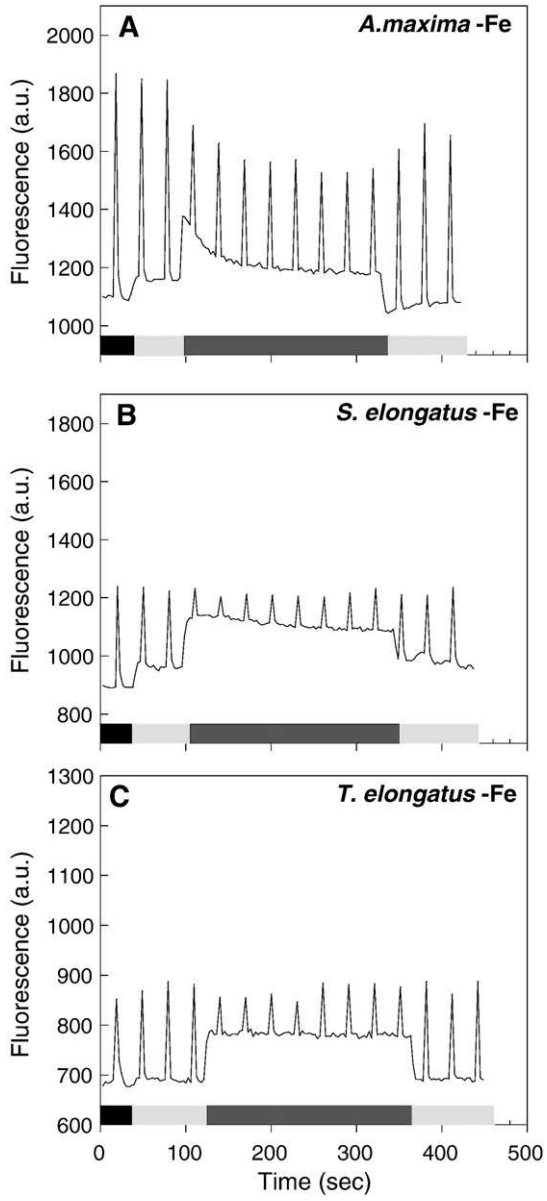


Fig. 3. Changes in fluorescence yield induced by high blue-green light in iron-starved *A. maxima* (A), *S. elongatus* (B) and *T. elongatus* (C) cells. 10 days iron-starved dark-adapted cells (at 3 μg Chl mL^{-1}) were illuminated successively with low (400–550 nm, 80 μmol photons m^{-2} s^{-1}) and high blue-green light (740 μmol photons m^{-2} s^{-1}); and then again with low blue-green light. Fluorescence yield changes were detected with a PAM fluorometer and saturating pulses were applied to measure maximal fluorescence levels.

preferentially absorbed by the PC-rich PBs, were used to monitor the changes in the photosynthetic apparatus under iron starvation. When iron-replete and iron-deplete *A. maxima, T. elongatus* and *S. elongatus* cells were excited at 430 nm (Fig. 6), the 77 K fluorescence spectra showed bands at 685 nm and 695 nm related to the inner antennae CP43 and CP47 of PSII, respectively [55,56] and a larger PSI-related band at 730 nm. The PSI to PSII ratio appeared to differ among strains, being higher in *A. maxima* and *T. elongatus* than in *S. elongatus*. First, an increase in the fluorescence PSII (685 and 695 nm peaks) to PSI ratio was observed. This is in accordance with the fact that the content of PSI which contains 4Fe-S centers, decreased faster than that of PSII [49,52,57]. It was also proposed that the increase of the PSII to PSI fluorescence ratio reflects that the dark iron-replete cells are in State 2 while the dark iron-depleted cells are in State 1 [58]. All strains then showed a marked increase of the emission at 685 nm relative to that at 695 nm. This increase is related to the accumulation of IsiA aggregates not associated to PSI, as previously described by Yeremenko et al. [59]. We also observed in the three strains the typical shift of the PSI-related peak from 730 nm to 725 nm, related to IsiA complexes surrounding PSI [29,57,60,61] (Fig. 6).

When 600 nm light was used for excitation, the resulting 77 K fluorescence emission spectrum presented bands related to PC (650 nm), APC (660 nm), PSII (685 and 695 nm), and PSI (730 nm) (Fig. 7). Fluorescence emission from both the CP47 and the reaction centre II contributed to the 695 nm emission. The emission at 685 nm is principally related to the PB terminal emitter and, to a lesser extent to the CP43 antenna of PSII [7,56]. When empty IsiA complexes are present, their fluorescence emission also contributes to the 685 nm peak. In the early phases of iron starvation, *A. maxima* cells showed an increase in the ratio of PSII fluorescence (685 and 695 nm peaks) to PSI fluorescence. This was concomitant with a higher Fv to Fo ratio suggesting an increased PSII to PSI ratio. Then, extended iron starvation resulted in a large emission at 685 nm, thought to principally result from the accumulation of functionally disconnected, therefore highly fluorescent PBs, as previously described in iron-starved *Synechocystis* cells [21]. In contrast, in *T. elongatus* and *S. elongatus* iron-starved cells, although an increase in the fluorescence PSII to PSI ratio was also observed, the fluorescence emission related to the whole PBs (685 nm) as well as those related to PC and APC (650–660 nm) decreased indicating that in these strains there is no accumulation of functionally uncoupled PBs. Thus, *T. elongatus* and *S. elongatus* cells behave differently than *Synechocystis* and *A. maxima* cells under iron-starvation conditions: in the former strains, phycobiliprotein content decreases faster than Chl content and there is no accumulation of functionally uncoupled PBs. This is probably essential for the longer survival of the cells in the absence of the photoprotective blue-green light induced NPQ mechanism.

3.5. Photoinhibition in strains containing or not OCP

NPQ is associated to mechanisms that protect higher plants from high light particularly under conditions of fluctuating light intensities [62]. Thus, we tested the sensitivity of OCP-containing and -lacking strains to several short periods of high light intensities. For this study, we used *A. maxima* cells with large (induced by 15 days iron starvation) and small NPQ, *Synechocystis* cells with relatively small NPQ and *S. elongatus* and *T. elongatus* without NPQ. Fig. 8 shows the variations of Fm' in cells adapted to low intensities of blue-green light that were transiently illuminated with saturating white light. Fm'

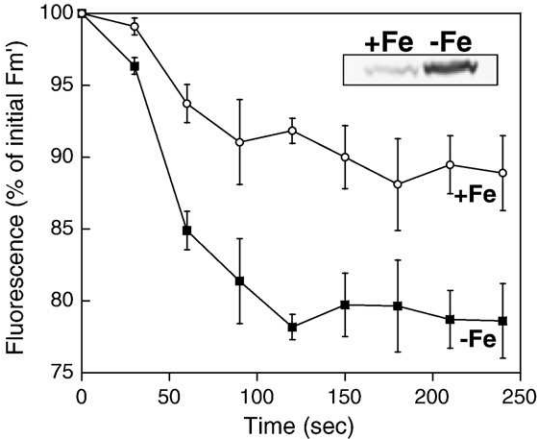
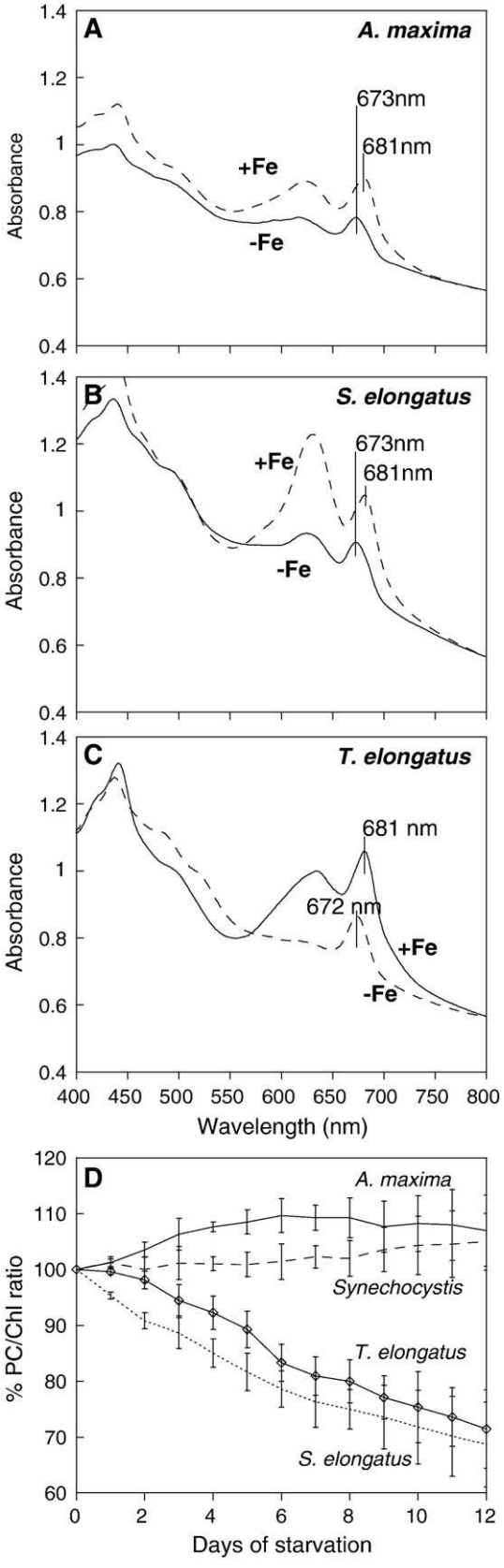


Fig. 4. Blue-green light induced fluorescence quenching in iron-replete and iron-deplete *A. maxima* cells. Blue-green light induced decrease of the maximum fluorescence level (Fm') measured by saturating flashes with a PAM fluorometer, in iron-containing (+Fe) and 10 days iron-starved (−Fe) *A. maxima* cells. Insert: OCP immunoblot of MP fractions from these cells (each lane contained 1 μg of Chl). The data represent the mean of 3 independent measurements with the indicated standard deviation.

levels decreased in all the strains. Upon return to the initial low intensities of blue-green light, a large recovery of Fm' was observed in the OCP-containing strains *A. maxima* and *Synechocystis* (Fig. 8). Thus, the Fm' decrease was largely related to NPQ and not to photoinhibition. In contrast, in *T. elongatus* and *S. elongatus* cells, which are not able to induce NPQ, Fm' decreased as a result of photoinhibition with almost no recovery (only 5%), within the 20 min following the high-light treatment. These results also show that high irradiances of white



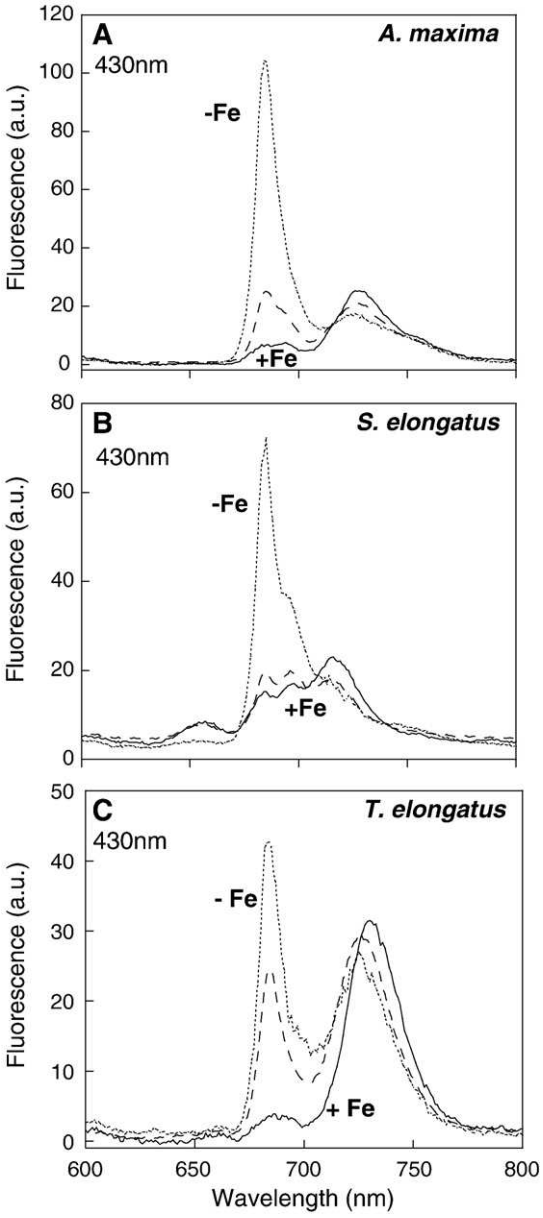


Fig. 6. Variations of 77 K fluorescence emission spectra (excitation at 430 nm) induced by iron starvation in *A. maxima* (A), *S. elongatus* (B) and *T. elongatus* (C) cells. The 77 K fluorescence spectra of iron-replete cells (solid line, +Fe), 6 days iron-depleted cells (dashed line, −Fe) and 10 days iron-depleted cells (dotted line, −Fe). The cells were at 3 μg Chl mL^{-1}. The 77 K fluorescence spectra were normalized to the fluorescence emitted at 800 nm. Each spectrum is the mean of 3 replicates. The figure shows a representative iron-starvation experiment; the experiments consistently showed similar fluorescence changes and kinetics.

Fig. 5. Variations of the cell absorption properties during iron starvation in *A. maxima*, *S. elongatus* and *T. elongatus cells*. Absorbance spectra of iron-containing (solid line, +Fe) and 10 days iron-starved (dashed line, −Fe) (A) *A. maxima*, (B) *S. elongatus* and (C) *T. elongatus* cells. The absorbance spectra were normalized to the absorbance at 800 nm. (D) Changes in the Phycocyanin (PC) to Chl ratio during iron starvation in *A. maxima* (solid line), *Synechocystis* (dashed line), *T. elongatus* (solid line with diamonds) and *S. elongatus* (dotted line). The variations are shown as percentages of iron-replete cells. Each curve is the mean of 3 replicates with error bar representing standard deviation.

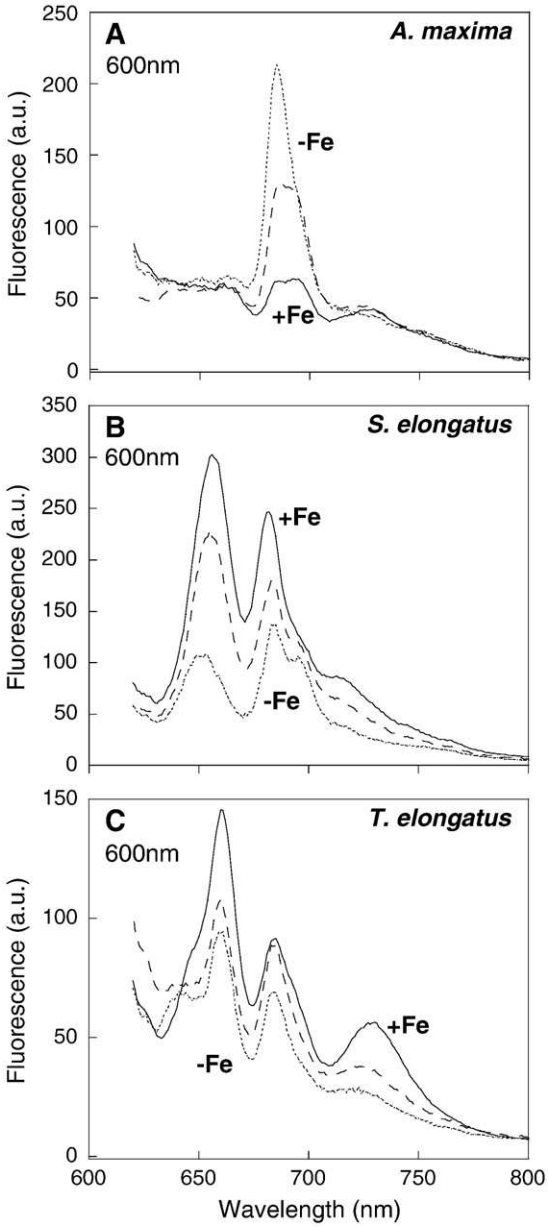


Fig. 7. Variations in 77 K fluorescence emission spectra (excitation at 600 nm) induced by iron starvation in *A. maxima* (A), *S. elongatus* (B) and *T. elongatus* (C) cells. 77 K fluorescence spectra of iron-replete cells (solid line, +Fe), 6 days iron-depleted cells (dashed line, −Fe) and 10 days iron-depleted cells (dotted line, −Fe). The cells were at 3 μg Chl mL^{-1}. The 77 K fluorescence spectra were normalized to the fluorescence emitted at 800 nm. Each spectrum is the mean of 3 replicates. The figure shows a representative iron-starvation experiment; the experiments consistently showed similar fluorescence changes and kinetics.

light are, like blue-green ones, unable to induce NPQ in *T. elongatus* and *S. elongatus*.

We also performed a series of longer photoinhibitory treatments. The cells were illuminated with 4 and 6 periods of 2 min of saturating white light. Between the high-light periods and at the end of the white light illumination the cells were illuminated with low intensities of blue-green light (20 min). After the relaxation of the fluorescence quenching associated to the photoprotective mechanism, the variable fluorescence (Fv = Fm' − Fo) was measured and compared to the initial Fv as a measure of photoinhibition (Table 2). Longer illumination induced higher Fv loss in all strains, but the Fv loss was more pronounced in the strains lacking the OCP. Moreover, the loss of variable fluorescence seemed to be negatively correlated to the NPQ

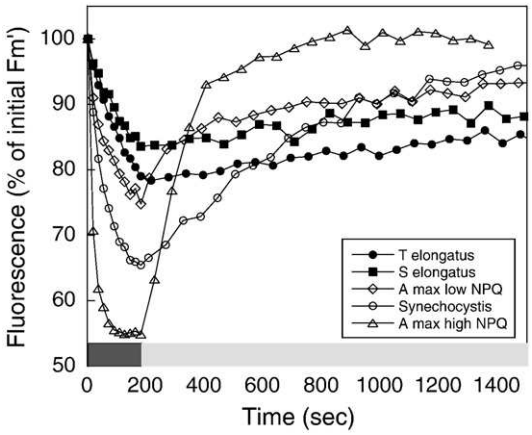


Fig. 8. Photoinhibition in *A. maxima*, *Synechocystis*, *S. elongatus* and *T. elongatus cells*. Changes in maximal fluorescence levels (Fm') during different illuminations in (A) *A. maxima* (15 days iron-starved), (B) *Synechocystis*, (C) *A. maxima* (iron-replete), (D) *T. elongatus* and (E) *S. elongatus* cells. Dark-adapted cells (at 3 μg Chl mL^{-1}) were pre-illuminated with low blue light (400–550 nm, 80 μmol photons m^{-2} s^{-1}), illuminated for 3 min with saturating white light (2500 μmol photons m^{-2} s^{-1}) and then again with low blue-green light. Fluorescence yield changes were detected with a PAM fluorometer and saturating pulses were applied to measure maximal fluorescence levels.

induction: after 12 min of high-light illumination (6 periods of 2 min) *S. elongatus* and *T. elongatus* lost about 60% of initial Fv, *Synechocystis* and *A. maxima* (low NPQ) about 40% and *A. maxima* (high NPQ) about 30% (Table 2). It is also of note that a larger Fv decrease was induced in *T. elongatus* cells than in *S. elongatus* suggesting a slightly higher sensitivity to high light of the former strain.

3.6. State transitions under iron starvation

We also tested the behavior of these strains under different light qualities. We recorded fluorescence traces of dark-adapted iron-replete and iron-depleted *A. maxima*, *S. elongatus* and *T. elongatus* cells successively illuminated by dim blue-green light and dim orange light (Fig. 9). As mentioned above, dark-adapted cyanobacteria cells are typically in State 2 [44,45]. Upon illumination of iron-replete cells by low blue-green light an increase of the maximal fluorescence level (Fm') was observed and State 1 was reached. When the blue-light acclimated cells were illuminated with orange light, efficiently absorbed by phycocyanobilin-rich PBs and preferentially transferred to PSII thus inducing the reduction of the PQ pool, a decrease of the Fm' level, characteristic of the transition to State 2, was observed (Fig. 9A, C and E). The kinetics of state transitions were slower in *S. elongatus* cells compared to the other two strains (Fig. 9). State transitions were completely inhibited in 10 days iron-starved *A. maxima*, *S. elongatus* and *T. elongatus* cells (Fig. 9B, D and F, respectively). Fm' remained at the dark Fm_d level during the blue

Table 2
Decrease of variable fluorescence (Fv) during illumination with high intensities of white light

	3 min (% of initial Fv±5%)	8 min (% of initial Fv±5%)	12 min (% of initial Fv±5%)
A maxima(high NPQ)	98	81	70
A maxima(low NPQ)	86	74	61.5
Synechocystis	88	75	61
S elongatus	80	62	42
T elongatus	75	57	38

Cells were illuminated with high intensities of white light (2500 μmol photons m^{-2} s^{-1}) for 3 min, 8 min (4 periods of 2 min separated by 5 min of low blue-light) and 12 min (6 periods of 2 min separated by 5 min of low blue light) and then with low intensities of blue light. The Fv was measured 20 min after the last period of white light in order to ensure the relaxation of the fluorescence quenching related to the photoprotection mechanism.

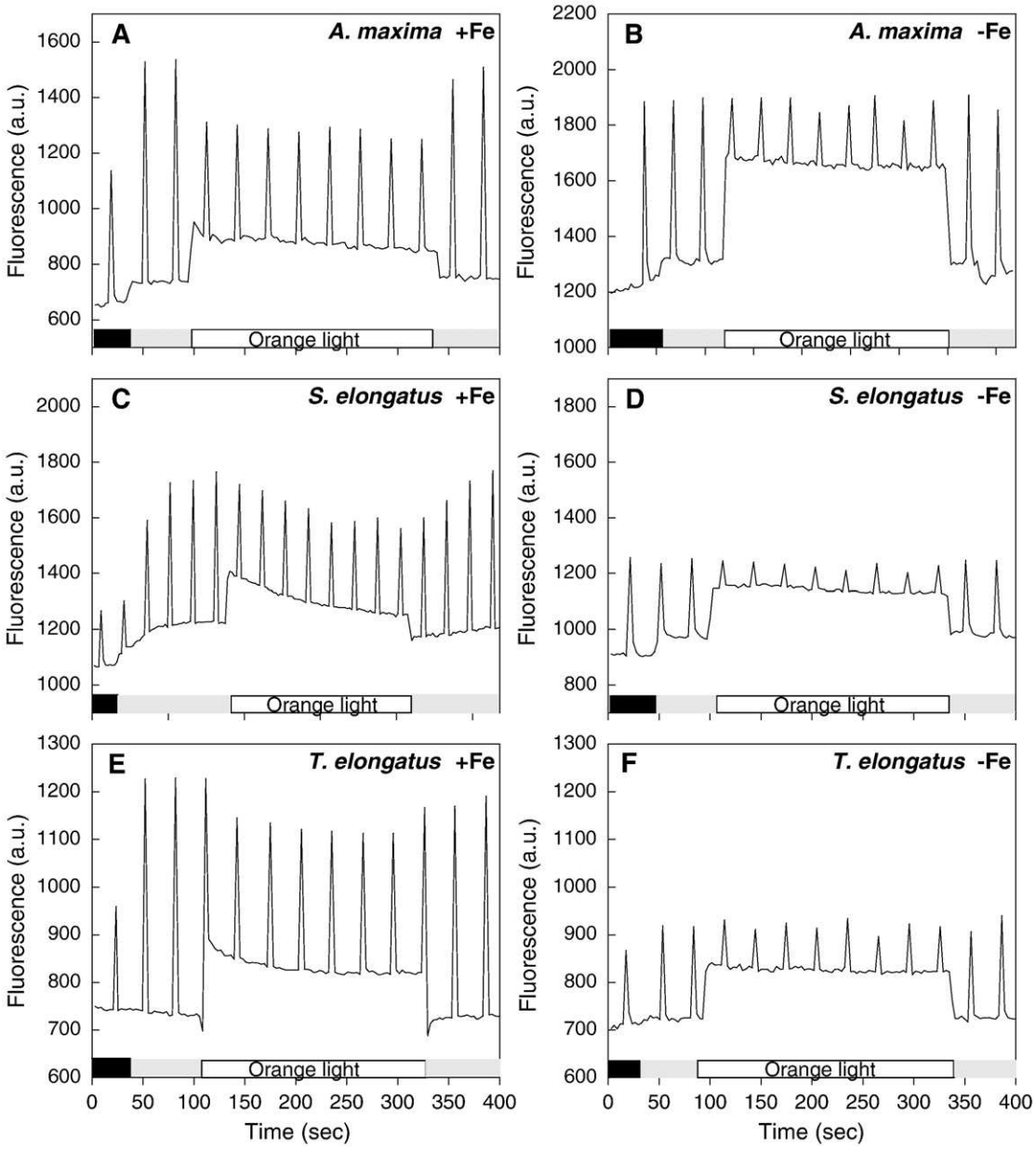


Fig. 9. State transitions in *T. elongatus* (A, B), *A. maxima* (C, D) and *S. elongatus* (E, F) in the presence (A, C, E) (+Fe) and absence of iron (B, D, F) (−Fe). Dark-adapted iron-replete and 10 days iron-starved *T. elongatus*, *A. maxima* and *S. elongatus* cells (at 3 μg Chl mL^{-1}) were illuminated successively with low blue-green light (400–550 nm, 80 μmol photons m^{-2} s^{-1}) and dim orange light (20 μmol photons m^{-2} s^{-1}), and then again with dim blue-green light. Fluorescence yield changes were detected with a PAM fluorometer and saturating pulses were applied to measure maximal fluorescence levels.

and orange illumination. It is worth noting that under the same intensity of orange light, the Fs level was higher in iron-starved cells than in non-starved cells, indicating a higher concentration of Q_A^- and close reaction centers. This is in accordance with a more reduced PQ pool due to the higher PSII to PSI ratio in iron-starved cells and to a restricted photosynthetic intersystem electron transport [63].

4. Discussion

We recently demonstrated that the OCP is essential for the buildup of blue-green-light induced NPQ in *Synechocystis* PCC 6803, and we here extend this observation to other cyanobacteria strains. Many cyanobacteria, within a large phylogenetic range and from diverse habitats, contain homologs of the *Synechocystis slr1963* gene, suggesting that this cyanobacterial gene plays an important role in the physiology of these organisms. We studied seven of these strains, showed that the whole OCP protein is present in all of them and that they are all able to perform blue-green light induced NPQ. In contrast, in the OCP-lacking strains we tested, the mechanism appeared to be inexistent. These results thus strongly suggest that blue-green light induced NPQ existence is correlated to the presence of the OCP gene.

A number of cyanobacterial genomes contain gene fragments encoding either the C- or the N-terminal part of the OCP. In *Nostoc punctiforme* several of the N-terminal paralogs are expressed [64] but we do not know if this is also the case in other cyanobacteria. Our results showed that in *T. elongatus*, the resulting proteins, if they are translated, do not allow NPQ induction. The function of the OCP N- and C-terminal gene products, if they have one, is still to be determined. It is also possible that these dispersed, more or less conserved gene fragments are the result of successive duplication and recombination

events and that, although being translated, do not have a precise function in the cell.

A question that remains open is why a few strains of cyanobacteria do not contain the OCP and its associated photoprotective mechanism. Their absence in the thermophilic cyanobacteria such as *T. elongatus* could be explained by their peculiar ecological niche, but the cases of the freshwater *S. elongatus* PCC 7942, PCC 6301 strains and the marine *Synechococcus* CC9605 and *Crocosphaera watsonii* WH8501 strains are more intriguing, since they share their habitat with OCP-containing cyanobacteria.

The presence or absence of the OCP does not affect state transitions. Iron-replete cells of all tested strains were in State 2 under dark and orange light conditions and in State 1 under low blue-light conditions. Illumination of iron-starved cells by blue light did not induce an increase of fluorescence as already observed by Ivanov et al. [58]. Moreover, orange illumination of blue-light adapted cells did not induce any change of fluorescence. Thus in all iron-starved cells state transitions were inhibited.

It has been shown in a *Synechocystis* OCP-lacking mutant, which is unable to induce NPQ, that high-light sensitivity is enhanced. The oxygen evolving activity decreased faster in the mutant than in the wild-type when exposed to high light [20]. The mutant moreover lost 35% of its initial F_V, while the wild-type lost only 15% after 2 min of high-light illumination [20]. Our results strongly suggest that strains containing the OCP and showing blue-green light induced NPQ are more resistant to episodes of high-light irradiance than strains lacking the OCP. It is delicate to compare the light sensitivity of different strains exhibiting different PSI to PSII ratio and PB content. The rate of photoinhibition depends on the energy arriving to the PSII and on the balance between PSII and PSI activities: bigger antenna and/or more reduced PQ pool induce stronger photoinhibition at a same light intensity [13,14,16]. Our results however suggest a relationship between the resistance to high light and the ability to perform blue-green light induced NPQ, independently of these physiological ratios. *S. elongatus* and *T. elongatus*, which cannot induce NPQ, indeed show different PSI to PSII and phycobiliprotein to Chl ratios and they presented the largest sensitivity to high light. On the other hand, although 15-days iron-starved *A. maxima* cells presented higher PSII to PSI ratio and higher PBs to Chl ratio than non-starved cells, they were more resistant to high-light intensities, displaying a stronger NPQ.

Our results showed that most changes of the photosynthetic apparatus induced by iron starvation were independent of the presence or absence of OCP. Indeed, in the iron-starved cells of all the studied strains containing or lacking OCP, we observed the accumulation of the ring-forming IsiA protein typically indicated by the blue shift of the 683 nm Chl absorption peak [29,30] and the 77 K fluorescence PSI emission [29,57,60,61], with a specific increase of the 685 nm 77 K fluorescence emission [59]. In addition, the content of PC and Chl as well as that of PSI and PSII was lower in iron-deplete than in iron-replete cells [49–52].

Iron-starved *Synechocystis* PSII-less [38], IsiA-less and WT cells [21] accumulate functionally disconnected, highly fluorescent PBs with an increase of blue-green light induced NPQ, concomitantly to an increase of the OCP to Chl ratio [21]. Here, we showed that another OCP-containing strain, *A. maxima*, behaves as *Synechocystis* under iron starvation. Extended iron-starved *A. maxima* cells indeed presented a higher Fo level and a large 685 nm fluorescence emission peak in the 77 K fluorescence spectrum (excitation at 600 nm) indicating an increase of functionally disconnected PBs. In these iron-depleted cells, an increased NPQ, probably related to the higher OCP to Chl ratio, was observed. In contrast, in the OCP-lacking strains, appearance of functionally disconnected PBs was completely avoided by quickly decreasing the phycobiliprotein cell content. The phycobiliprotein to Chl absorbance ratio decreased during iron starvation in these strains, while remaining constant in *Synechocystis* and *A. maxima* cells. These results support the hypothesis that these functionally disconnected PBs are 'dangerous' for the cells because they may transfer excess absorbed energy to the thylakoids. This may induce oxidative damage (e.g. peroxidation of lipids) that cannot be thermally dissipated at the level of the PBs or the IsiA complexes [21,31]. Thus, when cyanobacteria are unable to reduce the amount of energy arriving to the thylakoids from the PBs, they protect themselves by decreasing the PB to photosystem ratio.

5. Conclusions

Our study suggests that most cyanobacteria protect themselves from light fluctuations using the energy dissipation OCP-PB mechanism previously discovered in *Synechocystis*. The few strains unable to perform this process are more sensitive to photoinhibitory conditions and have adopted different physiological strategies to endure stressful conditions such as iron-deficiency. If the OCP is as widespread in nature as it seems to be, its presence in the cyanobacterial radiation has played a key role in the ability of these organisms to regulate light utilisation, and has allowed them to thrive in many ecological niches.

Acknowledgements

Thanks to Pr JC Thomas (ENS, Paris) for kindly providing the *Arthrospira maxima* and *Anabaena variabilis* strains and Dr Ghada Ajlani (CNRS, Saclay) for kindly providing *Synechococcus elongatus*. The research was partially supported by EU network INTRO2.

References

[1] N. Adir, Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant, Photosynth. Res. 85 (2005) 15–32.
[2] A.N. Glazer, Phycobilisome — a macromolecular complex optimized for light energy-transfer, Biochim. Biophys. Acta 768 (1984) 29–51.
[3] A.R. Grossman, M.R. Schaefer, G.G. Chiang, J.L. Collier, The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental-conditions, Microbiol. Rev. 57 (1993) 725–749.
[4] R. MacColl, Cyanobacterial phycobilisomes, J. Struct. Biol. 124 (1998) 311–334.
[5] N. Tandeau de Marsac, Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations, Photosynth. Res. 76 (2003) 197–205.
[6] E. Gantt, S.F. Conti, Phycobiliprotein localization in algae, Brookhaven Symp. Biol. 19 (1966) 393–405.
[7] T. Redlinger, E. Gantt, A M(r) 95,000 polypeptide in Porphyridium cruentum phycobilisomes and thylakoids: possible function in linkage of phycobilisomes to thylakoids and in energy transfer, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79 (1982) 5542–5546.
[8] C.W. Mullineaux, Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem-I in a cyanobacterium, Biochim. Biophys. Acta 1100 (1992) 285–292.
[9] M.G. Rakhimberdieva, V.A. Boichenko, N.V. Karapetyan, I.N. Stadnichuk, Interaction of phycobilisomes with photosystem II dimers and photosystem I monomers and trimers in the cyanobacterium *Spirulina platensis*, Biochemistry 40 (2001) 15780–15788.
[10] J.J. van Thor, C.W. Mullineaux, H.C.P. Matthijs, K.J. Hellingwert, Light harvesting and state transitions in cyanobacteria, Botanica Acta 111 (1998) 430–443.
[11] W.P. Williams, J.F. Allen, State 1/State 2 changes in higher-plants and algae, Photosynth. Res. 13 (1987) 19–45.
[12] F.A. Wollman, State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus, EMBO J. 20 (2001) 3623–3630.
[13] E.M. Aro, I. Virgin, B. Andersson, Photoinhibition of photosystem II, inactivation, protein damage and turnover, Biochim. Biophys. Acta 1143 (1993) 113–134.
[14] O. Prasil, N. Adir, I. Ohad, Dynamics of photosystem II: mechanism of photoinhibition and recovery processes, in: J. Barber (Ed.), The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1992, pp. 295–348.
[15] E. Tyystjärvi, Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster, Coordination Chem. Rev. 252 (2008) 361–376.
[16] I. Vass, E.M. Aro, Photoinhibition of Photosystem II electron transport, in: G. Renger (Ed.), Primary Processes of Photosynthesis: Basic Principles and Apparatus, Roy. Soc. Chem., Cambridge, 2007, pp. 393–411.
[17] K. El Bissati, E. Delphin, N. Murata, A. Etienne, D. Kirilovsky, Photosystem II fluorescence quenching in the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803: involvement of two different mechanisms, Biochim. Biophys. Acta 1457 (2000) 229–242.
[18] M.G. Rakhimberdieva, I.N. Stadnichuk, I.V. Elanskaya, N.V. Karapetyan, Carotenoid-induced quenching of the phycobilisome fluorescence in photosystem II-deficient mutant of *Synechocystis* sp, FEBS Lett. 574 (2004) 85–88.
[19] M. Scott, C. McCollum, S. Vasil'ev, C. Crozier, G.S. Espie, M. Krol, N.P. Huner, D. Bruce, Mechanism of the down regulation of photosynthesis by blue light

in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, Biochemistry 45 (2006) 8952–8958.
[20] A. Wilson, G. Ajlani, J.M. Verbavatz, I. Vass, C.A. Kerfeld, D. Kirilovsky, A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria, Plant Cell 18 (2006) 992–1007.
[21] A. Wilson, C. Boulay, A. Wilde, C.A. Kerfeld, D. Kirilovsky, Light-induced energy dissipation in iron-starved cyanobacteria: roles of OCP and IsiA proteins, Plant Cell 19 (2007) 656–672.
[22] T.K. Holt, D.W. Krogmann, A carotenoid-protein from cyanobacteria, Biochim. Biophys. Acta 637 (1981) 408–414.
[23] C.A. Kerfeld, Structure and function of the water-soluble carotenoid-binding proteins of cyanobacteria, Photosynth. Res. 81 (2004) 215–225.
[24] C.A. Kerfeld, Water-soluble carotenoid proteins of cyanobacteria, Arch. Biochem. Biophys. 430 (2004) 2–9.
[25] Y.P. Wu, D.W. Krogmann, The orange carotenoid protein of *Synechocystis* PCC 6803, Biochim. Biophys. Acta 1322 (1997) 1–7.
[26] C.A. Kerfeld, M.R. Sawaya, V. Brahmandam, D. Cascio, K.K. Ho, C.C. Trevithick-Sutton, D.W. Krogmann, T.O. Yeates, The crystal structure of a cyanobacterial water-soluble carotenoid binding protein, Structure 11 (2003) 55–65.
[27] A. Wilson, A. Gall, C. Bonetti, M. Alexandre, J.M. Routaboul, C.A. Kerfeld, R. van Grondelle, B. Robert, J.T.M. Kennis, D. Kirilovsky, A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105 (2008) 12075–12080.
[28] T. Polivka, C.A. Kerfeld, T. Pascher, V. Sundström, Spectroscopic properties of the carotenoid 3'-hydroxyechinenone in the orange carotenoid protein from the cyanobacterium *Arthrospira maxima*, Biochemistry 44 (2005) 3994–4003.
[29] R.L. Burnap, T. Troyan, L.A. Sherman, The highly abundant chlorophyll-protein complex of iron-deficient *Synechococcus* sp PCC 7942 (CP43) is encoded by the isiA Gene, Plant Physiol. 103 (1993) 893–902.
[30] D.E. Laudenbach, N.A. Straus, Characterization of a cyanobacterial iron stress-induced gene similar to psbC, J. Bacteriol. 170 (1988) 5018–5026.
[31] M. Havaux, G. Guedeney, M. Hagemann, N. Yeremenko, H.C.P. Matthijs, R. Jeanjean, The chlorophyll-binding protein IsiA is inducible by high light and protects the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 from photooxidative stress, FEBS Lett. 579 (2005) 2289–2293.
[32] R. Jeanjean, E. Zuther, N. Yeremenko, M. Havaux, H.C. Matthijs, M. Hagemann, A photosystem 1 psaFJ-null mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 expresses the isiAB operon under iron replete conditions, FEBS Lett. 549 (2003) 52–56.
[33] N. Yousef, E.K. Pistorius, K.P. Michel, Comparative analysis of idiA and isiA transcription under iron starvation and oxidative stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 wild-type and selected mutants, Arch. Microbiol. 180 (2003) 471–483.
[34] T.S. Bibby, J. Nield, J. Barber, Iron deficiency induces the formation of an antenna ring around trimeric photosystem I in cyanobacteria, Nature 412 (2001) 743–745.
[35] E.J. Boekema, A. Hifney, A.E. Yakushevska, M. Piotrowski, W. Keegstra, S. Berry, K.P. Michel, E.K. Pistorius, J. Kruip, A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria, Nature 412 (2001) 745–748.
[36] J.C. Cadoret, R. Demouliere, J. Lavaud, H.J. van Gorkom, J. Houmard, A.L. Etienne, Dissipation of excess energy triggered by blue light in cyanobacteria with CP43' (IsiA), Biochim. Biophys. Acta 1659 (2004) 100–104.
[37] S. Joshua, S. Bailey, N.H. Mann, C.W. Mullineaux, Involvement of phycobilisome diffusion in energy quenching in cyanobacteria, Plant Physiol. 138 (2005) 1577–1585.
[38] M.G. Rakhimberdieva, D.V. Vavilin, W.F. Vermaas, I.V. Elanskaya, N.V. Karapetyan, Phycobilin/chlorophyll excitation equilibration upon carotenoid-induced non-photochemical fluorescence quenching in phycobilisomes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, Biochim. Biophys. Acta 1767 (2007) 757–765.
[39] M. Herdman, S.F. Delaney, N.G. Carr, A new medium for the isolation and growth of auxotrophic mutants of the blue-green alga *Anacystis nidulans*, J. Gen. Microbiol. 79 (1973) 233–237.
[40] U. Mühlenhoff, F. Chauvat, Gene transfer and manipulation in the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*, Mol. Gen. Genet. 252 (1996) 93–100.
[41] R. Rippka, T. Coursin, W. Hess, C. Lichtle, D.J. Scanlan, K.A. Palinska, I. Iteman, F. Partensky, J. Houmard, M. Herdman, Prochlorococcus marinus Chisholm et al. 1992 subsp pastoris subsp nov strain PCC 9511, the first axenic chlorophyll a (2)/b(2)-containing cyanobacterium (*Oxyphotobacteria*), Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50 (2000) 1833–1847.
[42] N.J. Fuller, D. Marie, F. Partensky, D. Vaulot, A.F. Post, D.J. Scanlan, Clade-specific 16S ribosomal DNA oligonucleotides reveal the predominance of a single marine *Synechococcus clade* throughout a stratified water column in the Red Sea, Appl. Environ. Microbiol. 69 (2003) 2430–2443.
[43] Y. Kashino, H. Koike, K. Satoh, An improved sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis system for the analysis of membrane protein complexes, Electrophoresis 22 (2001) 1004–1007.
[44] P.J. Dominy, W.P. Williams, The role of respiratory electron flow in the control of excitation energy distribution in blue-green-algae, Biochim. Biophys. Acta 892 (1987) 264–274.
[45] C.W. Mullineaux, J.F. Allen, State 1-State 2 Transitions in the cyanobacterium Synechococcus 6301 are controlled by the redox state of electron carriers between Photosystem I and Photosystem II, Photosynth. Res. 23 (1990) 297–311.
[46] D. Campbell, V. Hurry, A.K. Clarke, P. Gustafsson, G. Öquist, Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 (1998) 667–683.
[47] K. El Bissati, D. Kirilovsky, Regulation of psbA and psaE expression by light quality in *Synechocystis* sp PCC 6803. A redox control mechanism, Plant Physiol. 125 (2001) 1988–2000.
[48] C. Six, J.C. Thomas, L. Garczarek, M. Ostrowski, A. Dufresne, N. Blot, D.J. Scanlan, F. Partensky, Diversity and evolution of phycobilisomes in marine *Synechococcus* sp: a comparative genomics study, Genome Biol. 8 (2007) R259.
[49] J.A. Guikema, L.A. Sherman, Organization and function of chlorophyll in membranes of cyanobacteria during iron starvation, Plant Physiol. 73 (1983) 250–256.
[50] G. Öquist, Changes in pigment composition and photosynthesis induced by iron-deficiency in the blue-green alga *Anacystis nidulans*, Physiol. Plant. 25 (1971) 188–197.
[51] G. Öquist, Iron deficiency in blue-green alga *Anacystis nidulans* — changes in pigmentation and photosynthesis, Physiol. Plant. 30 (1974) 30–37.
[52] G. Sandmann, Consequences of iron-deficiency on photosynthetic and respiratory electron transport in blue-green algae, Photosynth. Res. 6 (1985) 261–271.
[53] D.M. Sherman, L.A. Sherman, Effect of iron deficiency and iron restoration on ultrastructure of *Anacystis nidulans*, J. Bacteriol. 156 (1983) 393–401.
[54] S. Spiller, N. Terry, Limiting factors in photosynthesis: II. Iron stress diminishes photo-chemical capacity by reducing the number of photosynthetic units, Plant Physiol. 65 (1980) 121–125.
[55] D. Siefermann-Harms, Fluorescence properties of isolated chlorophyll-protein complexes, in: H. Lichtenthaler (Ed.), Application of Chlorophyll Fluorescence, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, 1988, pp. 45–54.
[56] R.J. Vandorssen, J.J. Plijter, J.P. Dekker, A. Denouden, J. Amesz, H.J. Vangorkom, Spectroscopic properties of chloroplast grana membranes and of the core of Photosystem II, Biochim. Biophys. Acta 890 (1987) 134–143.
[57] S. Falk, G. Samson, D. Bruce, N.P.A. Huner, D.E. Laudenbach, Functional-analysis of the iron-stress induced CP43' polypeptide of PS II in the cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC 7942, Photosynth. Res. 45 (1995) 51–60.
[58] A.G. Ivanov, M. Krol, D. Sveshnikov, E. Selstam, S. Sandström, M. Koochek, Y.I. Park, S. Vasil'ev, D. Bruce, G. Öquist, N.P.A. Huner, Iron deficiency in cyanobacteria causes monomerization of photosystem I trimers and reduces the capacity for state transitions and the effective absorption cross section of photosystem I in vivo, Plant Physiol. 141 (2006) 1436–1445.
[59] N. Yeremenko, R. Kouril, J.A. Ihalainen, S. D'Haene, N. van Oosterwijk, E.G. Andrizhiyevskaya, W. Keegstra, H.L. Dekker, M. Hagemann, E.J. Boekema, H.C. Matthijs, J.P. Dekker, Supramolecular organization and dual function of the IsiA chlorophyll-binding protein in cyanobacteria, Biochemistry 43 (2004) 10308–10313.
[60] G. Öquist, Iron deficiency in blue-green alga *Anacystis nidulans* — fluorescence and absorption spectra recorded at 77 degrees K, Physiol. Plant. 31 (1974) 55–58.
[61] Y.I. Park, S. Sandström, P. Gustafsson, G. Öquist, Expression of the isiA gene is essential for the survival of the cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC 7942 by protecting photosystem II from excess light under iron limitation, Mol. Microbiol. 32 (1999) 123–129.
[62] C. Kulheim, J. Agren, S. Jansson, Rapid regulation of light harvesting and plant fitness in the field, Science 297 (2002) 91–93.
[63] A.G. Ivanov, Y.I. Park, E. Miskiewicz, J.A. Raven, N.P.A. Huner, G. Öquist, Iron stress restricts photosynthetic intersystem electron transport in *Synechococcus* sp PCC 7942, FEBS Lett. 485 (2000) 173–177.
[64] D.C. Anderson, E.L. Campbell, J.C. Meeks, A soluble 3D LC/MS/MS proteome of the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme*, J. Proteome Res. 5 (2006) 3096–3104.

Characterization of the Orange Carotenoid Protein associated photo-protective mechanism in cyanobacteria

Cyanobacteria have developed a photoprotective mechanism, named qE_{cya}, to protect themselves from high light intensities. It diminishes the formation of dangerous oxygen species by increasing energy dissipation into heat and thus, decreases the energy arriving at the reaction centers from the phycobilisomes (PBS, the cyanobacterial external antennae). The mechanism is induced by the absorption of blue-green light by the carotenoid of the soluble photoactive Orange Carotenoid Protein, OCP. The process is accompanied by a reversible decrease (quenching) of fluorescence.

In this work, we first demonstrated that, in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 under iron starvation conditions, the large blue-green light-induced fluorescence quenching is related to OCP and its associated qE_{cya} mechanism, and not to the iron-starvation-induced IsiA protein. Then, I showed that the OCP and the qE_{cya} mechanism are widespread among phycobilisome-containing cyanobacteria. While in the OCP containing cyanobacteria, energy dissipation and fluorescence quenching are increased under stress conditions like iron starvation, another strategy based on a quick degradation of their PBS was developed in the few cyanobacteria without OCP.

Preliminary results about OCP-PBS interactions are also described. It was not possible to isolate OCP-containing-PBS. However after incubation of PBS in the presence of the OCP, I was able to isolated OCP-PBS complexes in a sucrose gadient, even when only the core of the PBS was put in the presence of the OCP. These results strongly suggest that OCP and the core of the PBS are interacting. However I did not succeed to induce the qE_{cya} mechanism in these purified OCP-PBS complexes *in vitro*.

The most important result of this PhD is the discovery and the first characterization of a new component essential for the qE_{cya} mechanism : a 13kDa protein strongly bound to the membrane encoded by the *slr*1964 gene in *Synechocystis* PCC 6803. This protein appeared to be conserved in almost all the OCP cyanobacteria. We have named this protein the Fluorescence Recovery Protein, FRP, because it is involved in the recovery of the phycobilisome fluorescence quenching induced by strong blue-green light. The characterization of the *slr*1964 gene showed that it is conserved downstream to the gene of OCP in cyanobacteria, and that it can be transcribed independantly or co-transcribed with the gene of OCP. Our results also strongly suggested that the FRP and the OCP interact.

Caractérisation du mécanisme de photo-protection impliquant l'Orange Carotenoid Protein chez les cyanobactéries

Pour se protéger des fortes illuminations, les cyanobactéries ont développé un mécanisme de photo-protection nommé qE_{cya}. Sous forte lumière, il diminue la formation d'espèces dérivées de l'oxygène très réactives et dangereuses, en augmentant la dissipation de l'énergie absorbée sous forme de chaleur. L'énergie provenant des phycobilisomes (PBS, les antennes externes des cyanobactéries) atteignant les centres réactionnels est ainsi diminuée. Le mécanisme est induit par l'absorption de la lumière bleue-verte par une protéine photoactive soluble qui attache un caroténoïde : l'Orange Carotenoid Protein (OCP). Le processus est accompagné d'une diminution de fluorescence réversible.

Dans une étude sur les mécanismes de photo-protection sous carence en fer, nous avons montré que le large quenching de fluorescence induit par la lumière bleue-verte est associé à l'OCP et au mécanisme qE_{cya}. Et qu'il n'est pas associé à la protéine IsiA induite sous carence en fer comme cela avait été suggéré dans le passé. Ensuite, j'ai montré que l'OCP et son mécanisme de photo-protection associé sont répandus chez les cyanobactéries à phycobilisomes. Alors que les cyanobactéries contenant l'OCP augmentent leur dissipation d'énergie au niveau des phycobilisomes pour diminuer l'énergie arrivant aux centres réactionnels, il est apparu que les quelques cyanobactéries ne contenant pas l'OCP ont développé une autre stratégie basée sur la dégradation rapide de leurs phycobilisomes en condition de stress.

Des résultats préliminaires sur les interactions OCP-PBS sont aussi décrits dans ce travail. Des PBS incubés en présence de l'OCP ont été co-isolés en complexes OCP-PBS dans un gradient de saccharose, même quand seulement des cœurs de PBS ont été mis en présence de l'OCP. Ces résultats suggèrent fortement que l'OCP et les PBS interagissent. Cependant le mécanisme qE_{cya} n'a pas pu être induit *in vitro* sur ces complexes OCP-PBS purifiés.

Le résultat principal de cette thèse est la découverte d'un nouvel acteur essentiel au mécanisme qE_{cya}: une protéine de 13kDa fortement attachée à la membrane. Nous l'avons nommée la Fluorescence Recovery Protein, FRP, car elle est impliquée dans la récupération de l'émission de fluorescence des phycobilisomes dans le mécanisme qE_{cya} après une forte illumination de lumière bleue-verte. La caractérisation de son gène, *slr*1964, a montré qu'il est conservé en aval du gène de l'OCP chez les cyanobactéries, et qu'il peut être transcrit indépendamment ou co-transcrit avec le gène de l'OCP. De plus, notre étude suggère fortement que l'OCP et la FRP interagissent.