HAL
open science

Adaptation des cyanobactéries marines du genre Synechococcus au gradient latitudinal de température

Justine Pittera

To cite this version:

Justine Pittera. Adaptation des cyanobactéries marines du genre Synechococcus au gradient latitudinal de température. Océanographie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066505 . tel-01486637v1

HAL Id: tel-01486637

https://theses.hal.science/tel-01486637v1

Submitted on 10 Mar 2017 (v1), last revised 14 Mar 2017 (v2)

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.

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité Océanographie Biologique
Ecole Doctorale Sciences de l'Environnement d'Ile de France (ED129)

Présentée par

Justine PITTERA

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

ADAPTATION DES CYANOBACTERIES MARINES DU GENRE *SYNECHOCOCCUS* AU GRADIENT LATITUDINAL DE TEMPERATURE

Soutenue le 17 décembre 2015, devant le jury composé de :

Dr. Christophe Six ..... **Directeur de thèse**
Université Pierre et Marie Curie

Dr. Frédéric Partensky ..... **Co-directeur de thèse**
Université Pierre et Marie Curie

Pr. Jose Manuel Garcia Fernandez ..... **Rapporteur**
Université de Cordoue

Pr. Conrad Mullineaux ..... **Rapporteur**
Université de Londres

Dr. Jean-François Humbert ..... **Examinateur**
Institut d'écologie et des Sciences de l'Environnement

Dr. Angela Falciatore ..... **Examinateur**
Université Pierre et Marie Curie

Pr. Eric Thiébaut ..... **Examinateur**
Université Pierre et Marie Curie

Equipe Procaryotes Phototrophes Marins
UMR UPMC-CNRS 7144 Adaptation et Diversité en Milieu Marin

« La persévérance est au courage ce que la roue est au levier,
c’est le renouvellement perpétuel du point d’appui »
Victor Hugo

Je remercie les membres de mon jury de thèse, Jose Garcia Fernandez,
Conrad Mullineaux, Angela Falciatore, Jean François Humbert
et Eric Thiébaut d'avoir bien voulu lire et juger ce travail.

Je remercie la plateforme METATOUL, Justine Bertrand-Michel et Fabien Riols
pour les analyses d'acides gras, ainsi que la platerforme METABOMER ,
Fanny Gaillard et Karine Cahier, pour les analyses de lipides.

Merci à l'Université Pierre et Marie Curie pour avoir financé ces trois années de thèse roscovite,
ainsi qu'aux ANR SAMOSA et PELICAN qui ont supporté mes travaux.

MERSI BRAS…

J'y suis… ou presque. Il ne me reste plus que quelques pages à écrire, mais finalement pas les plus simples !

L'aboutissement de mes travaux de thèse repose en grande partie sur la qualité de l'encadrement dont j'ai bénéficié, c'est donc une évidence, mes premiers remerciements s'adressent à Christophe, mon directeur de thèse. Merci pour cette aventure ! La science est un ascenseur émotionnel, dans lequel je suis montée en novembre 2011, lorsque tu m'annonçais que je pouvais préparer mes valises pour venir faire mon stage de M2 à Roscoff. Les six mois de stage m'ont vite convaincue ! Malgré les (lourdes) contraintes climatiques, je ne résistais pas à la tentation d'en apprendre plus sur Syn*. Je te remercie de m'avoir donné cette opportunité extraordinaire, et d'avoir été là au cours de ces trois années. Merci pour tes avis éclairés tout au long de cette thèse, pour le fil conducteur que tu lui as donné, et nos discussions scientifiques du vendredi soir qui n'en finissaient pas et qui étaient tellement enrichissantes au déroulé de ma thèse. Merci également pour ta rigueur et ton perfectionnisme… Au détriment du développement de troubles compulsifs d'alignements de figures, j'ai apprécié travailler de cette façon. Merci également pour ton calme dans les moments où je l'étais moins… J'en profite pour te remercier de m'avoir donné l'opportunité de participer à l'enseignement, expérience à travers laquelle j'ai pris beaucoup de plaisir, mais aussi de m'avoir laissée voyager et conter l'histoire de* Synechococcus*. Je te souhaite de continuer à mettre en lumière les mystérieuses adaptations à la température de* Syn*… la route est longue, et je suis heureuse qu'on ait contribué à ces débuts ensemble.*

Tout comme Syn *et* Proc*, on ne peut évoquer l'un sans penser à l'autre, et c'est donc ensemble que je vous dis merci, Fred et Lôh, pour tout ! Pour le climat que vous instaurez dans cette équipe, le bouillonnement scientifique, pour vos bonnes idées, votre écoute, le rire de Lôh qui traverse les murs, les voyages ensemble à Paris, Texel… Lôh, merci pour tes encouragements du soir au quotidien durant cette dernière année qui ont été un moteur ! Fred, un merci particulier pour ton investissement ces dernières semaines, ton œil bionique pour les corrections, et surtout ton enthousiasme ! Je garderai en souvenir ces moments précieux, ou toute la SBR nous jalousait… les fameuses pauses baby de l'équipe MaPP !*

Un énorme merci à celle qui fait vivre cette équipe… Momo ! Merci pour tout le travail que tu fais au quotidien, sans lequel l'équipe ne pourrait fonctionner. Merci d'insuffler ce vent de fraîcheur, folie (ou psychose ?!) qui dynamise tant le groupe ! Mais surtout merci d'avoir été d'un soutien sans faille tout au long de cette dernière année. Merci de t'être si bien occupée de nous ces derniers mois. Salon de thé et discussions matinales…finalement mes journées commençaient plutôt bien. Merci pour ton oreille attentive, tes encouragements quotidiens, ton investissement ces dernières semaines dans le manuscrit, et tant d'autres choses. Je te dédis les accents circonflexes de cette thèse ☺ !

D'une façon générale, merci à toute l'équipe « stress Syn » ! Que de longues manips (et ce n'est que le début), mais toujours réalisées dans la bonne humeur ! On se sent bien dans cette équipe… Même les dimanches matins où il faut se lever à l'aube pour le réplicat Y de la manip préliminaire ! Ces manips à plusieurs mains nous ont offert quelques moments magiques, entremêlés de pains au chocolat, de jeans qui craquent, des fameux « on a shifté ?! » puis « on a shifté back ?! », et des mesures Fv/Fm jusqu'au bout de la nuit. Bon courage à tous pour la suite, ils vont se remplir ces -80°C… ! Ah oui mince, les remplir ce n'est que le début…. !
An, merci pour ta bonne humeur, malgré ces cultures qui t'en ont fait voir de toutes les couleurs ! A quand un voyage d'équipe au Vietnam ?! Merci également à Charles pour cette année passée avec nous, tous les bons moments au labo, et les premiers mots de la journée qu'on échangeait entre lève-tôt.

Merci à cette grande famille qu'est le groupe Plancton ! Merci aux « filles » Pris, Roseline, Sarah, Estelle, Gwen et Marie vous faites vivre ce premier étage et le rendez si mythique ! Merci aux mamans du groupe, Fabienne et Flo, pour votre écoute, votre soutien et les petits mots d'encouragements qui font tellement de bien! Merci également à la moins fille de toutes les filles, Valerian. Et dire que tu nous as laissé croire pendant quelques mois que tu étais du genre calme et timide ! Merci Nathalie, Anne-Claire et Adriana pour avoir été un voisinage si agréable et les si nombreux sourires.

Merci aux deux bonhommes du groupe, Domi et Christian. Merci pour votre bonne humeur et tous ces bons moments passés ensemble qui ont ponctué ces dernières années… Merci d'être venus me tenir compagnie durant mes interminables journées dans la salle noire… en particulier durant les quinzaines de RG ! Domi, merci pour ta touche grammaticale dans ce manuscrit.

Un grand merci également à Céline Manceau ! Merci de prendre tant de choses en charge durant ces dernières semaines de traversée du désert ! Tu nous épargnes une dépense d'énergie considérable (et ô combien précieuse à cette période) ! Si nous franchissons les méandres

administratifs des différentes institutions c'est grâce à toi ! J'en profite pour remercier également Brigitte, et Nathalie Q. pour leur travail considérable qui rend le notre plus agréable.

Vient maintenant le temps de remercier ceux qui, quotidiennement, ont participé à mon bonheur en Breizh… Tout d'abord ceux qui étaient là au tout début, Aliou, Fred, JB et Domi B. Merci à tous les quatre pour les bons moments de ces premières années, et Domi de m'avoir épaulée lors de mes premiers hivers (mais il n'y a donc jamais de fin ?! Ou jamais d'été…?!).

Florian, merci pour… de nombreuses choses ! Des chansons matinales à bloc Jean Floc dans le couloir, les bons moments passés à la Station, à Banyuls, ou au téléphone, et les discussions sur l'avenir et la science… un débat sans fin ! Merci pour tout ce que tu m'auras transmis.

Merci également Greg pour ces dernières années, ces discussions improbables, et ton enthousiasme à toute épreuve !

La génération des futurs anciens… Merci Klervi d'avoir été là depuis le début de la thèse. Merci pour cette intégration dans ce far ouest (!), pour avoir toujours été mon soutien dans ces vieux murs. Maintenant grâce à toi je peux dire que je connais les ribines pour aller en riboule ! Allez, je le dis… elle est belle ta Bretagne ! Notamment durant les soirées d'été barbeuc-pétanque et petit jaune, avec en fond le coucher de soleil santecois… Finalement le sud et la Bretagne se marient bien! Merci pour tout, et courage. Merci également à Marie, pour l'équipe JJC que l'on a formée toutes les trois. Merci Marie pour les bons moments de ces dernières années, marchés, soirées… je te souhaite plein de bonheur pour la suite. Merci à toute l'équipe AJC 2014 (Camille, Héloïse, Marie, Klervi, Karine, François G., Tristan, Rozenn et Jérôme) pour avoir mené à bien tous les projets entrepris, et les folles soirées… Celui qui pense qu'on s'ennuie à Roscoff n'y a définitivement jamais mis les pieds !

Merci à mon collègue de bureau pour ces trois dernières années, Tristan (#fripon) ! J'ai suivi ton évolution sur R au gré des coups que tu donnais à ton clavier… merci pour cette douce musique qui a bercée ces années ! C'était motivant de vivre cette dernière année ensemble. Notre bureau sera bien vide les prochains week-ends ! Merci Doriane également pour tous les bons moments de ces derniers mois !

Merci à la génération des anciens petits nouveaux (#générationpilierdebar). Du potentiel rigolade dans ce lot là ! Merci Huhu pour des tas de choses qui seraient trop longues à lister ici ! Je m'arrête donc à la plus importante… merci pour le pain ☺ ! Que les secrets de la différenciation écotypique des Syn *se révèlent à toi ! Merci au philosophe du groupe, le susnommé David… Une belle année passée ensemble. Merci Laura, Delphine, Ambre, Marine et Alexis, Garf, Thibaut pour vos rires et sourires d'encouragement. Merci également à ceux qui sont déjà partis, mais qui ont également compté, Joanne, Andres, Lourdes et Fran.*

Aux petits nouveaux, Solène, merci pour les données que tu nous as permis d'acquérir durant ton stage. Je te souhaite une bonne continuation et bonne chance dans la caractérisation des lipides et désaturases de Syn (courage, il sait parfois se montrer ingrat)! Laure, le capitale folie de la SBR va prendre un peu de fraîcheur avec ta venue ! Bonne route !

Je remercie particulièrement les copains OEM. Merci à Camille pour cette première année roscovite. Les repas du midi sur la terrasse, les confidences (!), les rires… L'aventure commençait sur de bonnes bases ! Merci aux copains, Alice, Sophie, François et Camilla. Merci pour ces week-ends de retrouvailles ou plus rien ne comptait. Merci de faire partie de l'histoire depuis 5 ans déjà ! Merci Laura pour les soirées brestoises , bien qu'elles n'étaient pas aussi fréquentes qu'on aurait voulu ! Merci pour les petits messages, et le soutien.

Merci aux poules de St Caradec, « Syn » et « Proc », qui étendent la distribution des picocyanobactéries marines à des contrées jusqu'alors inconnues ! Longues vies aux suivantes, « Phycocyanine » et « Phycoérythrine » !

Merci à tous ceux que, malheureusement, mon cerveau embrumé n'a pas pu restituer…

*Enfin, merci Théophile, d'être là, réconfortant, patient, de m'avoir faire rire, et tout oublier quand il le fallait. Merci de m'avoir supportée ces derniers mois, dans mes « meilleurs » moments… Tes encouragements m'ont portée, tu as été ma force ! Merci :**

Je finirai en remerciant ma famille. Je n'ai pas les mots pour exprimer toute la reconnaissance que je vous dois. Merci à mon frère et Estelle pour votre soutien, les étés ensemble où le temps etait suspendu, et les deux vagues de bonheur qui ont ponctué ces trois années de thèse, Clémence et Juliette.

Et finalement, merci à mes parents, d'avoir toujours été là, d'y avoir cru, depuis le tout début. Je suis désolée pour la distance que je vous ai imposée ces dernières années, et de mon indisponibilité ces derniers mois. Merci pour tout ce que vous faites pour nous et de nous avoir toujours encouragé à réaliser nos rêves, l'effort en vaut la peine.

Table des matières

INTRODUCTION

PRÉAMBULE ……..1

I. LE FACTEUR TEMPERATURE SUR LA PLANÈTE TERRE ……4

1. Le gradient latitudinal de température sur la planète Terre 4
2. Biogéographie et thermophysiologie : la distribution des organismes est contrainte par la température 7
3. L'adaptation aux températures extrêmes..... 8
   - *a. Les organismes thermophiles 9*
   - *b. Les organismes psychrophiles.....10*

II. DIVERSITÉ TAXONOMIQUE ET FONCTIONELLE DU PHYTOPLANCTON 12

1. La diversité cachée d'une goutte d'eau de mer : le plancton microscopique 12
2. Le phytoplancton : poumon de l'océan..... 14
   - *a. Rôle du phytoplancton dans la pompe biologique.....14*
   - *b. Classes de tailles et diversité taxonomique 17*
3. Les picocyanobactéries marines *Prochlorococcus* et *Synechococcus* 20
   - *a. Histoire et évolution des cyanobactéries 20*
   - *b. Découverte des picocyanobactéries marines.....21*

III. INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LA PHYSIOLOGIE DES CYANOBACTÉRIES .23

1. Morphologie et systèmes membranaires des cyanobactéries 23
   - *a. Les systèmes membranaires des cyanobactéries.....25*
   - *b. La composition lipidique des systèmes membranaires.....27*
2. Réponse du métabolisme lipidique aux variations environnementales 30
   - *a. Régulation de la composition en têtes polaires.....31*
   - *b. Régulation de la composition en acides gras.....32*
3. Photosynthèse et température 34
   - *a. La machinerie photosynthétique des cyanobactéries.....34*
   - *b. La photoinactivation du photosystème II : effets de la température.....49*
   - *c. La photoprotection : dissipation non photochimique de l'énergie lumineuse 53*

IV. MICRODIVERSIFICATION ADAPTATIVE CHEZ LES CYANOBACTÉRIES MARINES ... 62

1. Diversité génétique et génomique des picocyanobactéries marines 62
2. Diversité de la radiation *de Synechococcus et Prochlorococcus* 67
3. Distribution des picocyanobactéries marines et phyloécolologie 70
   a. *Distribution de* Prochlorococcus *70*
   b. *Distribution de* Synechococcus *72*
4. Spécialisation physiologique à une niche écologique et concept d'écotype cyanobactérien .. 76
   a. Prochlorococcus *77*
   b. Synechococcus *82*

OBJECTIFS DE LA THÈSE 87

CHAPTER 1 : Thermotypes in the marine *Synechococcus* radiation

I. CONTEXT OF THE WORK 93

II. CONNECTING THERMAL PHYSIOLOGY AND LATITUDINAL NICHE PARTITIONING IN MARINE *SYNECHOCOCCUS* 95

III. WIDENING THE *SYNECHOCOCCUS* THERMOTYPE PICTURE 117

1. Marine *Synechococcus* strains selection 118
2. Experimental design and flow cytometry analysis 118
3. First results and discussion 120

IV. BIOVOLUME AND PIGMENT CONTENT RESPONSE TO TEMPERATURE 124

1. Side scatter, biovolume and latitude 124
   a. *Methods* *124*
   b. *Results and discussion* *125*
2. Fluorescence and scattering function of growth temperature 127

CHAPTER 2 : Thermoadaptation of the photosynthetic apparatus among marine *Synechococcus*

I. CONTEXT OF THE WORK 133

II. ADAPTIVE THERMOSTABILITY OF LIGHT-HARVESTING COMPLEXES IN MARINE *SYNECHOCOCCUS* CYANOBACTERIA 135

III. FUNCTIONAL THERMOSTABILITY OF THE REACTION CENTER II 152

1. Context of the work 152
2. Methodological approach 153
3. First results and discussion 154

IV. REACTION CENTER II REPAIR CAPACITY IN RESPONSE TO TEMPERATURE 159

1. Strain selection and experimental design 159
   a. Strain selection 159
   b. Experimental design and flow cytometry analysis 159
2. Results 161
3. Discussion 163
   a. Photosystem II response to a temperature decrease 163
   b. Photosystem II response to a temperature increase 164
   c. Conclusion 165

CHAPTER 3 : Membrane lipid thermoregulation in marine *Synechococcus*

I. CONTEXT OF THE WORK 169

1. Membranes: the place of key metabolic reactions affected by temperature 169
2. Lipid biosynthesis 170
   a. Fatty acids 170
   b. Lipid classes 172
3. Desaturation of fatty acids 174
4. Objectives 176

II. TEMPERATURE INDUCED MODIFICATION OF MEMBRANE ACYL CHAINS IN *SYNECHOCOCCUS* SP. WH7803 178

1. Context of the work 178
2. Experimental approach 178
   a. Strain conditions and sampling strategy 178
   b. Fatty acids analysis 179
3. Results and discussion 181

III. COMPARATIVE GENOMIC STUDY OF LIPID SYNTHESIS PATHWAYS AND REGULATION IN MARINE *SYNECHOCOCCUS*.....185

1. Context of the work..... 185
2. Methodological approach 186
3. Fatty acid synthase and polar head diversification pathways 186
   a. Results..... 186
   b. Discussion 191
4. Desaturase enzymes in marine *Synechococcus*..... 192
   a. Results..... 192
   b. Discussion 195

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES ……207

RÉFÉRENCES ……225

Liste des figures

Figure 1 |L'écophysiologie, ou l'étude de l'interaction entre l'environnement, les organismes et leur physiologie.

Figure 2 |Spectre du rayonnement électromagnétique émis par le soleil et la proportion des gammes spectrales (UV/visible/InfraRouge).

Figure 3 | Radiations infrarouges absorbées à la surface de la Terre et température de l'atmosphère.

Figure 4 | Variations de la quantité d'énergie solaire atteignant la terre en fonction de la latitude créant un gradient de flux d'énergie solaire et température.

Figure 5 | Température des eaux de surface lors des phénomènes d'upwelling et gyres.

Figure 6 | Alexandre Von Humboldt, auteur du premier essai traitant de la biogéographie.

Figure 7 | Diversité des protistes marins.

Figure 8 | Production primaire mondiale océanique et terrestre.

Figure 9 | Rôle du phytoplancton dans la pompe biologique et boucle microbienne océanique.

Figure 10 | Vésicules produites par le picophytoplancton et leur abondance le long de la colonne d'eau.

Figure 11 | Répartition des différentes classes de tailles du phytoplancton selon la classification de Seiburth et *al.* (1978).

Figure 12 | Bloom de coccolithophores visible depuis l'espace.

Figure 13 | Evolution de la composition atmosphérique, et grands événements biologiques et chimiques associés.

Figure 14 | Première page des articles révélant l'existence de *Synechococcus* et *Prochlorococcus*.

Figure 15 | Représentation de la bicouche de lipides des membranes biologiques, avec les protéines et sucres qui y sont insérés.

Figure 16 | Modèle d'organisation de l'enveloppe d'une cellule cyanobactérienne.

Figure 17 | Photographie en microscopie électronique de *Synechococcus* et *Prochlorococcus.*

Figure 18 | Structure moléculaire des quatre glycolipides membranaires des cyanobactéries.

Figure 19 | Modification de la fluidité membranaire en fonction de la température.

Figure 20 | Degrés d'insaturation des chaînes d'acides gras chez les cyanobactéries.

Figure 21 | Représentation des complexes photosynthétiques thylacoïdiens au sein d'une cellule de *Synechococcus.*

Figure 22 | Structure du phycobilisome associé aux membranes thylacoidiennes chez les cyanobactéries.

Figure 23 | Modèle d'agrégation des phycobiliprotéines avec l'exemple de la structure de la phycocyanine.

Figure 24 | Organisation d'un monomère de phycocyanine et des hélices protéiques constituant chaque sous-unités α et β.

Figure 25 | Structure des phycobilines des cyanobactéries.

Figure 26 | Chromophorylation des différentes phycobiliprotéines chez les cyanobactéries.

Figure 27 | Localisation probable des différents polypeptides de liaison au sein du phycobilisome des cyanobactéries.

Figure 28 | Transfert orienté de l'énergie au sein du phycobilisome et organisation des chromophores acteurs de ce transfert dans un hexamère de phycobiliprotéines.

Figure 29 | Structure d'un dimère du centre réactionnel II de cyanobactéries.

Figure 30 | Schéma en Z représentant le transfert d'électrons lors de la photosynthèse oxygénique.

Figure 31 | Modèle 3D de l'organisation spatiale d'une cellule de Prochlorococcus et d'un carboxysome cyanobactérien.

Figure 32 | Cycle de Calvin-Benson au sein d'une cellule de cyanobactérie.

Figure 33 | Cycle de réparation de la protéine D1 du photosystème II.

Figure 34 | Structure de la caroténo-protéine orange et changement de conformation en fonction de son état actif ou inactif.

Figure 35 | Contexte génomique de la Caroténo-Protéine Orange (OCP).

Figure 36 | Transition d'état du phycobilisome chez les cyanobactéries.

Figure 37 | La photoacclimatation induit des ajustements des pools de complexes photosynthétiques au sein des membranes thylacoïdales.

Figure 38 | Arbre phylogénétique des différentes représentantes de la radiation des cyanobactéries.

Figure 39 | Arbre phylogénétique des picocyanobactéries marines basé sur le gène 16S de l'ARN ribosomal.

Figure 40 | Tailles des génomes de souches de *Synechococcus* et *Prochlorococcus*.

Figure 41 | Représentation des concepts de la génomique comparative du *pan genome* du, génome coeur et du génome accessoire.

Figure 42 | Arbre phylogénétique de la radiation des *Synechococcus* marins.

Figure 43 | Arbre phylogénétique de la radiation de *Prochlorococcus*.

Figure 44 | Abondance moyenne de *Prochlorococcus* le long du gradient latitudinal et de profondeur dans les océans.

Figure 45 | Distribution des groupes phylogénétiques de *Prochlorococcus* le long du gradient de profondeur de lumière, à basses et plus hautes latitudes.

Figure 46 | Abondance moyenne de *Synechoocccus* marins le long du gradient latitudinal et de profondeur dans les océans.

Figure 47 | Relation entre l'abondance de picocyanobactéries marines du genre *Synechococcus* (cercles pleins) et la latitude dans l'océan austral.

Figure 48 | Nuages de points montrant l'abondance relative des clades de *Synechococcus* en fonction de la température de l'eau.

Figure 49 | Pourcentage d'identité nucléotidique moyenne et identité des séquences de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal entre différents génomes de *Synechococcus*.

Figure 50 | Distribution in situ et taux de croissance en fonction de l'intensité lumineuse des écotypes de lumière de *Prochlorococcus*.

Figure 51 | Présence et absence des gènes impliqués dans la photosynthèse chez différentes souches de *Prochlorococcus*.

Figure 52 | Distribution *in situ* et taux de croissance en fonction de la température des écotypes de surface I et II de *Prochlorococcus*.

Figure 53| Comparaison de la région génomique des projections radiaires du phycobilisome chez les *Synechococcus* marins.

Figure 54 | Distribution of the four most abundant *Synechococcus* clades in the ocean.

Figure 55 | Location of the isolation sites of the 14 marine *Synechococcus* strains selected for the SAMOSA project.

Figure 56 | Growth rates as a function of temperature for the 14 marine *Synechococcus* strain representatives of clades I, II, III, IV, V and CRD-1.

Figure 57 | Temperature variables output from the model function of clades for the fourteen marine *Synechococcus* strains studied.

Figure 58 | *Synechococcus* cell size measurements under epifluorescence microscopy.

Figure 59 | Biometrics of several marine *Synechococcus* strains.

Figure 60 | Side scattering values of marine *Synechococcus* function of their isolation latitude.

Figure 61 | Orange fluorescence (FL2) variations along acclimation temperature for the 14 marine *Synechococcus* strains.

Figure 62 | Ultrastructure and thylakoid number in *Synechococcus* sp. BA-120 (freshwater strain) grown at two light irradiances.

Figure 63 | Side Scatter (SSC) variations along acclimation temperature for the 14 marine *Synechococcus* strains.

Figure 64| Phycobiliprotein purification steps in marine *Synechococcus* displaying pigment type 3a.

Figure 65 | Variations of reaction center II efficiency along a rapid temperature increase allowing the determination of RCII $T_{50\%}$.

Figure 66 | Reaction center II efficiency and growth rates as a function of growth temperature in six marine *Synechococcus* strains.

Figure 67 | Neighbor joining analysis of the aminoacid sequences of the D1 isoform proteins in marine *Synechococcus*.

Figure 68 | Reaction center II mid-inactivation temperature function of acclimation temperature.

Figure 69 | Calculation of photosystem II repair rate.

Figure 70 | Cell density and photophysiological measurements along low and high temperature shifts for low and high light acclimated cultures of *Synechococcus* sp. WH7803.

Figure 71 | Photosystem II photoinactivation cross section (σ_i) variations after a low and high temperature shift for in low and hight light acclimated cultures of *Synechococcus* sp. WH7803.

Figure 72| Representation of the balance between the rate of energy reaching the RCII (σ_{PSII} E_k : source) and the rate of energy used for the global metabolism (τ^{-1}: sink).

Figure 73 | Enzymatic pathways for fatty acid synthesis II (FAS II) in cyanobacteria.

Figure 74 | Enzymatic pathways of the insertion of fatty acids in the membrane in cyanobacteria until the synthesis of phosphatidyl acid.

Figure 75 | Enzymatic pathways for lipid polar head diversification in cyanobacteria.

Figure 76 | Main pathways for fatty acids desaturation in freshwater cyanobacteria, and the corresponding groups defined from Murata et al 1992.

Figure 77 | Extraction of lipid in marine *Synechococcus* sp. WH7803 following the protocol of Bligh & Dyer (1959).

Figure 78 | Dissociation of polar lipid class by thin layer chromatography on *Synechococcus* sp. WH7803 acclimated to 22°C

Figure 79 | Proportion of the lipid classes in the membranes of the model strain *Synechococcus* sp. WH7803.

Figure 80 | Proportion of total saturated and unsaturated fatty acid in *Synechococcus* sp. WH7803 acclimated to a range of temperature.

Figure 81 | Proportion of total saturated and unsaturated fatty acids for each lipid class in *Synechococcus* sp. WH7803 acclimated to a range of temperature.

Figure 82 | Maximum likelihood analysis of aligned amino acid sequences of desaturases in marine *Synechococcus* and freshwater cyanobacteria, retrieved from Cyanorak v2 and Cyanobase.

Figure 83 | Histidine boxes in cyanobacterial desaturase enzymes.

Figure 84 | Maximum-likelihood analysis of amino acid sequences of desaturases DesC (Δ9) and DesA (Δ12) in marine *Synechococcus*.

Figure 85 | Clade phyletic profile of desaturase genes in marine *Synechococcus*.

Figure 86 | Geographic distribution of desaturases of marine *Synechoocccus* whose genome has been entirely sequenced.

Figure 87 | Maximum likelihood analysis of DesC4 amino acid sequences in *Synechococcus* genomes.

Figure 88 |Different genomic region configurations of the *desC3* and *desC4* genes in the marine *Synechococcus* cluster 5.1.

Figure 89 | Modèle putatif des différentes étapes de perturbations du centre réactionnel II et du phycobilisome induites par une augmentation rapide de la température à l'obscurité chez les *Synechococcus* marins.

Figure 90 | Différentes gammes thermiques d'activité de la phycocyanine entre les thermotypes chauds et froids de *Synechococcus*.

Figure 91 | Pourcentage des bases azotées guanine-cytosine chez les *Synechococcus* marins en fonction de la température d'isolement.

Figure 92 | Phylogénie des *Synechococcus* marins et hypothèse d'évolution convergente entre les clades I et IV.

Liste des tableaux

Tableau 1 | Protéines constitutives du centre réactionnel du photosystème II chez les cyanobactéries.

Tableau 2 | Biogéographie des principaux clades de *Synechococcus* marins retrouvés dans l'environnement.

Table 3 | Information regarding the fourteen marine *Synechococcus* strains used in the SAMOSA project.

Table 4 | Physiological measurements carried out during low and high temperature shifts on *Synechococcus* sp. WH7803 cultures acclimated to low or high light.

Table 5 | Solvents use for two dimensions thin layer chromatography to dissociate lipid classes in *Synechococcus* sp. WH7803 samples.

Table 6 | Fatty acid esterified on polar lipid head identified in *Synechococcus* sp. WH7803.

Table 7 | Genes encoding the enzymes involved in the fatty acid synthesis and the polar head diversification of membrane lipids in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and clusters annotated in *Synechococcus* genomes.

Table 8 | Phyletic profiles of fatty acid synthesis enzymes (FASII).

Table 9 | Phyletic profiles of the genes encoding the enzymes involved in lipid polar head diversification.

Table 10 | Desaturase genes in the genome of *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Table 11 | Phyletic profiles of desaturase encoding genes in marine *Synechococcus* genomes.

Introduction

PREAMBULE

L'écophysiologie

L'écophysiologie (du grec *oikos*, maison, *physis,* nature, origine et *logia*, « étude ») est une discipline de la biologie qui étudie le fonctionnement, le mode de vie et les interactions entre un organisme vivant et son environnement. L'écophysiologie consiste à étudier comment l'environnement, de façon physique et biologique, interagit avec la physiologie d'un organisme. Cette science est directement dérivée de l'écologie qui, selon Haeckel, est définie comme « la science des relations des organismes avec le monde environnant, c'est-à-dire, dans un sens large, la science des conditions d'existence ». Le terme physiologie a quant à lui été employé la première fois par Fernel en 1537, et défini comme la science qui vise à étudier le fonctionnement, le rôle et l'organisation biochimique et physique des organismes vivants et de leurs composants, organes, tissus, cellules et molécules (Fig. 1). L'écophysiologie implique donc l'étude de différents niveaux d'informations afin de comprendre le fonctionnement global d'un système biologique, *i.e.* la mise en place d'approches de type systémique.

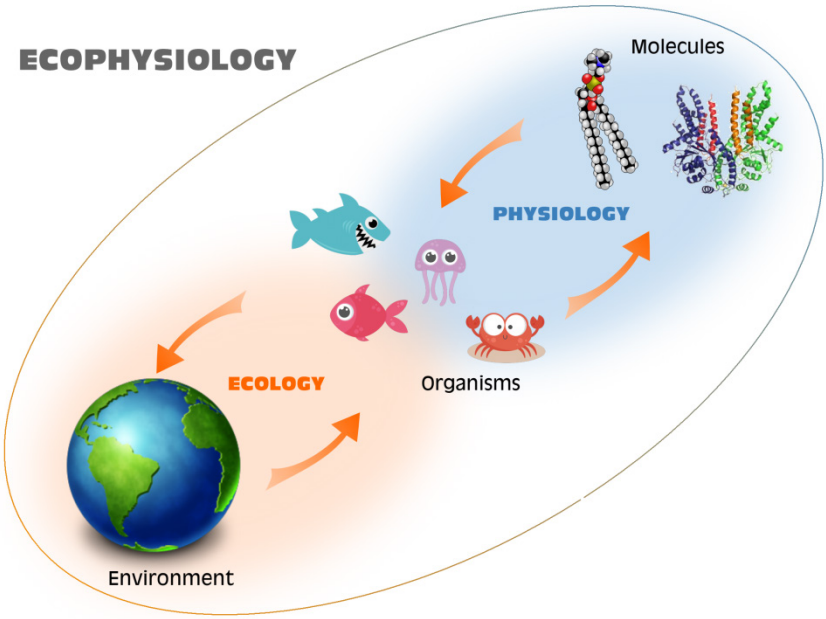


Figure 1 | **L'écophysiologie, ou l'étude de l'interaction entre l'environnement, les organismes et leur physiologie.** L'écophysiologie, à travers l'étude des différents niveaux d'intégrations, des molécules à l'environnement, permet de comprendre le fonctionnement global d'un système biologique.

L'écophysiologie comparative vise quand à elle à comprendre la diversité fonctionnelle et adaptative des organismes en réponse à leur environnement, à travers la comparaison de leurs réponses et de

leurs performances. Cette discipline a vu le jour au début du XXème siècle, initiée par Schmidt-Nielsen sur la physiologie comparative des vertébrés (Schmidt-Nielsen *et al.* 1956). Cette discipline vise à comprendre les mécanismes fondamentaux sous-jacents au fonctionnement des organismes au sein de leur niche écologique, et à comparer les stratégies adaptatives qu'ils ont mis en place afin d'y prospérer (Somero 2011).

Fluctuations, contraintes et stress

Le biotope (du grec *bios*, vie et *topos*, lieu) au sein duquel les êtres vivants sont distribués est en changement constant. L'environnement est souvent caractérisé par un ensemble de facteurs biotiques (prédation, broutage, compétition, parasitisme, *etc.*) et abiotiques (température, lumière, nutriments, pH, humidité, salinité, *etc.*) susceptibles de varier au cours du temps (variations diurnes, saisonnières, climatiques, *etc.*) et de l'espace (latitude, longitude, altitude, profondeur, *etc.* ; Meyers and Bull 2002). Cette hétérogénéité environnementale peut être régulière (cycles glaciaires, saisons, journées, *etc.*), ou irrégulière (couverture nuageuse, orages, tempêtes). Ces fluctuations sont la source d'une multitude de modifications (morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires) entrainant des changements dans la croissance et la reproduction des individus, permettant la survie ou non d'un organisme au sein de sa niche. Les organismes ont donc évolué des adaptations métaboliques de façon à faire face à ces variations environnementales. Ainsi, les variations imprévisibles et de grande amplitude d'un facteur environnemental autour de l'*optimum* d'un organisme sont appelées contraintes. La flexibilité du métabolisme des organismes leur permet de gérer, jusqu'à un certain degré, ce type de variations. La conséquence de ces contraintes est appelée stress (Selye 1973). Elle correspond à l'ensemble des modifications biologiques induites par l'environnement qui auront des répercussions défavorables sur la croissance et la reproduction (Lutts *et al.* 1996). Ainsi, l'environnement devient une contrainte lorsque l'organisme n'est plus capable de maintenir ses performances physiologiques à leur niveau optimal. Dès lors, il doit mettre en place des stratégies pour essayer de contourner ou surpasser ces contraintes.

Adaptation et acclimatation

La planète Terre abriterait environ 8.7 millions d'espèces eucaryotes, dont 2.2 millions vivraient dans les océans (Mora *et al.* 2011). Bien que la vie ait jusqu'à maintenant été observée dans tous les écosystèmes explorés sur Terre, c'est loin d'être le cas des organismes qui la composent. En effet, les êtres vivants se distribuent au sein de niches écologiques définies, correspondant à une gamme de conditions qui leurs sont favorables, leur permettant de fonctionner et de s'y reproduire de

façon optimale. La colonisation de ces niches écologiques par les organismes est possible grâce à un certain nombre de stratégies évolutives. L'ensemble de ces traits résulte d'un processus évolutif à long terme, façonné par la sélection naturelle et donc génétiquement ancré, appelé adaptation. L'adaptation implique des modifications de l'information génétique, *i.e* des mutations, qui s'opèrent sur le génome de façon aléatoire. Si ces mutations sont bénéfiques et entraînent une augmentation du succès reproducteur (*fitness*) d'un individu, elles seront sélectionnées par l'environnement et transmises de génération en génération (transfert vertical). Ces mutations dans la séquence d'ADN sont considérées comme l'une des principales voies adaptatives. Elles peuvent impliquer la substitution d'un nucléotide par un autre, pouvant entraîner la modification de l'acide aminé codé, ou se faire *via* l'insertion ou la délétion d'un nucléotide. L'adaptation est également influencée par le transfert latéral de gènes, processus par lequel un organisme intègre des séquences d'ADN provenant d'un autre organisme sans lien de parenté (par opposition au transfert vertical ; Keeling & Palmer 2008, D'Cruz *et al.* 2000). C'est donc parmi la grande diversité génétique des individus, que vont ensuite être sélectionnés les phénotypes (expression du génotype, c'est l'ensemble des caractères observables d'un individu) et les allèles (versions différentes d'un même gène, base du polymorphisme génétique) les plus adaptés à l'environnement.

Ce concept est lié à l'acclimatation, que l'on définira ici comme plasticité phénotypique, qui fait référence à la capacité d'un organisme à exprimer différents phénotypes à partir d'un génotype donné selon les conditions environnementales. Contrairement à l'adaptation, l'acclimatation suggère la modulation par l'environnement de caractères phénotypique. De cette façon, l'acclimatation s'opère à l'échelle de la vie de l'individu, sur une échelle de temps relativement courte et généralement de façon réversible. L'acclimatation entraîne donc des réajustements physiologiques impliquant des mécanismes sensoriels détectant les changements environnementaux.

I.

LE FACTEUR TEMPERATURE SUR LA PLANETE TERRE

1. Le gradient latitudinal de température sur la planète Terre

La planète Terre tourne autour du soleil qui produit une quantité faramineuse d'énergie. La planète Terre ne reçoit cependant qu'une petite partie de ce rayonnement solaire, un phénomène énergétique quantique ondulatoire. Une partie du spectre électromagnétique délivré par le soleil est communément appelée lumière et se conceptualise comme un flux de *quanta* appelés photons, définissant l'intensité lumineuse (en µmole photon m^{-2} s^{-1}). Cette lumière est divisée en fonction de la perception de l'œil humain en une partie visible et une invisible. La partie visible de ce flux énergétique représente 40% de l'énergie incidente à la surface de l'atmosphère, le reste se distribuant dans l'infrarouge proche (50%) et dans l'ultraviolet (10% ; Fig. 2). Moyennée sur l'année et sur l'ensemble de la Terre, l'énergie solaire qui arrive à la surface de la planète est de 342 W m^{-2}. Seulement 70% de cette énergie traverse l'atmosphère et est absorbée par les océans et les continents, réchauffant ainsi la planète, le reste étant réfléchi vers l'espace.

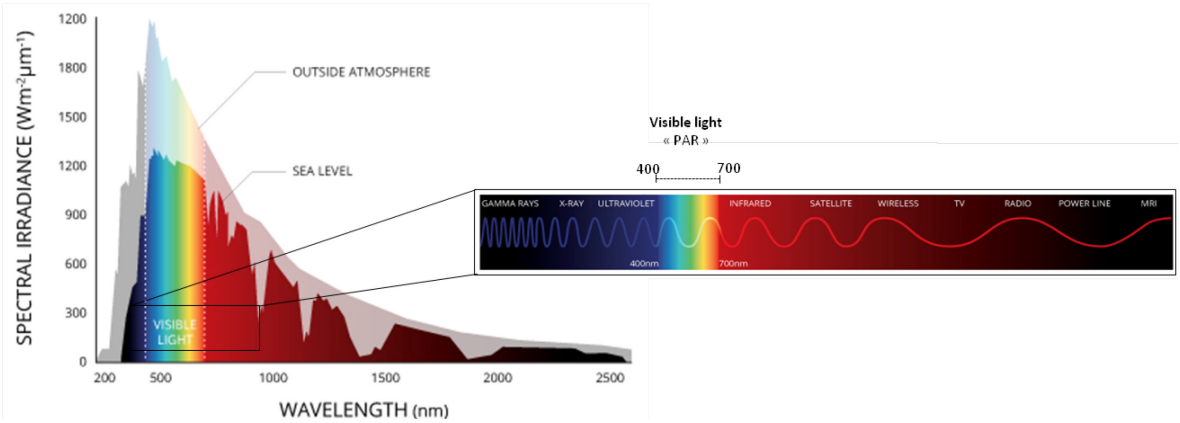


Figure 2| Spectre du rayonnement électromagnétique émis par le soleil et la proportion des gammes spectrales (UV/visible/InfraRouge). L'intensité lumineuse atteignant l'atmosphère ainsi que celle atteignant la surface des océans (http://www.fondriest.com/environmental-measurements) sont représentées.

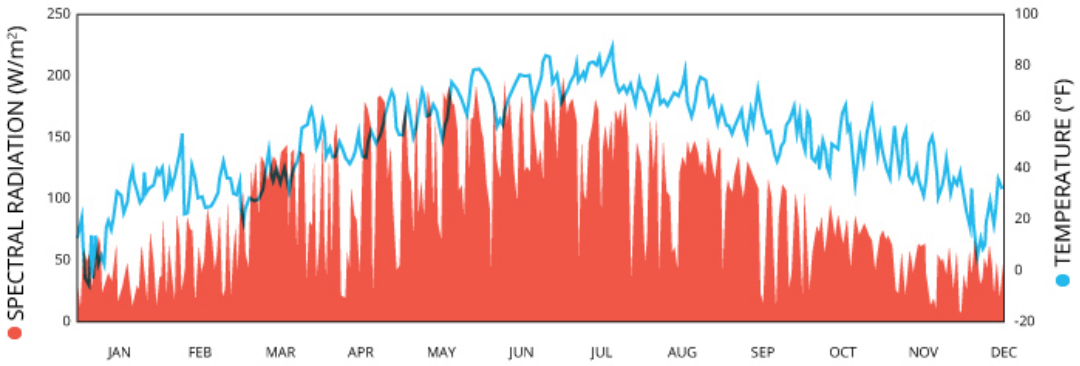


Figure 3 | **Radiations infrarouges absorbées à la surface de la Terre et température de l'atmosphère.** L'absorption des rayons infrarouges (en rouge) entraîne un réchauffement de l'atmosphère (température en bleu ; http://www.fondriest.com/environmental-measurements).

Environ 50% de la lumière absorbée par l'atmosphère et les océans est constituée de rayons infrarouges, aux longueurs d'onde supérieures à 700 nm (Fig. 2). Ces rayons sont efficacement absorbés par les molécules d'H_20 et de CO_2 et convertis en énergie calorifique, réchauffant le système terrestre. La température moyenne par unité de surface est donc directement dépendante de la quantité de rayonnements solaires absorbée (Fig. 3).

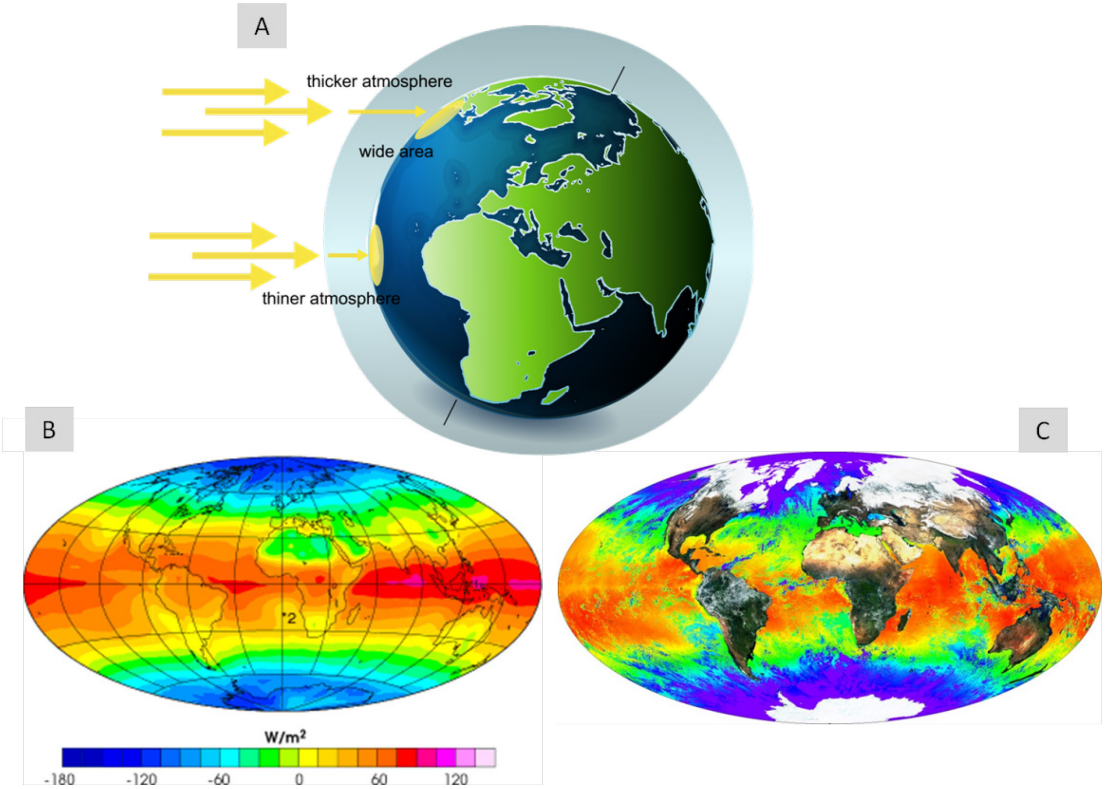


Figure 4 | **Variations de la quantité d'énergie solaire atteignant la terre en fonction de la latitude créant un gradient de flux d'énergie solaire et température**. L'épaisseur de l'atmosphère traversée, ainsi que la surface au soleil atteinte varie en fonction de la latitude (**A**), entraînant un gradient de l'intensité lumineuse. Le flux d'énergie solaire incidente annuelle (Watt m^{-2}) sur la Terre (**B** ; NASA), et la température annuelle des eaux de surface (**C** ; NASA).

La température sur la planète Terre est toutefois loin d'être homogène. La Terre étant quasiment sphérique, la quantité d'énergie solaire atteignant sa surface diminue avec la latitude. Aux hautes latitudes, les rayons solaires atteignent la surface de la Terre suivant un angle plus faible et doivent ainsi traverser une couche atmosphérique plus épaisse (Fig. 4). Par conséquent la quantité d'énergie incidente diminue de l'équateur aux pôles, générant un gradient latitudinal de température. Les températures globales à l'échelle de la planète sont donc directement liées aux flux d'énergie solaire incidente (Fig. 4). D'un point de vue global, la température moyenne au niveau de la mer diminue d'environ 0.4°C par degré de latitude en s'éloignant de l'équateur (Greenwood & Wing 1995). Ainsi, à l'équateur la température de l'eau dépasse généralement 30°C et peut atteindre 36°C dans les eaux du Golfe Persique, réputées les plus chaudes de la planète. Aux hautes latitudes, au delà du cercle polaire (66° 33' N/S), la température de l'eau oscille entre 2°C et -1.8°C, la température de congélation de l'eau de mer.

Il existe cependant quelques anomalies du gradient latitudinal de température dans les océans. C'est notamment le cas des zones d'*upwellings*. Ces phénomènes océanographiques apparaissent près des côtes, et correspondent à un déplacement des eaux chaudes de surface vers le large par les courants marins et les vents, notamment les alizés dans les régions intertropicales, soufflant d'est en ouest. La conséquence de ces déplacements est la remontée le long des côtes des eaux profondes, plus froides (Fig. 5). Les upwellings les plus intenses sont localisés le long des côtes de Californie, du Pérou, de Mauritanie et la Namibie.

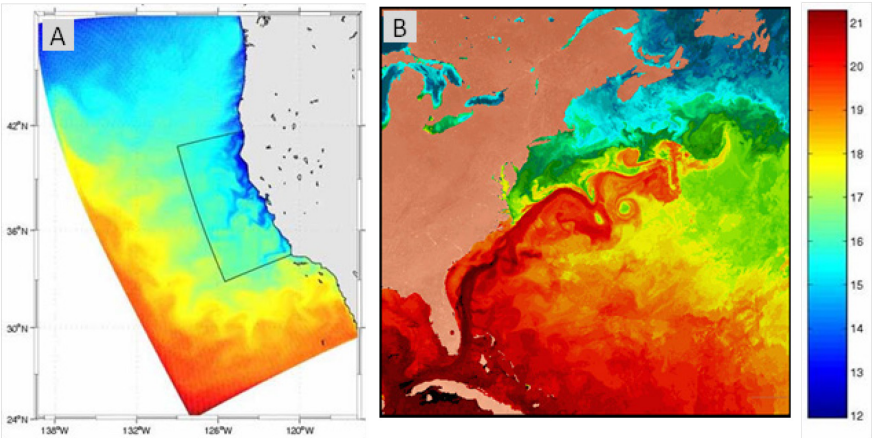


Figure 5 | **Température des eaux de surface lors des phénomènes d'upwelling et gyres.** La remontée des eaux profondes et froides le long de l'upwelling de Californie entraîne un refroidissement des eaux de surface (**A** ; http://sanctuarysimon.org/monterey/sections/other/whats_new_upwelling.php). Formation de gyres chaudes et froides dans l'Atlantique Nord (**B** ; http://www.marine.tmd.go.th/marinemet_html/lect16.html). L'échelle de température est représentée en degrés Celsius.

Un second processus océanographique génère également des anomalies du gradient latitudinal de température dans les océans, appelés gyres. Ces gyres sont de grandes boucles d'eau, qui se

dissocient de leur courant océanique originel, pour former un système circulatoire indépendant, d'un diamètre variant de 100 à 500 km. Elles peuvent se former à partir de la dissociation d'un courant chaud (Fig. 5 ; Gulf stream, Kurashio) ou d'un courant froid (Benguela, Califronie, Perou*)*. Ces gyres peuvent être stables durant plusieurs mois, et ainsi constituer un environnement à une température très différente des eaux qu'elles traversent.

Dans les océans, la température ne varie pas uniquement le long du gradient latitudinal, mais également le long du gradient de profondeur. En effet, de la même façon qu'à la surface, la température des masses d'eau est régie par les radiations électromagnétiques solaires incidentes. La quasi totalité de ces rayonnements solaires est absorbée dans les premiers mètres de la colonne d'eau et la chaleur est ensuite transmise en profondeur par vibrations des molécules d'eau. Alors que la température de l'océan de surface oscille en fonction de l'ensoleillement et des saisons, les couches inférieures de l'océan sont caractérisées par une température stable, avoisinant les 4°C.

2. Biogéographie et thermophysiologie : la distribution des organismes est contrainte par la température

La biogéographie est l'étude de la distribution spatiale des organismes, en intégrant les processus biologiques et écologiques en rapport avec l'évolution (spéciation, adaptation, *etc.*) à des processus qui influencent l'environnement physique (barrières physiques, climatiques, *etc. ;* Brown & Lomolino 2000). Le naturaliste anglais Alfred Russel Wallace, sous l'influence de Charles Darwin, est considéré comme le père de la biogéographie, qu'il décrivait, en 1880, simplement comme la science tentant d'expliquer pourquoi des organismes « sont là et d'autres pas ».

Depuis le XIXème siècle, les naturalistes se sont agités autour d'une grande question, visant à comprendre pourquoi la vie est plus luxuriante aux tropiques et la diversité diminue au fur et à mesure de l'éloignement de l'équateur. C'est Alexander Von Humboldt qui observa le premier, au cœur du continent américain, une richesse incroyable et déclara que les tropiques abritaient plus d'espèces que les autres régions du globe (Essai sur la géographie des plantes, 1807, Fig. 6). Dans le sillage d'Humboldt, d'autres explorateurs ont constaté que si les tropiques présentent une grande diversité, les régions polaires sont elles très pauvres et qu'il existe entre ces latitudes un gradient de diversité, que les écologues appellent le « gradient latitudinal de diversité » (Dowle *et al.* 2013). Décrite depuis les années 1800, une des principales explications écologiques et évolutives de ce gradient serait la température et son rôle clé dans la cinétique des processus biologiques (reproduction, dispersion, interaction, mutation, adaptation, *etc.*; Rohde 1992, Allen *et al.* 2002,

Brown *et al.* 2004). Cette hypothèse est imagée sous le nom « *the red queen runs faster when she is hot* » (Benton 2009). Ainsi, l'ensemble de ces travaux soulignent l'influence de la température dans la distribution des organismes le long du gradient latitudinal (Roy *et al.* 2000, Brown *et al.* 2004, Fuhrman *et al.* 2008, Wang *et al.* 2009).

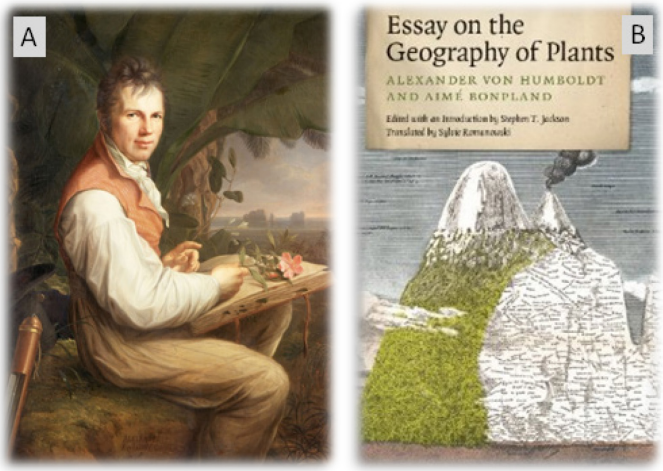


Figure 6 | **Alexandre Von Humboldt, auteur du premier essai traitant de la biogéographie**. Portrait d'Alexandre Von Humboldt (**A**) et couverture de l' « Essai sur la géographie des Plantes », coécrit par Humboldt et Bonpland (**B**), considéré comme le premier ouvrage de biogéographie (1807).

Le facteur température apparait comme une contrainte dans la distribution des organismes, les obligeant à mettre en place des stratégies adaptatives pour être compétitifs au sein de leurs niches thermiques respectives.

3. L'adaptation aux températures extrêmes

Depuis une trentaine d'année, il apparait de plus en plus évident sur Terre que, tant qu'il y a de l'eau à l'état liquide, quelques soient les conditions physico-chimiques, il y a de la vie. Ce concept a pendant longtemps été impensable du fait des limites physico-chimiques au delà desquelles la vie ne pouvait, *a priori*, pas se développer. Ces barrières sont en train d'être repoussées suite à la découverte de nouveaux organismes capables de prospérer dans ces environnements hors-normes. La majorité de ces organismes sont microscopiques, pour la plupart membres du domaine des Archées ou des Bactéries et ont développé des adaptations ingénieuses à leurs environnements. Ces extrêmophiles, du grec *extremus philos,* aimant l'extrême, sont définis comme des organismes vivant dans des conditions physico-chimiques létales pour la plupart des autres organismes, à savoir une température très élevée ou très basse, des conditions particulièrement acides ou encore des salinités élevées ou

des fortes pressions (Madigan & Orent 1999). De façon intéressante, ces organismes extrêmophiles ne se contentent pas de tolérer les conditions particulières de leur environnement, mais y sont inféodés.

a. Les organismes thermophiles

Parmi les extrêmophiles, les thermophiles sont définis comme les organismes dont la croissance est optimale entre 50°C et 80°C. Ces adeptes de la chaleur sont observés dans des environnements atypiques tels que les systèmes hydrothermaux volcaniques et géothermiques, les sources chaudes, les cheminées hydrothermales, *etc.* Les premiers organismes thermophiles ont été découverts en 1960 par Thomas Brock dans les sources chaudes du parc de Yellowstone (Brock 2012). Ce sont majoritairement des procaryotes, appartenant à des *phyla* des domaines des Archées ou des Bactéries, mais il existe aussi quelques eucaryotes considérés thermophiles, dont les températures maximales de croissance avoisinent les 50°C. Chez les procaryotes, un grand nombre de thermophiles est affilié au domaine des Archées, au sein duquel se trouvent les organismes vivant à des températures les plus extrêmes, les hyperthermophiles, tels que l'Archée *Pyrolobus fumarii*, chémolithoautotrophe réducteur de nitrates, isolée prés d'un fumeur noir. Cet organisme capable de se diviser à la température maximale de 113°C, voit son cycle cellulaire inhibé en dessous de 90°C (Blöchl 1997). La croissance d'Archées à 121°C, *Geogemma barossi 121*, a été rapportée mais ces résultats restent controversés (Kashefi et *al.* 2003).

Au sein du domaine des Bactéries, les thermophiles sont représentés par des eubactéries appartenant aux genres *Bacillus*, *Clostridium, Thiobacillus, Desulfotomaculum, Thermus, etc*, des bactéries sulfato-reductrices, mais également des bactéries photosynthétiques comme les cyanobactéries, des bactéries pourpres et vertes. Les cyanobactéries sont considérées thermophiles lorsqu'elles présentent une croissance optimale à des températures supérieures à 45°C (Castenholz 1969). La première cyanobactérie thermophile isolée en laboratoire est *Synechococcus lividus* (Dyer & Gafford 1961), capable de se diviser jusqu'à 55°C. Des travaux *in situ* ont cependant permis de révéler que la limite haute de croissance des cyanobactéries thermophiles se situerait plutôt entre 73 et 75°C. C'est notamment le cas pour certaines souches de *Synechococcus lividus* et *Thermosynechococcus elongatus* (Castenholz 1969, Brock 1967, Kempner 1963). La survie de ces organismes thermophiles à des conditions hors-norme s'explique par l'émergence durant l'évolution d'adaptations moléculaires leur permettant de croître à des températures extrêmes. Il semblerait en effet que les cyanobactéries thermophiles soient caractérisées par des enzymes plus stables que leurs cousines mésophiles (Madigan & Oren 1999, Laksanalamai & Robb 2004). Le fonctionnement et la stabilité membranaires semblent également être des points clés dans l'adaptation à la température (Brock 1967).

b. Les organismes psychrophiles

Plus de 70% des écosystèmes de la planète Terre sont caractérisés par des températures comprises entre 0 et 3°C (Morgan-Kiss 2006). Ces écosystèmes froids regroupent par exemple toutes les plaines abyssales des océans, les sommets montagneux et les environnements polaires. La vie y est dominée par des organismes psychrophiles, *i.e* les êtres vivants dont la température optimale de croissance est inférieure à 15°C, et dont la température maximale de croissance est inférieure à 20°C (Eddy 1960, Morita 1975) et les psychrotrophes, *i.e* les organismes capables de se développer à des températures inférieures à 15°C, mais dont la température optimale de croissance est supérieure à 18°C. Les défis de la vie à basse température sont nombreux : réduction de l'activité enzymatique, diminution de la fluidité membranaire, altération du transport des nutriments et des produits de dégradation, diminution du taux de transcription, traduction et division cellulaire, repliement inapproprié et dénaturation des protéines, et formation de glace intracellulaire. Pour pallier cela, les organismes psychrophiles ont évolué différentes stratégies, comme celle de la synthèse de polypeptides particuliers, les *antifreeze proteins* (AFP). Ces dernières se fixent de façon irréversible aux cristaux de glace en formation, inhibant ainsi leur croissance et abaissant ainsi le point de congélation intracellulaire (Jia & Davies 2002, Feller & Gerday 2003). D'autres molécules seraient également impliquées dans la diminution du point de congélation comme le tréhalose (disaccharide constitué de deux molécules de glucose) qui prévient la dénitratation et la tendance à l'agrégation des protéines exposées au froid (Phadtare, 2004). Chez les bactéries en particulier, les exopolysaccharides, à travers la modification de l'environnement physico-chimique de la cellule, participeraient à la rétention de l'eau intracellulaire, la séquestration et la concentration des nutriments, ainsi que la protection des enzymes extracellulaires contre la dénaturation (Mancuso Nichols et *al.* 2005). En effet, le maintien des activités enzymatiques et protéiques à des températures glaciales est un enjeu vital. Les enzymes, catalyseurs des réactions biochimiques indispensables à la vie, doivent être suffisamment flexibles pour pouvoir exercer leur activité catalytique, tout en étant suffisamment rigide pour conserver leur structure. Alors que les enzymes des bactéries thermophiles sont suffisamment rigides pour résister à des températures élevées, leur flexibilité ne leur permet pas d'être efficaces dans le froid. *A contrario,* les protéines des psychrophiles ont été beaucoup moins étudiées. Il semblerait cependant que ces organismes possèdent des enzymes caractérisées par un réseau d'interactions moléculaires plus lâche que leurs homologues thermophiles, les rendant plus flexibles et ainsi fonctionnelles à faible température. Cependant, ces enzymes sont moins stables dès lors que la température augmente (D'Amico et *al.* 2006). Les adaptations des psychrophiles ne s'arrêtent pas là. En effet, leur membranes sont particulièrement riches en lipides insaturés, permettant d'ajuster la fluidité des membranes à un degré nécessaire pour le bon fonctionnement des protéines qui y sont insérées (Goodchild et *al.* 2004, Ratkowsky et *al.* 2005).

A l'heure actuelle, les températures les plus froides auxquelles la croissance et le métabolisme de microorganismes ont été reportés sont respectivement -12°C et -32°C (Bakermans & Skidmore 2011). Les bactéries les plus couramment observées sont les Gram négatives α, β, et γ-protéobactéries (*Pseudomonas* spp. et *Vibrio* spp.) et le *phylum* des *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*. Les bactéries Gram positives sont quand à elles principalement représentées par des espèces des genres *Arthrobacter* et *Micrococcus*. Les bactéries dominent généralement en nombre et en diversité les archées, bien que dans certains environnements tels que les grandes profondeurs océaniques, elles peuvent être trouvées en nombre équivalent. Les cyanobactéries sont particulièrement douées pour survivre dans ces environnements glaciaires, où elles sont généralement les phototrophes dominants dans les lacs et rivières, les calottes glaciaires, les déserts polaires et le permafrost. C'est notamment le cas des Oscillatoriales, Nostocales et Chroococales qui jouent un rôle particulièrement important dans l'écologie des lacs Arctiques et la structuration des communautés des microorganismes dans les glaces (Bonilla et *al.* 2005, Jungblut et *al.* 2010, Tang et *al.* 1997). De façon surprenante, malgré l'obscurité totale, des cyanobactéries (et des algues vertes) ont également été retrouvées dans le permafrost Sibérien (Vishnivetskaya et *al.* 2006). Une des hypothèses avancées pour expliquer leur survie propose que ces photoautotrophes survivent dans le permafrost depuis des millions d'années dans un état de dormance, sans avoir perdu leurs capacités photosynthétiques, et sont capables de proliférer dès que les conditions environnementales le permettent (Vishnivetskaya et *al.* 2006). Cependant, bien qu'étant dominantes dans de nombreux écosystèmes polaires, il est intéressant de constater que les cyanobactéries planctoniques sont rares voire absentes dans les océans polaires (Vincent et *al.* 2000).

II.

DIVERSITÉ TAXONOMIQUE ET FONCTIONELLE DU PHYTOPLANCTON

1. La diversité cachée d'une goutte d'eau de mer : le plancton microscopique

La planète Terre s'est formée il y a environ 4.6 milliards d'années et depuis 4.3 milliards d'années, sa surface est majoritairement recouverte d'eau. L'origine de toute cette eau sur Terre n'a pas encore été clairement expliquée (Robert 2001, Drake & Righter 2002), alors qu'elle constitue l'essence même de l'identité de notre planète et la distingue des autres astres. Sur Terre, 97% de l'eau est salée, constituant les océans. Ces masses d'eau océaniques couvrent plus de 70% de la surface terrestre et représentent ainsi un environnement physico-chimique dominant notre planète.

D'un point de vue numérique, la très grande majorité des organismes qui peuplent ce vaste écosystème est planctonique (du grec *planktos*, errer), *i.e.* qui se déplace uniquement au gré des courants (Hensen, 1887) et une grande partie de sa diversité reste encore à appréhender. En effet, les organismes planctoniques sont, pour la plupart, communément rassemblés sous le terme de « microbes » (ou microorganismes), littéralement petite vie. Les microorganismes rassemblent les organismes vivants invisibles à l'œil nu. Ils comprennent diverses formes de vie dont les procaryotes (bactéries et archées), les eucaryotes unicellulaires et, éventuellement, les virus selon la définition du vivant utilisée. Au sein des eucaryotes unicellulaires on distingue les champignons, mais également tous les eucaryotes unicellulaires (mais capables de former des colonies pour certains) qui n'appartiennent ni aux métazoaires, ni aux eumycètes et embryophytes, et que, par exclusion, Haeckel a défini comme « protistes ». Ce groupe, paraphylétique (*i.e.* qui ne rassemble pas tous les descendants d'une lignée), est très hétérogène tant du point de vue taxonomique, anatomique que physiologique (Fig. 7). Alors qu'originellement la définition du mot protiste comprenait uniquement la diversité des formes hétérotrophes, l'acquisition de nouvelles données morphologiques et ultrastructurales à la fin du XXème siècle a cependant clairement démontré les relations

phylogénétiques entre les formes chloroplastiques et les formes hétérotrophes (Caron et *al.* 2012). Depuis lors, les protistes rassemblent les eucaryotes unicellulaires hétérotrophes et mixotrophes. La reconnaissance de ces protistes et de leur contribution aux processus océaniques a été tardive par rapport aux procaryotes (Not et *al.* 2004, Caron et *al.* 2008) et leur diversité commence tout juste à être révélée, notamment au travers de l'expédition *TARA Ocean* (Caron et *al.* 2009, de Vargas et *al.* 2015). Cependant, les protistes excluent un compartiment essentiel de la vie océanique, les procaryotes, qu'ils soient photosynthétiques ou non.

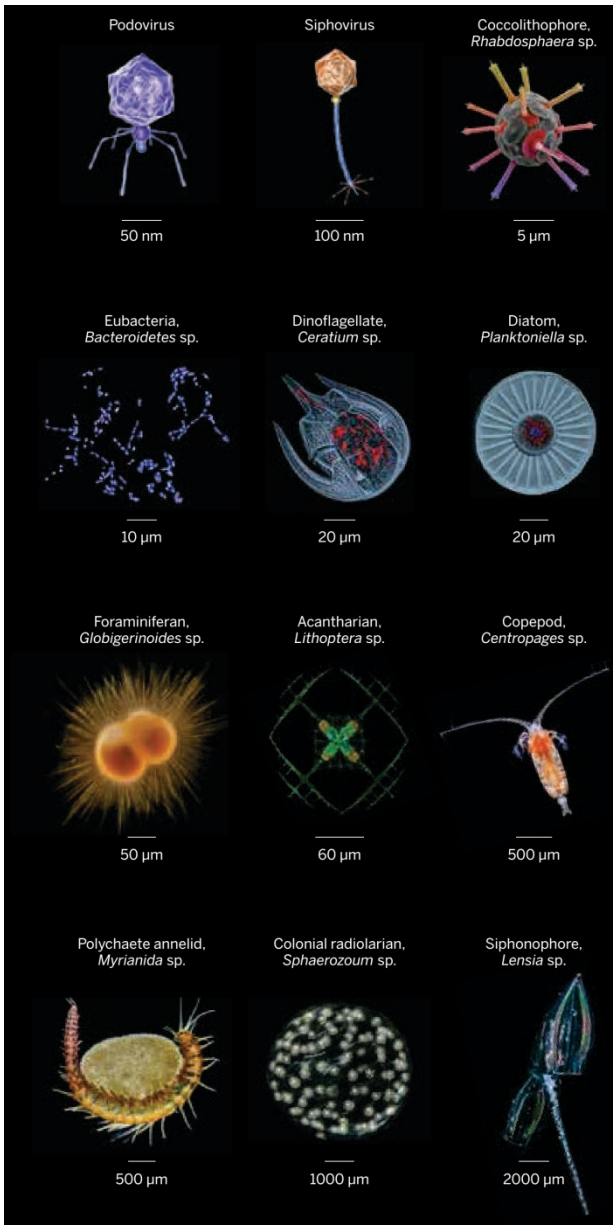


Figure 7 | **Diversité des protistes marins**. Diversité des organismes trouvés dans les océans, des virus au zooplancton étudiés notamment au cours de *l'expédition Tara Ocean* (Photo TARA Consortium, Science).

Une vision plus ancienne, qui ne reflète cependant pas la diversité des microbes de l'environnement marin notamment *via* les processus endosymbiotiques, et la capacité ou non à

réaliser la photosynthèse oxygénique, est toujours couramment utilisée. Celle-ci différencie les organismes planctoniques en zoo- (du grec *zoon*, animal) et phytoplancton (*phytos*, plante).

2. Le phytoplancton : poumon de l'océan

Le phytoplancton rassemble tous les organismes photosynthétiques microscopiques, eucaryotes et procaryotes. Bien qu'il ne représente que 1% de la biomasse photosynthétique de la planète, le phytoplancton est responsable de 45 % de la production primaire globale (Fig. 8, Field et *al.* 1998, Falkowski 1994), ce qui en fait le garant invisible de l'équilibre de l'écosystème océanique.

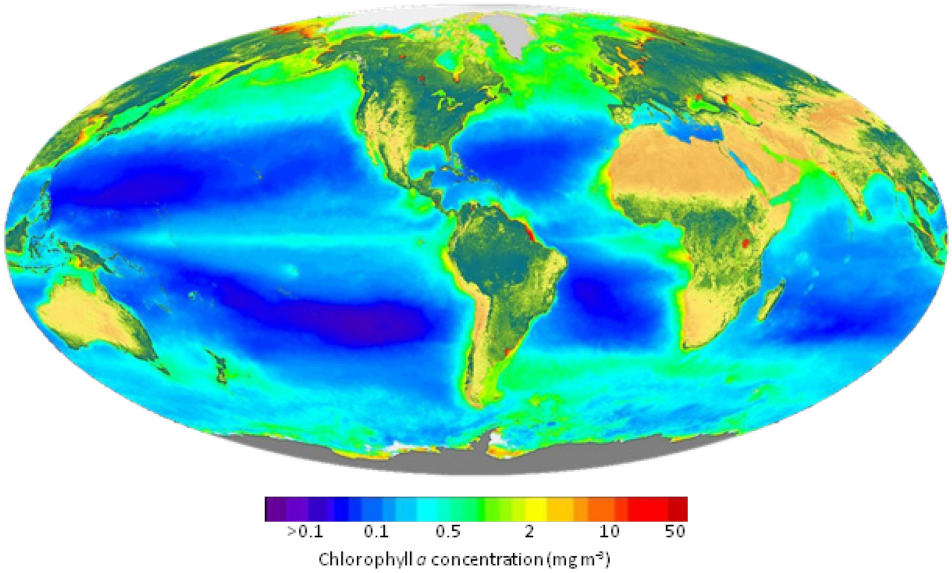
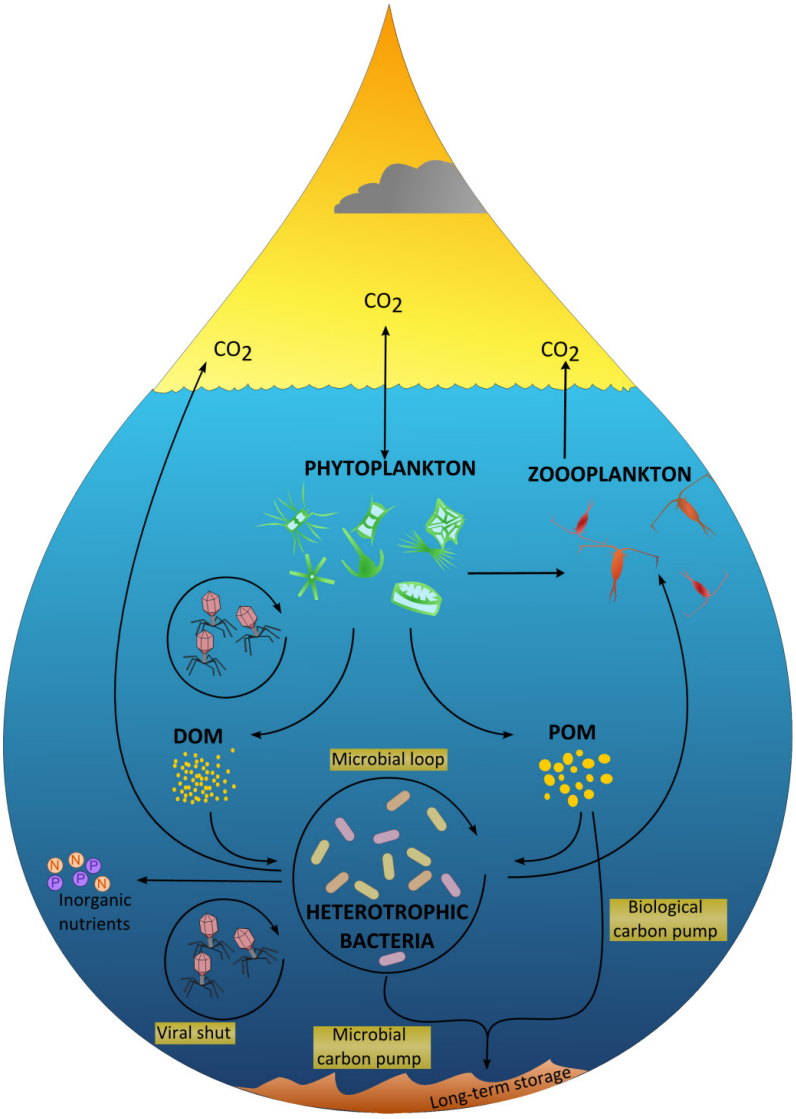


Figure 8 | **Production primaire mondiale océanique et terrestre**. La concentration en chl *a* est représentée en mg chl *a* m^{-3}. Les données sont issues des images satellitaires Seawifs Project (NASA/Goddard Space Flight Center& ORBIMAGE).

a. Rôle du phytoplancton dans la pompe biologique

De par leur abondance, les organismes phytoplanctoniques jouent un rôle essentiel dans les grands cycles biogéochimiques de la planète et notamment celui du carbone. En effet, ces organismes photosynthétiques sont capables de fixer le carbone atmosphérique sous la forme de CO_2 et, *via* l'utilisation de l'énergie lumineuse, le convertissent en matière organique carbonée (*cf* paragraphe photosynthèse). En comparaison aux plantes terrestres, les microorganismes planctoniques sont particulièrement efficaces dans l'absorption du CO_2 atmosphérique grâce à leur rapport

surface/volume élevé, permettant des taux de fixation de carbone important dans un petit volume. Ainsi, à travers leur contribution importante à la production primaire globale (40 – 50% ; Falkowski 1994), le phytoplancton représente un réservoir considérable de matière organique. Environ la moitié du carbone fixé par le phytoplancton constitue la base d'un réseau trophique complexe et sera transférée dans les niveaux trophiques supérieurs à travers le broutage du phytoplancton par le zooplancton, puis la prédation de ces derniers par les consommateurs primaires. L'autre moitié est excrétée, sous forme de matière organique particulaire ou dissoute (*Particulate/Dissolved Organic Matter*, POM/DOM), telle que du carbone, azote et phosphore organique. Cette matière organique constitue la neige marine, c'est-à-dire une pluie ininterrompue d'agrégats, de matière et détritus tombant de la couche photique vers le fond des océans (Fig. 9).



<u>Figure 9</u> | Rôle du phytoplancton dans la pompe biologique et boucle microbienne océanique. Le phytoplancton est un acteur clé de l'export et séquestration du carbone vers les fonds océaniques, et du recyclage de la matière à travers la boucle microbienne (modifié de Banchan et *al.* 2014).

Au cours de ce voyage, une partie de cette matière va être recyclée en matière inorganique à travers la boucle microbienne, dont les actrices principales sont des bactéries hétérotrophes et des archées (Fig. 9). Ces dernières, en reminéralisant les nutriments organiques tels que l'azote et le phosphore, les rendent à nouveau disponibles, sous leur forme inorganique, pour les organismes phytoplanctoniques. La partie non reminéralisée, appelée carbone récalcitrant, n'est pas recyclée à travers la boucle microbienne, et va ainsi être séquestrée, sous sa forme inorganique, à long terme au fond des océans (Jia et *al.* 2010). Enfin, les virus contribuent eux aussi à la libération de matière dissoute et particulaire à travers la lyse virale d'organismes phytoplanctoniques et bactériens. La pompe biologique est définie comme l'ensemble des mécanismes biologiques qui contribuent à l'export de carbone de la couche photique et son enfouissement au fond de l'océan pour des milliers d'années (Fig. 9).

Alors que la contribution des organismes phytoplanctoniques les plus gros est prise en compte dans les modèles depuis plusieurs décennies (Walsh et *al.* 1981, Walsh 1983), celle des plus petits organismes phytoplanctoniques (picophytoplancton, *cf.* paragraphe classes de tailles) dans la pompe biologique a pendant longtemps été sous-estimée. En effet, de par leur petite taille, leur vitesse de sédimentation lente, et leur consommation rapide dans la boucle microbienne, l'implication du picophytoplancton était jusqu'à peu ignorée dans les modèles biogéochimiques de carbone. Richardson & Jackson (2007) ont cependant récemment démontré que la contribution à l'exportation de carbone vers les fonds océaniques des différentes classes de tailles phytoplanctoniques est en fait proportionnelle à leur contribution à la production primaire. Ainsi, dans le Pacifique équatorial, le picophytoplancton soutient 70% de la production primaire nette et est ainsi responsable de 87% du carbone organique particulaire exporté *via* les détritus et 76% du carbone exporté à travers le mesozooplancton, les brouteurs et les détritivores (Richardson & Jackson 2004). Les flux de sédimentation du picoplancton ont également été recalculés en tenant compte de la formation d'agrégats par le picophytoplancton et une vitesse de sédimentation considérablement augmentée a été déterminée (Johnson & Lin 2009). De plus, une étude récente suggère que le picophytoplancton serait également impliqué dans l'export de carbone à travers l'excrétion de vésicules lipidiques contenant des acides nucléiques, qui n'avaient été observées jusqu'alors uniquement chez les bactéries hétérotrophes (Fig. 10 ; Biller et *al.* 2014). Le rôle de ces vésicules n'est à l'heure actuelle pas encore élucidé, mais de par leur teneur importante en carbone organique particulaire, ces vésicules pourraient favoriser la croissance de bactéries hétérotrophes, jouer un rôle dans la défense cellulaire contre les infections phagiques, ou encore constituer un réservoir d'information génétique, constituant ainsi de possibles vecteurs pour le transfert horizontal de gènes (Biller et *al.* 2014). Ces auteurs ont estimé que la production de vésicules par ces picocyanobactéries représenterait entre 10^4 et 10^5 tonnes de C exporté par jour à l'échelle de l'océan global (Biller et *al.* 2014).

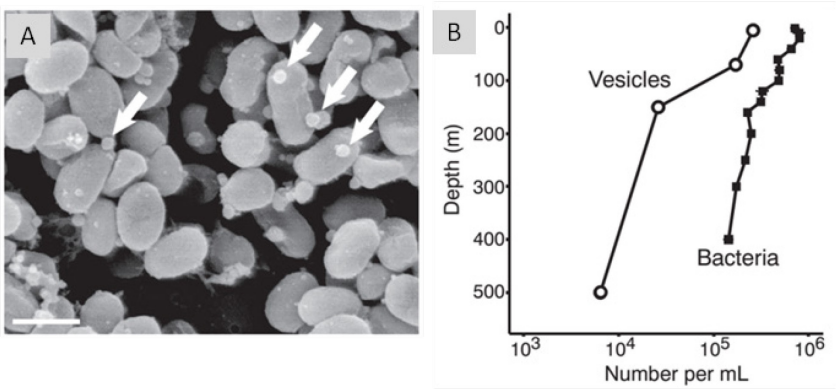


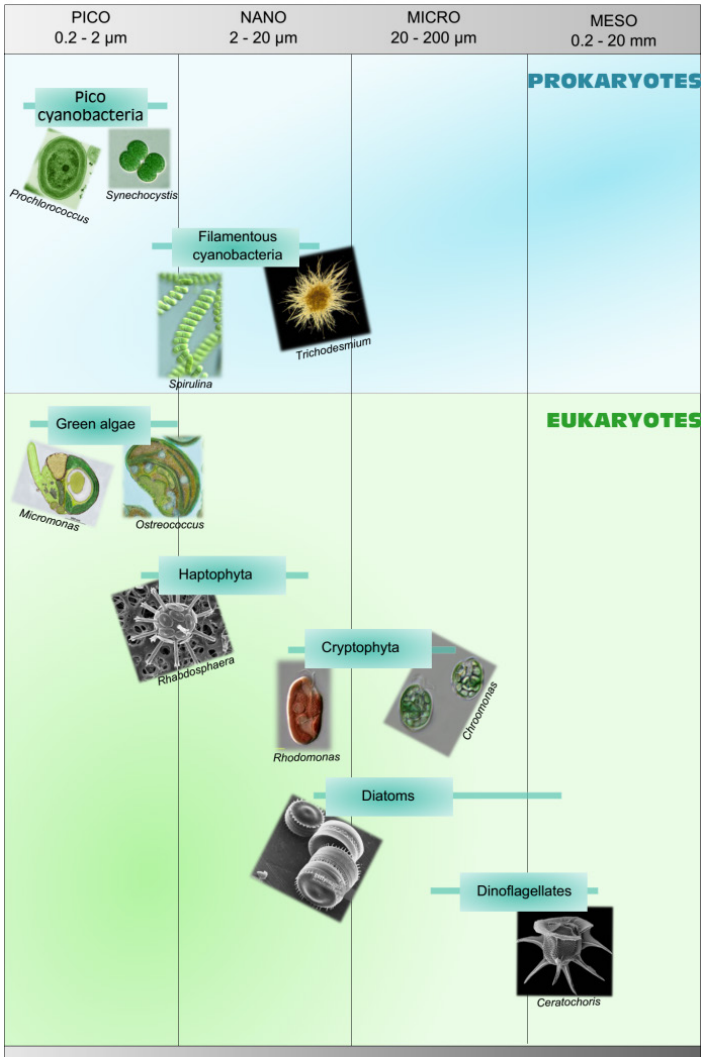
Figure 10 | **Vésicules produites par le picophytoplancton et leur abondance le long de la colonne d'eau.** Photographie en microscope électronique à balayage d'une cyanobactérie (*Prochlorococcus* MIT9313) et de nombreuses petites vésicules sphériques indiquées par des flèches blanches (**A**) ; Concentrations des vésicules (cercles blancs) et des bactéries (cercles noirs) dans la mer des Sargasses (**B** ; Biller et *al.* 2014).

Il apparait donc évident que la prise en compte de la contribution du picophytoplancton dans l'export de carbone est nécessaire à la fiabilité et la précision des modèles.

b. Classes de tailles et diversité taxonomique

Le plancton est classiquement divisé en classes de tailles (Sieburth et *al.* 1978, Fig. 8). Le phytoplancton est présent quasiment exclusivement dans les classes de tailles micro, nano et picoplanctoniques (Fig. 11). Ainsi, le mésophytoplancton rassemble les organismes dont la taille est comprise entre 0.2 et 20 mm, représentés principalement par les diatomées et les dinoflagellés. Le microphytoplancton (20 – 200 µm) est principalement représenté par les diatomées et les dinoflagellés. Cette classe de taille domine la biomasse des environnements côtiers, riches en sels nutritifs, en particulier durant les efflorescences. Le nanophytoplancton regroupe les organismes de taille inférieure, entre 2 et 20 µm, tels que les cryptophytes qui représentent un taxon diversifié rassemblant plus de 200 espèces, les haptophytes et certaines cyanobactéries filamenteuses. Enfin, les plus petits organismes photosynthétiques sont rassemblés dans la classe du picophytoplancton (0.2 – 2 µm) qui comprend de nombreux petits eucaryotes photosynthétiques dont la diversité commence seulement à être appréciée (Guillou et *al.* 2004, Vaulot et *al.* 2008, de Vargas et *al.* 2015) et une composante procaryotique importante, les picocyanobactéries. Le picophytoplancton est généralement dominant dans les eaux du large, caractérisées par de faibles concentrations en sels nutritifs. Les picoeucaryotes, dont la taille est comprise entre 0.8 et 2 µm sont étudiés depuis les années 1950 (Knight-Jones & Walne 1951, Butcher 1952), mais c'est seulement depuis quelques années que leur incroyable diversité commence à être dévoilée (Vaulot et *al.* 2008, de Vargas et *al.* 2015). Les picoeucaryotes représentent en effet un groupe très diversifié, incluant 3 taxons majeurs : les Chlorophytes, les Haptophytes et les Hétérokontes (Vaulot et *al.* 2008). Ces taxons sont

particulièrement abondants dans les zones côtières, en particulier en zones tempérées et tropicales, (Moran 2007, Kirkham et *al.* 2013) et dominent la composante phytoprocaryotique dans les zones polaires (Lovejoy et *al.* 2006, 2007).



<u>Figure 11</u> | **Répartition des différentes classes de tailles du phytoplancton selon la classification de Seiburth et *al.* (1978)**. Le phytoplancton est représenté par des organismes procaryotes et eucaryotes, principalement distribués au sein de différentes classes de tailles de 0.2 µm à 20 mm.

La lignée des Chlorophytes (algues vertes) est à la base de la lignée verte, qui a donné ensuite naissance aux plantes terrestres. C'est au sein de celle-ci qu'ont été décrits les plus petits eucaryotes connus à ce jour, tels que *Bathycococcus*, *Micromonas* et *Ostreococcus* (Mamiellophyceae, Mamiellales). La lignée des Hétérokontes (du grec *kontos*, flagelle, et *hetero,* différent, *i.e.* ces organismes ont des flagelles inégaux), également appelés Straménopiles, est caractérisée par la présence de mastigonèmes sur les flagelles, et rassemble des organismes moins bien connus car très peu de leurs représentants ont pu être isolés en culture. Contrairement aux Chlorophytes, qui rassemblent en grande majorité des organismes photosynthétiques, les Hétérokontes regroupent des

organismes phototrophes, hétérotrophes et mixotrophes. Ils sont le produit d'une endosymbiose secondaire (*i.e* la phagocytose d'un organisme eucaryote photosynthétique par un autre eucaryote), ajoutant ainsi un degré de complexité à leur organisation intracellulaire. On y trouve par exemple le genre *Bolidomonas*, qui appartient à un groupe frère des diatomées mais ne présente pas de structure siliceuse et est capable de déplacements très rapides, de près de 800 fois sa taille cellulaire par seconde (Guillou et *al.* 1999). Les Haptophytes ou Prymnésiophytes, sont un troisième groupe rassemblant des picoeucaryotes photosynthétiques. Cet embranchement a évolué suite à une endosymbiose secondaire, mais serait apparu plus récemment au cours de l'évolution que les Hétérokontes (Fujiwara et *al.* 2001). Les Haptophytes comprennent notamment les Coccolitophores, caractérisés par un exosquelette composé de plaques calcaires, les coccolithes. La représentante la plus emblématique est *Emiliania huxleyi*, capable de former de vastes efflorescences visibles depuis l'espace (Fig. 12).

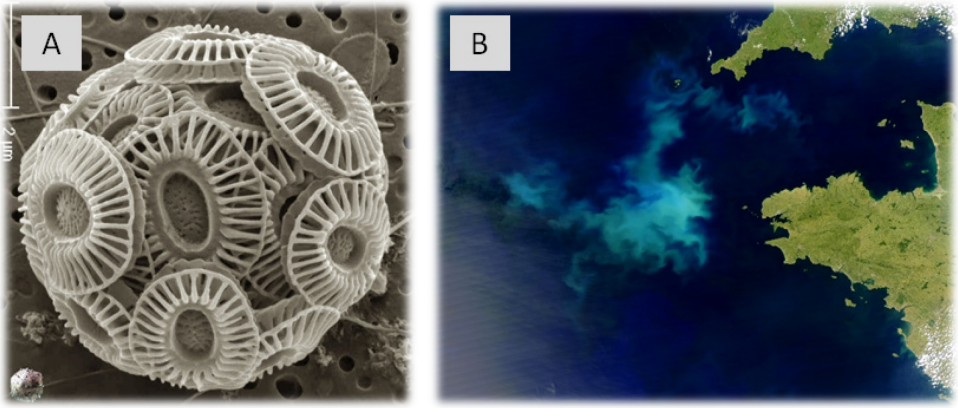


Figure 12 | **Bloom de coccolithophores visible depuis l'espace.** *Emiliania huxleyi* en microscopie électronique à balayage (**A**) ; efflorescence *d'Emiliania* au cours de l'été 2014 au large des côtes Bretonnes photographiée par le satellite MODIS (**B** ; NASA)

Alors que les picoeucaryotes constituent un groupe très diversifié, la composante procaryotique de cette fraction de taille est représentée par deux organismes emblématiques : *Prochlorococcus* et *Synechococcus*. Ces deux picocyanobactéries sont considérées comme les organismes photosynthétiques les plus abondants sur la planète. Leur production primaire nette a été estimée à 4 Gt C an^{-1} et 8 Gt C an^{-1} soit une contribution à la production primaire nette des océans à hauteur de respectivement 8% et 16% (Flombaum et *al.* 2013).

3. Les picocyanobactéries marines *Prochlorococcus* et *Synechococcus*

a. *Histoire et évolution des cyanobactéries*

Les cyanobactéries forment un groupe monophylétique au sein du domaine des bactéries, (Stanier et *al.* 1971, Castenholz & Waterbury 1989). Les phylogénies réalisées à partir de différents marqueurs moléculaires suggèrent que les cyanobactéries auraient été un des premiers groupes à diverger au sein de la lignée bactérienne ancestrale (Blank 2004). Leur origine évolutive reste encore sujette à controverse, au regard des différences de datation de leur origine. Des premiers travaux, basés sur des traces fossiles, ont proposé que les cyanobactéries seraient apparues il y a 3.5 milliards d'années (Schopf & Packer 1987, Schopf 1993). Une analyse plus récente, combinant la paléobiologie et des analyses phylogénétiques, daterait ce groupe plutôt de la fin de l'Archéen, il y a 2.7 milliards d'années (Blank & Sanchez-Baracaldo 2010). Les cyanobactéries sont à l'origine de la photosynthèse oxygénique, qui consiste notamment en l'extraction d'électrons d'une molécule d'eau pour générer un flux électronique entre deux photosystèmes travaillant en série. Avant l'apparition des cyanobactéries, l'atmosphère terrestre était très pauvre en O_2 et riche en CO_2, CH_4, et la teneur en Fe^{2+} dans l'eau était très élevée. Ainsi, durant les premiers millions d'années de photosynthèse oxygénique, le dégagement de l'oxygène par les cyanobactéries entraîna l'oxydation du fer ferreux Fe^{2+} en fer ferrique et sa précipitation en hématite ou magnétite.

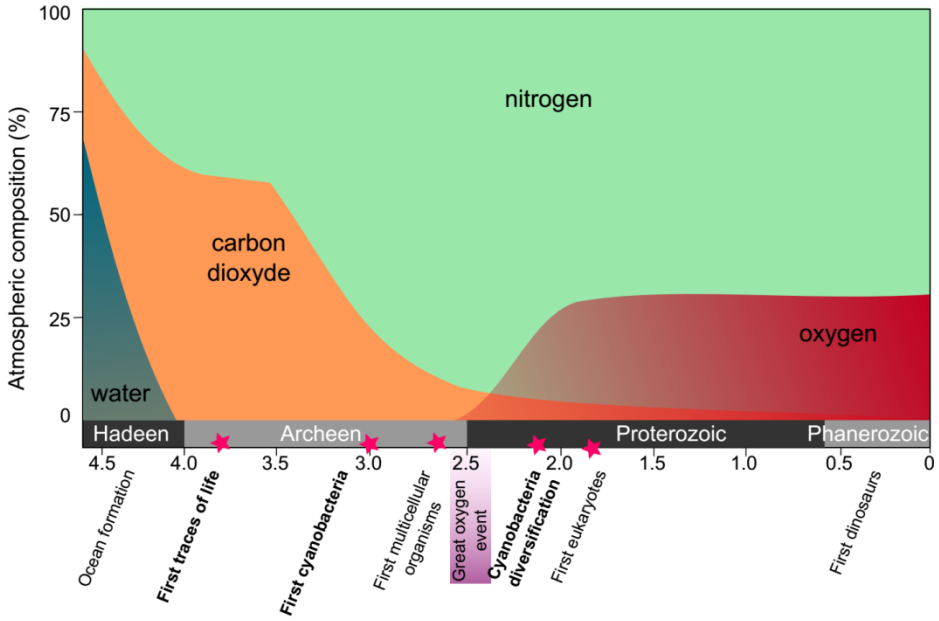


Figure 13 | **Evolution de la composition atmosphérique, et grands événements biologiques et chimiques associés**. L'apparition des cyanobactéries sur terre, à travers la photosynthèse, a modifié la composition atmosphérique de la planète.

Avec l'épuisement du fer dissous dans les océans, l'O_2 libéré par les cyanobactéries a enrichi les océans puis l'atmosphère terrestre. Cet événement, daté de 2.4 – 2.5 milliard d'années, est défini comme la « grande oxygénation », ou encore la « catastrophe de l'oxygène ». Au cours des millions d'années qui suivirent, l'oxygène produit et libéré au cours des photoréactions, s'est progressivement accumulé dans l'atmosphère, influençant de façon considérable l'évolution biologique de la planète Terre (Fig. 13). Les premières étapes de la diversification des cyanobactéries auraient ensuite eu lieu au cours du Protérozoïque, lorsque la concentration en oxygène était en cours d'augmentation (Schirrmeister et *al.* 2013). Cette diversification aurait abouti à la colonisation, par les cyanobactéries, des écosystèmes estuariens, puis océaniques, conduisant à élargir considérablement la niche écologique des organismes pratiquant la photosynthèse oxygénique. C'est au cours du Protérozoïque, avec la diversification des procaryotes phototrophes oxygéniques, que la teneur en oxygène de l'atmosphère augmenta considérablement, pour atteindre, il y a 2.2 milliard d'années des niveaux similaires aux concentrations actuelles (Bekker et *al.* 2004). Cette teneur en oxygène a permis, *via* l'endosymbiose d'une cyanobactérie, la diversification des formes de vie sur terre, et l'apparition des premiers eucaryotes il y a environ 1.8 milliards d'années (Han & Runnegar 1992, Knoll 1994, 2008, Javaux et *al.* 2001). Au cours de l'évolution, différents événements de colonisation du milieu océanique se seraient probablement produits, de manière indépendante. Des millions d'années d'évolution ont conduit aux formes de cyanobactéries retrouvées aujourd'hui dans l'environnement.

b. Découverte des picocyanobactéries marines

Alors que les picocyanobactéries marines sont aujourd'hui considérées comme les phototrophes oxygéniques numériquement les plus abondants dans bien des régions océaniques, elles ne sont toutefois représentées que par les deux genres que sont *Prochlorococcus* et *Synechococcus*, découverts il y a une quarantaine d'années seulement. La mise en évidence de ces organismes de taille microscopique et de leur importance a été possible grâce à l'apparition de nouvelles technologies telles que la microscopie à épifluorescence et la cytométrie en flux. C'est en 1979 que John Waterbury observa la présence en abondance d'une cyanobactérie coccoïde fluoresçant en orange sous lumière bleue (caractéristique de la fluorescence de la phycoérythrine), et assigna cet organisme au genre *Synechococcus* (Waterbury et *al.* 1979, Fig.14). Cette étude insiste notamment sur l'ubiquité de cet organisme et sa taille très réduite comprise entre 0.8 et 2 µm.

Quelques années plus tard, c'est l'adaptation de la cytométrie en flux à l'océanographie qui permit à Sallie Chisholm et collaborateurs de détecter pour la première fois, au cours de campagnes océanographiques dans l'Atlantique Nord, des populations de cellules picophytoplanctoniques encore plus petites que celles de *Synechococcus* (ne dépassant pas 1.5 µm), qui s'en différencient par l'absence de fluorescence orange (Chisholm et *al.* 1988 ; Fig. 14).

Nature Vol. 277 25 January 1979

Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium

JOHN B. WATERBURY
STANLEY W. WATSON
ROBERT R. L. GUILLARD
LARRY E. BRAND

NATURE VOL. 334 28 JULY 1988

A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone

Sallie W. Chisholm, Robert J. Olson*, Erik R. Zettler*, Ralf Goericke†, John B. Waterbury* & Nicholas A. Welschmeyer†

Figure 14 | **Première page des articles révélant l'existence de *Synechococcus* et *Prochlorococcus***. John Waterbury signale le premier l'existence de *Synechococcus* en 1979 (panel de gauche), et quelques années plus tard, en 1988, Sallie Chisholm révèle la découverte de *Prochlorococcus* (panel de droite).

Les années qui ont suivi cette découverte ont été dédiées à la caractérisation physiologique et phylogénétique de cette cyanobactérie très proche de la lignée des *Synechococcus* marins qui fut baptisée *Prochlorococcus* (Chisholm et *al.* 1992).

III.

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LA PHYSIOLOGIE DES CYANOBACTÉRIES

Depuis la découverte et la prise de conscience de l'importance des cyanobactéries, nombreuses de leurs représentantes ont été isolées de l'environnement et mises en cultures en laboratoire. Les premières études en laboratoire sont attribuables à Roger Stanier, qui a consacré une partie de ses travaux à l'évolution des cyanobactéries, appelé alors algues bleues-vertes. Afin de prouver que ces organismes étaient affiliés au domaine des bactéries, il réalisa les premières isolations et mises en cultures, notamment de la souche *Synechocystis* PCC 6301. Les souches modèles de cyanobactéries sur lesquelles la majorité des études de physiologie ont été réalisées se sont ensuite diversifiées. Chez les cyanobactéries d'eau douce, ces souches sont notamment *Anabanena* sp. PCC7120, *Microcystis aeruginoa* NIES-83, *Cyanothece* sp. ATCC51142, et *Synechocystis* sp. PCC6803. Chez les cyanobactéries marines, les représentantes les plus étudiées au cours des trente dernières années sont *Synechococcus* sp. WH7803, *Synechococcus* sp. WH8101, *Prochlorococcus* sp. MED4 et *Prochlorococcus* sp. MIT9311.

Cependant, l'utilisation de tels modèles de laboratoire représente une vision restreinte de la diversité présente dans l'environnement (Amann et *al.* 1995, Rappé & Giovannoni 2003). En effet, la majorité de la diversité microbienne reste à l'heure actuelle impossible à cultiver en laboratoire, masquant une part importante des adaptations et processus évolutifs de l'environnement. Toutefois, ces souches modèles sont indispensables aux prémices de la compréhension de la physiologie de ces organismes, et permettent, l'étude de différents niveaux d'intégration, du niveau moléculaire à l'écologie.

1. Morphologie et systèmes membranaires des cyanobactéries

Les membranes cellulaires possèdent toutes la même structure de base, formée d'une bicouche lipidique au sein de laquelle s'insèrent des protéines ainsi que des sucres (Fig. 15). Cette matrice lipidique constitue un environnement dynamique où les protéines adoptent une conformation spécifique, leur permettant d'exercer leur fonction. Ainsi, les lipides membranaires sont des composés

fonctionnels et structuraux des membranes biologiques, jouant un rôle crucial dans la structure et l'intégrité des membranes, leur fonctionnement et en particulier l'activité des protéines membranaires (Singer & Nicolson 1977).

Les membranes ont des rôles variés mais partagent toutefois certaines grandes fonctions. Elles permettent notamment la compartimentation cellulaire et présentent la propriété de perméabilité sélective, qui permet le contrôle de l'entrée et de la sortie des différentes molécules et ions entre les deux milieux qu'elles séparent.

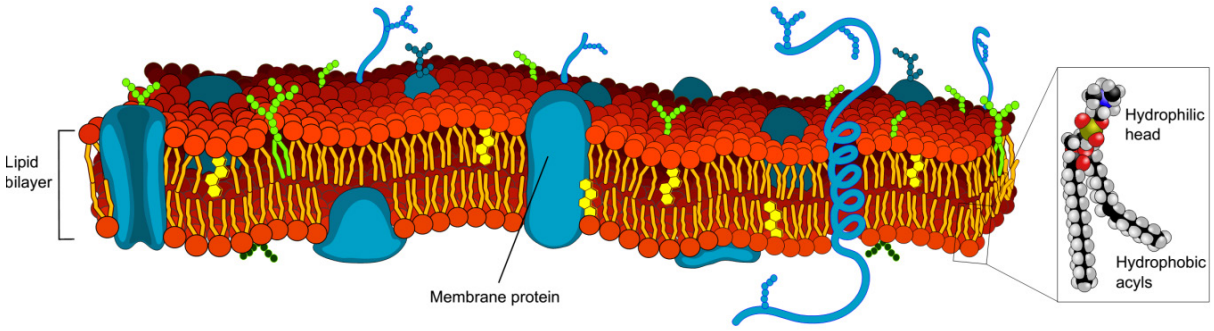


Figure 15 | **Représentation de la bicouche de lipides des membranes biologiques, avec les protéines et sucres qui y sont insérés.** Zoom sur un lipide membranaire (phosphatidylcholine), et représentation de sa tète, hydrophile, et de la queue, hydrophobe, composées de deux groupements acyles (modifié de https://fr.wikipedia.org/wiki/Membrane_(biologie))

La matrice membranaire est constituée de lipides polaires amphiphiles, caractérisés par une partie hydrophobe et une hydrophile. La tendance des parties hydrophobes à s'associer et l'affinité des régions hydrophiles à interagir avec les environnements aqueux constituent la base physique de la formation et de la structure des membranes biologiques (Van Meer et *al.* 2008).

Chez les procaryotes, Hans-Christian Gram (1884), a mis en évidence, grâce à une coloration, deux organisations distinctes de l'enveloppe cellulaire chez les bactéries. Cette coloration est basée sur l'action successive d'un colorant, le cristal violet, d'iode suivie d'une élution à l'alcool. Dans un premier temps, le colorant pénètre dans la paroi et le cytoplasme, puis dans un second temps l'iode réagit avec le colorant et le rend insoluble. L'ajout d'alcool, va alors décolorer ou non le cytoplasme bactérien en fonction du système membranaire, permettant l'identification de deux organisations membranaires distinctes. Les bactéries Gram positives sont dotées d'une paroi simple, la membrane plasmique, protégée par une épaisse couche de 40-60 nm de peptidoglycanes riche en muréine, un polymère de polysaccharides composé de phospholipides, qui est donc dans ce cas en contact direct avec le milieu extérieur. L'épaisseur de la membrane des Gram positives constitue une barrière imperméable à l'alcool, les bactéries resteront donc de couleur violette. A l'opposé, les bactéries Gram négatives ont une structure bimembranée, qui s'organise en trois parties : la membrane externe, l'espace périplasmique ou périplasme comportant une couche fine de peptidoglycanes (2-6 nm) et la

membrane plasmique. La couche beaucoup plus fine de peptidoglycane laisse passer l'alcool, qui va décolorer les cellules.

Les cyanobactéries, répondant négativement à la coloration de Gram, sont des bactéries Gram négatives. Ceci a été confirmé en 1984 par Omata et Murata, qui ont grandement contribué à la compréhension des systèmes membranaires cyanobactériens, et ont isolé chez *Synechocystis* sp. PCC 6714 trois membranes distinctes. Deux d'entre elles, de couleur orangée contenaient principalement des xanthophylles (molécules de la famille des caroténoïdes) inconnues. Les membranes les plus abondantes de couleur verte étaient riches en chl *a* en β-carotène et xanthophylles. Ils en déduirent ainsi l'existence de trois systèmes membranaires chez les cyanobactéries, respectivement la membrane externe et la membrane cytoplasmique, délimitant l'enveloppe cellulaire, et les membranes thylacoïdiennes contenant l'appareil photosynthétique (Stanier & Cohen-Bazire 1977).

a. Les systèmes membranaires des cyanobactéries

i. L'enveloppe cellulaire

La face extérieure de l'enveloppe cellulaire des cyanobactéries est généralement recouverte par le glycocalyx ou glycolemme, une couche de polysaccharides qui constituent souvent la partie cytoplasmique de glycolipides membranaires. Le glycocalyx constitue ainsi un environnement hydrophile, de structure fibreuse, qui protège la membrane externe (Fig. 16).

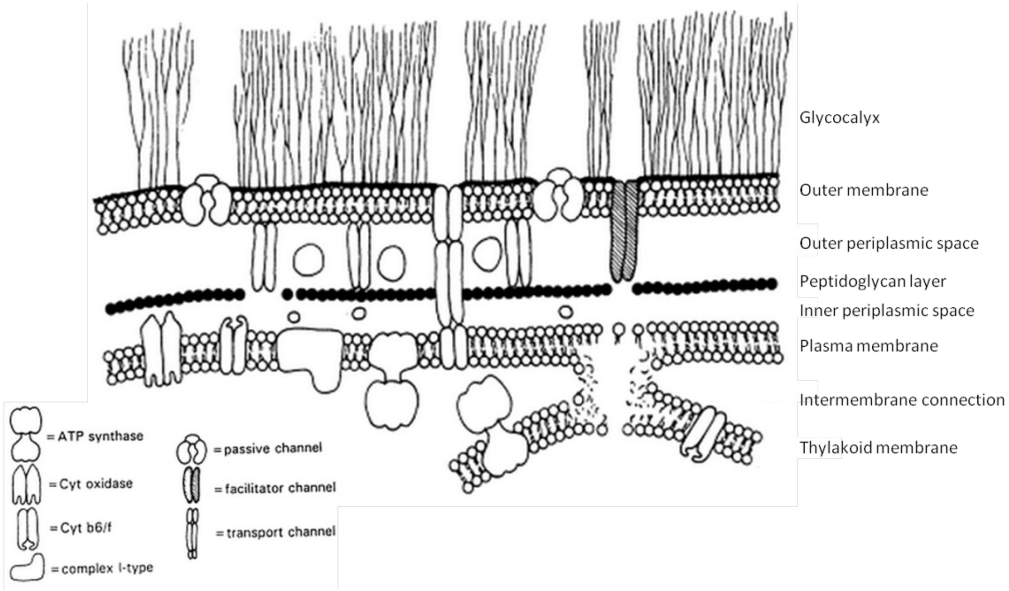


Figure 16 | **Modèle d'organisation de l'enveloppe d'une cellule cyanobactérienne**. Le glycocalyx est étroitement attaché à la membrane externe qui est riche en canaux de transport. Une couche de peptidoglycanes (représentée ici assez finement mais décrite par la suite bien plus épaisse) située dans le périplasme, sépare la membrane externe de la membrane plasmique. Des points de contact entre cette dernière et la membrane thylacoïdes ont été observés (Gantt, Bryant 1994).

Alors que chez les cyanobactéries terrestres il prévient les cellules de la dessiccation, dans l'environnement aqueux où la dilution est un maître mot, il serait notamment impliqué, dans la séquestration d'éléments nutritifs essentiels (Gantt 1994). La membrane externe des cyanobactéries a suscité jusqu'à maintenant peu d'intérêt et rares sont les études récentes qui se sont attachées à caractériser sa composition et son fonctionnement (Brahamasha 1996). Les rares travaux sur le sujet reportent pourtant une composition inhabituelle par rapport à celle des autres bactéries Gram négatives, notamment à travers la présence de caroténoïdes (Omata & Murata 1994, Resch et *al.* 1983), d'acides gras originaux tels que l'acide β-hydroxypalmitique et de protéines notamment impliquées dans d'absorption du fer. L'isolement de la membrane externe de *Synechocystis* sp. PCC 6714 a permis de mettre en évidence la présence de *maxima* d'absorption à 462, 485 et 513 nm, alors que les pics d'absorption typiques de la chl *a* à 432 et 665 nm étaient absents (Omata & Murata 1984, Jürgens & Weckesser 1985, Woitzig et *al.* 1988). Ces longueurs d'ondes d'absorption montrent la présence d'échinénone, de zéaxanthine, de myxoxanthophylle et de β-carotène (Jürgens & Weckesser 1985). La membrane externe des cyanobactéries est très riche en protéines et polysaccharides, alors que les lipides membranaires et les caroténoïdes sont relativement mineurs (Omata & Murata 1984, Jürgens & Weckesser 1985). Un espace périplasmique sépare la membrane externe et la membrane cytoplasmique au sein duquel prend place une épaisse couche de peptidoglycane. Chez *Synechococcus lividus,* les peptidoglycanes peuvent atteindre 10 nm d'épaisseur (Golecki 1979).

La membrane cytoplasmique contient des xanthophylles et de faibles quantités de β-carotène et chl *a* (Omata & Murata 1984). La membrane plasmique est riche en complexes protéiques particuliers, appelés complexes transporteurs ou canaux, dont le rôle est de faciliter le passage de solutés ou de petites molécules entre périplasme et cytosol (Nikaido & Saier 1992). Ces dernières années, la présence de chl et de précurseurs de protéines constituant l'appareil photosynthétique a été reportée dans la membrane cytoplasmique (Zak et *al.* 2001, Nieckelsen & Rengstl 2013). Ces travaux suggèrent donc que la membrane plasmique, à travers certaines zones de connexion avec les membranes thylacoidiennes, serait impliquée dans la synthèse des complexes photosynthétiques.

ii. Les membranes thylacoïdiennes

Les membranes thylacoïdiennes sont localisées dans le cytoplasme et leur agencement précis varie en fonction des espèces et de l'état physiologique (Stevens & Nierzwicki-Bauer 1991). Les membranes thylacoïdiennes sont observées chez toutes les cyanobactéries à l'exception de la cyanobactérie primitive *Gloeobacter violaceus*. Chez *Prochlorococcus* et *Synechococcus* les membranes thylacoidiennes sont organisées de façons concentriques, parallèles à la membrane cytoplasmique (Fig. 17). Les thylacoïdes forment des sacs membranaires aplatis, délimitant le lumen dans le cytosol, au sein desquels prennent place les réactions claires de la photosynthèse (*cf.* paragraphe

photosynthèse). L'organisation de ces membranes est différente chez les deux picocyanobactéries puisque les membranes sont accolées chez *Prochlorococcus* (Fig. 17), alors qu'elles sont espacées chez *Synechococcus*. Leur nombre varie également en fonction des souches et des conditions de croissance. Chez *Synechococcus*, les thylacoïdes se présentent souvent sous la forme de 3 ou 4 lamelles concentriques et régulières (Fig. 17 ; Sherman et *al.* 1994), et constitue ainsi le système membranaire le plus abondant de la cellule.

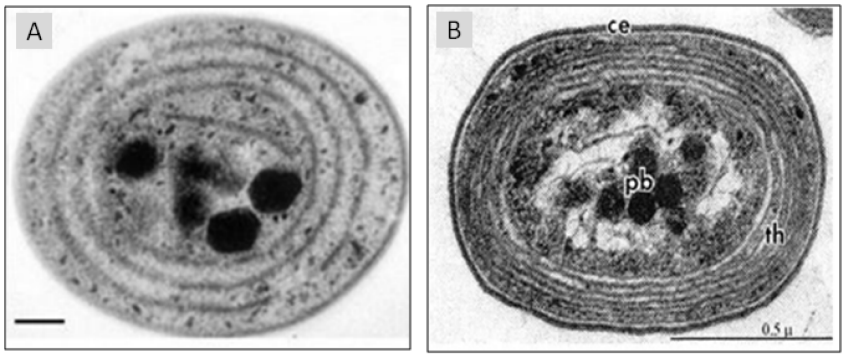


Figure 17 | **Photographie en microscopie électronique de *Synechococcus*** (**A** ; Beveridge) **et *Prochlorococcus*** (**B** ; Johnson & Sieburth 1979). Les membranes photosynthétiques de *Prochlorococcus* sont plus resserrées par rapport à *Synechococcus*.

Les thylacoïdes sont un système membranaire important car il est le lieu des réactions photochimiques mais également de la chaîne respiratoire du transport d'électrons (qui a lieu dans la membrane cytoplasmique et dans les thylacoïdes ; Pescnek et *al.* 2004, Lea-Smith et *al.* 2013, Mullineaux, 2014). Outre les protéines clés impliquées dans la photosynthèse (*cf* paragraphe photosynthèse), les thylacoïdes renferment également un grand nombre d'oxydases (cytochrome *bd*, plastoquinones, succinate deshydrogénase, *etc.* ; revu par Mullineaux 2014)

b. *La composition lipidique des systèmes membranaires*

i. Les têtes polaires

Les lipides jouent un rôle crucial dans la signalisation cellulaire, le transport, et la transduction du signal lumineux à travers l'appareil photosynthétique et le transfert d'électrons. Les lipides membranaires sont ainsi très importants dans bien des aspects de la photosynthèse et du métabolisme énergétique chez les cyanobactéries. Les propriétés physiques des membranes dépendent en grande partie des classes lipidiques qui les constituent. Les membranes cyanobactériennes présentent une composition remarquablement conservée au cours de l'évolution. Quatre lipides dominent la composition des systèmes membranaires cyanobactériens, appartenant tous au groupe des glycérolipides (Fig. 18 ; Wada & Murata 1998). Les glycérolipides sont caractérisés par la présence dans leur structure d'une molécule de glycérol (3 carbones), possédant un ou deux

groupements acyles estérifiés aux positions *sn-1* et *sn-2* du glycérol (carbones 1 et 2 du glycérol), et une tête polaire à la position *sn-3*, qui caractérisent chacune des quatre classes. Trois d'entre elles regroupent des glycolipides, caractérisés par des têtes polaires formées de molécules d'oses (Fig. 18). Les glycolipides majoritaires chez les cyanobactéries sont le monogalactosyl diacylglycerol (MGDG) qui possède un groupement 1β-galactose fixé sur la tête lipidique, le digalactosyl diacylglycerol (DGDG) sur lequel un second galactose est fixé au premier (Carter et *al.* 1965), et le sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG) caractérisé par une tête 6-déoxy-6-sulfo-α1-glucose. Le quatrième lipide majoritaire appartient au groupe des phospholipides, le phosphatidylglycérol (PG), dont la partie polaire est constituée d'une molécule de phosphate liée à une molécule de glycérol (Benson & Maruo 1958). Cette composition lipidique tout à fait particulière des thylacoïdes par rapport aux autres systèmes membranaires semble commune à la grande majorité des organismes photosynthétiques, dans le sens où ils sont caractérisés par un contenu faible en PG, au profit des glycolipides (Sakurai et *al.* 2006, Guskov et *al.* 2009). En plus de ces quatre lipides majoritaires, les cyanobactéries ont la particularité de contenir des traces de monoglucosyldiacylglycerol (MGlcDG ; Sato & Murata 1982).

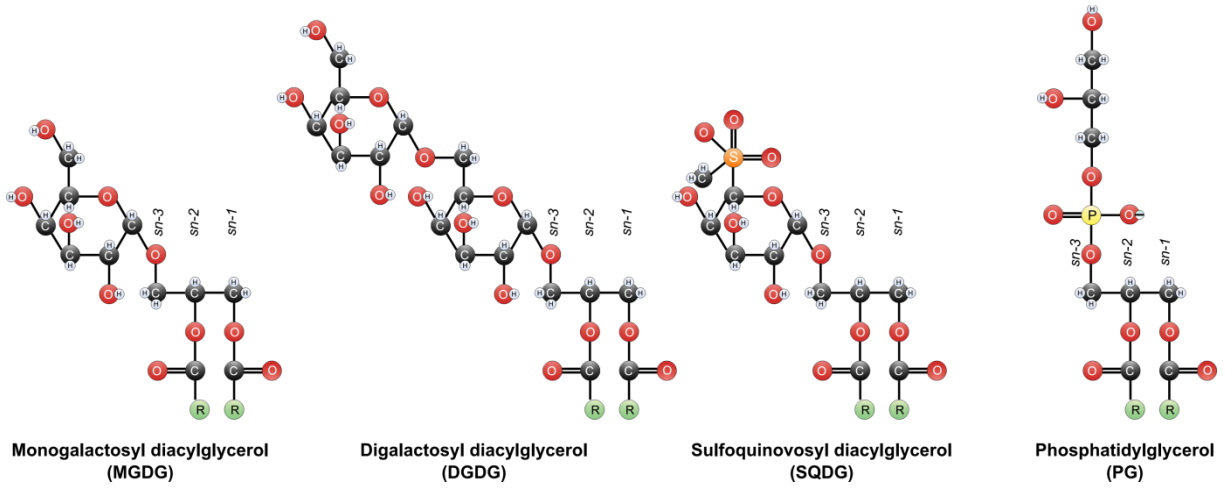


Figure 18 | **Structure moléculaire des quatre glycolipides membranaires des cyanobactéries**. Le MGDG, DGDG et SQDG sont des glycérolipides, alors que le PG appartient à la classe des phospholipides. Les groupements R désignent les chaînes carbonées acyles (acides gras) de longueurs et degrés d'insaturation variable sur les positions *sn-1* et *sn-2*.

Chez les cyanobactéries d'eau douce, le MGDG est le lipide membranaire le plus abondant (tout comme dans les chloroplastes eucaryotes), avec une contribution de 40 à 60% (Merritt et *al.* 1991, Wada & Murata 1998). Le DGDG est généralement le second lipide en termes d'abondance relative. Du fait de l'étendue de la surface des thylacoïdes et de la conservation de leur composition lipidique des thylacoïdes de cyanobactéries aux eucaryotes, le MGDG et le DGDG sont considérés comme les lipides membranaires les plus abondants sur la planète (Gounaris & Barber 1983). Le SQDG et le PG représentent chacun entre 10 et 20% de la teneur en lipides totaux chez *Nostoc muscorum*, *Pectonema boryanum* et *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Murata et *al.* 1992, Wada & Murata 1998). Les

thylacoïdes, constituent le compartiment membranaire le plus important chez les cyanobactéries, et la composition en lipides totaux est généralement très proche de celle des thylacoïdes (Sakurai et *al.* 2006).

A contrario des cyanobactéries d'eau douce, peu d'études se sont attelées à la caractérisation de la composition lipidique des thylacoïdes chez les picocyanobactéries marines. L'une des premières identifie, chez les souches *Synechococcus* spp. WH7803, WH8113 et WH8103 les lipides DGDG et MGDG comme étant majoritaires, suivis par le SQDG (Merrit et *al.* 1991). Cependant, plus récemment, de nouveaux travaux reportent, de façon étonnante, chez *Prochlorococcus* sp. MED4 et *Synechococcus* sp. WH8102, des teneurs élevées de SQDG (38-66%), amenant les auteurs à décrire le SQDG comme le lipide majoritaire des picocyanobactéries marines. Les auteurs suggèrent des contributions du MGDG et PG jusqu'à respectivement 25 % et 10 % des lipides totaux. Cependant, la dernière étude en date sur la composition lipidique des souches de *Prochlorococcus* spp. MED4 et MIT9313, reporte chez ces deux souches des systèmes membranaires composés en majeur partie de MGDG (environ 50%), le SQDG ne représentant que 10% des lipides membranaires, et le DGDG et PG moins de 10% (Biller et *al.* 2014a). Devant le peu d'études et leurs contradictions, il apparait que la composition lipidique des picocyanobactéries marines reste encore très mal connue.

ii. Les acides gras

Chacun des quatre lipides membranaires cyanobactériens possède deux chaînes d'acide gras, appelés groupements acyles, fixés au glycérol. Ces chaînes carbonées constituent la partie hydrophobe du lipide. La nature des acides gras varie en fonction du lipide considéré, des organismes et des conditions environnementales. Chez les cyanobactéries, les acides gras sont généralement composés de chaînes allant de 14 à 18 carbones, les C16 et C18 étant les longueurs généralement majoritaires (Los & Mironov 2015). Ces acides gras peuvent être insaturés ou saturés, c'est-à-dire comporter ou non des doubles liaisons. Le nombre maximal d'insaturations reporté chez les cyanobactéries est de quatre par chaîne (Murata et *al.* 1992, Murata & Wada 1995). La désaturation des acides gras consiste en l'insertion d'une double liaison le long de la chaîne acyle hydrophobes, action entreprise par les enzymes désaturases.

2. Réponse du métabolisme lipidique aux variations environnementales

Chez tous les êtres vivants, la régulation de la fluidité membranaire est indispensable au bon fonctionnement des membranes biologiques, en particulier lors de changements environnementaux tels que la chaleur, le froid, la dessiccation, la salinité, *etc*. La fluidité membranaire est définie comme le degré de désordre moléculaire et du mouvement des molécules qui constituent la bicouche lipidique. Depuis plusieurs décennies, les scientifiques ont mis en évidence que la température entraîne des modifications importantes des propriétés physiques des membranes, affectant ses fonctions (Hazel & Williamas 1990, Haque & Russell 2004, Jones et *al.* 2002, Russel et *al.* 1990) et *in fine,* la survie des organismes. Ainsi, certains travaux sur le sujet proposent que l'état et les propriétés physiques des membranes lipidiques contribuent fortement à la définition des limites thermiques de croissance, particulièrement la limite basse (Murata 1989), alors que les facteurs définissant la température maximale de croissance ne sont pas clairement identifiés.

Les mécanismes invoqués pour expliquer le remodelage des membranes en fonction de la température sont connus sous le nom d'acclimatation homéovisqueuse ou homéophasie (Sinensky 1974, McElhaney 1984). Selon cette hypothèse, les membranes auraient un fonctionnement optimal au sein d'une certaine gamme de température. Au-delà de celle-ci, la fluidité membranaire augmente, entraînant une hyperfluidité des bicouches lipidiques, alors qu'au contraire, sous la gamme de température optimale, la fluidité des membranes diminue. Ces deux phénomènes peuvent limiter considérablement l'activité des protéines membranaires (Fig. 19).

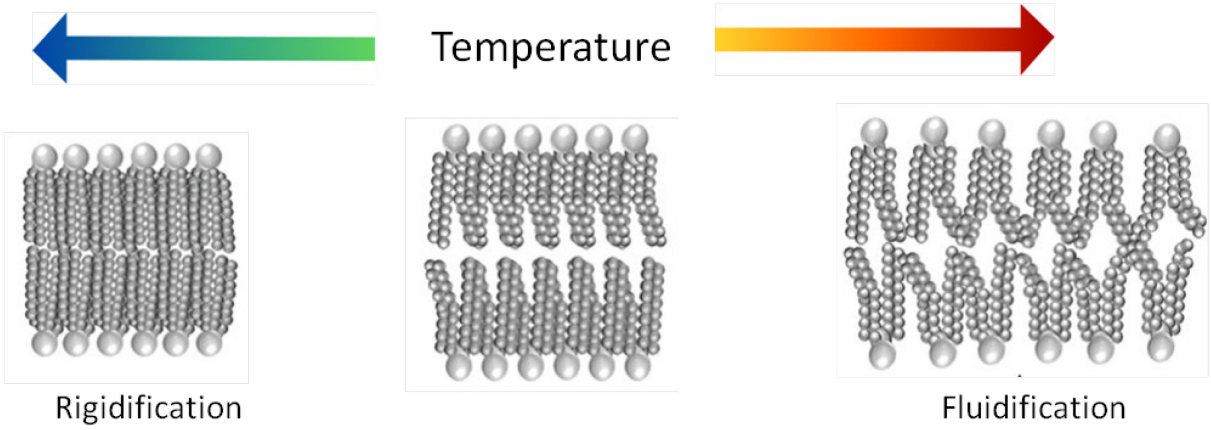


Figure 19 | **Modification de la fluidité membranaire en fonction de la température**. Alors que le froid provoque une rigidification de ces dernières, le chaud entraîne une hyperfluidification de la bicouche lipidique. (modifié de Los et *al.* 2013).

Une exposition continue à des températures supérieures ou inférieures à cette gamme optimale induit généralement des mécanismes d'acclimatation (au cours de la vie de l'organisme, mécanismes réversibles) ou d'adaptation (à l'échelle de l'espèce, souvent irréversibles) de la composition lipidique. Pour faire face à ces changements de température, les cyanobactéries maintiennent la fluidité de leurs systèmes membranaires grâce à différents mécanismes physiologiques. Ces processus impliquent la modification des propriétés physiques des membranes pour faire face aux changements environnementaux, notamment à travers la régulation des proportions des différentes classes lipidiques, de la longueur des chaînes carbonées des acides gras ou encore du degré d'insaturation des groupements acyles (Kates et *al.* 1984, Murata & Wada 1995).

a. Régulation de la composition en têtes polaires

A l'heure actuelle, l'étude des variations de classe lipidique chez les cyanobactéries marines en fonction de la température n'a pas encore été entreprise, mais il est cependant probable que ces dernières soient capables de réguler les proportions de MGDG, DGDG, SQDG, et PG en fonction de la température de croissance. En effet, les travaux de Van Mooy et collaborateurs (2006, 2009) suggèrent que les picocyanobactéries marines sont capables d'induire ce genre de variations en fonction de la concentration en sels nutritifs. A travers une approche couplant terrain et laboratoire, les auteurs proposent qu'une teneur atypique en SQDG chez les picocyanobactéries distribuées dans des environnements pauvres en éléments nutritifs, résulterait de mécanismes adaptatifs qui viseraient à remplacer le phosphore, élément limitant dans ces environnements, par le soufre. La substitution des phospholipides par des glycolipides non phosphatés tels que le SQDG diminuerait ainsi considérablement les besoins en phosphore de ces organismes (Van Mooy et *al.* 2006). En laboratoire, les souches *Synechococcus* spp. WH8102 et WH7803 cultivées en présence de phosphates présentent un rapport SQDG:PG d'environ 10, alors que celui-ci passe respectivement à 120 et 60 lorsque les cultures sont carencées en cet élément (Van Mooy et *al.* 2009).

Chaque classe de lipides semble être importante, et peut être impliquée dans une fonction précise. Plusieurs études ont mis en évidence, à travers la mutagenèse ciblée, que la présence de PG chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 est indispensable à l'activité du PSII, probablement à travers la stabilisation de la protéine D1 lors de l'assemblage et de la réparation du complexe (Sakurai et *al.* 2006, Leng et *al.* 2008). Des résultats similaires ont été obtenus avec le DGDG et la stabilisation du PSII, ce dernier semble jouer un rôle particulièrement important dans la tolérance aux fortes lumières et aux températures élevées (Kruse & Schmid 1995, Mizusawa & Wada 2012). Une étude récente a mis en évidence chez deux espèces de *Chlamydomonas*, une mésophile et une psychrophile, des variations de leur composition en lipides complexes en fonction de la température, mais également que ces deux espèces possédaient des systèmes membranaires très différents. En effet, l'espèce

psychrophile a des membranes enrichies en PG, représentant jusqu'à 90% de la composition lipidique, alors que les membranes de l'espèce mésophile, sont principalement composées de MGDG (Lukes et *al.* 2013). Les auteurs proposent que chez la souche psychrophile, la teneur élevée en PG permettrait notamment une augmentation de la fluidité membranaire, *via* l'augmentation du taux de transfert d'électrons et ainsi l'optimisation de la photosynthèse à basse température (Lukes et *al.* 2013 ; cf paragraphe photosynthèse).

Ces différents exemples montrent que la composition des membranes photosynthétiques en têtes polaires des lipides complexes est sensible aux conditions environnementales. Elles suggèrent ainsi que les cyanobactéries pourraient avoir évolué des voies de régulation des lipides membranaires qui prennent en compte différents paramètres environnementaux, et qui leur permettent de s'adapter à leur niche écologique.

b. Régulation de la composition en acides gras

La fluidité membranaire est étroitement liée à la composition en acides gras. En effet, deux caractéristiques des chaînes acyles peuvent influencer considérablement la fluidité des membranes et ainsi l'activité des protéines qui y sont insérées. La première est la longueur des chaînes : plus les acides gras sont courts, plus les membranes sont fines, et la fluidité membranaire importante, et inversement en cas d'acides gras à longues chaînes. Les cyanobactéries présentent des acides gras principalement à 14, 16 ou 18 carbones. Les travaux sur la température suggèrent une augmentation de la concentration en acides gras C18 et une diminution des C16 à basses températures, entraînant un épaississement des membranes dans le froid (Wada & Murata 1998). La fluidité peut aussi être régulée par un second mécanisme, qui consiste en l'insertion d'une ou plusieurs double liaisons dans les chaînes carbonées grâce à l'action des enzymes désaturases (Harwood 1988, Stump et *al.* 1980). Les désaturases sont des oxydoréductases qui convertissent les liaisons simples, C-C, en liaisons doubles C=C, le long d'une chaîne acyle (Shanklin et *al.* 1998). Les doubles liaisons résultantes sont appelées liaisons insaturées. L'introduction du nombre approprié d'insaturations le long de la chaîne acyle diminue la température à laquelle la membrane se rigidifie, et fournit la fluidité nécessaire au bon fonctionnement des membranes. Ces enzymes sont régio- et stéréoselectives, *i.e* chaque désaturase est capable de catalyser l'insertion d'une double liaison à une position spécifique de la chaîne d'acides gras. Les désaturases agissant sur les acides gras estérifiés sur un glycérolipide sont codées par les gènes *des* (Chintalapti et *al.* 2006).

Le modèle cyanobactérien le mieux caractérisé pour l'étude des désaturases est *Synechocystis* sp. PCC 6803, pour lequel une série de mutants et de systèmes de surexpression ont été construits.

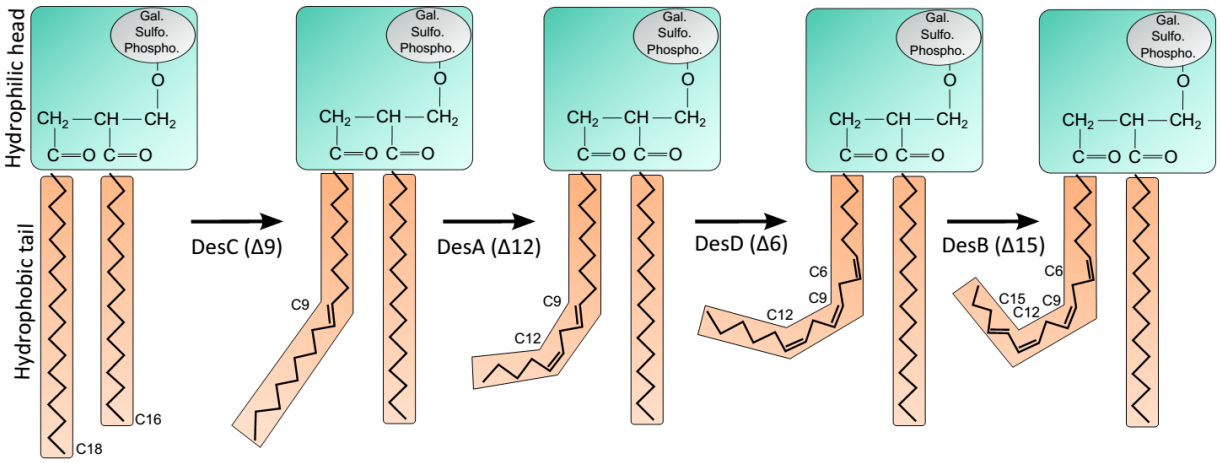


Figure 20 | **Degrés d'insaturation des chaînes d'acides gras chez les cyanobactéries.** Insertion de doubles liaisons le long du groupement acyle en position sn-1 par différentes enzymes chez *Synechocystis* sp. PCC 6803. Les désaturases DesC, DesA, DesD et DesB introduisent des doubles liaisons sur les carbones des positions Δ9, Δ12, Δ6 et Δ15 respectivement.

Cette souche contient dans son génome quatre gènes *des ABCD*, qui codent pour les désaturases correspondantes. Ces enzymes introduisent chacune une double liaison sur des atomes de carbone précis. Ainsi DesA désature le carbone localisé en Δ12, DesB en Δ15, DesC en Δ9 et DesD sur le Δ6. Les classes lipidiques MGDG, SQDG et PG sont désaturés selon un ordre précis, s'initiant en Δ9 puis Δ12 et Δ15 (Fig. 20 ; Sato & Murata 1982). A l'inverse, jusqu'à maintenant cette désaturation séquentielle et organisée n'a pas été démontrée sur les DGDG. Plusieurs études ont montré que grâce à cet équipement en désaturases, *Synechocystis* était capable de faire varier le nombre d'insaturations le long des acides gras, en introduisant des doubles liaisons lorsqu'elle est exposée à des températures basses (Wada & Murata 1990, Murata & Wada 1995, Quoc & Dubacq 1997, Chintalapati et *al.* 2007).

Contrairement aux cyanobactéries d'eaux douces, les voies de désaturation des cyanobactéries marines n'ont jamais été étudiées et caractérisées en détails. Cependant, une étude de 2008, à travers l'exploration de 37 génomes cyanobactériens, révèle la présence de désaturases particulières, telles que DesC1 et DesC2, ou encore un groupe de séquences proche de DesB de *Synechocystis* (Chi et *al.* 2008). Ainsi, il ne fait pas de doute que les désaturases sont parmi les enzymes les plus importantes pour l'acclimatation à une gamme de températures donnée et qu'il reste presque tout à faire chez les picocyanobactéries marines.

3. Photosynthèse et température

a. La machinerie photosynthétique des cyanobactéries

i. Mécanisme général

Parmi les organismes qui utilisent la lumière comme source d'énergie, *i.e.* les phototrophes, les cyanobactéries sont les seuls procaryotes à pratiquer la photosynthèse oxygénique. Ce processus, qui permet la fixation de carbone inorganique grâce à la conversion d'énergie lumineuse en énergie chimique de liaison, serait apparu il y a 3.5 milliards d'années (Awramik 1992). Il repose sur l'utilisation d'une molécule d'eau comme donneur d'électrons qui engendre la libération de dioxygène selon la réaction suivante :

$$6\ CO_2 + 6\ H_20 \xrightarrow{\textit{lumière}} C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2$$

Les réactions photosynthétiques sont classiquement divisées en réactions « claires » et « sombres ».
Les réactions claires se déroulent au niveau des thylacoïdes. Ces membranes contiennent notamment quatre complexes mutliprotéiques à l'origine du transfert photosynthétique d'électrons : les photosystèmes (PS) I et II, le cytochrome b_6f et l'ATP synthase (Fig. 21). Chacun des deux PS est constitué d'un centre réactionnel (*Reaction Center,* RC) composé de deux protéines principales liant des molécules de chl *a* et de β-carotène, et d'une antenne collectrice de lumière composée d'un ensemble de protéines pigmentées dont la nature varie selon le PS et l'organisme.

i. Les antennes collectrices de l'énergie lumineuse des cyanobactéries

Les photoréactions de la phase claire de la photosynthèse sont possibles grâce à la présence d'antennes collectrices de lumière, qui transfèrent leur énergie à un centre réactionnel (*Reaction Center*, RC), initiant un transport d'électrons photosynthétiques. Les antennes collectrices de l'énergie lumineuse existent sous différentes formes chez les cyanobactéries.

Structure et organisation de l'antenne photosynthétique principale des cyanobactéries

L'antenne majeure chez la plupart des cyanobactéries est un énorme macrocomplexe chromoprotéique appelé le phycobilisome. De 7 000 à 15 000 kDa, il est extrinsèque aux thylacoïdes, et ainsi non limité en taille selon l'épaisseur des membranes. Visualisable en microscopie électronique à transmission, sa présence est connue depuis longtemps. C'est en effet en 1836 que Nees Ensenbeck a décrit le premier, chez la cyanobactérie *Oscillatoria,* la présence d'un pigment bleu, soluble et très fluorescent qu'il appela "saprocyanine" (Esenbeck, 1836).

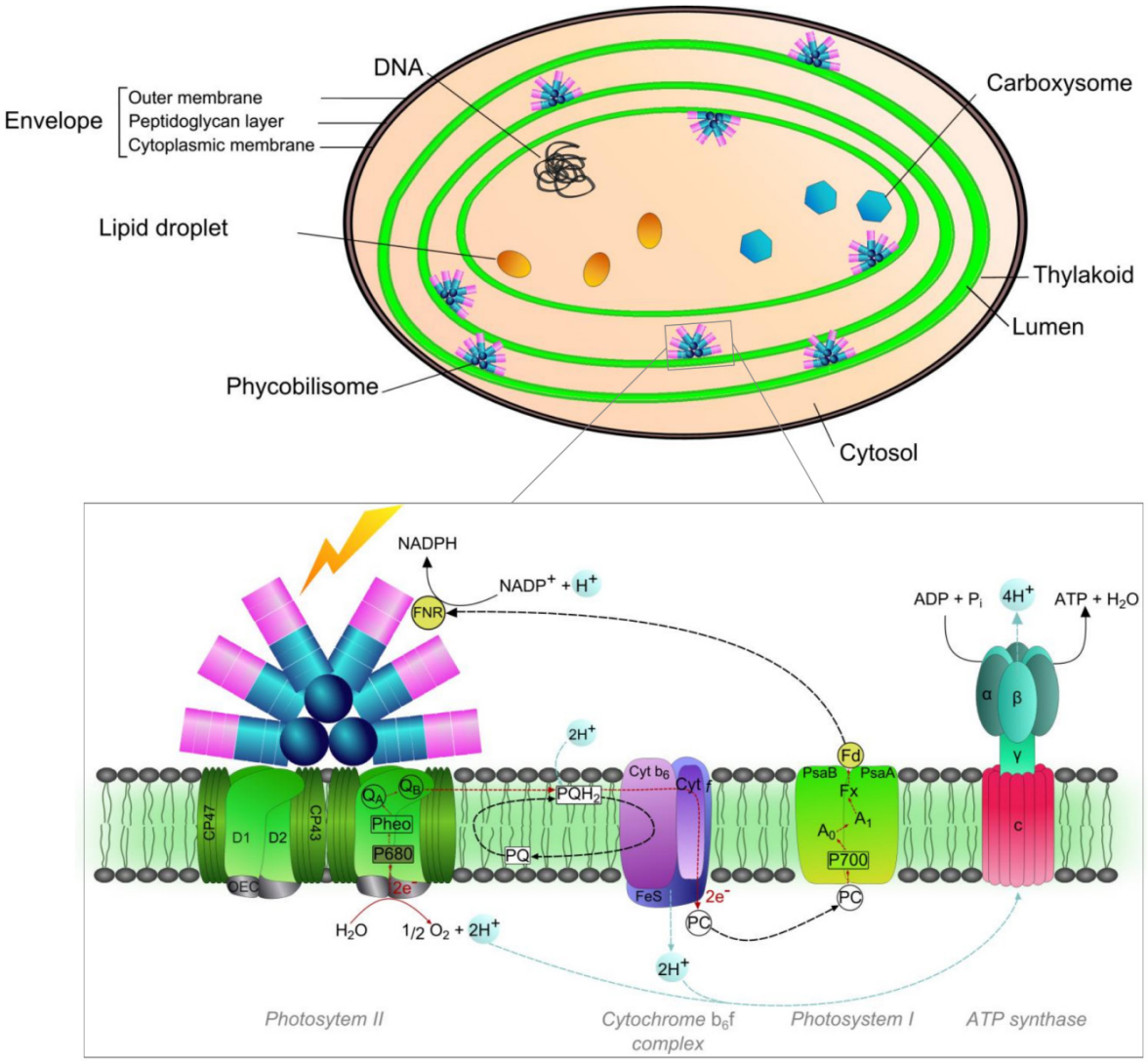


Figure 21 | **Représentation des complexes photosynthétiques thylacoïdiens au sein d'une cellule de *Synechococcus*.** Les quatre complexes des réactions claires de la photosynthèse sont présents dans les thylacoïdes, en forme de sacs membranaires circulaires dans le cytosol. L'absorption lumineuse par le phycobilisome génère un ensemble de réactions biochimiques, qui s'initient par un flux d'électrons (en rouge) et de protons (en bleu) générés lors de la photosynthèse.

Quelques années plus tard Kutzing (1843), renomma ce pigment "*phykokan*", et isola à partir d'algues rouges un pigment soluble de couleur rouge, la "*phykoerythrin*". Dans les années qui suivirent, les analyses spectroscopiques permirent de mieux caractériser les propriétés optiques de ces pigments (Stokes 1854, Sorby 1877), mais c'est seulement avec l'apparition de la microscopie électronique, dans les années 1950 que de réelles avancées ont été faites quant à la structure et l'organisation du PBS *in vivo*. A travers leur nombreux travaux sur le sujet, Gant & Conti (1965, 1966) ont considérablement contribué à la caractérisation du macrocomplexe et ont mis en évidence la présence de petits granules attachés aux lamelles chloroplastiques de l'algue rouge *Porhyridium*.

Deux fois plus larges que les ribosomes, ces granules appelées PBSs (Gant & Conti 1966) sont essentiellement composées de protéines richement pigmentées, les phycobiliprotéines (PBPs ; Glazer 1989).

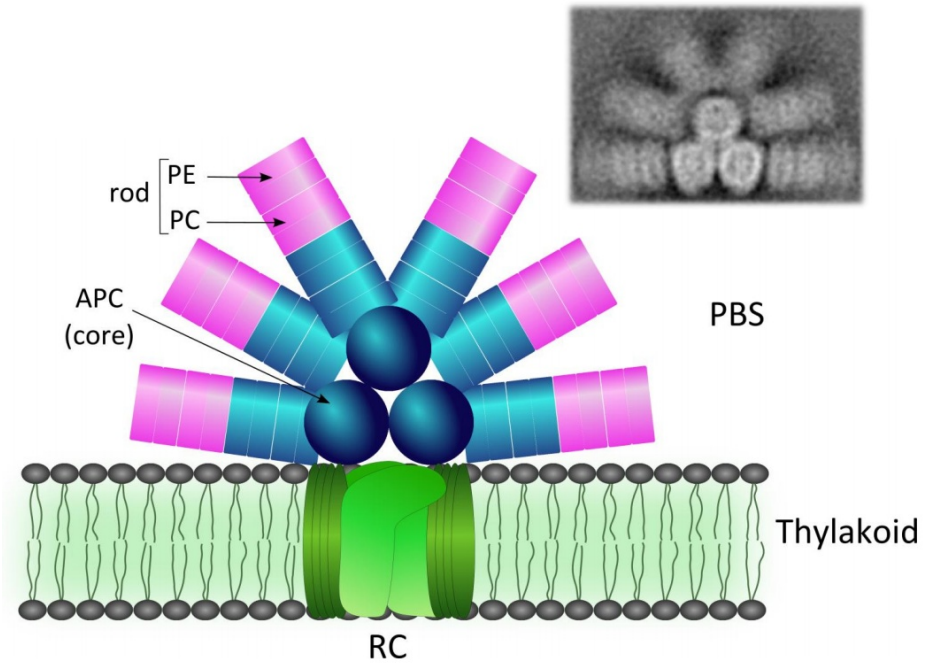


Figure 22 | **Structure du phycobilisome associé aux membranes thylacoidiennes chez les cyanobactéries.** Organisation du phycobilisome sur la membrane thylacoïdienne. Le nom des phycobiliprotéines constituant le bras (rod) est indiqué : phycoérythrine (PE) et phycocyanine (PC). Le cœur (core) est constitué d'allophycocyanine (APC). L'encart représente le phycobilisome par microscope électronique à transmission (Arteni et *al.* 2009).

Les PBPs ont une structure similaire aux globines et comprennent une partie protéique et une partie pigmentaire solidement fixée. Par la suite, les PBS ont été décrits chez de nombreuses algues rouges et cyanobactéries (pour revue voir Gant 1980, Tandeau de Marsac 2003). Les PBSs présentent différentes organisations structurales selon les organismes. La structure la plus commune chez les cyanobactéries est la forme hémi-discoïdale, qui consiste en l'assemblage de deux parties : un cœur pouvant être composé de 2 à 5 cylindres protéiques, autour duquel s'articule la partie périphérique composée de 6 à 8 projections radiaires appelées plus communément « bras » (Fig. 22 ; Adir 2005, Glauser et *al.* 1992, MacColl 1998 ; pour une structure récente et bien résolue du complexe *cf.* Chang et *al.* 2015).Chez les *Synechococcus* marins, trois classes de PBPs composent le PBS : Le cœur est invariablement composé d'allophycocyanine (APC), alors que la partie proximale des bras est constituée de phycocyanine (PC) et éventuellement de phycoérythrine pour la partie distale (PE ; Fig. 22).

Chacune de ces PBPs est composée de deux peptides principaux de 17 à 20 kDa : les sous-unités α et β (Ficner & Huber 1993). Ces deux polypeptides s'associent pour former un monomère αβ (en fait un hétérodimère) correspondant au plus petit état d'agrégation connu des PBPs (Fig. 23 ;

Schirmer et *al.* 1986). Ce complexe hétérodimérique forme spontanément, par association, un trimère $(\alpha\beta)_3$. Deux trimères s'assemblent ensuite face à face pour former un hexamère $[(\alpha\beta)_3]_2 = (\alpha\beta)_6$ qui constitue la PBP, *i.e.* l'unité structurale du PBS (Fig. 23).

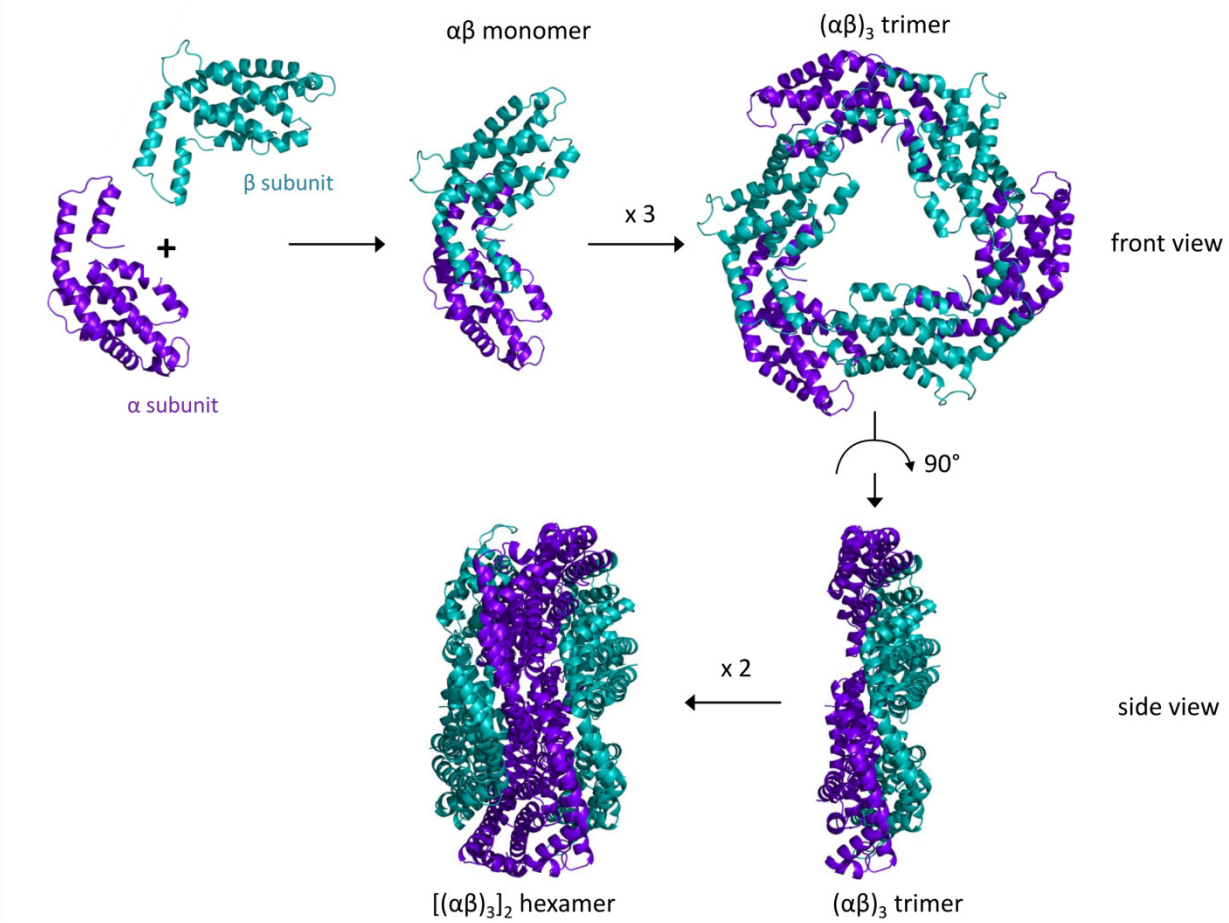


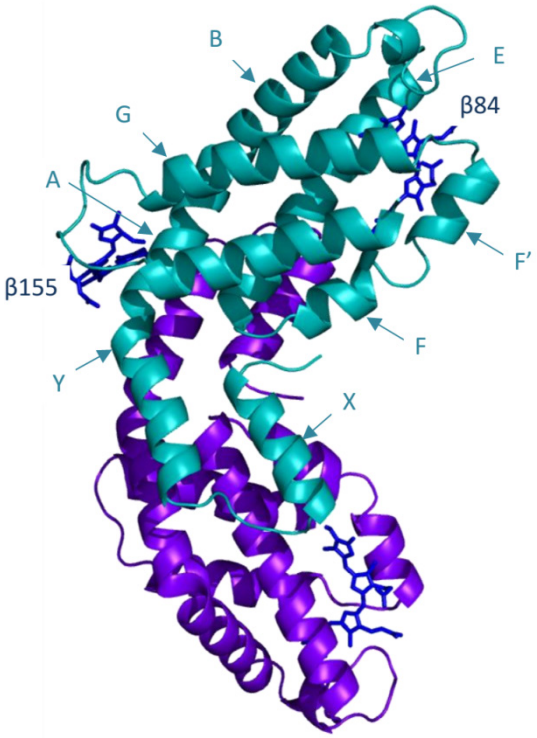
Figure 23 |**Modèle d'agrégation des phycobiliprotéines avec l'exemple de la structure de la phycocyanine.** Le crystal de phycocyanine utilisé est celui de la cyanobactérie d'eau douce *Spirulina platensis* (1ha7). La sous-unité α est représentée en violet et β en turquoise. Les deux sous-unités s'assemblent pour former un monomère αβ, puis un trimère $(\alpha\beta)_3$ et enfin l'association de deux trimères constitue l'état d'agrégation fonctionnel *in vivo*, l'hexamère $(\alpha\beta)_6$.

Les hexamères présentent une structure discoïdale de 110-120 Å (11-12 nm) de diamètre et de 60 Å d'épaisseur, laissant apparaitre un canal central de 35 Å de diamètre (Schirmer et *al.* 1986, Brejc et *al.* 1995). Ces structures s'empilent les unes sur les autres jusqu'au niveau d'organisation supramoléculaire du PBS.

Phycobiliprotéines et chromophorylation

L'analyse structurale des PBPs a mis en évidence des structures tertiaires similaires entre les sous unités α et β. Chaque PBP est caractérisée par 9 domaines d'hélice α, définis par une lettre distincte. Ainsi, les hélices X et E d'une sous-unité et Y et A de la sous unité complémentaire sont impliquées

dans des interactions fortes, stabilisant l'hétérodimère αβ. Ces hélices sont séparées par des boucles irrégulières (Fig. 24).



<u>Figure 24</u> | Organisation d'un monomère de phycocyanine et des hélices protéiques constituant chaque sous-unités α et β. Le crystal utilisé est celui de phycocyanine *Spirulina platensis*. Ce monomère de phycocyanine illustre l'organisation structurale très conservée de toutes les phycobiliprotéines. Les sous unités α et β sont représentées respectivement en violet et turquoise, les trois phycocyanobilines sont représentées en bleu. La position des différentes hélices constituant les sous-unités est indiquée.

Le pourcentage des hélices au sein du polypeptide est d'environ 75% (Ritter et *al.* 1999). Bien qu'étant structurellement très proches, les différentes PBPs arborent des couleurs très vives et diverses grâce aux chromophores qui leur sont associés (Rüdiger, 1975, 1980). Ces chromophores, ou phycobilines, sont des groupements tétrapyrroliques linéaires, fixés de façon covalente à des résidus cystéines de l'apoprotéine par des liaisons thiothers (Glazer 1989). Les différentes bilines sont des isomères parfaits qui se différencient par le nombre et la localisation de doubles liaisons, qui suffisent à leur conférer des propriétés spectroscopiques très différentes (Fig. 25 ; Glazer 1989). Chez les cyanobactéries, quatre phycobilines peuvent être associées aux PBPs : un pigment bleu, la phycocyanobiline (PCB, A_{max} 620 nm), la phycoérythrobiline de couleur rouge (PEB, A_{max} 545nm), la phycourobiline orange (PUB, A_{max} 495nm), et enfin un pigment violet, la phycobilivioline (A_{max} 570 nm). Chez les cyanobactéries typiquement marines, les PBS ne contiennent jamais de PVB et on y trouve des quantités variables de PCB, PEB et PUB. Ces phycobilines sont des isomères qui se différencient selon le nombre et l'emplacement des doubles liaisons (Fig. 25) et chaque sous unité α et

β des PBPs en porte entre une et quatre, ce nombre étant croissant depuis l'APC jusqu'à la PE (Fig. 26; Sidler 1994).

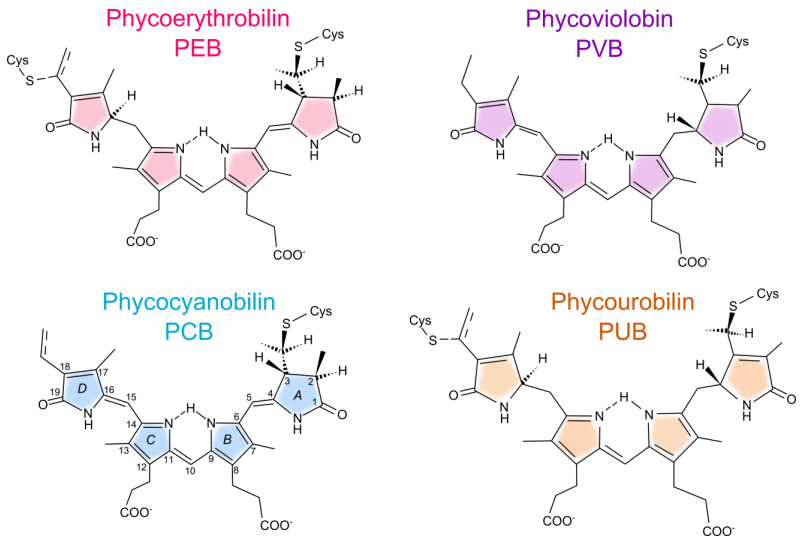


Figure 25 | **Structure des phycobilines des cyanobactéries**. Sont représentées en rose le phycoérythrobiline (PEB), en violet le phycoviolobiline (PVB), en bleu la phycocyanobiline (PCB), et en orange la phycourobiline (PUB). La désignation des quatre cycles de la phycobiline est indiquée sur la phycocyanobiline, ainsi que la numérotation de chaque carbone.

Chez toutes les PBPs, un site de fixation de chromophores est systématiquement présent au résidu 82,83 ou 84 de chacune des deux sous-unités (position consensus, le site variant entre 81 et 84).

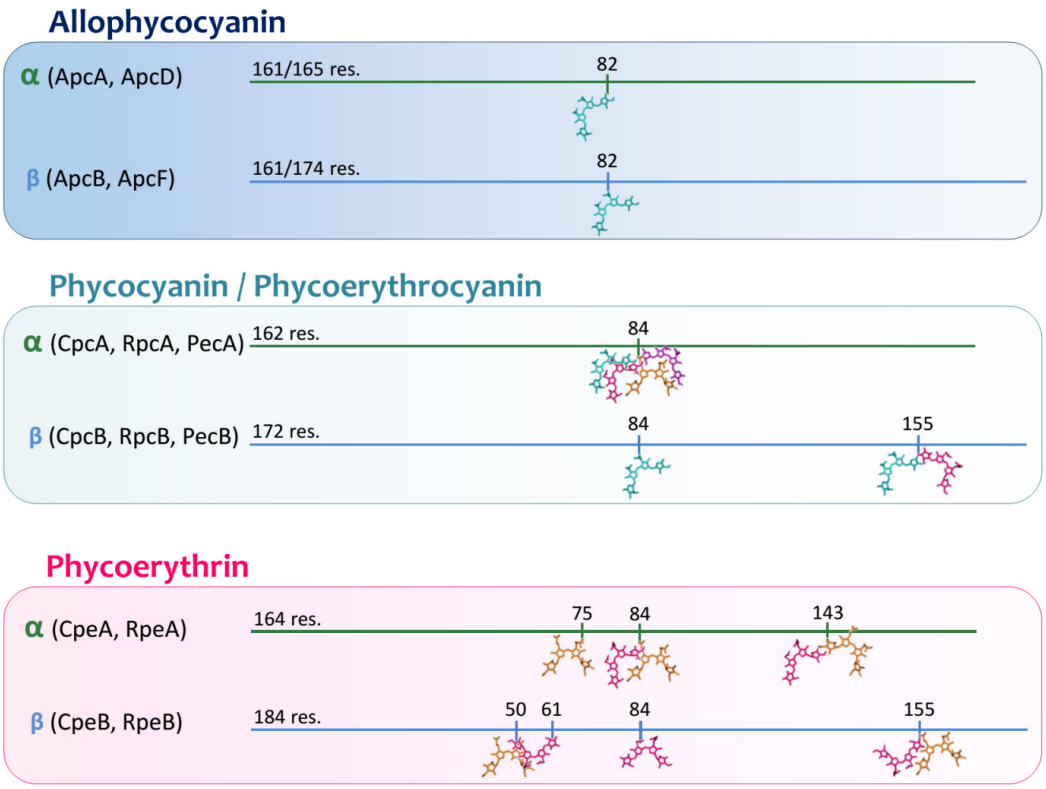


Figure 26 | **Chromophorylation des quatres principales classes de phycobiliprotéines chez les cyanobactéries**. Les sites de fixation des chromophores (résidus cystéines) sont indiqués. Les quatre chromophores pouvant se fixer aux phycobiliprotéines sont représentés en bleu (phycocyanobiline), en violet (phycoviolobine), en rouge

(phycoérythrobiline) et en orange (phycourobiline). Entre parenthèses sont indiqués le nom de chaque sous-unité protéique : Apc, sous-unité de l'allophycocyanine ; Cpc sous unité de phycocyanine lorsque celle ci ne fixe que de la phycocyanobiline, Rpc lorsque de la phycoérythrine est présente, et Pec lorsque la phycocyanine est associée à la phycoviolobine ; Cpe lorsque la biline chromophorylée en position α-84 est une phycoerythrobiline, Rpe lorsque c'est une phycourobiline. Lorsque plusieurs chromophorylations sont possibles, les différentes phycobilines sont représentées. Le site Cys-α75 n'est présent que chez certaines phycoérythrines marines (*cf.* paragraphe Microdiversification adaptative des cyanobactéries).

La Cys-β84 est l'accepteur d'énergie au sein de chaque trimère. La plupart des chromophores sont attachés au résidu cystéine de l'apoprotéine par une liaison thioether simple sur le C-3 du chromophore, mais une seconde liaison peut être présente sur certaine PE, ou la PEB ou la PUB est attachée par une liaison C-3 et C-18, c'est notamment le cas de la biline fixée aux résidus Cys-β50 et -β61 de la PE (Ficner & Hubner 1993). Lorsqu'elles sont liées à la chaîne polypeptidique, les bilines sont maintenues dans un état linéaire et rigide, imposé par l'environnement protéique, permettant d'accroître la durée de vie et l'amplitude de l'état excité (Ficner & Huber 1993, Ritter et *al.* 1999). Au contraire, sous leur forme libre, les phycobilines absorbent faiblement la lumière, et celle-ci est rapidement dissipée sous forme de chaleur, au lieu d'être transférée (Scheer et *al.* 1982, Braslavsky et *al.* 1983). La composition en bilines de chaque sous-unité polypeptidique confère aux PBPs des propriétés optiques différentes (*cf* paragraphe types pigmentaires).

Stabilisation du complexe chromoprotéique

En 1977, Tandeau de Marsac et Cohen-Bazire ont donné un nouveau souffle à la compréhension de la structure et la stabilité des PBS grâce à la découverte des polypeptides de liaison. La stabilité d'un complexe de cette taille est un véritable défi moléculaire et cette tache est assurée par ces protéines de liaison, ou *linkers*, qui peuvent représenter environ 15% de la masse du PBS (Tandeau de Marsac & Cohen Bazire 1977, Gant, 1980, Lundell et *al.* 1981). Bien que les interactions *linker*-PBPs ne soient pas complètement élucidées, il semblerait que ces derniers, positivement chargés, alors que les PBP sont de charges négatives, stabilisent les associations de PBP principalement *via* des forces hydrophobes et de multiples interactions chargées (Sidler et *al.* 1994, Fuglistaller et *al.* 1984, Liu et *al.* 2005). D'autre part, les alignements des séquences protéiques des *linkers* ont permis de mettre en évidence six domaines conservés, certainement impliqués dans les interactions structurales avec les PBPs (Liu et *al.* 2005).

En se basant sur les localisations dans le PBS et les poids moléculaires, un système d'abréviation a été proposé par Glazer afin de classer les différentes familles de polypeptides de liaison (Glazer, 1985). Ainsi, les *linkers* sont nommés par un « L », suivi en exposant de leurs poids moléculaire et en indice de leur localisation : C pour *core*, le cœur, R pour *rods*, les bras, RC pour la jonction bras-cœur, et CM pour la jonction cœur-membrane thylacoïdale. En utilisant cette classification, quatre familles de polypeptides de liaison ont été définies : les L_R, dont le poids

moléculaire varie entre 17-35 kDa, interviennent dans l'agencement et la stabilisation des différents polypeptides composants les bras, les L_{RC} (25-27 kDa) assurent l'attachement des bras au cœur du PBS, les L_C (de plus faible poids moléculaire) interviennent dans la structuration du cœur, et enfin les L_{CM}, ou polypeptides d'ancrage (70-120 kDa suivant le degré de complexité du PBS) sont impliqués dans l'attachement du complexe à la membrane thylacoïdale (Glazer 1989, Zilinskas & Greenwald 1986, Glauser et *al.* 1992b, MacColl, 1998, Pizarro & Sauer, 2001). Le L_{CM} est deux à quatre fois plus long que les L_R, en fonction du nombre de disques d'APC composant le cœur du PBS (Fig. 27).

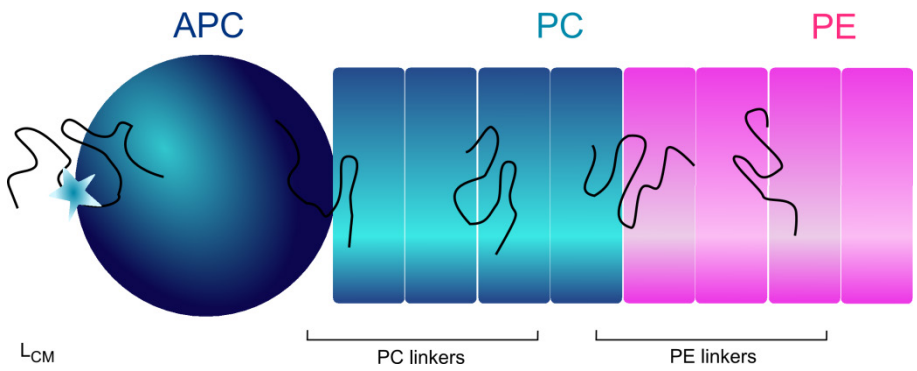


Figure 27 | **Localisation probable des différents polypeptides de liaison au sein du phycobilisome des cyanobactéries**. Les étoiles représentent les positions possibles des chromophores orange associés aux phycobiliprotéines. Le polypeptide de liaison L_{CM}, core-membrane, est chromophorylé avec une phycocyanobiline, représentée par une étoile bleue (modifié d'après Six et *al.* 2005 et Humily 2013).

La majorité des polypeptides de liaison assurent uniquement un rôle structural, et sont dépourvus de chromophores. Néanmoins, deux groupes de polypeptides de liaison contribuent à l'absorption et/ou au transfert de la lumière en portant une phycobiline (Lundell et *al.* 1981, Zhao et *al.* 2005). Le premier polypeptide de liaison chromophorylé mis en évidence est le L_{CM}, qui fixe un pigment bleu, la PCB, et absorbe dans le rouge lointain (668-676 nm) et transmet l'énergie de l'APC aux chl *a* du RCII (Fig. 27 ; MacColl & Guard-Friar 1981, Sidler et *al.* 1994). Il sert ainsi d'accepteur terminal d'énergie aux centaines de chromophores portés par le PBS (Gindt et *al.* 1994, Gao et *al.* 2012). Le second groupe de polypeptides de liaison chromophorylés est typique des organismes marins et appartient à la classe des L_R. Ces polypeptides interviennent dans la stabilisation des disques distaux de PE du bras (Willbanks & Glazer 1993). Ainsi, les polypeptides MpeC et MpeE portent un pigment orange (A_{max} 495 nm, PUB) et interviennent dans la stabilisation de la partie distale du bras. Un autre linker, MpeD, deux fois plus long que les précédents et spécifique des *Synechococcus* marins, est le produit d'une fusion entre un linker non chromophorylé de la PE proximale et un linker portant un pigment de la PE distale, assurant ainsi la liaison entre ces deux types de PBPs (Fig 27, Six et *al.* 2005).

Transfert orienté de l'énergie

Le PBS est un système complexe de taille importante au travers duquel l'énergie transite avec une efficacité supérieure à 90% (Manodori et *al.* 1984, 1985 ; Glazer 1989). Pour arriver à une telle performance, Glazer et collaborateurs ont estimé que l'énergie traverse le bras du PBS en 50 picosecondes (Glazer 1985 ; soit environ 1000 m s^{-1}). Ce transfert d'énergie est dicté par les niveaux d'énergie des chromophores qui sont très précisément agencés dans et entre les différentes PBP (Glazer 1989). L'énergie lumineuse collectée par la partie périphérique des bras migre de façon unidirectionnelle vers le cœur d'APC, avant d'être délivrée aux chl du RCII (Fig. 28).

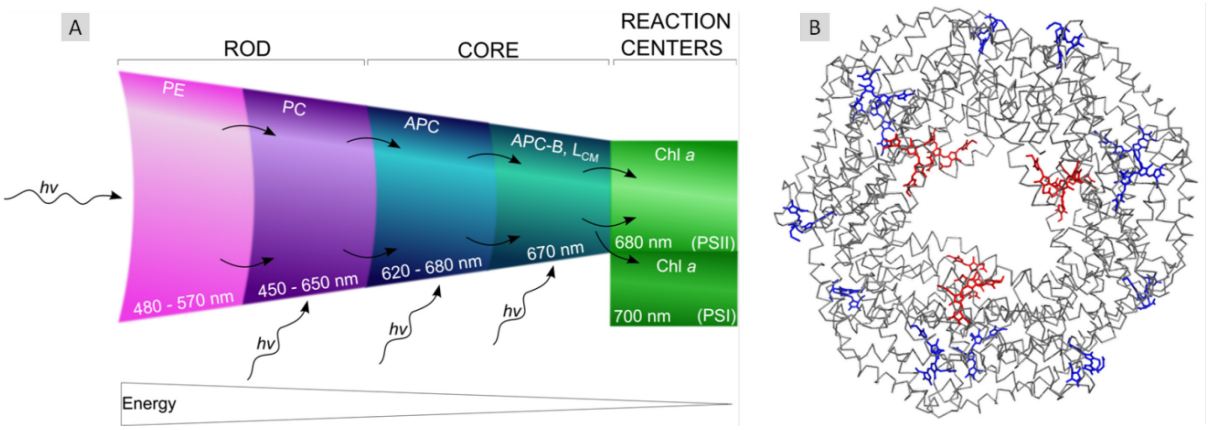


Figure 28 | **Transfert orienté de l'énergie au sein du phycobilisome et organisation des chromophores acteurs de ce transfert dans un hexamère de phycobiliprotéines.** Le transfert d'énergie est représenté de l'extrémité du bras du phycobilisome jusqu'au photosystème (**A** ; modifié d'après Sidler 1994). Localisation des chromophores sensibles, *s* (bleu), et fluorescents, *f* (rouge) fixés à l'hexamère de phycocyanine chez *Spirulina platensis* (**B**).

Ce transfert d'énergie au sein du PBS est non radiatif et est induit par une interaction dipôle-dipôle entre deux molécules. L'énergie transite entre ces molécules par résonnance selon le mécanisme de transfert énergétique défini par Forster (*Forster Resonnance Energy Transfer*, FRET)

Les PBPs comprennent deux types de phycobilines. Les premières sont dites sensibles, « *s* », et absorbent l'énergie d'excitation : ce sont les chromophores donneurs. Cette énergie est transmise au second type de phycobiline, les accepteurs, qui fluorescent et constituent le type « *f* » (Sidler 1994 ; Fig. 28). Les analyses structurales des PBPs ont mis en évidence les emplacements conservés des résidus liant les chromophores. Ainsi, dans la PC de *Spirulina platensis*, les phycobilines liées aux résidus α-84 et β-155 sont les donneurs d'énergie, située sur l'extérieur de la protéine (en bleu Fig. 28), alors que le chromophore situé en et β-82 est l'accepteur terminal d'énergie, toujours situé à proximité du canal parcourant le bras du PBS (en rouge Fig. 28). Les travaux de Glazer suggèrent que les chromophores *s* transfèrent l'énergie aux chromophores *f*, accepteurs terminaux. Les chromophores accepteurs sont agencés verticalement dans le cylindre central du bras et assurent un transfert rapide d'énergie d'hexamère en hexamère vers le cœur du PBS et *in fine* aux chl des RC.

L'ordre d'agencement des PBPs, PE (A_{max} 495/550 nm), PC (A_{max} 620 nm) et APC (A_{max} 650 nm) correspond à un ordre croissant d'énergie de transition (Fig. 28).

Génétique et génomique des phycobilisomes

La connaissance des gènes codant pour les différentes sous unités du PBS a permis des avancées considérables dans la compréhension de l'organisation, la synthèse et la stabilisation du macrocomplexe (Conley et *al.* 1985, Willbanks & Glazer 1993). Ces différents travaux proposent une nomenclature permettant de désigner les gènes homologues d'organismes distincts, impliqués dans la synthèse du PBS. Ainsi les gènes codant pour l'APC sont désignés *apc*, et ceux codant pour la PC *cpc* si la protéine ne fixe que de la PCB et *rpc* si cette dernière fixe également d'autres chromophores. Chez les cyanobactéries d'eau douce, les gènes de PE sont désignés *pec* s'ils sont associés avec de la PVB. Chez les cyanobactéries marines, deux formes de PE ont été identifiées, les gènes de PEI sont désignés *cpe* et ceux impliqués dans la synthèse de PEII *mpe*. Tous les gènes codant les PBP sont suivis de lettres désignant la sous-unité polypeptidique pour laquelle ils codent. Par exemple, *cpeA* code la sous unité α d'une PC, alors que *mpeB* code la sous-unité β de la PEII. Les lettres différentes de A et B font généralement référence à des *linkers* associés aux PBP, ou encore à des phycobilines lyases. Ainsi, *cpeC* code pour le linker stabilisant deux hexamères de PC, et CpcT est la lyase responsable de la fixation de la PCB à la PC.

Chez les cyanobactéries, les gènes codant pour les différents composants du PBS sont généralement retrouvés au sein de régions spécialisées. Ainsi, chez les *Synechococcus* comme pour la majorité des cyanobactéries, une première région comprend les gènes impliqués dans la synthèse du cœur du PBS. Cette région comprend quatre gènes codant pour l'APC (*apcAEBC*), alors que deux autres gènes, *apcD* et *apcE* sont absents de cette région. La majorité des gènes codant pour les PBP constituant le bras du PBS forment quant à eux une région génomique de taille beaucoup plus large, dont la taille varie en fonction du degré de complexité du PBS (Six et *al.* 2007).

Le cas des antennes de « Prochlorophytes »

Chez *Prochlorococcus*, l'antenne est intrinsèque aux membranes et est composée, de façon similaire aux plantes vasculaires, d'un assemblage de protéines fixant des dérivés divinyls des chl *a* et *b* (Chisholm et *al.* 1988, Goericke & Repeta 1992), qui donnent une couleur vert clair caractéristique à ces organismes. Ce type d'antenne très atypique chez les cyanobactéries, également retrouvé chez d'autres genres tels que *Prochloron* et *Prochlorothrix*, a poussé les scientifiques à former un nouveau groupe : les "Prochlorophytes" (*pro* pour avant, et *chlorophyta* pour plantes vertes ; Lewin et *al.* 1976) qui auraient pu représenter un chainon manquant entre les cyanobactéries et les chloroplastes modernes. Des analyses phylogénétiques ont toutefois démontré que ce type d'antenne

cyanobactérienne est apparu plusieurs fois au cours de l'évolution et que le groupe des Prochlorophytes n'a pas de valeur taxonomique puisque ces organismes forment des radiations très distantes entre elles et de celles des chloroplastes algaux et d'embryophytes. Le terme Prochlorophytes a ensuite été abandonné au profit d'oxyphotobactéries vertes (Tuner et *al.* 2001, Partensky & Garczarek 2003). Chez ces organismes, les protéines constituants l'antenne collectrice de l'énergie sont appelées Pcb (*Prochlorophyte chl binding*) et sont caractérisées par six hélices transmembranaires liant les molécules de chl *a* et *b* (Barber et *al.* 2000, Barber & Nield 2002). Elles rappellent la structure et la composition des antennes d'algues vertes et de plantes vasculaires mais ont une origine différente.

ii. Les centres réactionels

Suite à son transfert le long du PBS, l'énergie lumineuse arrive au RC et déclenche une série de photoréactions. Le RCII est un macrocomplexe protéique, constitué d'un cœur hétérodimérique formé par les protéines D1 et D2, codées respectivement par les gènes *psbA* et *psbD* (Fig. 29).

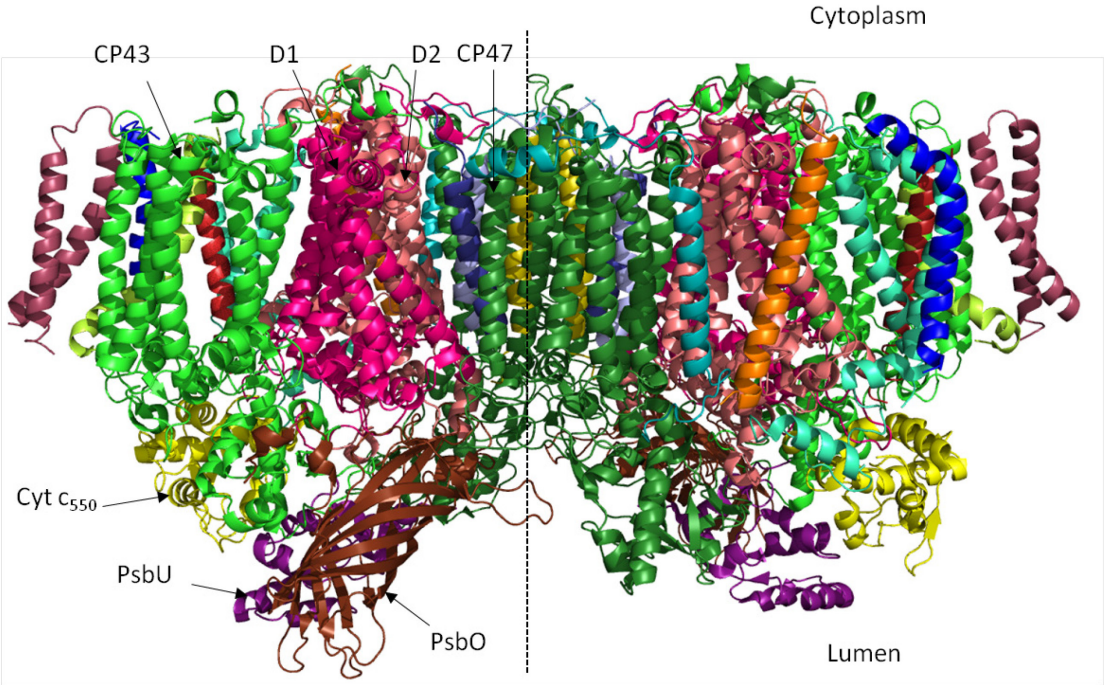


Figure 29 | **Structure d'un dimère du centre réactionnel II de cyanobactéries**. Le crystal protéique a été purifié chez *Thermosynechococcus elongates*, à la résolution de 2.44 Å. Les différentes protéines composant le supercomplexe sont différentiellement colorées, et la localisation des protéines principales discutées ci-dessous est indiquée sur la structure. La ligne en pointillée représente l'axe de symétrie délimitant les deux monomères (modifié de Hellmich et *al.* 2014, PDB 4PJ0).

Alors que chez les eucaryotes la protéine D1 est couramment encodée par un gène chloroplastique unique, *psbA*, les cyanobactéries possèdent généralement plusieurs gènes *psbA*, codant pour deux isoformes de la protéine D1 (Schaefer & Golden 1989, Vrba & Curtis 1990, Mate et *al.* 1998, Sicora et *al.* 2006). Les *Synechococcus* marins contiennent entre 3 et 7 copies de *psbA*

(Garczarek et *al.* 2008). Parmi celle-ci, l'isoforme D1:1 est codée par *psbAI* qui est toujours présent en une seule copie (Golden et *al.* 1986, Mate et *al.* 1998), alors que l'isoforme D1:2 est codée par les gènes *psbAII* et *psbAIII*, qui se présentent en deux à six copies (Garcarek et *al.* 2008). Ces deux isoformes protéiques différent seulement de 25 acides aminés parmi les 360 constituant la protéine. De plus, alors que l'isoforme D1:1 est caractérisée par une glutamine sur la 130ème position de la séquence protéique, cet acide aminé est systématiquement un glutamate chez l'isoforme D1:2 (Clarke et *al.* 1993). Ces faibles divergences sont suffisantes pour fournir à ces deux polypeptides différentes fonctions caractéristiques (Golden et *al.* 1986). En effet, l'isoforme D1:1 est préférentiellement exprimée dans des conditions non stressantes, telles qu'une faible intensité lumineuse, ou une température optimale. A l'inverse, de basses températures, une intensité lumineuse excessive, ou un stress UV entrainent l'expression des gènes *psbAII* et *psbAIII*, codant l'isoforme alternative D1:2 (Bustos et *al.* 1990, Clarke et *al.* 1993 a,b, Campbell et *al.* 1995, 1998, 1999, Garczarek et *al.* 2008, Kos et *al.* 2008)

Autour de ce cœur, s'agence une antenne interne composée des sous-unités CP43 (PsbC) et CP47 (PsbB), liant chacune 20 molécules de chl *a* et 5 de β-carotène (Pakrasi, 1995 ; Green & Durnford 1996 ; Rhee et *al.* 1998), les sous-unités α et β du cytochrome b_{559} (PsbE et PsbF), ainsi que des polypeptides de plus petite taille, PsbH, I, J, K, L, M, N, X, Y and Z (Fig. 29,Table 1). Chez les cyanobactéries, s'ajoutent à cela cinq protéines extrinsèques aux thylacoïdes. Trois d'entre elles, le cytochrome c_{550} (PsbV), PsbU (12 kDa), et le *manganese-stabilizing protein* (PsbO), ont été cristallographiées. Ces polypeptides s'associent avec les quatre atomes de manganèse, constituant ainsi *l'Oxygen Evolving Complex* (OEC, Umena et *al.* 2011). Les protéines PsbV et PbsU apparaissent comme étant spécifiques aux cyanobactéries et aux algues rouges (Bricker et *al.* 2012). De plus, deux protéines homologues à PsbB et PsbQ chez les plantes vasculaires et les algues vertes (Kashino et *al.* 2002 Thornton et *al.* 2004) ont été copurifiées avec l'OEC, mais leurs interactions avec les nombreuses protéines de faible poids moléculaire sont encore mal caractérisées (Thinrnton et *al.* 2004, Nishiyama et *al.* 1997). Alors que tous les RCII cyanobactériens semblent contenir PsbQ, PsbP serait quant à elle plutôt impliquée dans une étape spécifique de l'assemblage du PSII et ne serait fixée au PSII que de façon transitoire (Thornton et *al.* 2004). Ces cinq protéines extrinsèques sont toutes localisées sur la face luminale des membranes thylacoïdiennes et contrairement aux protéines intrinsèques, très conservées des cyanobactéries aux plantes vasculaires, présentent des compositions en acides aminés plus variables (Enami et *al.* 2005, Roose et *al.* 2007).

Disposée entre les deux protéines cœur du RC, D1 et D2, se trouve une paire de chl *a* particulière, dénommée P680 (en référence à sa longueur d'onde d'absorption maximale, 680 nm), qui constitue un piège à énergie d'excitation (Pakrasi 1995, Kühlbrandt et al., 1994; Durrant et al., 1995).

Ces dernières vont passer à un état excité P680* et céder un électron à un accepteur primaire qui est une molécule de phéophytine *a*, créant ainsi une séparation de charge. Les électrons sont ensuite transférés de transporteurs en transporteurs (plastoquinones A, B, cytochrome b_6f puis PSI) à travers des réactions d'oxydoréduction (Fig. 29).

Tableau 1 | **Protéines constitutives du centre réactionnel du photosystème II chez les cyanobactéries.** Le gène codant la protéine, sa localisation vis-à-vis des membranes thylacoidiennes et son poids moléculaire sont indiqués. Les couleurs correspondent à celle de la structure du centre réactionnel du photosystème II (Fig. 29).

	Protéines	Gene	Localisation par rapport aux membranes	Poids moléculaire (kDa)
Protéines cœur	D1	*psbA*	Intrinsèque	39
	D2	*psbD*	Intrinsèque	39
	CP43	*psbC*	Intrinsèque	49
	CP47	*psbB*	Intrinsèque	56
	cyt b_{559} α sous-unité	*psbE*	Intrinsèque	10
	cyt b_{559} β sous-unité	*psbF*	Intrinsèque	5
Protéines de faible masse moléculaire	PsbH	*psbH*	Intrinsèque	7
	PsbI	*psbI*	Intrinsèque	4
	PsbJ	*psbK*	Intrinsèque	7
	PsbK	*psbK*	Intrinsèque	5
	PsbL	*psbL*	Intrinsèque	5
	PsbM	*psbM*	Intrinsèque	4
	PsbT	*psbT*	Intrinsèque	3
	PsbX	*psbX*	Intrinsèque	4
	PsbY	*psbY*	Intrinsèque	5
	PsbZ	*psbZ*	Intrinsèque	7
Oxygen evolving complex	PsbU	*psbU*	Extrinsèque	15
	cyt c_{550}	*psbV*	Extrinsèque	18
	PsbO	*psbO*	Extrinsèque	30
Structure non caractérisée	PsbP	*psbP*	Extrinsèque	18
	PsbQ	*psbQ*	Extrinsèque	17

Pour revenir à l'état non excité, le P680* récupère l'électron perdu auprès du donneur primaire : un résidu tyrosine de la protéine D1 appelé tyrosine Z. Chez les organismes pratiquant la photosynthèse oxygénique, cet électron est issu de la photolyse de l'eau au niveau de l'OEC (Ghanotakis et Yocum, 1990; Nugent et al, 2001). La dissociation de la molécule d'eau est catalysée par un cluster de manganèse et calcium (Mn_4CaO_5) qui permet quatre oxydations successives, aboutissant à la libération d'une molécule d'O_2 et de 4 H^+, à partir de deux molécules d'eau.

Le PSI est constitué de deux protéines principales, PsaA et PsaB et d'un grand nombre de protéines, liant différents cofacteurs, dont une centaine de chl et une quinzaine de molécules de β-carotène. Contrairement au PSII, l'antenne du PSI est complètement intégrée au complexe dans le sens qu'elle est constituée par les protéines PsaA et PsaB elles-mêmes qui, chez les cyanobactéries typiques, lient l'essentiel des pigments du PSI. Les extrémités N-terminales de PsaA/B et CP43/47, ainsi que les domaines C-terminaux de PsaA/B et D1/D2 présentent une forte similarité (Barer et *al.*

2000, Ferreira et *al.* 2004), suggérant que ces différents complexes ont probablement une origine évolutive commune.

Bien que ces deux PS diffèrent de par leur structure et leur activité catalytique, la transformation de l'énergie au sein de ces complexes se fait de façon analogue. En effet, l'hétéroduplex PsaA/B renferme lui aussi une paire spéciale de chl *a*, le P700, (absorption maximale dans le rouge lointain), qui a notamment permis sa mise en évidence par Kok dans les années 1950. Le P700, sous l'action de la lumière, passe à un état excité P700* et cède un électron au puissant réducteur A_0. L'électron sera ensuite transféré de cofacteur en cofacteur jusqu'à l'accepteur final, la ferrédoxine, qui induira la synthèse de NADPH. *In fine*, le transfert d'électrons au cours de la photosynthèse oxygénique s'opère selon un schéma d'oxydoréduction en Z entre les deux PS (Fig. 30).

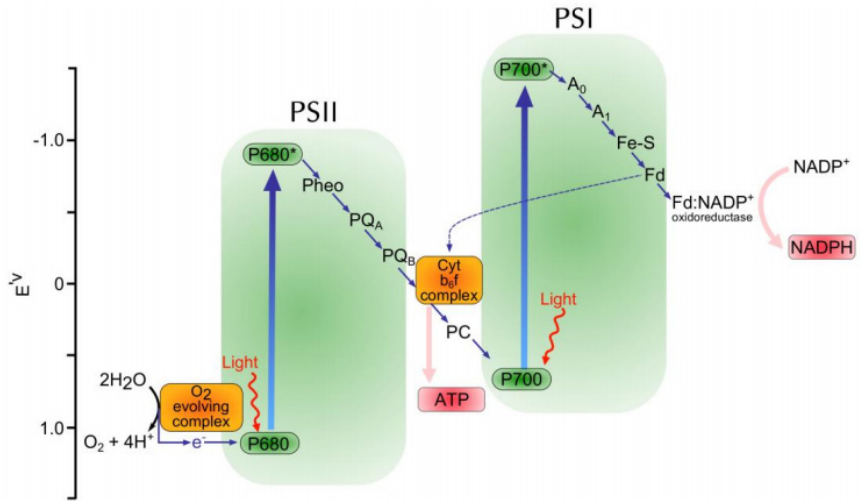


Figure 30 | **Schéma en Z représentant le transfert d'électrons lors de la photosynthèse oxygénique**. La génération d'électrons est initiée par la photolyse de l'eau au niveau de *l'oxygen evolving complex* et conduisant à la formation de dioxygène, d'ATP et de NADPH. Les chlorophylles des P680 et P700 sont les donneurs primaires des photosystèmes II et I, respectivement. Pheo : phéophytine ; PQ_A : plastoquinone A ; PQ_B : plastoquinone B ; PC : plastocyanine ; A_0 et A_1 : accepteur d'électrons ; Fe-S : protéine fer-souffre ; F_d : ferrédoxine. La ligne discontinue représente le transfert cyclique des électrons, et n'implique que le photosystème I (Humily 2013).

Le transfert d'électrons au sein des membranes thylacoïdiennes a au moins trois conséquences fondamentales qui caractérisent la photosynthèse oxygénique. Tout d'abord, l'OEC est responsable de la photolyse de l'eau et génère de l'oxygène moléculaire. Les réactions en chaîne d'oxydation qui s'opèrent conduisent à l'acidification du lumen par importation de protons depuis le cytosol. Ce gradient de pH électrochimique transthylacoïdal génère un flux de protons à travers les complexes d'ATP synthase, qui vont induire la synthèse d'ATP dans le cytosol. Enfin, le transport d'électrons s'achève par la formation d'un puissant réducteur, le NADPH. Ces molécules seront utilisées notamment dans les réactions photosynthétiques dites « sombres ».

iii. Les réactions sombres

Les réactions sombres consistent en des réactions enzymatiques indépendantes de la lumière, qui permettent grâce à l'ATP et au NADPH produits lors de la phase claire, l'incorporation du CO_2 dans des composés organiques glucidiques. Ces réactions, réalisées de façon cyclique, sont appelées cycle de Calvin-Benson. L'enzyme clé de ce cycle est la Ribulose 1,5 Bisphosphate Carboxylase Oxygénase, appelé RuBisCO, qui catalyse la fixation du carbone inorganique, qui entrera dans la composition de tous les constituants cellulaires (acides nucléiques, protéines, lipides, *etc.*). Chez les cyanobactéries, les réactions photosynthétiques sombres s'initient au sein de microcompartiments bactériens (BMC), similaires aux organelles des eucaryotes, dans le sens où ils renferment des protéines impliquées dans une activité précise (Fig. 31). Les BMCs sont constitués d'une capsule protéique et renferment un grand nombre d'enzymes impliquées dans des fonctions diverses. Chez les cyanobactéries, il existe un seul type de BMC, impliqué dans la fixation du carbone inorganique : le carboxysome (Fig. 31).

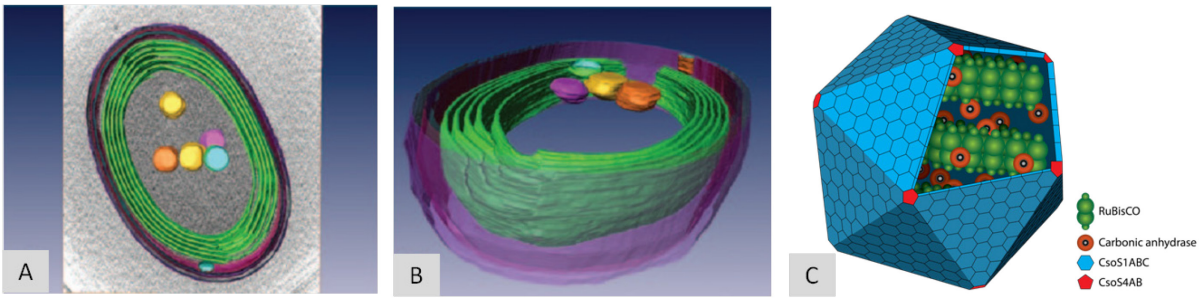


Figure 31 | **Modèle 3D de l'organisation spatiale d'une cellule de Prochlorococcus et d'un carboxysome cyanobactérien**. La membrane externe (bleu clair), membrane interne (bleu foncé), thylacoïdes (vert) et les carboxysomes (violet, orange et jaune) d'une cellule de *Prochlorococcus* (souche MIT9313) vue de face (**A**) et de profil (**B** ; Ting et *al.* 2007). Représentation schématique d'un carboxysome. La RuBisCO et l'anhydrase carbonique, les deux enzymes clés impliquées dans la fixation du CO_2, sont encapsulées au sein d'une coque protéique de forme icosahédrale (**C** ; http://2014.igem.org/Team:Bielefeld-CeBiTec/Project/CO2-fixation/Carboxysome).

Les carboxysomes sont des inclusions de forme polygonale et leur existence a été reportée pour la première fois en 1956, chez la cyanobactérie *Phormidium uncinatum* (Drews & Niklowitz 1956). A cette époque, leur rôle était encore inconnu et ces inclusions étaient appelées corps polyèdres. Leur isolement en 1973 a permis de mettre en évidence la nature de leur enveloppe protéique et la concentration très importante de ribulose 1,5-biphosphate carboxylase oxygénase (RuBisCO) et d'anhydrase carbonique qu'ils renferment (Shively et *al.* 1973, Fig. 31). Ainsi, le nom de carboxysome a été proposé (revue de Yeates et *al.* 2008). Depuis lors, ces structures ont été observées chez toutes les cyanobactéries ainsi que chez certaines bactéries chémioautrophes. De taille variant entre 80 - 120 nm, les carboxysomes permettent la conversion du bicarbonate en CO_2, son accumulation et sa concentration autour de la RuBisCO, permettant ainsi d'optimiser l'activité carboxylase de cette enzyme qui limite souvent le cycle de Calvin. Cette enzyme, qui est probablement l'enzyme la plus abondante des végétaux, catalyse la réaction entre le Ribulose 1.5-biphosphate (RuBP) et le CO_2,

produisant ainsi une molécule à 6 carbones, peu stable, qui se dégrade quasi instantanément en deux molécules à 3 carbones de 3-phosphoglycérate. Une partie de ce 3-phosphoglycérate sera utilisée pour régénérer de nouveau la Ribulose 1.5 –biphosphate, alors que la fraction restante sera utilisée pour la synthèse de fructose biphosphate, molécule intermédiaire à la synthèse de glucose, saccharose, amidon et autres carbohydrates (Fig. 32).

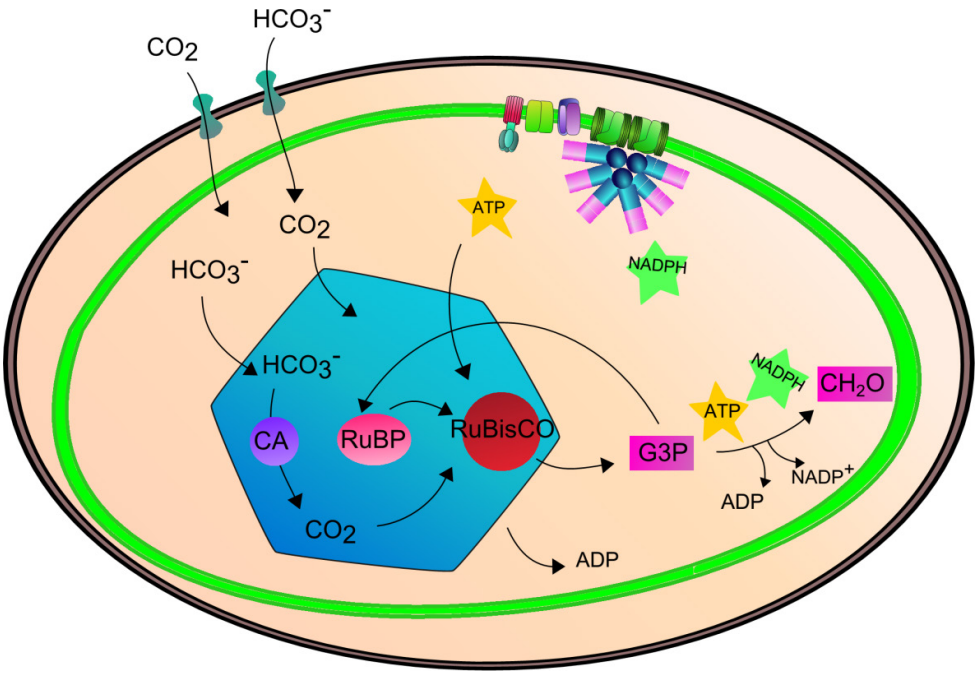


Figure 32 | **Cycle de Calvin-Benson au sein d'une cellule de cyanobactérie.** La première étape consiste en la transformation du bicarbonate en CO_2 catalysée par l'anhydrase carbonique (CA), et l'accumulation de ce dernier dans le carboxysome (en bleu). En utilisant l'ATP produit au cours de la phase claire, la Ribulose 1,5 Bisphosphate Carboxylase Oxygénase (RuBisCO) permet l'incorporation du CO_2 dans une molécule de ribulose 1,5 biphosphate (RuBP) qui se scindera en deux molécules de 3-phosphoglycerate (G3P). Une partie des molécules de 3-phosphoglycerate est utilisée pour régénérer les molécules de ribulose 1,5 biphosphate, alors que l'autre partie représente le gain net du cycle et constitue le point de départ de la synthèse des sucres.

b. La photoinactivation du photosystème II : effets de la température

La photosynthèse est un mécanisme très sensible et son rendement est facilement impacté par des changements de conditions environnementales, notamment de température (Berry and Bjorkman 1980, Yordanov et *al.* 1986). La température interfère avec la photosynthèse en agissant à différents niveaux tels que le transport d'électrons, la diffusion du CO_2, l'activité de la RuBiscCO, la formation d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS), ou encore le fonctionnement du PSII. En effet, ce dernier est une cible privilégiée des stress environnementaux et, quand l'organisme est exposé à des conditions défavorables ou stressantes, son activité diminue avec un taux plus important que la plupart des fonctions cellulaires (Berry & Bjorkman, 1980, Deeming-Adams & Adams 1992, Aro et *al.* 1993, Anderson & Aro 2001).

i. Le processus de photoinactivation du photosystème II

La lumière est indispensable à la vie des organismes photosynthétiques mais peut paradoxalement facilement devenir nuisible à toute la machinerie photosynthétique (Powles 1984, Aro et *al.* 1993). Pour une cellule photosynthétique, un enjeu principal est d'utiliser le maximum d'énergie lumineuse qu'elle est capable de métaboliser et un des points cruciaux de la régulation de l'utilisation de la lumière est le PSII. Le PSII est un complexe qui a une durée de vie limitée lorsqu'il est en fonctionnement et lorsqu'il a traité un certain nombre de photons, il s'inactive. Ainsi, en conditions normales, l'inactivation des RCII s'effectue à des taux que l'on pense proportionnels au flux de photons incidents (Powles 1984, Aro et *al.* 1993, Andersson & Aro 2001, Campbell & Tyystjarvi 2012). Bien que connus depuis le milieu du XXème siècle (Kok et *al.* 1956), les mécanismes précis de la photoinactivation du PSII sont toujours le sujet de débats entre photophysiologistes et l'implication de nombreux complexes a été suggérée au fil des études (plastoquinones A et B, P680, le cluster de manganèse, la recombinaison de charges entre l'OEC oxydé et les quinones réduites, etc.). Ces dernières années, deux écoles de pensée principales ont émergé et proposent une origine différente du mécanisme de photoinactivation du RCII.

La première souligne l'importance de la séparation de charge, qui conduirait à la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ROS ; Vass et *al.* 1992, Keren et *al.* 1997, Szilard et *al.* 2005), qui ont un fort pouvoir oxydant et peuvent rapidement endommager le RCII. Les ROS et notamment la molécule la plus agressive, l'oxygène singulet $^1O_2$, peuvent être produits lors de la photolyse des molécules d'eau au niveau de l'OEC (Hideg et *al.* 1994, Krieger-Liszkay et *al.* 2008) et de l'interaction avec des molécules de chl. En effet, les chl excitées peuvent spontanément s'associer en triplets de chl extrêmement réactifs ou ces derniers peuvent être produits lors de la séparation de charge entre P680* et la phéophytine. Ainsi, dans ce mécanisme hypothétique, le taux de séparation de charge du RCII, dépendant de l'énergie délivrée par son antenne, serait le mécanisme qui générerait (indirectement sous l'action de ROS) des dommages importants au RCII, notamment la dégradation de la protéine D1, et son inactivation (Vass et *al.* 1992, Vass & Cser 2009).

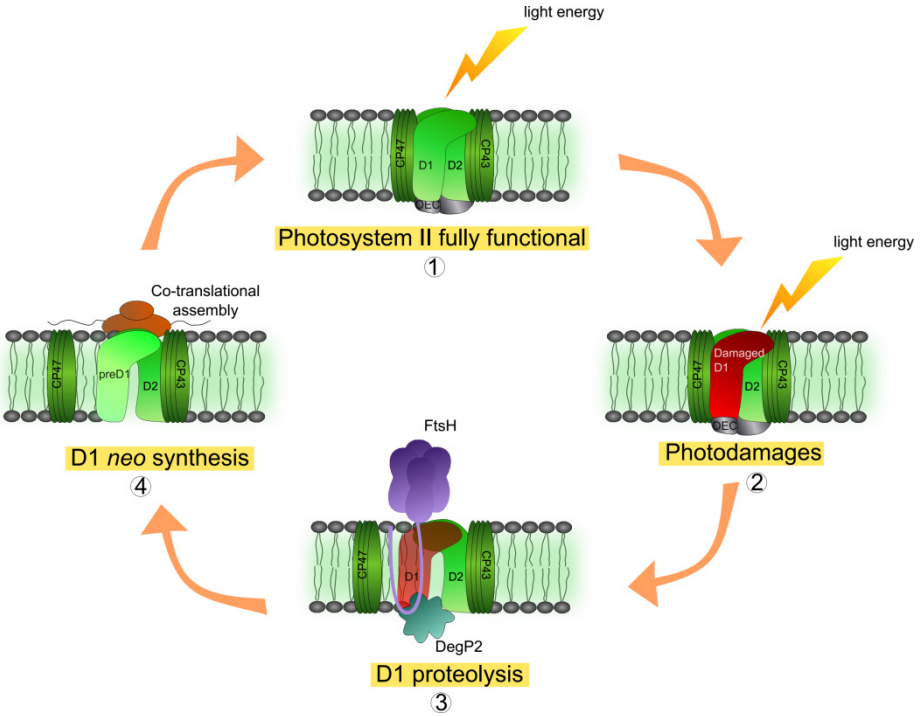
La seconde école de pensée propose un modèle de photoinactivation du RCII en deux étapes dit « modèle Mn » (Hakala et *al.* 2005, Ohnishi et *al.* 2005). Des dégâts primaires auraient tout d'abord lieu sur le complexe d'atomes de manganèse de l'OEC, qui serait le photorécepteur de la photoinactivation (Renger et *al.* 1989, Nishiyama et *al.* 2006). Ces dégâts seraient directement proportionnels à l'éclairement reçu par le complexe OEC (Park et *al.* 1995, Tyystjarvi & Aro 1996) et provoqués principalement par des photons de longueur d'onde courte (Nishiyama et *al.* 2006). Cette première étape conduirait à l'inactivation du complexe puis, dans une seconde étape, des dommages secondaires seraient causés sur le RCII, notamment la destruction de la protéine D1, de pigments et cofacteurs environnants (Ohnishi et *al.* 2005).

Ainsi, dans le premier mécanisme hypothétique, les photons photoinactivants proviennent de l'antenne et leur flux peut donc être régulé selon les conditions environnementales (voir paragraphe photoprotection). Leur longueur d'onde dépend de la pigmentation de l'antenne. Dans le modèle Mn, les photons photoinactivants sont principalement bleu/UV et leur flux correspond au flux de photons incidents, sans possibilité de régulation par l'antenne photosynthétique. Il faut noter que les observations faites lors d'un certain nombre d'études depuis les années 90 supportent tantôt l'une tantôt l'autre des hypothèses de mécanismes. Certains auteurs soulignent que la plupart du temps, chaque hypothèse seule ne peut tout expliquer et proposent que les deux mécanismes opèrent en même temps, car il n'y aurait aucune raison pour qu'ils soient exclusifs (Vass & Cser 2009, Oguchi et *al.* 2011).

Bien que l'origine du processus reste actuellement un sujet de controverse, la protéine D1 est quant à elle unanimement considérée comme une cible majeure du processus d'inactivation du PSII (Vass et *al.* 1992, Edelman & Mattoo 2008). La protéine cœur du PSII est constituée de cinq hélices transmembranaires, connectée par des hélices traversant tour à tour le cystosol et le stroma (Trebst 1986). La haute sensibilité de la protéine D1 pourrait en partie s'expliquer par sa proximité avec le site manganèse de l'OEC et les chl impliquées dans la séparation de charge, pouvant amener à la génération de ROS (Diner & Rappaport 2002). Il apparait cependant que l'inactivation du PSII ne concerne pas seulement la protéine D1, et il est probable que la protéine D2 et la protéine d'antenne mineure CP43 soient aussi affectées (Komenda & Masojidek, 1995).

ii. Le processus de réparation du photosystème II

Pour palier l'accumulation de RCII inactivés dans la cellule, qui conduirait inéluctablement à un effondrement du taux global de photosynthèse, tous les organismes photosynthétiques oxygéniques ont mis en place une voie de réparation du PSII, qui consiste à rapidement remplacer les protéines endommagées par des protéines synthétisées *de novo* (Fig. 35). Lorsque les conditions sont non stressantes, toute l'énergie d'excitation absorbée par la cellule est convertie en transport photosynthétique d'électrons et le système est à l'équilibre. Dans ces conditions, les polypeptides endommagés des CRII inactivés, et notamment la protéine D1, sont rapidement remplacés par des protéines nouvellement synthétisées. Le remplacement de la protéine D1, consiste en la digestion protéolytique du polypeptide *via* l'action de protéases (revu par Adam & Clarke 2002). La première, DegP2, cisaille la protéine sur un site de la boucle inter-hélice D-E, puis D1 est définitivement dégradée par une métalloprotéase, FtsH afin d'être retirée du PSII et de la membrane thylacoïdale (Fig. 33 ; Lindahl et *al.* 2000, Kato & Sakamoto 2009). La reprise de l'activité photosynthétique du RCII nécessite la réparation du RCII à travers l'insertion d'une protéine D1 *neo* synthétisée.



<u>Figure 33</u> | **Cycle de réparation de la protéine D1 du photosystème II.** La lumière endommage de façon continuelle les protéines photosynthétiques, en particulier le photosystème II et sa protéine clé, D1 (**2**). Un cycle efficace de réparation a été mis en place par les organismes photosynthétiques consistant en la reconnaissance puis la dégradation de la protéine D1 endommagée par les enzymes FtsH et DegP2 (**3**). Une protéine *neo* synthétisée est ensuite insérée dans le photosystème II, appelée preD1 (**4**). Une fois preD1 insérée dans le centre réactionnel, ce dernier sera de nouveau complètement fonctionnel (**1** ; modifié de Kato & Sakamoto 2009).

iii. Photoinhibition et température

Le modèle Mn considère que le taux d'inactivation du PSII est proportionnel au flux de photons incident (Mattoo et *al.* 1984, Tyystjarvi et *al.* 1996, Nishiyama et *al.* 2001) et ne serait donc pas affecté par des stress environnementaux tels que la température car le mécanisme serait purement biophysique (Allakhverdiev et *al.* 2008). Le taux de réparation des PSII dépend également de l'intensité lumineuse, atteignant une valeur maximale sous une intensité relativement faible (Allakhverdiev et *al.* 2008) mais cependant, la vitesse de remplacement de la protéine D1, qui est dépendante de processus enzymatiques, est influencée par des paramètres abiotiques tels que la température. En effet, les enzymes fonctionnent de façon optimale au sein d'une gamme de température qui leur est propre, au delà et en deçà de laquelle elles ne sont plus capables de maintenir leur fonction. Ainsi, différentes études ont mis en évidence que l'exposition des organismes photosynthétiques à de basses températures tend à inhiber l'étape de traduction du promoteur *psbA* de la protéine D1, induisant une forte diminution du taux de réparation du PSII (Allakhverdiev & Murata 2004, Chow et *al.* 2005, Nishiyama et *al.* 2004). De plus, la protéine FtsH serait plus ou moins induite en fonction des conditions environnementales, agissant sur le taux de réparation du RCII (Singh et *al.* 2005).

L'exposition à un stress thermique chaud et froid, tout comme à une forte lumière, chez les organismes phototrophes entraîne une augmentation de la concentration cellulaire en ROS. Chez ces organismes, ces molécules sont continuellement produites au cours de la photosynthèse et la respiration (Imlay 2003, Giorgio er *al.* 2007), mais sont contrôlées par le système antioxydant de la cellule en conditions normales. Les stress abiotiques induisent cependant une augmentation de la production de ROS tels que le radical superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^-) ou encore l'oxygène singulet ($^1O_2$). Les ROS réduiraient considérablement le taux de synthèse de toutes les protéines photosynthétiques en habitant la synthèse des précurseurs protéiques (Takahashi & Murata 2004), et sembleraient également capables de perturber le fonctionnement de la protéine D1 au sein même du RCII, lorsque celle-ci est en place. En effet, certaines études proposent que les ROS induisent des changements conformationnels de la protéine, la rendant ainsi plus susceptible à certaines protéases (Aro et *al.* 1993), tandis que d'autres auteurs proposent une action directe des ROS sur les acides aminés. Quelque soit le mécanisme précis, le stress oxydatif joue un rôle important dans la photoinhibition du PSII en inhibant la réparation de la protéine D1 (Nishiyama et *al.* 2001, 2004, Vass & Cser 2008).

c. La photoprotection : dissipation non photochimique de l'énergie lumineuse

La photoinhibition de la photosynthèse trouve en grande partie son origine dans l'inactivation du PSII, qui résulte la plupart du temps d'un déséquilibre entre la quantité d'énergie absorbée et celle qui est utilisable par la cellule. Pour limiter cela, les phototrophes oxygéniques ont évolué des mécanismes dits de « photoprotection », qui permettent de contrôler dans une certaine mesure l'énergie atteignant les RC. Ces processus sont particulièrement importants sur le court terme, lorsque les organismes sont confrontés à des variations rapides de lumière (rythme journalier, éclaircie soudaine, *etc*.) et/ou de température (courant froid, upwelling, *etc*.). En effet, ces changements de paramètres abiotiques vont impacter l'activité métabolique générale de la cellule et modifier la quantité d'énergie utilisable. Ainsi par exemple, une baisse de température sera susceptible de ralentir considérablement l'activité des voies métaboliques nécessitant les produits de la photosynthèse (ATP, NADPH) et il pourra alors être nécessaire de dissiper de l'énergie lumineuse incidente, considérée alors comme excédentaire au regard des capacités d'utilisation de la cellule.

i. Le rôle de la caroténo-protéine orange

Une des voies de photoprotection les plus étudiées chez les organismes photosynthétiques concerne la dissipation d'énergie lumineuse excédentaire sous forme de chaleur, qui est la plupart du temps associée à une extinction non photochimique de fluorescence (*quenching non photochimique*, NPQ ; Horton et *al.* 1994, Muller et *al.* 2001). Il existe plusieurs mécanismes permettant ce processus, qui

varient selon les organismes considérés. Chez les plantes supérieures, la photoprotection *via* le NPQ est assurée en grande partie par le cycle des xanthophylles (double déépoxydation réversible de la violaxanthine en zéaxanthine) et la protéine PsbS, qui dissipent l'énergie lumineuse en excès au niveau des antennes intrinsèques aux membranes du PSII (Roach & Krieger-Liszkay 2012). Les cyanobactéries, qui ne possèdent pas de cycle des xanthophylles, ont pendant longtemps laissé la communauté scientifique perplexe quant à leurs mécanismes de dissipation de l'énergie (Campbell et *al.* 1996b). Elles sont pourtant tout à fait capables d'induire de l'extinction non photochimique de fluorescence, mais à travers des mécanismes très différents de ceux décrits chez les plantes vasculaires (El Bissati et *al.* 2000, Rakhimberdieva et *al.* 2004). Une des voies importantes de dissipation de d'énergie lumineuse chez les cyanobactéries aurait lieu entre le PBS et le RCII, impliquant une Caroténo-Protéine Orange (OCP ; Wilson et *al.* 2006, 2007). Le rôle de l'OCP dans ce mécanisme semble essentiel puisque, chez *Synechocystis* sp. PCC6803, l'inactivation de son gène provoque l'inhibition de la dissipation sous forme de chaleur, rendant la cellule beaucoup plus sensible à la photoinhibition (Wilson et *al.* 2006). L'OCP est présente chez beaucoup de cyanobactéries, y compris chez les *Synechococcus* marins. Cette caroténo-protéine est un photorécepteur essentiel pour détecter les changements environnementaux afin de s'y acclimater rapidement. L'OCP est une protéine d'environ 35 kDa, présentant un domaine N-terminal replié sous la forme d'hélices α et un second domaine en C-terminal, structuralement composé d'hélices α et feuillets β. Chez les cyanobactéries d'eau douce, un seul pigment est fixé sur la protéine : une molécule de 4-cétocaroténoïdes (hydroxyéchinénone ou canthaxanthine), presque entièrement enfouis à l'intérieur de la protéine, n'exposant que 4% de sa surface (Kerfeled et *al.* 2004a, 2004b, Leverenz et *al.* 2015). L'illumination par une lumière bleue verte intense induit un changement de conformation de la protéine et la conversion de sa forme inactive orange OCP^O en sa forme active rouge OCP^R. Récemment, les travaux collaboratifs des équipes de Kirilovsky et Kerfeld ont permis d'obtenir la structure d'un cristal de l'OCP^R (Fig. 34 ; Leverenz et *al.* 2015). Ces travaux révèlent que la conversion de l'OCP en sa forme active s'accompagne de la translocation de la molécule d'échinénone de 12 Å au sein de la protéine, qui présente alors une structure plus ouverte. Le changement conformationnel de la protéine et son ouverture permettraient l'attachement et la fixation de l'OCP^R sur le PBS et ainsi la dissipation de l'énergie excédentaire sous forme de chaleur. Bien que l'élucidation de cette composante du NPQ chez les cyanobactéries ait considérablement avancé ces dernières années, des questions subsistent encore, telles que le site de fixation de l'OCP^R au PBS. Il a été proposé que la protéine sous sa forme rouge se fixe au niveau du cœur du PBS (Gwizdala et *al.* 2011), à un ou deux hexamères d'APC (Fig. 34 ; Jallet et *al.* 2014).

Une fois l'énergie dissipée, le retour de l'OCP^R vers son état orange inactif est fortement influencé par la présence d'une protéine de 13 kDa, la FRP (*Fluorescence Recovery Protein*, Boulay et *al.* 2010).

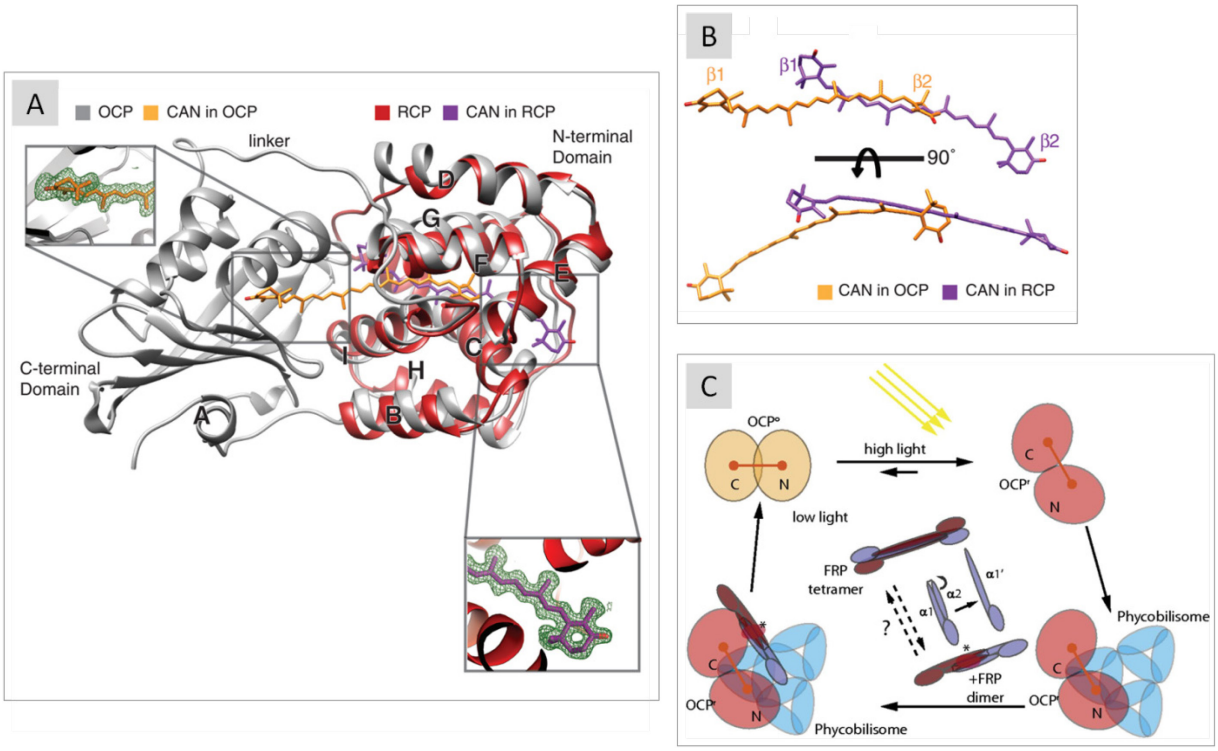


Figure 34 | **Structure de la caroténo-protéine orange et changement de conformation en fonction de son état actif ou inactif.** La superposition des cristaux de la caroténo-protéine orange sous son état orange inactif, OCP^O (gris) et actif OCP^R (rouge), isolée de la souche Synechocystis sp. PCC 6803. Le caroténoïde associé à la protéine, la canthaxanthine, est représenté en orange dans l'OCP^O et en violet dans l'OCP^R. Les panels représentent les cartes de densités électroniques du caroténoïde au sein de chaque structure (**A** ; Leverenz et *al.* 2015). Conformation structurale de la canthaxanthine au sein de l'OCP^O et l'OCP^R, montrant une structure plus planaire de la chaîne polyène au sein de la protéine active (B ; Leverenz et *al.* 2015). Modèle des interactions entre l'OCP, la FRP et l'allophycocyanine, site d'ancrage de l'OCP. Sous de fortes intensités lumineuses, l'OCP^O subit des modifications conformationnelles, induisant sa conversion en forme active OCP^R. La forme rouge se fixe à l'allophycocyanine pour dissiper l'excès d'énergie. La FRP se fixe sur l'OCP^R et la convertit en sa version inactive, l'OCP^O, puis la dissocie du phycobilisome (Sutter et *al.* 2013). OCP : Caroténo-Protéine Orange; RCP : Caroténo-Protéine Rouge CAN : canthaxanthine ; FRP : Protéine de Récupération de la Fluorescence.

La FRP accélère la conversion des OCP^R libres vers leur forme orange, jouant ainsi un rôle crucial en accélérant la récupération des capacités maximales des PBS et en ayant vraisemblablement un rôle dans le détachement de l'OCP du PBS. La récente structure de la FRP a permis de mettre en évidence deux conformations différentes de cette protéine, une forme homodimérique, qui serait sa forme active, et un état tétramérique, probablement inactif du fait que, sous cet état, les sites actifs de la protéine sont enfouis (Sutter et *al.* 2013). A travers l'exploration de 130 génomes cyanobactériens, Sutter et collaborateurs révèlent que 97 d'entre eux possèdent l'OCP et ont retrouvé au sein de 71 génomes le gène de la FRP (Sutter et *al.* 2013). L'exploration des 97 génomes de picocyanobactéries marines disponibles dans la base de données Cyanorak révèle que la majorité des *Synechococcus* marins possède l'OCP (16 souches de *Synechococcus* n'ont pas le gène de l'OCP sur les 54 génomes actuellement disponibles) et le gène est totalement absent chez *Prochlorococcus*, de façon cohérente avec son antenne photosynthétique. Les résultats sont identiques en ce qui concerne la présence du gène codant pour le FRP. La région génomique de l'OCP est constituée de 3 gènes, codant

respectivement pour l'OCP, une β-carotène kétolase, probablement nécessaire à la synthèse de l'échinénone ou d'un autre céto-caroténoïde, et la FRP (Fig. 35). Alors que la présence de ces 3 gènes est très conservée chez les souches ayant la caroténo-protéine orange, le contexte génomique en amont et aval de cette région est quant à lui beaucoup plus variable, suggérant que ces gènes pourraient constituer un îlot génomique transféré latéralement entre *Synechococcus*. (Boulay et *al.* 2010).

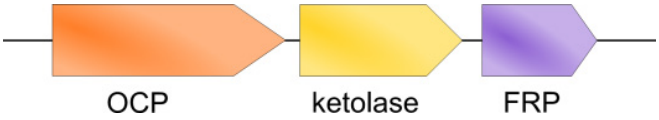


Figure 35 | **Contexte génomique de la Caroténo-Protéine Orange (OCP)**. Région génomique de *Synechocystis* sp. PCC6803 codant l'OCP et la Fluorescence Recovery Protein (FRP), séparées par un gène codant une ketolase (modifié de Boulay et *al.* 2010).

Les cyanobactéries n'ont pas seulement évolué des mécanismes de protection face aux variations rapides des conditions environnementales, elles ont également mis en place des mécanismes permettant de réguler de façon fine la quantité d'énergie incidente en fonction de leur besoin sur différentes échelles de temps. Certains de ces mécanismes se déroulent en effet à l'échelle d'une seconde ou d'une minute et sont dits réponses à court terme, alors que d'autres nécessitent des échelles de temps plus longues, en heures ou jours, et sont dites réponses à long terme (Anderson 1986). Comme nous l'avons expliqué ci-avant, les baisses soudaines de température sont connues pour induire un ralentissement du métabolisme cellulaire (Burns et *al.* 2005, Price & Sowers 2004) qui, chez les organismes photosynthétiques, entraîne un déséquilibre entre la quantité d'énergie absorbée et celle utilisable par la cellule. La plupart du temps, cette situation, tout à fait comparable à un stress lumineux, induit des réponses dites de « photoacclimatation », mais faisant en fait référence à tous les mécanismes permettant de réguler la quantité d'énergie absorbée face à des changements des conditions environnementales.

ii. Autres voies de régulation de l'énergie distribuée aux photosystèmes

Le mécanisme de transitions d'états

Les transitions d'états du PBS sont un mécanisme de reconfiguration rapide de l'appareil photosynthétique en réponse à des changements de l'environnement. Ce mécanisme a été décrit pour la première fois chez les algues rouges par Murata (1969) et les algues vertes (Bonaventura & Myers 1969), bien que celles-ci possèdent un appareil photosynthétique très différent. Les transitions d'états sont un mécanisme important de régulation de la distribution de l'énergie entre les deux PS afin d'optimiser l'efficacité photosynthétique globale (Takahashi et *al.* 2006, Murata 2009, Puthiyaveetil et *al.* 2012). En effet, de par les antennes photosynthétiques qui leur sont associées et les propriétés de

leur paire spéciale de chl *a*, les PSI et PSII présentent des capacités d'absorption très différentes. Ainsi, les longueurs d'ondes inférieures à 600 nm sont préférentiellement absorbées par le PBS et utilisées pour exciter le RCII. Au contraire, les longueurs d'ondes supérieures à 600 nm vont préférentiellement exciter les nombreuses chl *a* de l'antenne du PSI (Fujita et *al.* 1994). Dans ces conditions, il n'est pas rare que l'un des PS reçoive plus d'énergie que l'autre. Ainsi, lorsque les PSII sont surexcités par rapport aux PSI, les PBS peuvent transiter le long des membranes thylacoïdales pour venir se fixer au dessus du PSI, passant ainsi à l'état 2. Au contraire, lorsque l'énergie d'excitation arrivant au RCI est supérieure à celle du RCII, la reconfiguration s'opère vers l'état 1, où la majorité des PBS est associée au RCII (Fig. 36 ; revue par van Thor et *al.* 1998, Allen & Forsberg 2001, Mullineaux 2014).

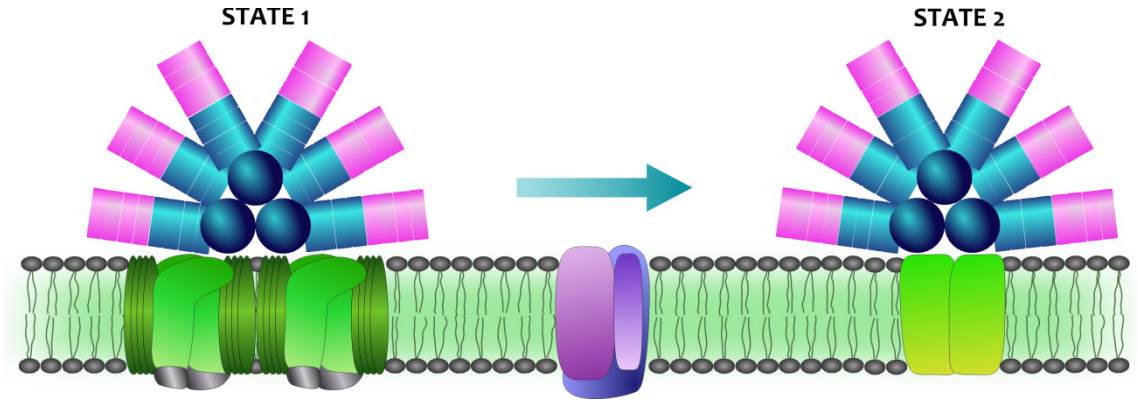


Figure 36 | **Transition d'état du phycobilisome chez les cyanobactéries**. A l'état 1, le phycobilisome est associé au photosystème II et lui transmet préférentiellement son énergie. En conditions éclairées, le phycobilisome peut transiter vers l'état 2, s'associant alors avec le photosystème I à qui il délivrera son énergie.

Ce mécanisme de régulation de l'énergie repose sur la mobilité du PBS le long des membranes entre le PSII et le PSI (Mullineaux 1999), alors que les RC seraient quasiment immobiles, intégrés dans les membranes (Mullineaux et *al.* 1997, Sarcina et *al.* 2001). Ce schéma suggérerait donc que l'interaction PBS-RC soit très flexible. Une approche de mutagenèse aléatoire chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 a permis de mettre en évidence un gène spécifiquement requis pour les transitions d'état, appelé *rpaC* (*regulator of phycobilisomes association C* ; Emlyn-Jones et *al.* 1999). Le gène *rpaC* code pour une petite protéine membranaire de 9kDa, jusque-là non caractérisée. Le mutant *rpaC*$^-$ chez *Synechocystis* montre un phénotype très clair, avec une inhibition totale des transitions d'état mais le mécanisme d'action reste encore flou (Joshua et *al.* 2005). Dans le mutant, il semble que le PBS joue toujours son rôle de collecte et de transfert d'énergie, mais les PBS seraient bloqués à l'état 1 (Emlyn-Jones et *al.* 1999). Puisque le PBS peut interagir avec des complexes différents tels que le PSII et le PSI, des travaux récents soulèvent la question d'une interaction possible avec d'autres complexes au sein des thylacoïdes (Mullineaux, 2008). Une des possibilités impliquerait notamment la protéine IsiA, une protéine fixant des chl, qui est synthétisée lors de carence en fer ou de situations stressantes

(Boekema et *al.* 2001, Singh et *al.* 2007). Cette protéine pourrait agir comme dissipateur de l'énergie collectée par le PBS (Joshua et *al.* 2005, Wilson et *al.* 2007).

Bien que de nombreux détails des mécanismes moléculaires des transitions d'états restent encore inconnus, la régulation de la distribution de l'énergie lumineuse entre les deux PS permet de maintenir un état d'équilibre de l'énergie d'excitation entre les deux RC et ainsi d'optimiser la photosynthèse malgré les changements environnementaux. Cependant, le rôle et les avantages écophysiologiques que pourraient conférer les transitions d'états font encore débats. Il a été montré que le mouvement du PBS le long des membranes est physiologiquement important pour l'acclimatation à de faibles intensités lumineuses et permettrait ainsi de maximiser l'efficacité de collecte de l'énergie à basse lumière (Mullineaux & Emlyn-Jones 2004). Néanmoins, jusqu'à maintenant, aucune étude n'a montré que la température influe de façon considérable le mécanisme des transitions d'états (Sarcina et *al.* 2001, Nellaepalli et *al.* 2012).

Ce mécanisme de reconfiguration rapide de l'appareil photosynthétique, de l'ordre de la seconde, ne suffit pas à réguler la quantité d'énergie incidente face à des changements qui s'inscrivent dans le temps ou de plus grandes intensités. C'est alors que des mécanismes de photoacclimation à long terme sont nécessaires.

***High Light Induced Proteins* (HLIP)**

Les analyses génomiques des cyanobactéries ont révélé que ces dernières encodaient des protéines particulaires, appelées *High Light Induced Proteins* (HLIP) ou *Small Chla/b binding-like Proteins* (SCP ; Funk and Vermass 1999). Ces petites protéines seraient capables de se fixer au RCII et ainsi, dissiper l'excès d'énergie afin de diminuer le risque de photoinhibition (Yao et *al.* 2007). Les HLIP seraient induites sous de fortes lumières, de basses températures ou encore des carences en nutriments. Chez *Synechocystis* sp. PCC6803, l'expression de quatre gènes *hli* est induite sous les stress précédemment cités (He et *al.* 2001). L'exploration génomique des picocyanobactéries marines, révèle que leur nombre apparait beaucoup plus variable. En effet, alors qu'une quinzaine de gènes a été observée chez *Synechococcus* (Palenik et *al.* 2006), *Prochlorococcus* en contiendrait une quarantaine (Coleman & Chisholm 2007).

iii. Régulation de l'utilisation de la lumière

Les pigments membranaires des cyanobactéries sont répartis dans deux groupes : les chl (représentées principalement par la chl *a*) et les caroténoïdes. Les caroténoïdes naturels sont très diversifiés, avec plus de 600 molécules identifiées à ce jour (Sandmann et *al.* 1999). Les caroténoïdes sont très répandus dans le monde du vivant : chez tous les organismes photosynthétiques, des procaryotes, beaucoup de champignons et d'animaux. Chez les cyanobactéries, les caroténoïdes les

plus fréquents sont le β-carotène et la zéaxanthine, mais l'échinénone, la canthaxanthine, la myoxanthophylle, la caloxanthine et la nostoxanthine sont aussi souvent observées (revue de Roy et *al.* 2011). Alors que la chl *a* est le pigment accepteur terminal d'énergie, les caroténoïdes sont des pigments accessoires, impliqués dans deux mécanismes distincts. Ils peuvent tout d'abord jouer un rôle dans la collecte de l'énergie lumineuse (A_{max} entre 400 et 500 nm) et le transfert de cette énergie vers les chl, mais ils sont également impliqués dans les mécanismes de photoprotection et la prévention des dommages photooxydatifs. Chez les *Synechococcus* marins, les concentrations en chl *a* et zéaxanthine sont souvent du même ordre de grandeur, du fg cellule^{-1}, alors que le β-carotène est en général dix fois moins abondant (Kana et *al.* 1988, Six et *al.* 2004). Cependant la quantité de ces pigments varie considérablement chez les cyanobactéries, notamment en fonction des conditions environnementales. Bien qu'étant tous deux des caroténoïdes, le β-carotène et la zéaxanthine présentent des variations différentes en fonction des stress environnementaux (lumière, température) suggérant qu'ils sont localisés au sein de systèmes distincts (Kana et *al.* 1988 ; Six et *al.* 2004). Les co-variations des concentrations en chl *a* et β-carotène suggèrent que ce caroténoïde est localisé dans les membranes thylacoidiennes, hypothèse confirmée par la purification des thylacoïdes et les analyses structurales des PS (Jordan et *al.* 2001, Loll et *al.* 2005). En effet, localisés autour des RC, ils peuvent transférer de l'énergie aux chl *a*, mais également de par leur rôle antioxydant, protègent le RC des attaques des ROS (Tefler 2005).

Le rôle et la localisation de la zéaxanthine restent encore flous, bien que des études sur la cyanobactérie d'eau douce *Synechocystis* sp. PCC 6803 démontrent une augmentation de la teneur en zéaxanthine suite à une exposition à de fortes intensités lumineuses (Steiger et *al.* 1999). Un des mécanismes majeurs de photoacclimatation réside dans la régulation du contenu pigmentaire des cellules, afin de diminuer la quantité d'énergie absorbée. Ainsi, l'une des voies de régulation consiste, notamment, en la réduction de la surface et du nombre de thylacoïdes au sein desquels ces pigments sont insérés (Fig. 37 ; Kana & Glibert 1987). La réduction du contenu en PS est la plupart du temps accompagnée d'une diminution de la concentration en PBP, permettant de diminuer l'énergie d'excitation transférée aux PS. Ainsi, sous forte lumière, la souche *Synechococcus* sp. WH8102 diminue considérablement le contenu cellulaire en PE (réduction d'un facteur 20 entre 15 et 650 µmol photons m^{-2} s^{-1}) du fait de la réduction du nombre de PBS par cellule, mais également de la quantité d'hexamères de PE par PBS (Fig. 37 ; Six et *al.* 2004, 2005). Les spectres d'émission de fluorescence et d'absorption des PBS montrent en effet une diminution de PE par rapport à la PC, indiquant un raccourcissement des bras du PBS en réponse à une intensité lumineuse élevée. Les cyanobactéries peuvent également moduler le rapport PSI et PSII (PSII:PSI) en fonction des conditions environnementales. Sous faible éclairement, les cellules présentent des rapports PSII:PSI inférieurs aux

cellules exposées à de fortes lumières. La régulation des PS vise à ce que le PSI ne soit jamais saturé par le flux d'électrons, situation qui entraînerait du stress oxydatif (Melis 1989).

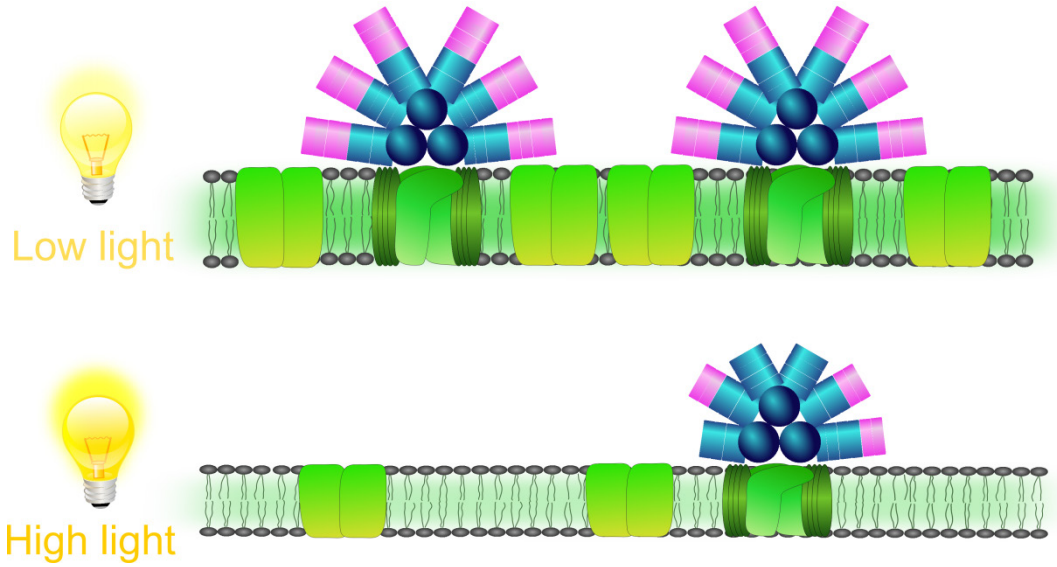


Figure 38 | **La photoacclimatation induit des ajustements des pools de complexes photosynthétiques au sein des membranes thylacoïdales**. Exposé à des conditions qui peuvent entraîner un déséquilibre entre l'énergie incidente et l'énergie utilisable par la cellule, *Synechococcus* met en place des processus de photoacclimatation. Ces derniers impliquent notamment la diminution de la surface des membranes thylacoïdales, de leur épaisseur ainsi que la diminution du contenu en chl *a* et β-carotène, en nombre de photosystèmes et de phycobilisomes et une réduction de la longueur des bras de ces derniers.

Des effets similaires à l'acclimatation à de fortes intensités lumineuses ont été montrés à faibles températures, avec une diminution du contenu en chl *a* par cellule (Maxwell et *al.* 1994) et la diminution de l'abondance relative des protéines codant pour le PSII (D1, D2, CP43, CP47) avec notamment une diminution de toutes les protéines constituant le PBS (ApcAB, CpeAB, MpeAB et les linkers), le PSI (PsaA, PsaB ; Mackey et *al.* 2013, Zorz et *al.* 2015).

iv. Protection et réparation : les protéines de choc thermique

Lors de stress abiotiques tels que les stress thermiques, le maintien des protéines sous leurs conformations fonctionnelles et la prévention de l'agrégation de polypeptides dénaturés sont particulièrement importants pour la survie des cellules (Wang et *al.* 2004). Ces fonctions sont notamment assurées par des molécules chaperonnes, des protéines clés qui veillent à maintenir l'homéostasie de la cellule, aussi bien sous des conditions optimales que stressantes. Elles interviennent notamment dans le repliement, l'assemblage, la translocation et la dégradation des protéines. Un grand nombre de ces chaperonnes sont des protéines de choc thermique, certaines induites lors de stress chauds (*Heat Shock Proteins*, HSP ; Lindquist 1986, Lindquist & Craig 1988) et d'autres lors de stress froids (*Cold Stress Proteins*, CSP ; Van Bogelen & Neidhardt 1990, La Teana et *al.*

1991). Cependant, ces protéines peuvent également être induites au cours de stress abiotiques n'impliquant pas la température (UV, intensités lumineuses fortes, etc). Chez les cyanobactéries, il existe une grande variété de gènes de stress codants pour des protéines chaperonnes (ex : HtpG, ClpB, DnaK, DnaJ, GroEL ; Eriksson & Clarke 1996).

IV.

MICRODIVERSIFICATION ADAPTATIVE CHEZ LES CYANOBACTÉRIES MARINES

1. Diversité génétique et génomique des picocyanobactéries marines

Les cyanobactéries constituent un groupe évolutif au sein des Eubacteria (Castenholz & Waterbury 1989, Wilmotte 1994). Le terme cyanobactérie (cyan fait référence à la couleur des premiers organismes observés, qui leur a valu autrefois l'appellation d'algues bleues-vertes) a officiellement été adopté en 1974 par Buchanan & Gibbons (1974) et rassemble les procaryotes pratiquant la photosynthèse oxygénique.

Les cyanobactéries sont historiquement divisées en plusieurs sections taxonomiques, basées sur des différences morphologiques (Rippka et *al.* 1979, Castenholz et *al.* 2001). Les cyanobactéries affiliées au cluster I (Chroococales et Prochlorales) sont des formes unicellulaires ou coloniales, qui se divisent essentiellement par fission binaire. Les représentantes de la section II (Pleurocapsales) sont de formes coloniales et se divisent par fissions multiples. La section III (Oscillatoriales) rassemble les formes filamenteuses, non hétérocystées, alors que la section IV (Nostocales) regroupe les organismes capables de différenciation cellulaire (hétérocystes et akinètes). Enfin, la section V (Stigonematales) regroupe les organismes filamenteux, à différenciation cellulaire, présentant des ramifications (revu par Tomitani et *al.* 2006).

Les reconstructions phylogénétiques réalisées à partie du gène 16S codant pour la petite sous-unité de l'ARN ribosomal ont cependant dévoilé une complexité plus importante, démontrant que plusieurs de ces groupes ne sont pas soutenus. Ainsi, le genre défini « *Synechococcus* » (ordre des Chroococales) apparait clairement polyphylétique, rassemblant des souches marines, halotolérantes et dulçaquicoles (Fig. 38 ; Honda et *al.* 1999, Robertson et *al.* 2001). Ce genre étant phylogénétiquement très diversifié, une nouvelle classification en unités taxonomiques distinctes devrait être envisagée. Les phylogénies montrent que les cyanobactéries marines ne forment pas non plus un groupe monophylétique,

amenant certains auteurs à penser que l'ancêtre commun des cyanobactéries était probablement dulçaquicole, duquel les cyanobactéries marines auraient émergé ensuite à plusieurs reprises (Battistuzzi et *al.* 2004, Sanchez-Baracaldo et *al.* 2005).

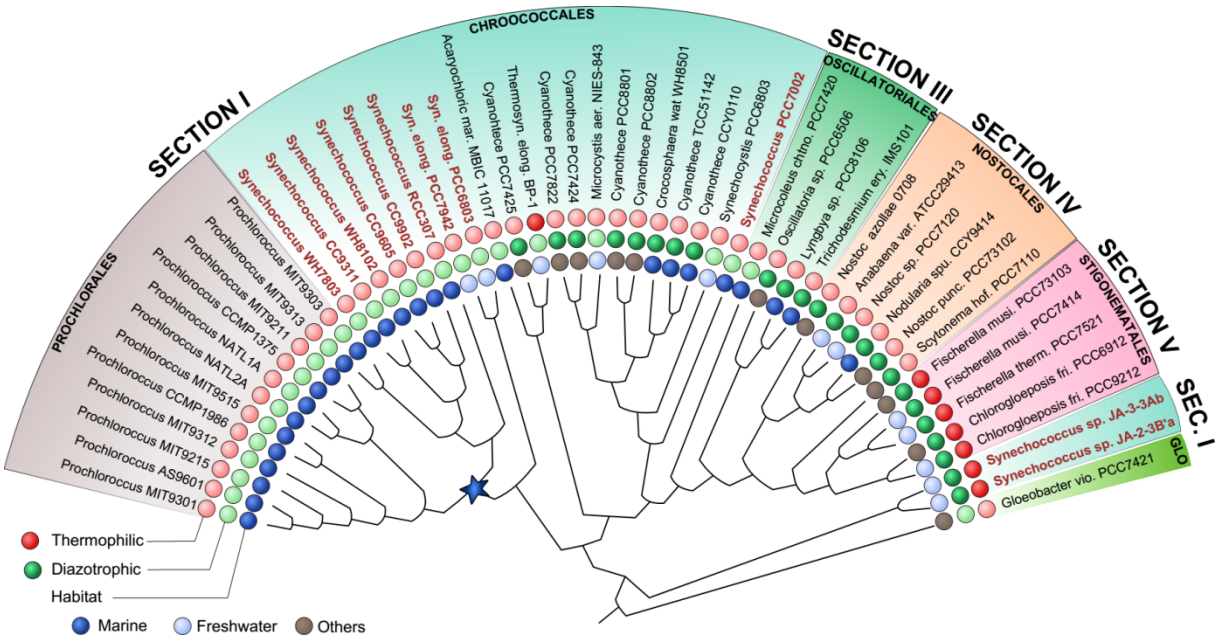


Figure 38 | **Arbre phylogénétique des différentes représentantes de la radiation des cyanobactéries.** L'analyse phylogénétique en *Neighbor-Joining* est basée sur l'analyse des séquences concaténées de 324 protéines communes aux 51 cyanobactéries représentées. L'arbre a été enraciné avec *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. Les branches noires indiquent l'évolution verticale. Des informations sur les différentes souches sont également indiquées : diazotrophie (cercles vert), thermophilie (cercle rouge), et habitat (cercle bleu marine, ciel ou marron. L'embranchement du groupe monophylétique formé par les *Synechococcus* marins et *Prochlorococcus* est représenté par une étoile. Les souches représentantes du genre *Synechococcus* sont représentées en rouge foncé. La polyphylie du groupe apparait évidente (modifié de Dagan et *al.* 2013).

Les différentes analyses phylogénétiques basées sur le gène de l'ARN ribosomal 16S et sur des séquences concaténées de protéines conservées chez les cyanobactéries ont permis de montrer que les picocyanobactéries marines forment, elles, une radiation bien différenciée des autres cyanobactéries (Shih et *al.* 2013, Dagan et *al.* 2013, Fuller et *al.* 2003). Les picocyanobactéries marines sont considérées comme un groupe phylogénétique relativement récent, qui aurait émergé de la radiation des cyanobactéries, notamment en perdant progressivement un certain nombre de gènes (Dufresne et *al.* 2005). *Prochlorococcus* forme une radiation monophylétique, au sein des *Synechococcus* marins, suggérant que ces organismes partagent un ancêtre commun. La différenciation de *Prochlorococcus* à partir des *Synechococcus* marins, estimée à 150 millions d'années (Fig. 39, Dufresne et *al.* 2005), s'est accompagnée d'une réduction drastique de la taille de son génome. En effet, alors que chez *Synechococcus* la taille du génome varie entre 2.1 Mbp (*Synechococcus* sp. M16.1) et 3.3 Mbp (*Synechococcus* sp. BIOS-E4-1 ; Farrant 2015), chez *Prochlorococcus* celui-ci varie de 1.6 à 2.7 Mbp (Dusfresne et *al.* 2008). Ainsi, comparés à la taille

moyenne du génome bactérien (3.7 ± 1.9 Mbp), les picocyanobactéries marines possèdent des génomes particulièrement réduits (Fig. 39, Dufresne et *al.* 2008, Scanlan et *al.* 2009).

<u>Figure 39</u> | Arbre phylogénétique des picocyanobactéries marines basé sur le gène 16S de l'ARN ribosomal. L'arbre, en neighbor joining, représente les relations phylogénétiques entre les picocyanobactéries marines. Uniquement les valeurs de bootstraps supérieures à 70% sont représentées, les ronds blancs représentent les valeurs entre 70 et 80%, et les ronds noirs celles supérieures à 90% (modifié de Scanlan et *al.* 2009).

L'explosion des sciences génomiques au début des années 2000 a conduit, dans les années qui suivirent, au séquencage d'un grand nombre de génomes de picoccyanobactéries qui, de par leurs petites tailles, se prétent bien à cette technologie (Fig. 40).

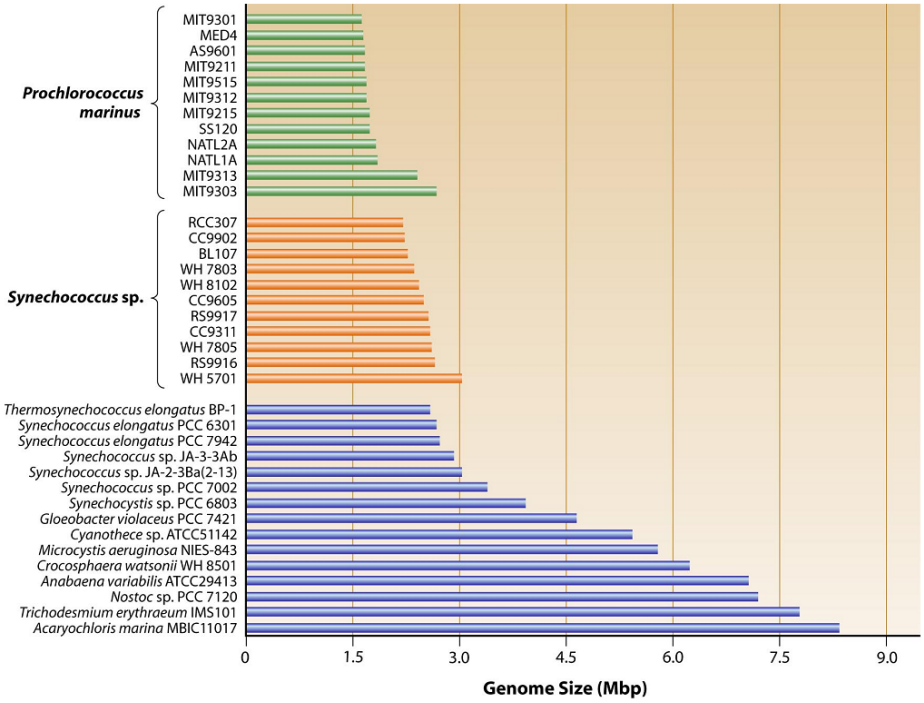


Figure 40 | **Tailles des génomes de souches de *Synechococcus* et *Prochlorococcus*.** La taille des génomes des picocyanobactéries marines est comparée à celle de génomes de cyanobactéries d'eau douce (Scanlan et *al.* 2009).

Il existe aujourd'hui 54 séquences génomiques complètes de *Synechococcus* marins et 43 de *Prochlorococcus*. Les études de génomique comparative ont permis de définir des concepts permettant l'appréhension des grandes tendances évolutives qui ont façonné les génomes des organismes actuels. Ainsi, le *pan-genome* représente l'ensemble des gènes présents dans une radiation donnée d'organismes (Tettelin et *al.* 2008). Il comprend le génome cœur, ou *core*, qui correspond aux gènes communs à tous les membres d'un groupe d'organismes (Fig. 41). Le génome core était, théoriquement, présent dans l'ancêtre commun du groupe d'organismes étudié. Le pan-génome rassemble également les gènes accessoires qui, contrairement au génome cœur, ne sont partagés que par un certain nombre d'individus. Deux scénarios peuvent expliquer cela : la perte de ces gènes au sein d'une lignée ou l'acquisition de gènes, par exemple par transfert horizontal. Chez les procaryotes, la génomique comparative a notamment permis de mettre en évidence l'ampleur de ces échanges horizontaux, en particulier entre organismes appartenant à des taxons différents. Le transfert horizontal représente une source de nouveautés presque inépuisable pour le génome receveur. Parmi les gènes accessoires, il existe des gènes uniques, *i.e* qui n'ont pas d'orthologues retrouvés dans les autres génomes disponibles. Sauf si le génome a divergé très tôt dans le groupe

considéré, l'hypothèse la plus parcimonieuse appuie un scénario de gain de gène, l'inverse impliquerait que le gène aurait été perdu dans toutes les autres lignées.

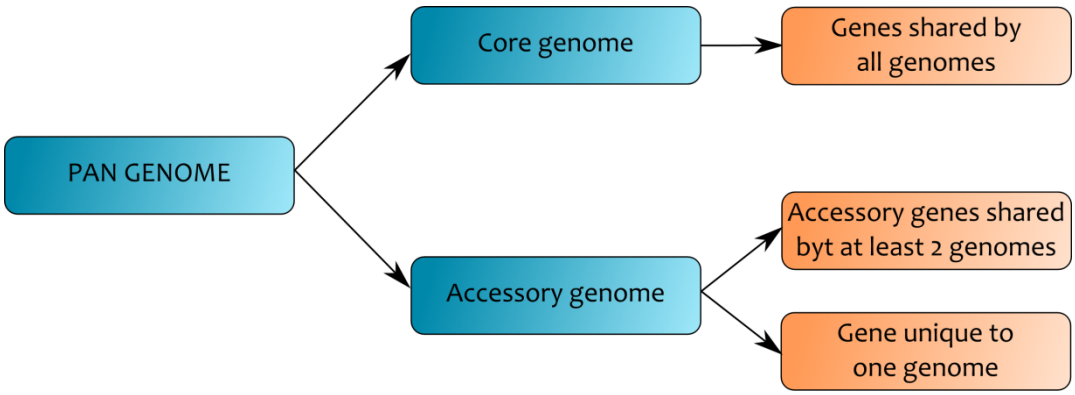


Figure 41 | **Représentation des concepts de la génomique comparative du *pan genome* du, génome coeur et du génome accessoire**. Le *pan genome*, rassemble les gènes cœur et les gènes accessoires, eux mêmes comprenant les gènes retrouvés au sein de plusieurs génomes, et les gènes uniques.

Alors que le génome cœur contient les gènes absolument essentiels au métabolisme de base des organismes, c'est dans le génome accessoire que l'on trouve les gènes impliqués dans l'adaptation à une niche écologique donnée. Chez les cyanobactéries, une partie des gènes accessoires (ou uniques) sont localisés dans des régions génomiques spécialisées, typiques des organismes procaryotes, appelées îlots génomiques. Ces îlots peuvent notamment être détectés à travers l'analyse de biais dans la composition en nucléotides (GC%). En effet, les génomes cyanobactériens ont une composition assez homogène, spécifique de chaque individu. Par conséquent, la présence de gènes et de régions génomiques ayant des caractéristiques différentes à celle de l'ensemble du génome est souvent interprétée comme le résultat d'un transfert horizontal de gènes (Dufresne et *al.* 2008). Les îlots génomiques, qui sont effet des *hotspots* de recombinaison de l'ADN, sont riches en gènes non indispensables, dont beaucoup ont une fonction encore inconnue. Le caractère hypervariable de ces îlots entre souches contribue significativement à la taille et à la diversité du réservoir de gènes disponibles pour une radiation d'organismes peut conférer des avantages sélectifs permettant la colonisation de nouveaux environnements. Ces régions sont ainsi supposées jouer un rôle important dans l'adaptation à une niche environnementale donnée (Dusfresne et *al.* 2008, Tettelin et *al.* 2008). Ainsi, par exemple chez *Prochlorococcus* des gènes impliqués dans l'assimilation du phosphate ont été identifié au sein des îlots génomique de souches distribués dans des environnements carencés cet élément est limitant (Martiny et *al.* 2006, 2009). A titre d'exemple, on estime que *Prochlorococcus* et *Synechococcus* ont acquis entre 10 et 30% de leurs gènes chez d'autres espèces (Dufresne et *al.* 2008).

2. Diversité de la radiation *de Synechococcus et Prochlorococcus*

Les *Synechococcus* marins sont rassemblés dans le *cluster* 5, divisés en trois groupes phylogénétiques distincts, les clusters, 5.1, 5.2 et 5.3 (Fig. 42 ; Herdman et *al.* 2001, Dufresne et *al.* 2008). Le *cluster* 5.2 rassemble principalement des souches halotolérantes, confinées dans les eaux côtières, en particulier dans les estuaires. Il existe assez peu de souches représentantes de ce *cluster* en culture. Les souches du *cluster* 5.3, réparties dans au moins 6 clades (Huang et *al.* 2011), sont encore très mal connues.

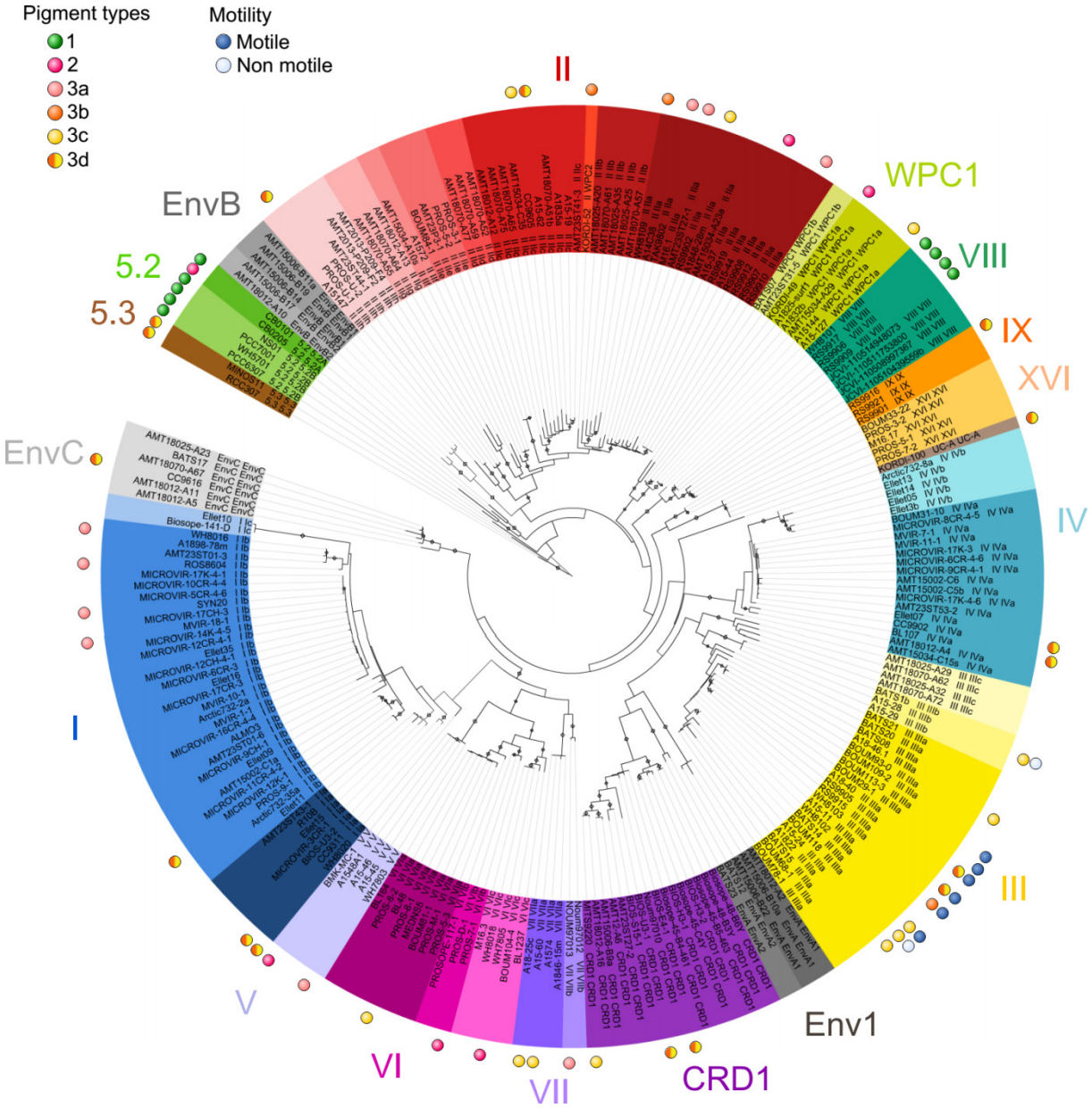


Figure 42 | **Arbre phylogénétique de la radiation des *Synechococcus* marins.** L'analyse phylogénétique, en maximum de vraisemblance de 230 séquences du gène *petB* de *Synechococcus* souligne la très grande diversité phylogénétique de ce groupe. Les losanges représentant les valeurs de *bootstrap* supérieures à 70%, les clades

et sous-clades sont représentés par différentes couleurs et nuances. Les cercles en face de certaines souches représentent le type pigmentaire et la capacité à être mobile (voir le paragraphe « Adaptations à la niche écologique » ; Garczarek & Farrant, non publié).

La majorité des *Synechococcus* strictement marins, *i.e* qui ont besoin d'une salinité élevée pour se diviser, sont rassemblés dans le sous-*cluster* 5.1 (Fig. 42). Les organismes représentants de ce cluster sont les plus abondants dans l'environnement et des centaines de souches ont été isolées en culture. La radiation des *Synechococcus* strictement marin est divisée en deux sous-cluster, le 5.1A qui regroupe principallement les clades II, III, IV, en cet WPC-1, et le sous-cluster 5.1B represenété par les clades I, V, VI, VII et CRD-1.

Les *Synechococcus* marins apparaissent beaucoup plus diversifiés que les *Prochlorococcus*. Les phylogénies du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S ont mis en évidence une dizaine de clades au sein de cluster 5.1 (Fuller et *al.* 2003, Fig. 39). Plus récemment, d'autres clades ont été découverts et un grand nombre de sous-clades décrits grâce à des marqueurs génétiques plus résolutifs tels que l'ITS (Ahlgren & Rocap 2006, Huang et *al.* 2012), *rpoC1* (Palenik 1994, Mühling et *al.* 2005), *narB* (Jenkins et *al.* 2006, Paerl et *al.* 2011), et surtout le gène *petB* (codant pour le cytochrome b_6f ; Fig. 42 ; Mazard et *al.* 2012). En se basant sur le gène *petB*, une quinzaine de clades et plus d'une trentaine de sous-clades ont été définis (Fig. 42 ; Mazard et *al.* 2012). La radiation des *Synechococcus* marins apparaît comme un buisson évolutif dont il est difficile de discerner des branches basales. De plus, certains clades sont plus ou moins bien définis selon les marqueurs utilisés et il est quelque fois délicat de comparer les différentes phylogénies obtenues avec des marqueurs distincts. Toutefois, les phylogénies sur les protéines ribosomales concaténées permettent de différencier, au sein du cluster strictement marin 5.1 deux sous-clusters. Le 5.1A, qui rassemble principalement les clades II, III, IV, et le sous-cluster 5.1B représenté par les clades I, V, VI, VII, VIII et CRD-1. La complexité de la radiation des *Synechococcus* marins, qui reflète une grande diversité génétique, est probablement liée à la distribution cosmopolite de ces organismes (voir ci-après). Elle suggère que ces organismes ont à leur disposition un réservoir important de gènes qui leur permet de coloniser des niches écologiques variées. Ainsi, chez *Synechococcus*, le génome accessoire représenterait de 50 à 60% du génome (Farrant *com. pers.* ; Dufresne 2008). Les premières estimations du génome accessoire des *Synechococus* marins (11 génomes ; Dufresne et *al.* 2008) ont estimé la taille de celui-ci à 750 gènes, mais la non-saturation de la courbe de raréfaction indique qu'il reste encore beaucoup de gènes accessoires à découvrir. Des estimations préliminaires en cours, réalisées sur 54 génomes, portent le nombre de gènes accessoires à 1300 (Farrant *com. pers.*).

Les analyses phylogénétiques ont montré que la radiation de *Prochlorococcus* se ramifie en plusieurs clades et sous-clades (Fig. 43 ; Ferris & Palenik 1998 ; Moore et *al.* 1998, Scanlan & West 2002, Huang et *al.* 2011). La base de la radiation est constituée par un groupe polyphylétique diffus de

plus de six clades regroupant des souches isolées principalement dans les eaux de profondeur. Certains de ces sous-groupes, constitués uniquement de séquences environnementales, sont très mal connus car il n'y existe pas de souches isolées en laboratoire.

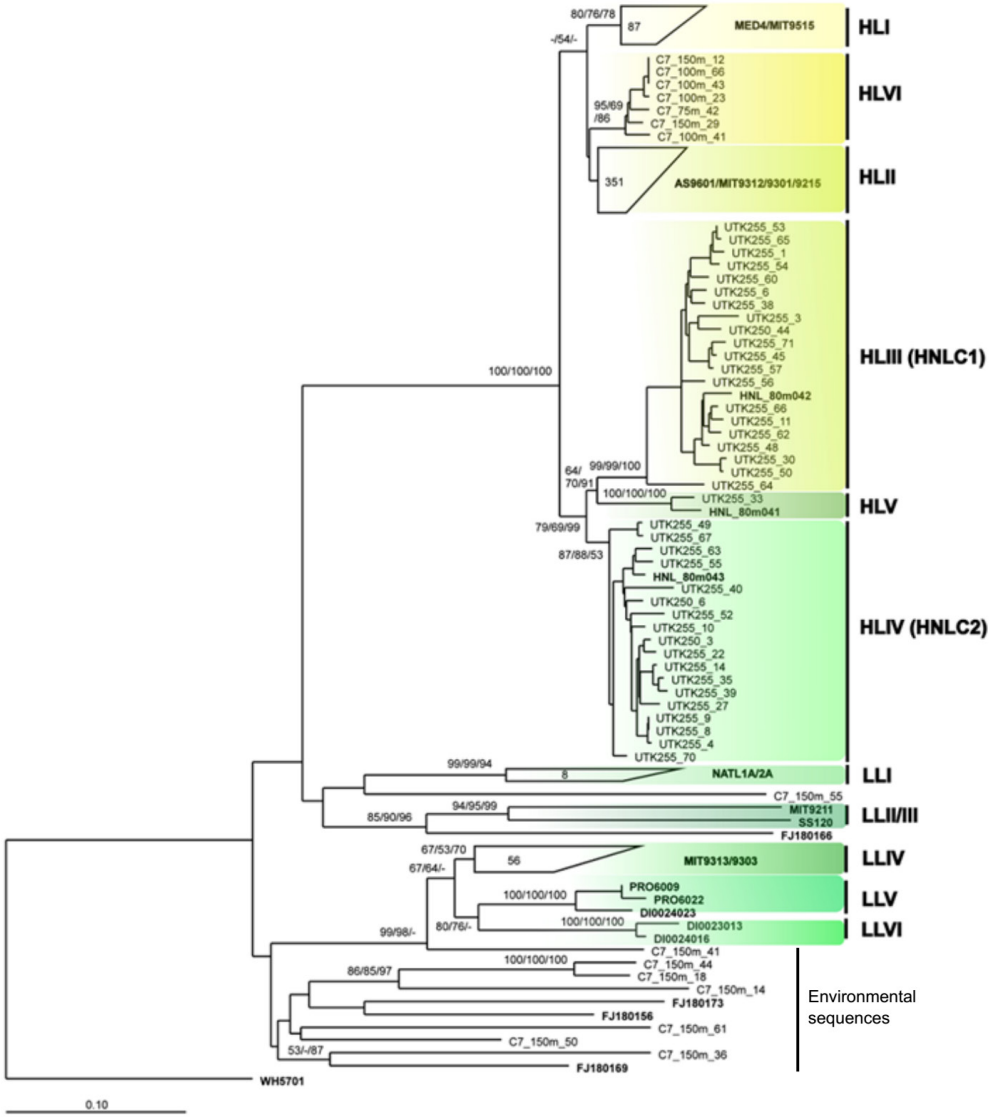


Figure 43 | **Arbre phylogénétique de la radiation de *Prochlorococcus***. Arbre phylogénétique en Neighbor-Joining basé sur l'espace intergénique 16S-23S montrant les relations entre les différents clades de *Prochlorococcus*. HL, High Light ou écotype de surface ; LL, Low Light ou écotype de profondeur ; HNLC, High Nutrient Low Chlorophyll (d'après Huang et *al.* 2011 et modifié par Humily 2013).

Parmi ces *Prochlorococcus* dits « Low Light » (LL ; car ils habitent en profondeur), le clade LLIV est remarquable de par le fait qu'il regroupe des souches de *Prochlorococcus* considérées primitives, proches du *Prochlorococcus* ancestral. Ces souches ont un génome de taille et de GC% significativement plus importants que les autres souches, tout à fait similaires aux caractéristiques des génomes de *Synechococcus* marins. Les analyses génomiques ont montré que ces souches primitives

partagent en effet un certain nombre de gènes avec les *Synechococcus* marins, gènes perdus durant l'évolution chez les autres souches de *Prochlorococcus* (Rocap et *al.* 2003).

Les *Prochlorococcus* les plus récents forment un clade monophylétique bien défini (Fig. 39, 43). Ce clade dit « *High Light* » (HL), qui rassemble des souches isolées dans les eaux de surface, s'est apparemment différencié il y a 80 millions d'années à partir d'une population de cellules LL ayant un génome déjà assez réduit (Dufresne et *al.* 2005).

La lignée HL est divisée en au moins six sous-clades dont les mieux connus sont les clades HLI et HLII. Les *Prochlorococcus* de ces clades ont considérablement réduit leur génome durant l'évolution, avec une perte de plus d'un tiers des gènes, en comparaison avec les souches primitives du clade LLIV (Dufresne et *al.* 2005). D'après une étude basée sur 12 génomes, le génome cœur de *Prochlorococcus* serait d'environ 1000 gènes, ce qui correspond, en fonction des souches, à 40 à 70% du génome (Kettler et *al.* 2007, Kashtan et *al.* 2014, Biller et *al.* 2014). La taille extrêmement petite de ce génome suggère qu'au cours de l'évolution, *Prochlorococcus* n'a maintenu que les gènes essentiels au fonctionnement cellulaire dans sa niche, faisant de lui un organisme hautement spécialisé et proche de l'« organisme photosynthétique minimal » (Partensky & Garczarek 2010).

3. Distribution des picocyanobactéries marines et phyloécolologie

a. Distribution de Prochlorococcus

Prochlorococcus est confiné dans les eaux de la bande latitudinale 48°N - 40°S (Fig. 44 ; Partensky et *al.* 1999, Johnson et *al.* 2006, Zwirglmaier 2007). Dans ces régions de l'océan mondial, *Prochlorococcus* présente des concentrations moyennes comprises en 10^4 et 10^5 cellules mL^{-1} (Partensky et *al.* 1999) et peut atteindre dans certaines conditions des concentrations de 7.10^5 cellules mL^{-1} (notamment dans les eaux chaudes de la mer d'Arabie ; Campbell et *al.* 1998). Alors que *Prochlorococcus* ne semble pas être limité par les températures chaudes, sa distribution semble néanmoins contrainte par les températures basses qui représentent une véritable barrière physique pour cet organisme. Au delà des eaux tempérées chaudes, la densité cellulaire des populations de *Prochlorococcus* chute de façon drastique.

Prochlorococcus est considéré comme un organisme spécialisé dans les zones oligotrophes des océans car il est nettement plus abondant dans ces environnements, de façon absolue comme relative par rapport aux autres populations phytoplanctoniques, mais il convient de préciser qu'il n'est pas

restreint à ces environnements (Partensky et *al.* 1999). Il est détecté tout le long du gradient côte-large, bien que sa densité cellulaire soit beaucoup plus faible dans les environnements riches en sels nutritifs (Partensky et *al.* 1999), où il est visiblement peu compétitif. Les abondances de *Prochlorococcus* sont souvent supérieures à celles de *Synechococcus* dans les zones où ils cohabitent, à l'exception des régions plus riches en sels nutritifs telles que les upwellings, les estuaires, *etc*.

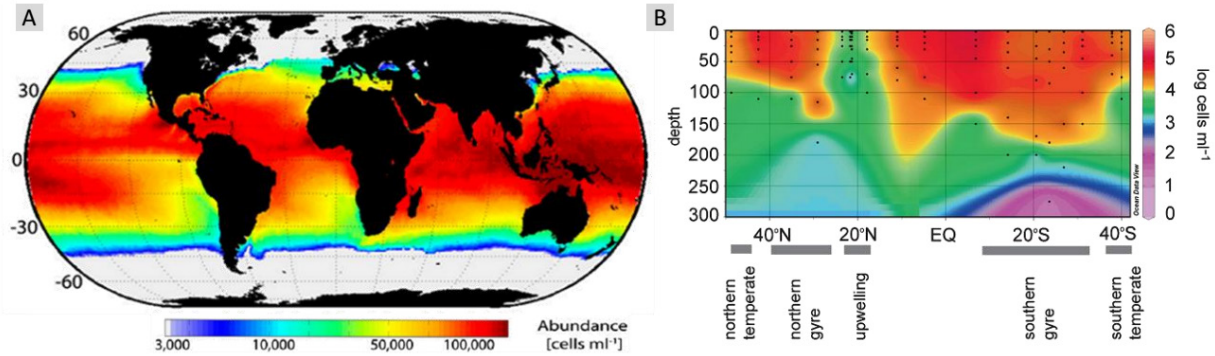


Figure 44 | **Abondance moyenne de *Prochlorococcus* le long du gradient latitudinal et de profondeur dans les océans**. La distribution de *Prochlorococcus* est essentiellement confinée aux basses latitudes, entre 48°N – 40°S (**A**). Abondance de *Prochlorococcus* le long d'un transect trans-Atlantique en cellules mL^{-1} (Flombaum 2013). Les plus fortes abondances cellulaires sont retrouvées au niveau des gyres nord et sud, jusqu'à 150 m de profondeur (**B** ; Zwirglmaier et *al.* 2007).

Dans la plupart des environnements qu'il a colonisés, *Prochlorococcus* est détecté sur toute la profondeur de la couche photique, jusqu'à des profondeurs records supérieures à 200m auxquelles la lumière est très faible (Partensky et *al.* 1999). Le développement d'outils moléculaires pour la détection de lignées spécifiques dans l'environnement naturel a permis de dévoiler les grands patrons de distribution des clades et sous-clades de *Prochlorococcus*. Il existe ainsi différentes populations de *Prochlorococcus* se succédant le long de la colonne d'eau avec, en surface, des cellules appartenant à la lignée récente HL et en profondeur, des cellules appartenant aux groupes phylogénétiques LL (Fig. 45). Les populations de cellules des sous-clades LLII et LLIV présentent des distributions similaires, à savoir de fortes concentrations à la base de la couche photique, de l'équateur jusqu'à 35°N/S, mais ces cellules disparaissent à plus haute latitude (Fig. 45 ; Johnson et *al.* 2006, Malmstrom et *al.* 2010).

Les populations de cellules du sous-clade LLI présentent un patron de distribution verticale qui semble dépendant de la latitude. Aux basses latitudes, ces cellules sont détectées entre les cellules des clades LLI-IV et les cellules des lignées HL, alors qu'à hautes latitudes, on les détecte à plus faible concentration sur toute la colonne d'eau. Les populations HLII, qui dominent les eaux de surfaces tropicales et subtropicales (30°N/S), sont les cellules de *Prochlorococcus* les plus abondantes dans l'océan mondial. Au delà de ces latitudes, les cellules du groupe HLI se substituent progressivement à celles du HLII et deviennent alors dominantes dans ces eaux plus fraiches.

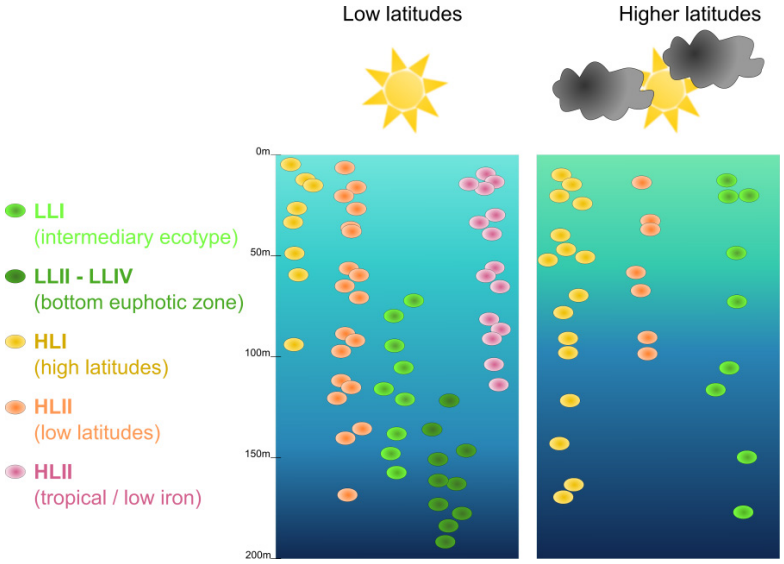


Figure 45 | **Distribution des groupes phylogénétiques de *Prochlorococcus* le long du gradient de profondeur de lumière, à basses et plus hautes latitudes**. Les différentes couleurs de cellules représentent les différentes lignées de *Prochlorococcus* comme indiqué en figure 39 (modifié de Garczarek, 2011).

Les clades HLIII et HLIV ont été décrits plus récemment en utilisant des approches de métagénomique environnementale. Ces clades semblent être confinés dans les régions dites HLNC (*High Nutrient Low Chlorophyll*), relativement riches en sels nutritifs à l'exception du fer qui y est difficilement détectable (Rusch et *al.* 2010, West et *al.* 2011).

b. Distribution de Synechococcus

Contrairement à *Prochlorococcus*, les *Synechococcus* marins présentent une distribution globale très étendue, quasiment ubiquiste, puisqu'on les détecte dans presque tous les environnements marins, des régimes estuariens et côtiers à l'océan ouvert et de l'équateur jusqu'aux cercles polaires (Fig. 46 ; Partensky et *al.* 1999).

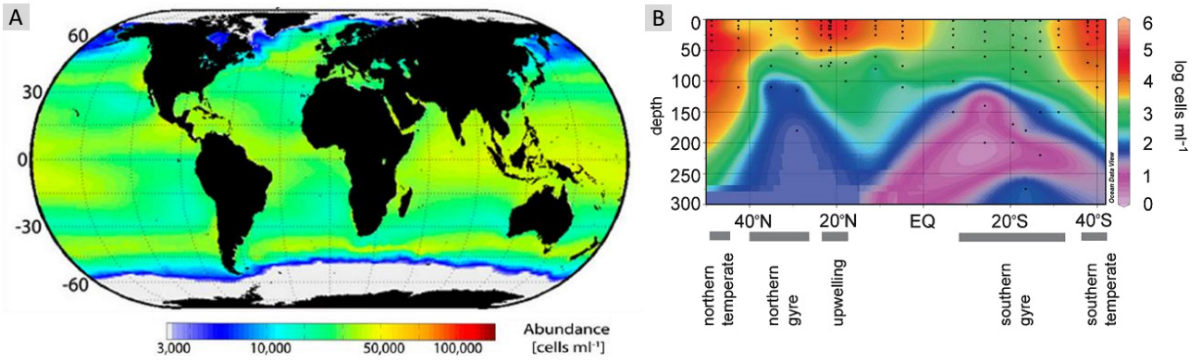


Figure 46 | **Abondance moyenne de *Synechoocccus* marins le long du gradient latitudinal et de profondeur dans les océans**. Les *Synechococcus* marins sont retrouvés de l'équateur au cercle polaire (**A** ; Flombaum et *al.* 2013). Abondance de *Synechococcus* le long d'un transect trans-Atlantique en cellules mL^{-1}. Les plus fortes abondances cellulaires sont retrouvées au niveau des zones tempérées et de l'uplwelling (**B** ; Zwirglmaier et *al.* 2007).

Leur présence a été reportée au sein de masses d'eau allant de 2°C à 30°C (Waterbury et *al.* 1986, Shapiro and Haugen 1988, Fuller et *al.* 2006) mais il semble cependant que des températures moyennes inférieures à 14°C limitent nettement leur abondance (Li 1998). Ainsi, différentes campagnes océanographiques ont reporté de faibles concentrations cellulaires dans l'Atlantique Sud (44°S et 62°S Wilmotte et *al.* 2002), ainsi qu'en Atlantique Nord entre l'Islande et le Groenland (Murphy & Haugen 1985 ; Not et *al.* 2005 ; Cottrell & Kirchman 2009).

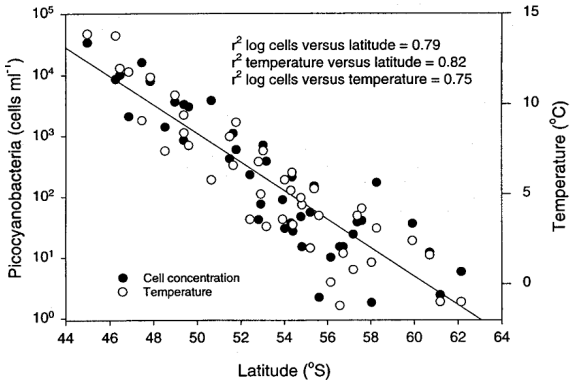


Figure 47 | **Relation entre l'abondance de picocyanobactéries marines du genre *Synechococcus* (cercles pleins) et la latitude dans l'océan austral.** Les données sont issues de quatre transects réalisés entre février 1986 et septembre 1989. Les mesures de la température (cercles vides) sont aussi représentées, ainsi que les coefficients de corrélation r^2 entre ces deux variables (Vincent 2000).

De façon surprenante, de fortes densités cellulaires ont été observées en mer Baltique, qui présente pourtant des températures en général en deçà de 15°C (10^5 à 10^6 cellules mL^{-1}; Kuosa 1991, Andersson et *al.* 1994). Dans les eaux polaires, la présence des *Synechococcus* marins est anecdotique, toujours à des concentrations très faibles voire nulles (Fig. 47). *Synechococcus* est quasiment toujours présent dans les environnements non carencés en nutriments (les gyres de l'Atlantique et du Pacifique) et sa distribution s'étend même aux environnements caractérisés par de faibles salinités (Jochem 1988, Vaulot & Xiuren 1988). La distribution verticale de *Synechococcus* est moins étendue que celle de *Prochlorococcus*, avec des *maxima* dans les eaux de surface et des abondances qui chutent en dessous de la thermocline (Partensky et *al.* 1999).

Les données récoltées au cours de campagnes océanographiques et le développement d'outils moléculaires ont permis de révéler quelques unes des tendances de distribution des clades majoritaires de *Synechococcus* marins dans l'environnement, laissant entrevoir des relations entre la phylogéographie et les grands gradients environnementaux (Zwirglmaier et *al.* 2008, Tai & Palenik 2009). L'ensemble de ces travaux suggère que les communautés de *Synechococcus* dans les océans sont dominées par 4 clades majoritaires, les clades I, II, III et IV, dont les préférences écologiques commencent à être bien définies (Table 2). Les clades I et IV sont co-dominants dans les environnements tempérés en particulier aux hautes latitudes, au delà de 30°N/S, où les eaux présentent des températures basses (Table 2, Fig. 48). Les cellules de ces clades sont détectées

principalement dans des écosystèmes côtiers plutôt productifs, riches en sels nutritifs (Brown & Fuhrman 2005, Zwirlgmaier 2007, 2008, Jing et *al.* 2009, Tai & Palenik 2009, Cai et *al.* 2010, Paerl et *al.* 2011, Perez-Cenci et *al.* 2014, Sohm et *al.* 2015). Généralement, les représentants du clade IV sont deux fois plus abondants que ceux du clade I, mais cette tendance générale peut varier au cours des saisons (Tai & Palenik 2009, Mella-Flores et *al.* 2011, Sohm et *al.* 2015).

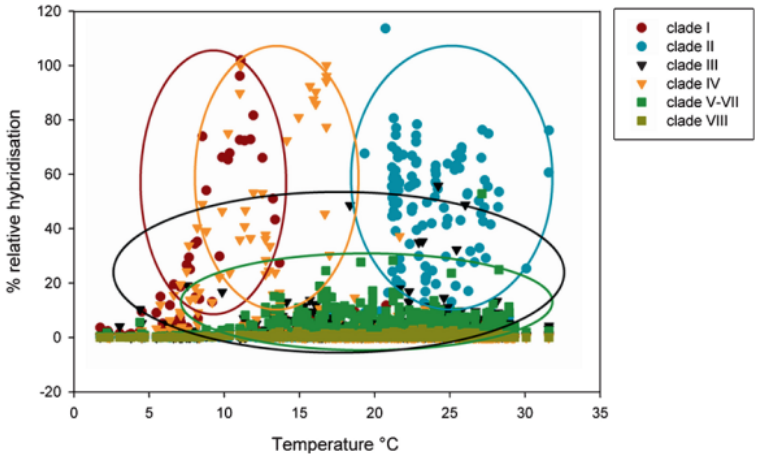


Figure 48 | **Nuages de points montrant l'abondance relative des clades de *Synechococcus* en fonction de la température de l'eau.** La dichotomie entre les clades I-IV (rouge et orange) et II-III (bleu clair et bleu foncé ; Zwirglmaier et *al.* 2008).

Contrairement à ces deux clades confinés dans les eaux tempérées froides (7°C à 20°C), le clade II est abondant dans les eaux chaudes tropicales et intertropicales, où la température oscille entre 22 et 32°C (Zwirglmaier et *al.* 2008, Sohm et *al.* 2015). La présence de ce clade a été reporté aussi bien dans les environnements côtiers (Zwirglmaier et *al.* 2007, 2008) qu'au large (Toledo & Palenik 2003, Ahlgren & Rocap 2006, Sohm et *al.* 2015). La distribution de ces trois clades est clairement influencée par la température (Fig. 48). A partir des données actuellement disponibles, le clade III ne montre pas de préférences latitudinales/thermales claires, mais semble dominant principalement dans les zones oligotrophes, notamment dans l'océan ouvert (Toledo & Palenik 2003, Zwirglmaier et *al.* 2007) et en Mer Méditerranée (Mella-Flores 2011, Farrant 2015).

Récemment, un clade a été décrit au *Costa Rica Dome* (clade CRD1 ; Saito et *al.* 2005). Ces cellules sont particulièrement abondantes dans cette zone, mais ont également été détectées à des concentrations plus faibles dans les eaux tropicales et subtropicales des océans Atlantique et Pacifique (Saito et *al.* 2005, Huang et *al.* 2011, Ahlgren et *al.* 2014). Grâce à une vaste base de données d'abondance des clades de *Synechococcus*, établie par PCR quantitative *in situ* à 92 stations des océans Atlantique et Pacifique, Sohm et collaborateurs (2015) ont récemment proposé que les clades CRD1 et CRD2 seraient les plus compétitifs dans les environnements pauvres en fer. Les préférences écologiques des autres clades de *Synechococcus* marins sont moins bien caractérisées. Les clades

V/VI/VII apparaissent comme ayant une distribution relativement étendue mais présentent de faibles abondances à l'échelle globale.

Tableau 2 | **Biogéographie des principaux clades de *Synechococcus* marins retrouvés dans l'environnement.** Pour chacun des clades, les préférences apparentes de distribution sont mentionnées.

	Clades	Distribution	Références
5.1A	II	Eaux chaudes, tropicales et subtropicales Environnements côtiers, océan ouvert	Ahlgren & Rocap (2006), Zwirglmaier et *al.* (2007, 2008), Chung et *al.* (2011), Huang et *al.* (2011), Mazard et *al.* (2012) , Fuller et *al.* (2003), Sohm et *al.* (2015)
	III	Préférentiellement dans les eaux chaudes Environnements oligotrophes, océan ouvert Très abondant en méditerranée	Zwirglmaier et *al.* (2008), Mella-Flores et *al.* (2011), Post et *al.* (2011), Ahlgren & Rocap (2006), Mazard et *al.* (2012), Sohm et *al.* (2015)
	IV	Préférentiellement aux hautes latitudes Environnements côtiers Cohabite souvent avec le clade I	Zwirglmaier et (2007), Tai & Palenik (2009), Paerl et *al.* (2011)
5.1B	I	Dominant aux hautes latitudes Environnements côtiers Cohabite souvent avec le clade IV	Ahlgren & Rocap (2006), Zwirglmaier et *al.* (2007, 2008), Chung et *al.* (2011), Huang et *al.* (2011), Mazard et *al.* (2012), Fuller et *al.* (2003)
	V	Préférences écologiques floues Plutôt océan ouvert	Fuller et *al.* (2003), Choi & Noh (2009), Ahlgren & Rocap (2006)
	VI	Préférences écologiques floues Mer de Chine, mer méditerranée	Fuller et *al.* (2003), Choi & Noh (2009), Choi et *al.* (2011), Alghren et *al.* (2012), Mella-Flores et *al.* (2011), Mazard et *al.* (2012)
	VII	Eaux tropicales et subtropicales	Lindell et *al.* (2005), Alghren et *al.* (2012), Huang et *al.* (2011)
	VIII	Halotolérant,souvent estuarien, certaines souches sont incapables d'utiliser les nitrates	Fuller et *al.* (2003), Choi & Noh (2009), Huang et *al.* (2011)
	IX	Rare. Observé en mer de Chine, mer Rouge et upwellings le long des côtes africaines	Fuller et *al.* (2003), Zwirglmaier et *al.* (2007, 2008), Choi & Noh (2009), Choi et *al.* (2011), Ahlgren et *al.* (2012)
	CRD1	Dominant au dôme du Costa-Rica, retrouvé dans le Pacifique Sud, et l'Atlantique	Saito et *al.* (2005), Huang et *al.* (2011), Mazard et *al.* (2012), Ahlgren et *al.* (2012), Sohm et *al.* (2015)
	CRD2	Environnements côtiers, océan Pacifique	Zwirglmaier et *al.* (2007, 2008), Sohm et *al.* (2015), Tai & Palenik (2009)
	EnvA	Océan Atlantique, préférences floues	Mazard et *al.* (2012)

De nouvelles pistes intéressantes ont cependant été récemment proposées : les clades XV et XVI seraient principalement retrouvés dans les écotones, zones de transition entre deux écosystèmes qui sont souvent caractérisées par une diversité plus importante que dans les deux écosystèmes qui la bordent (Sohm et *al.* 2015). De plus, les mêmes auteurs révèlent également l'importance du clade X (cluster 5.3 ; Dufresne et *al.* 2008, Mazard et *al.* 2012), jusqu'alors sous estimée et qui, dans leur jeu de données environnementales, cohabite fréquemment avec le clade II.

4. Spécialisation physiologique à une niche écologique et concept d'écotype cyanobactérien

.

L'exploration relativement récente des génomes cyanobactériens a notamment permis d'aborder la notion d'espèce chez ces organismes sous différents angles. Chez les procaryotes, le seuil d'espèce est classiquement fixé à 97% d'identité au niveau du 16S, soit 94% d'identité nucléotidique moyenne à l'échelle du génome (Konstantinidis & Tiedje 2005). Cependant, chez les cyanobactéries, Dufresne et collaborateurs ont montré que les deux souches de *Synechococcus* les plus proches présentent 100% d'identité au niveau du 16S, mais n'atteignent pas la valeur seuil d'ANI de 94%, suggérant une diversité génomique énorme chez les cyanobactéries, rendant la définition d'espèce délicate (Fig. 49).

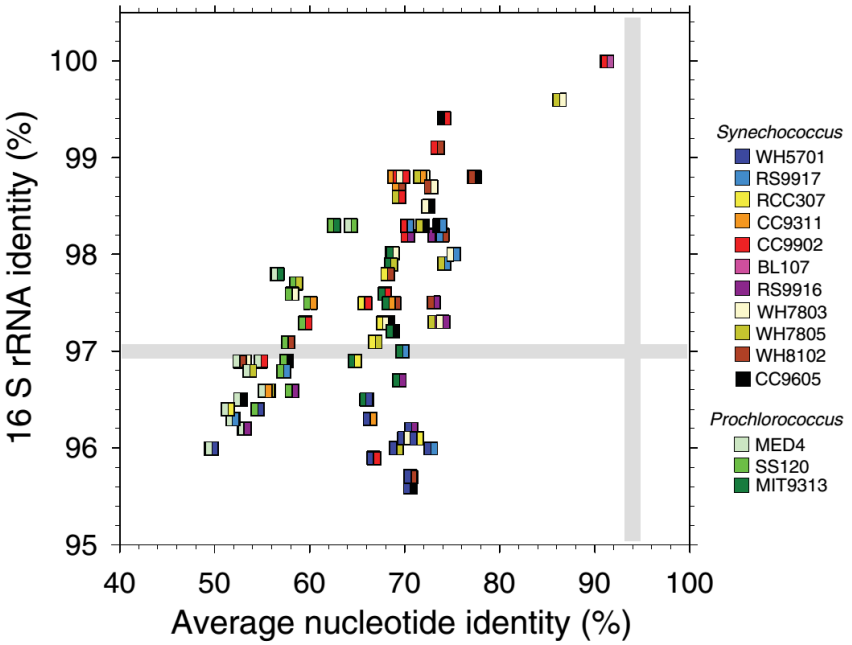


Figure 49 | **Pourcentage d'identité nucléotidique moyenne et identité des séquences de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal entre différents génomes de *Synechococcus***. La comparaison des génomes est faite deux à deux. Les souches *Synechococcus* spp. BL107 and CC9902 sont les plus proches (Dusfresne et *al.* 2008).

La grande diversité génomique et physiologique au sein des clades de picocyanobactéries suggère l'utilisation d'unités distinctes, telles que la notion d'écotype, pour évaluer la diversité taxonomique au sein de ces lignées.

a. Prochlorococcus

i. Spécialisation générale dans les environnements oligotrophes

La réduction considérable de génome de *Prochlorococcus* au cours de l'évolution est associée à une réduction globale de la taille cellulaire, particulièrement prononcée chez les souches HL les plus récentes, ce qui fait de *Prochlorococcus* le plus petit organisme photosynthétique connu sur la planète. Ce minimalisme est souvent interprété comme une stratégie évolutive visant à augmenter considérablement le rapport surface/volume, ce qui décuplerait les capacités d'acquisition des sels nutritifs dans les zones pauvres (Partensky & Garczarek 2010, Biller et *al.* 2014). Des phénomènes évolutifs comparables ont été observés dans le cadre de la mise en place au cours de l'évolution d'associations symbiotiques et parasitiques, mais *Prochlorococcus* est le seul exemple connu d'organisme libre ayant subi une réduction si drastique.

Une autre caractéristique remarquable de *Prochlorococcus* est le remplacement, au cours de l'évolution, de l'antenne photosynthétique typique des cyanobactéries, le PBS, par une antenne transmembranaire de plus petite taille. Ces antennes *Pcb* fixent principalement des composés chlorophylliens : la divinyl-chl *a* (A_{max} 443 - 450 nm) et la divinyl-chl *b* (A_{max} 468 - 480 nm ; Morel et *al.* 1993, Goericke & Repeta 1992, Moore et *al.* 1995) qui absorbent efficacement la lumière bleue, majoritaire dans les eaux oligotrophes pauvres en matière en suspension (Wood et *al.* 1998, Lantoine & Neveux 1997). Il a également été démontré que les antennes photosynthétiques à Pcb ont un coût métabolique beaucoup plus faible en azote et en fer, deux éléments limitants dans les régions oligotrophes, que le PBS (Ting et *al.* 2002, Partensky & Garczarek 2010, Biller et *al.* 2014). Le remplacement du PBS par une antenne plus économique, absorbant efficacement la lumière bleue apparaît donc comme un trait adaptatif majeur de *Prochlorococcus* aux zones oligotrophes des océans.

ii. Les écotypes de surface/profondeur chez *Prochlorococcus*

Les séquences de l'ARNr 16S des souches connues de *Prochlorococcus* ne diffèrent pas de plus de 3% (Dufresne et *al.* 2008), ce qui est la limite traditionnellement admise pour la définition d'une espèce procaryote. Toutefois, les études de la distribution des souches de *Prochlorococcus*, de leur phylogénie et de leur photophysiologie ont mis en évidence de très grandes différences dans les capacités d'acclimatation à la lumière qui sont directement liées aux lignées auxquelles les souches appartiennent. Il existe ainsi une différentiation physiologique forte de ces organismes sur le gradient vertical de lumière surface/profondeur. L'ensemble de ces observations a conduit les phytoplanctonologues à définir des écotypes cyanobactériens, *i.e.* des lignées ayant développé des traits adaptatifs leur conférant un avantage dans une niche écologique donnée (Coleman & Chisholm 2007).

Plusieurs études de physiologie comparée ont tout d'abord mis en évidence des *preferenda* lumineux de croissance différents (Fig. 50), les souches de surface étant capables de croître à des intensités lumineuses que les souches de profondeur ne peuvent supporter et vice-versa (Moore et *al.* 1995, 1998). Les adaptations qui sont associées à la colonisation de niches lumineuses distinctes par chacun des écotypes ont fait l'objet de nombreuses recherches. Les études de physiologie comparative ont souligné les différences de contenu pigmentaire entre ces deux populations de *Prochlorococcus* (Moore et *al.* 1995, 1998). Les souches de profondeur présentent des contenus cellulaires en pigments plus importants et un rapport divinyl chl *b*/divinyl chl *a* supérieur ou égal à 1, alors que ce rapport peut être jusqu'à 10 fois plus faible chez les souches de surface (Partensky et *al.* 1996).

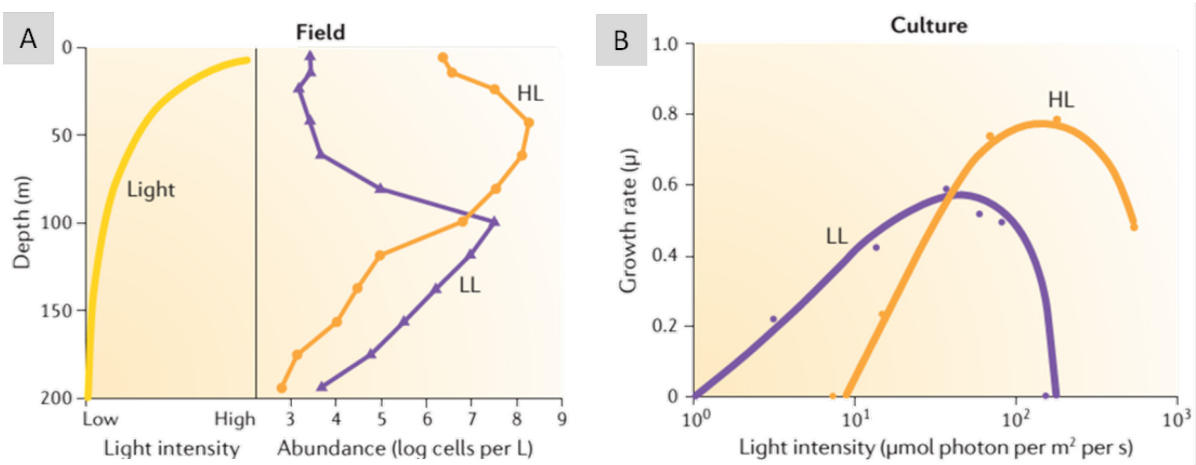


Figure 50 | **Distribution in situ et taux de croissance en fonction de l'intensité lumineuse des écotypes de lumière de *Prochlorococcus***. Distribution typique des écotypes de lumière chez *Prochlorococcus* le long du gradient de profondeur de lumière. L'écotype de surface (HL) est dominant dans les cent premiers mètres de la colonne d'eau, alors que l'écotype de profondeur (LL), est dominant plus en profondeur (**A**). *Preferenda* lumineux de croissance en laboratoire des deux écotypes (**B** ; Biller et *al.* 2014).

Ces différences de pigmentation sont associées à des structures différentes d'antenne photosynthétique. En effet, la souche modèle MED4, représentante du sous-clade HLI, ne possède qu'un seul gène codant pour l'antenne photosynthétique Pcb alors que la souche SS120, isolée à 120 m de profondeur (sous-clade LLII), en possède huit (Garczarek et *al.* 2000, Moore & Chisholm 1999, revue par Coleman & Chisholm 2007). La visualisation des antennes de ces deux écotypes a mis en évidence la présence d'une grande couronne antennaire de Pcb autour du PSI chez l'écotype de profondeur alors que le PSI de la souche de surface est nu (Bibby et *al.* 2001). Cette démultiplication de l'antenne photosynthétique chez les souches LL permet l'optimisation de la capture des photons qui sont rares en bas de la couche photique (Garczarek et *al.* 2007). Cependant, des études génomiques récentes ont montré que ce trait adaptatif est moins clair que ce qui a été décrit dans la

littérature du début des années 2000, puisque certaines souches HL possèdent deux copies de gènes Pcb.

De façon similaire, les mécanismes de photoprotection de *Prochlorococcus* semblent aussi s'être adaptés aux niches lumineuses au cours de l'évolution. Les cellules HL possèdent ainsi généralement un grand nombre de gènes codant les HLIP, probablement issus de multiples duplications, qui protègent la cellule de lumière excessive (He et *al.* 2001, Coleman & Chisholm 2007 ; Fig. 51). Les souches HL possèdent également des gènes de photolyases, qui catalysent la réparation de l'ADN après les dommages causés par les UV qui tendent à détruire les dimères de thymine. Ces gènes sont quasiment absents chez les souches de profondeur (Rocap et *al.* 2003, Hess et *al.* 2001, Dufresne et *al.* 2003). Seules les souches NATL1A et NATL21, appartenant au clade LLI, possèdent un gène de photolyase, ainsi que 41 HLIPs (Fig. 51) ce qui pourrait être lié au fait que les cellules de ce clade soient les seules LL à se développer dans les eaux de surface (Coleman & Chisholm 2007).

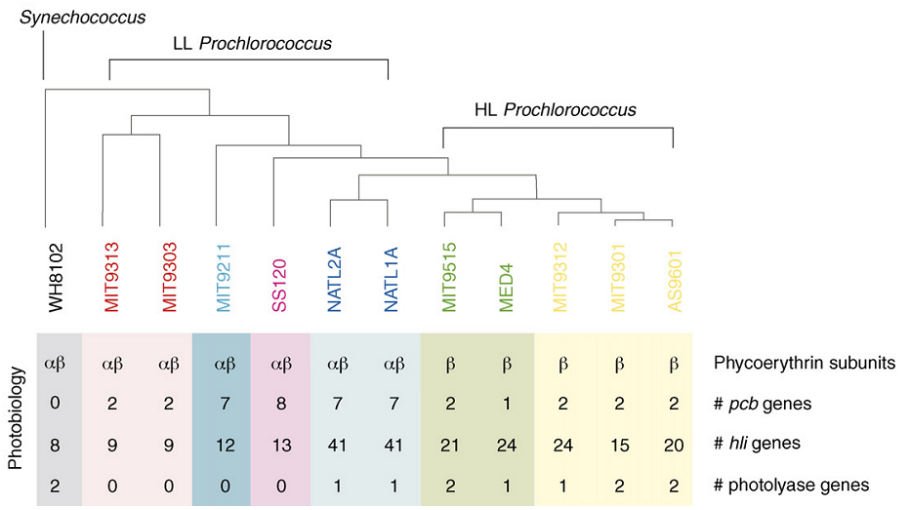


Figure 51 | **Présence et absence des gènes impliqués dans la photosynthèse chez différentes souches de *Prochlorococcus*.** La cladogramme représente l'écotype auquel appartient chaque souche. # représente le nombre de copies du gène. La présence des gènes impliqués dans la photobiologie correspond à la phylogénie des souches (Coleman & Chisholm 2007).

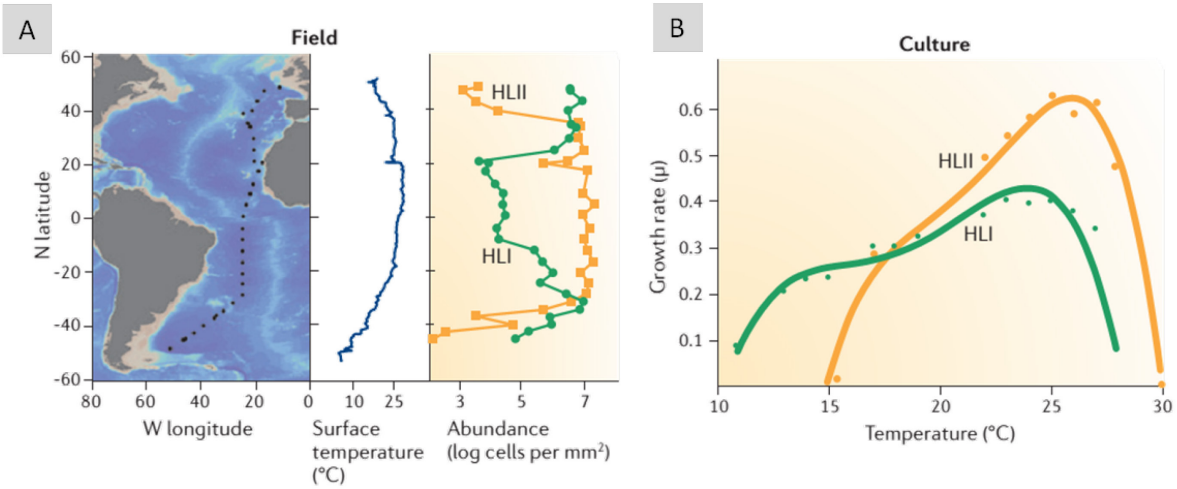
Alors que ces écotypes de lumière chez *Prochlorococcus* présentent des adaptations claires à leur niche lumineuse, certaines caractéristiques de la radiation restent encore floues. De façon intéressante, des gènes codant pour la PE ont été retrouvés chez *Prochlorococcus*, alors que les gènes codant pour l'APC, PC et leur *linkers* ont été perdus dès l'émergence de la radiation (Hess et *al.* 1996, 1999, 2001). Ainsi, les souches LL possèdent les gènes *cpeA* et *cpeB*, codant respectivement pour les sous unités de la PE-I, ainsi que quelques autres gènes de la région PBS de *Synechococcus*, permettant la synthèse d'une PE théoriquement fonctionnelle (Hess et *al.* 1999, Lokstein et *al.* 1999, Steglich et *al.* 2003). *A contrario*, les souches HL auraient perdu au cours de l'évolution la plupart de ces gènes pour ne garder que le gène *cpeB*. Le rôle de ces PE chez les écotypes de *Prochlorococcus*, qui ne participent

plus de façon prédominante à l'absorption de la lumière et leur expression à faible concentration dans la cellule, restent encore mystérieux (Steglich et *al.* 2003). Une hypothèse intéressante serait que ces PE soient à présent chez *Prochlorococcus* des photorécepteurs fonctionnant avec la lumière bleue verte.

iii. Les sous-écotypes de *Prochlorococcus*

Adaptation au gradient latitudinal de température

En 2006, une étude a permis d'aller plus loin dans la compréhension de la microdiversification de *Prochlorococcus*, en étudiant les capacités de thermoacclimatation des clades HLI et HLII des écotypes de surface (Johnson *et al.* 2006). Les auteurs ont montré que les sous-clades HLI et HLII présentent une température optimale de croissance similaire mais des limites de *preferenda* thermique marquées, les HLI pouvant croître à des températures plus basses que les HLII et inversement (Fig. 52). Ces mesures en laboratoire sont tout à fait en accord avec la distribution de ces lignées sur les grands gradients latitudinaux océaniques de température. En effet, alors que les populations HLII dominent les eaux tropicales et subtropicales de surface, entre les latitudes 30°N et 30°S, elles sont progressivement remplacées par la lignée HLI qui devient dominante aux plus hautes latitudes, entre 30 et 45° N/S (Fig. 52). Les mécanismes physiologiques majeurs permettant différentes capacités de thermoacclimatation chez les écotypes de surface HLI et HLII n'ont pas encore été mis en évidence.



<u>Figure 52</u> | Distribution *in situ* et taux de croissance en fonction de la température des écotypes de surface I et II de *Prochlorococcus*. Distribution des écotypes de surface (HL) I et II chez *Prochlorococcus* le long du transect latitudinal trans-Atlantique. L'écotype de surface (HL) est dominant dans les cent premiers mètres de la colonne d'eau, alors que l'écotype de profondeur (LL), est dominant plus en profondeur (**A**). *Preferenda* thermique de croissance en laboratoire des deux écotypes de surface (**B** ; Biller et *al.* 2014).

En se basant sur la biogéographie, ainsi que sur un certain nombre de données génomiques et metagénomiques, il a été proposé que les écotypes HLIII, IV et V qui habitent des environnements très pauvres en fer (Huang et *al.* 2011, Malmstrom et *al.* 2013, Rusch et *al.* 2010) ont développé des adaptations spécifiques à ces environnements. Ceci, en ayant notamment diminué leurs besoins cellulaires en fer en se séparant de protéines utilisant le fer comme cofacteur telles que le cytochrome c_M (dont le rôle reste toutefois mal compris), deux ferrédoxines et la plastoquinone terminale oxidase (Rusch et *al.* 2010). Il semble également que les membres de ces clades utilisent des sidérophores spécifiques (du grec *sideros* et *pherein*, signifiant porter le fer), chélateurs permettant d'augmenter l'efficacité d'assimilation du fer dans l'environnement (Rusch et *al.* 2010).

Au regard de cette microdiversité, Biller et Chisholm suggèrent que la diversité adaptative des populations de *Prochlorococcus* joue un rôle important dans la robustesse et la résilience des populations naturelles de *Prochlorococcus*, fournissant un réservoir de traits écologiques, sélectionnés par les pressions environnementales (Biller et *al.* 2014).

L'utilisation de l'azote minéral chez *Prochlorococcus*

Dans de nombreuses régions océaniques, la productivité est limitée par la disponibilité en azote. Les souches de *Prochlorococcus*, qui sont spécialisées dans l'oligotrophie, ont souvent considérablement réduit la quantité d'azote de leur protèome par rapport aux bactéries plus côtières, où les concentrations en éléments nutritifs sont plus importantes (Biller et *al.* 2014). De plus, les capacités d'utilisation des différentes sources de sels nutritifs varient entre les souches de *Prochlorococcus*. Les adaptations liées à la capacité d'utilisation d'éléments nutritifs tels que le phosphore et l'azote, ainsi que les métaux traces ne correspondent pas nécessairement aux ribotypes de *Prochlorococcus*, *i.e* les groupes phylogénétiques définis par des séquences de l'ARN ribosomal 16S, tel que c'est le cas pour la lumière (Berube et *al.* 2015). Parmi les formes d'azote disponibles dans les océans, les nitrates sont une des sources inorganiques les plus abondantes (Gruber & Galloway 2008), ainsi la majorité des cyanobactéries possède les voies enzymatiques nécessaires à l'absorption et l'assimilation de l'azote de la molécule de nitrate (Herrero et *al.* 2001, Garcia-Fernandez et *al.* 2004, Ohashi et *al.* 2011). Cependant, durant des années, ces voies enzymatiques sont restées inconnues chez *Prochlorococcus.* La réduction de la région génomique impliquée dans l'utilisation de l'azote chez *Prochlorococcus* laissait à penser que, au cours de l'évolution, *Prochlorococcus* s'était affranchi des gènes codant pour les nitrite et nitrate réductases (respectivement *nirA* et *narB*). Cette hypothèse était cohérente au regard de sa spécialisation pour les milieux oligotrophes au sein desquels la régénération de l'azote inorganique se fait principalement *via* la boucle microbienne, sous la forme d'ammonium (Coleman & Chisholm 2007, Berube et *al.* 2015, Biller et *al.* 2014). Cependant des travaux récents ont montré que la capacité d'utilisation des nitrates chez *Prochlorococcus* n'a pas

complètement disparu du pan génome de *Prochlorococcus* (Berube et *al.* 2015). En effet, l'identification de gènes d'assimilation de nitrate au sein de génomes de *Prochlorococcus* environnementaux suggère que cette capacité aurait pu être perdue tôt au cours de l'évolution de *Prochlorococcus*, mais que certaines souches auraient retenu ces gènes (Berube et *al.* 2015, Martiny et *al.* 2009). Cependant, l'étude de l'environnement génique de ces gènes chez certaines souches suggère aussi qu'ils auraient également pu être transférés latéralement, conférant un avantage à ces organismes dans les niches écologiques limitées, où nitrites et ammonium (les deux formes d'azote minéral les plus facilement assimilables) sont limitants, mais où le nitrate est présent.

b. Synechococcus

Contrairement à *Prochlorococcus*, la complexité de la radiation des *Synechococcus* marins rend l'identification de traits adaptatifs spécifiques à une niche environnementale au sein d'une même lignée beaucoup plus délicate. Cependant, quelques caractères phénotypiques spécifiques de clades ont été identifiés, et bien que les facteurs génomiques soient beaucoup moins bien caractérisés que chez *Prochlorococcus*, ils permettent d'entrevoir certains aspects de la diversification adaptative chez les *Synechococcus* marins.

Les adaptations à la niche écologique présentées jusque maintenant chez *Prochlorococcus* et *Synechococcus* impliquent un transfert des caractères adaptatifs basé sur des transferts verticaux de gènes, d'une cellule mère à une cellule fille, au sein d'une lignée (*cf*. le concept d'écotype). On connaît chez les *Synechococcus* marins des adaptations qui résultent visiblement de processus évolutifs différents.

Les analyses biochimiques et génétiques de l'antenne photosynthétique des *Synechococcus* marins ont en effet permis la mise en évidence d'une grande diversité moléculaire qui a conduit à la définition de types pigmentaires chez ces picocyanobactéries (Fig. 53, Six et *al.* 2007, Humily et *al.* 2013). Ces différents types pigmentaires constituent des spécialisations à la qualité spectrale de la lumière, qui varie beaucoup le long des gradients côte-large (et surface-profondeur) dans les océans. En effet, la matière en suspension absorbe de façon efficace la lumière bleue, instaurant une relation entre la turbidité de l'eau et un décalage des rayonnements dominants vers le rouge. Ainsi, dans les eaux côtières, la charge en matière dissoute et particulaire en suspension influe sur la qualité spectrale disponible pour le phytoplancton car elle absorbe efficacement la lumière bleue. La teneur en matière en suspension diminuant le long du gradient côte-large, un gradient de qualité spectrale s'instaure donc, avec près des côtes une bonne disponibilité en lumière jaune-orange (600-650 nm), alors que les eaux du large sont dominées par des eaux bleues de longueur d'onde 400-450 nm.

Parmi les types pigmentaires de *Synechococcus* marins, les souches bleues-vertes, isolées en milieux côtiers, appartiennent au type pigmentaire 1 et les bras du PBS sont composés uniquement d'une PC

portant exclusivement de la PCB. Ce type de PC est la PBP la mieux caractérisée et a été nommée C-PC (Bryant et *al.* 1976). Les souches appartenant au type pigmentaire 2, de couleur rose, sont caractérisées par des PBS comportant une PC portant deux PCB pour une PEB (appelée R-PCIII, Ong & Glazer 1987, Sidler 1994) et les extrémités des bras sont constituées par une seule forme de PE fixant uniquement de la PEB. Beaucoup de cyanobactéries d'eau douce présentent des PBS similaires aux types pigmentaires 1 et 2 des *Synechococcus* marins.

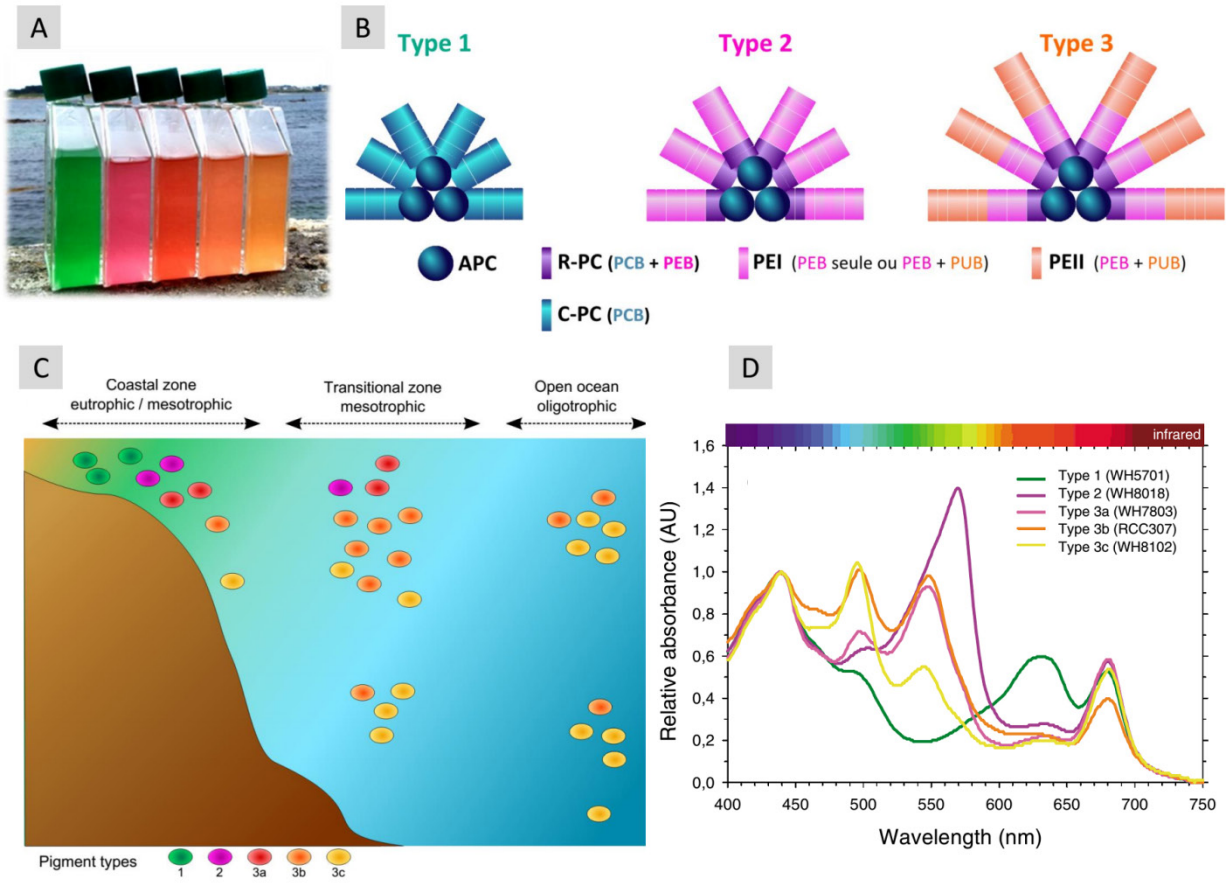


Figure 49 | **Phycobilisomes, distribution et absorption de la lumière par les différents types pigmentaires des *Synechococcus***. Photographie des cultures de *Synechococcus* marins appartenant aux types pigmentaires définis selon Six et *al.* 2007 et Humily et *al.* 2013 (**A** ; photographie F. Humily) ; Structures et compositions des phycobilisomes des 3 types pigmentaires (**B**). Distribution des différents types pigmentaires de *Synechococcus* le long du gradient côte-large (et surface-profondeur) de qualité spectrale de la lumière (**C**). Spectres d'absorption *in vivo* typiques de chacun des types pigmentaires (**D** ; Six et *al.* 2007). Les différents *maxima* d'absorbance des phycobilines (480-650 nm) correspondent à la qualité spectrale de la lumière de la niche lumineuse à laquelle la cellule est adaptée.

Le type pigmentaire 3, dont les cellules sont de couleur rouge à orange sont spécifiques des *Synechococcus* marins. Ils présentent des bras composés de PC liant une PCB pour deux PEB (R-PCII, Ong & Glazer 1987). La partie distale des bras a la particularité d'être composée de deux types de PE : la PE-I et PE-II. Ces deux types de PE lient des proportions différentes de deux phycobilines : la PEB et la PUB. Le type pigmentaire a été sous-divisé en quatre sous-types définis en fonction du rapport

d'absorption 495:545 nm qui reflète le rapport PUB:PEB dans le PBS. Ce rapport peut être faible (~0.4, correspondant au type pigmentaire 3a), moyen (~0.8, 3b), élevé (~1.6, 3c) ou variable (3d). Les souches de type pigmentaire 3d ont les PBS les plus sophistiqués que l'on connaisse et sont capables de modifier la pigmentation du PBS en fonction de la qualité spectrale de la lumière, phénomène appelé acclimatation chromatique de type IV (Palenik 2001, Everroad et *al.* 2006, Six et *al.* 2007, Humily et *al.* 2013). Les différents types pigmentaires permettent l'absorption optimale de certaines gammes de longueurs d'ondes, constituant ainsi une adaptation à la niche lumineuse.

La comparaison des génomes des différents types pigmentaires montre que les gènes impliqués dans la synthèse des bras des PBS sont tous réunis dans une région de taille variable en fonction du degré de complexité du PBS (9 kpb à 28.5 kbp ; Fig. 53).

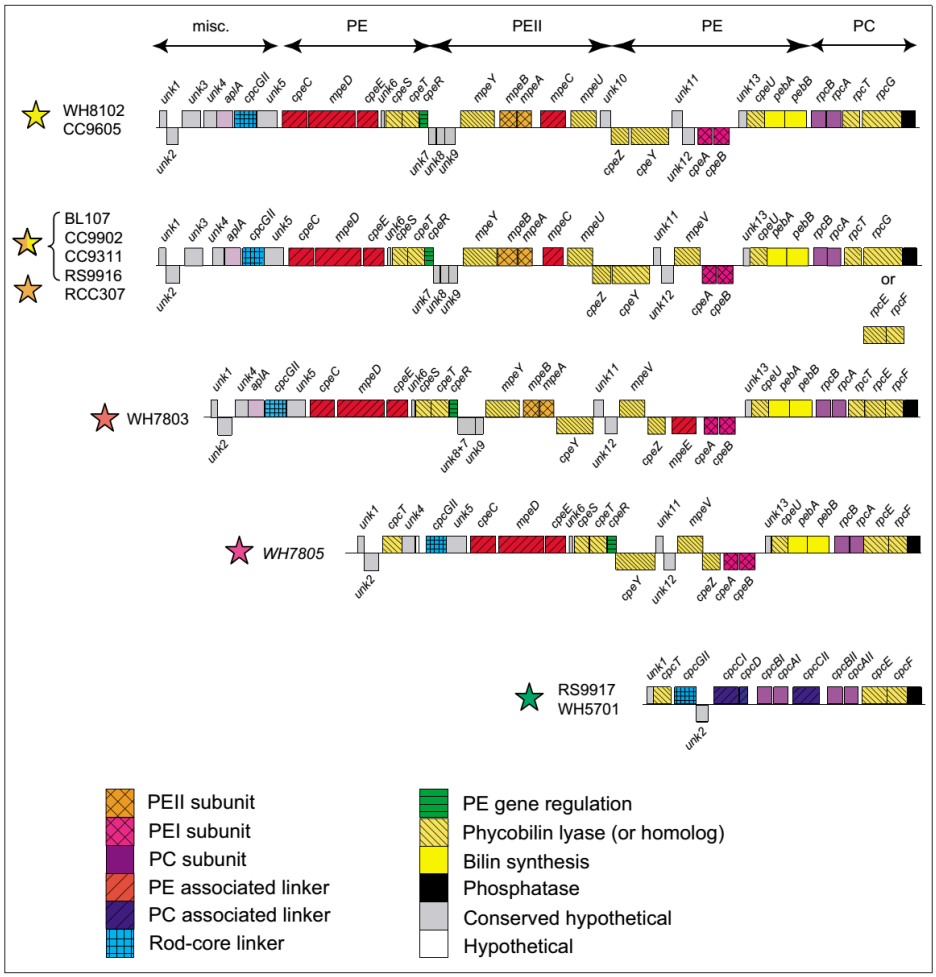


Figure 53| Comparaison de la région génomique des projections radiaires du phycobilisome chez les *Synechococcus* marins. Détail des régions génomiques impliquées dans la structure, la biosynthèse et la régulation des bras du phycobilisome, chez les trois types pigmentaires décrits par (Six *et al.* 2007). La couleur des étoiles correspond aux types pigmentaires : Vert, type 1 ; Rose, type 2 ; Rouge, type 3a ; Orange, type 3b, Jaune, type 3c ; Bicolore : 3d (adaptateur chromatique). A côté de chaque étoile figure des numéros de souches appartenant au type pigmentaire correspondant. La région phycobilisome a subi une complexification par insertion de cassettes de gènes par transferts latéraux de matériel génétique. Ceci a conduit à l'utilisation de nouvelles phycobiliprotéines qui ont permis la colonisation de niches lumineuses variées.

Ces gènes codent pour les protéines impliquées dans la structure, la biosynthèse et la régulation des PBS des différents types pigmentaires. Une analyse phylogénétique des gènes de chaque phycobiliprotéine a démontré que le cœur d'APC est une structure ancienne, très conservée au cours de l'évolution (Six et *al.* 2007). En revanche, les bras des PBS ont rapidement évolué par transfert latéral de régions génomiques qui se sont insérées dans les régions génomiques du PBS (Fig. 53). Ceci a conduit à la complexification de l'antenne, du type 1 au type 3c (Fig. 52) et a permis l'acquisition de nouvelles phycobiliprotéines, l'absorption de nouvelles longueurs d'onde et par conséquent la colonisation de nouvelles niches lumineuses dans les océans.

La capacité des communautés de *Synechococcus* marins à avoir autant diversifié leur pigmentation au cours de l'évolution leur permet aujourd'hui d'exploiter tous les spectres lumineux, et d'ainsi coloniser quasiment toutes les niches lumineuses de l'océan. Puisque chaque type pigmentaire ne constitue pas une lignée (un clade), les types pigmentaires de *Synechococcus* marins ne correspondent pas à la définition stricte d'écotypes sensu Coleman & Chisolm (2007). Leur élaboration au cours de l'évolution des *Synechococcus* marins semble plutôt basée sur des processus de duplication et de transfert horizontal de matériel génétique.

Les *Synechococcus* marins du clade VIII, isolés notamment en Mer Rouge et sur la côte Est Américaine, se sont visiblement spécialisés dans les niches écologiques côtières à salinité variable (Fuller et *al.* 2003, Dufresne et *al.* 2008). Les représentants de ce clade sont non seulement halotolérantes, mais sont également originales au regard de leur capacité à utiliser les nitrates (Fuller et *al.* 2003). En effet, plusieurs souches du clade VIII sont incapables de croître lorsque les nitrates sont l'unique source d'azote, ne pouvant alors assimiler uniquement l'ammonium. Cette incapacité est d'autant plus surprenante chez *Synechococcus* par rapport à *Prochlorococcus* au vue de la présence de PBS représente demande importante en azote. Ces spécificités constituent probablement des adaptations, issues de transfert latéral de gènes, à une niche écologique particulière, côtière et à la salinité faible (Fuller et *al.* 2003). De plus, le clade VIII est un des rares clades présentant une pigmentation homogène parmi les souches isolées jusqu'à aujourd'hui (type pigmentaire 1 ; Fig. 42, 53 ; Fuller et *al.* 2003). Cette pigmentation est très commune parmi les cyanobactéries d'eau douce et constitue un autre trait adaptatif de ce clade

Les représentants du clade III semble, elles aussi, avoir évolué des traits adaptatifs spécifiques à ce clade. Ces souches sont les seules de la radiation capables de motilité, grâce à un mécanisme spécifique particulier (Toledo et *al.* 1999). En effet, les cellules du clade III sont les seuls procaryotes motiles connus qui soient dépourvus de flagelles ou d'un organe de locomotion visible. Les gènes *swmA* et *swmB*, qui codent pour de grosses protéines de la membrane externe, sont parmi les gènes nécessaires à cette mobilité (McCarren et *al.* 2005, McCarren & Brahamsha 2007). Cependant, bien

qu'un grand nombre de souches au sein de ce clade soit motile, quelques souches ne possèdent pas les gènes *swmA* et *swmB*, les ayant peut-être perdus au cours de l'évolution (Fig. 42). Bien que la signification écologique de ce processus soit encore floue, il a été proposé que, habitant les environnements oligotrophes, il permettrait le déplacement des cellules vers des microagrégats de neige marine par chimiotaxisme (Willey & Waterbury 1989). Cette adaptation procurerait donc à ces souches la capacité d'exploiter au mieux leur microenvironnement dans les niches écologiques oligotrophes (McCarren & Brahamsha 2007, Brahamsha et *al.* 1996)

La complexité de la radiation chez *Synechococcus* rend l'identification et la compréhension de possibles différenciations écotypiques beaucoup plus délicates que chez *Prochlorococcus*. Alors que le clade III et VIII semblent avoir évolué des adaptations spécifiques leur conférant des avantages au sein d'une niche écologique donnée, très peu de travaux ont été réalisés sur les autres clades, en particulier les clades dominants. Les tendances de distribution reportées pour ces clades, notamment dépendantes de la latitude laissent envisager l'existence de traits adaptatifs propres à ces lignées (Zwirglmaier et *al.* 2008, Huang et *al.* 2011, Tai & Palenik 2009, Sohm et *al.* 2015).

OBJECTIFS

La distribution quasiment cosmopolite des *Synechococcus* marins suggère qu'ils ont développé des capacités d'acclimatation (au sens physiologique) et d'adaptation (au sens évolutif) aux grands gradients environnementaux de l'océan mondial. Il apparait en particulier que ces picocyanobactéries se distribuent le long d'une large portion du gradient latitudinal de température (de 2 à 32°C). Les caractères adaptatifs, en particulier physiologiques, qui ont permis la colonisation de ce large éventail de niches thermiques restent à l'heure actuelle inconnus. L'objectif global de ce travail de thèse est d'améliorer la compréhension des processus adaptatifs mis en place par les cyanobactéries marines du genre *Synechococcus* au gradient latitudinal de température.

Les rares données de thermophysiologie des *Synechococcus* marins disponibles dans la littérature ne permettent pas de déterminer si la vaste distribution latitudinale des *Synechococcus* marins résulte d'une grande plasticité d'acclimatation à la température chez ce genre, en faisant un organisme généraliste, ou s'il existe des processus marqués de spécialisation à des gammes plus ou moins restreintes de température (sténothermie). Dans ce contexte, il est possible de se demander s'il existe des *Synechococcus* marins psychrophiles, confinés aux eaux tempérées froides des hautes latitudes, ou si l'évolution de la radiation des *Synechococcus* se serait faite vers la différenciation de mésophiles « froids » et mésophiles « chauds ».

Une autre grande inconnue concerne les raisons de la limite de distribution de ces organismes au cercle polaire, alors que les picoeucaryotes n'ont eu aucun mal à franchir cette barrière physique (Lovejoy et *al.* 2011). Cela suggère l'existence de verrous physiologiques chez les *Synechococcus* marins, qui empêchent l'adaptation en deçà d'une certaine gamme de température. L'identification de ces processus physiologiques, définissant les limites de leurs niches thermales, représente un véritable enjeu qui permettrait d'expliquer la distribution mais aussi de réfléchir à l'évolution possible de la niche écologique de ces organismes dans un contexte de changement climatique.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons choisi de nous intéresser tout particulièrement à deux processus physiologiques clés pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, qui pourraient constituer des verrous physiologiques pour l'adaptation à la température. L'objectif est de comprendre dans quelle mesure ces processus physiologiques ont été impactés par le facteur température au cours de l'évolution des *Synechococcus* marins en utilisant des approches de physiologie comparée.

Le premier processus approvisionne en énergie chaque organisme phototrophe : la photosynthèse. Ce mécanisme bioénergétique permet la synthèse de matière organique et *in fine* la croissance des organismes. Depuis plusieurs décennies, des travaux ont montré la forte sensibilité de la photosynthèse face à des variations de température, la décrivant comme le premier processus physiologique inhibé en situation de stress thermique. L'objectif sera donc de comprendre les adaptations, physiologiques et moléculaires, potentiellement développées par les *Synechococcus*

marins pour optimiser le fonctionnement de la machinerie photosynthétique au sein de différentes niches thermiques.

Les complexes photosynthétiques sont insérés au sein des thylacoïdes, systèmes membranaires lipidiques, eux aussi hautement sensibles à la température. La régulation de la composition lipidique face à des variations de température permet le contrôle de la fluidité des membranes, indispensable au bon fonctionnement des protéines qui y sont insérées. Au cours de ce travail de thèse, nous posons l'hypothèse qu'il est possible qu'au cours de l'évolution, les *Synechococcus* marins aient déployé différents mécanismes de synthèse et de régulation des lipides membranaires (tête polaires et acides gras) en fonction de leur niche thermale.

Pour répondre à ces questions, des approches de physiologie comparative ont été mises en place, en utilisant des méthodes de culture des organismes, de biophysique de la photosynthèse, de biochimie des protéines, de lipidomique et de bioinformatique. En analysant et comparant des processus physiologiques adaptatifs chez des *Synechococcus* marins isolés le long d'un gradient latitudinal, mon travail de doctorat s'inscrit dans une approche de biologie des systèmes, visant à étudier l'adaptation à la température à différentes échelles d'intégration, de l'environnement à la molécule.

CHAPTER 1

Thermotypes in the marine *Synechococcus* radiation

I.

CONTEXT OF THE WORK

In the past few years, specific distribution patterns have been reported for the ecologically relevant *Synechococcus* clades (Fig. 54). Interestingly, these phyletic distributions appeared to be notably latitude dependent (Zwirglmaier et *al.* 2007, 2008). These authors unveiled that clades I and IV are dominant at high latitudes (> 30°N/S) in cold temperate waters, while clade II is dominant at low latitudes, in tropical waters. Clade III seems to have a preference for oligotrophic waters, mostly in tropical and warm temperate waters (Zwirglmaier et *al.* 2007, 2008, Huang et *al.* 2011, Sohm et *al.* 2015).

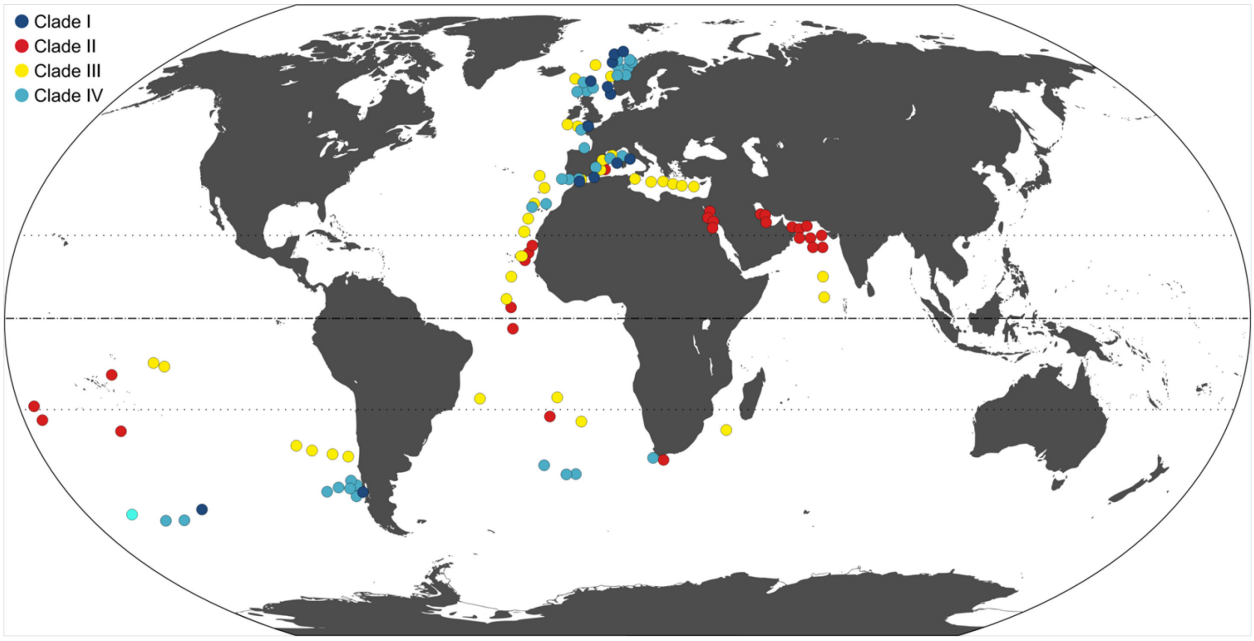


Figure 54 | Distribution of the four most abundant *Synechococcus* clades in the ocean. The data are retrieved from dot blot hybridisation (modified from Zwirglmaier et *al.* 2007).

At the beginning of my PhD, there were a number of comparative studies of the physiology of marine *Synechococcus* available in the literature. However, most of them dealt with nutrient utilization (Fuller et *al.* 2003, Mazard et *al.* 2012), light irradiance (Six et *al.* 2004, 2005, Liu et *al.* 2012), light quality (Palenik et *al.* 2001, Everroad et *al.* 2006, Six et *al.* 2007) and UV light (Six et *al.* 2007, Mella-Flores et *al.* 2012), and almost no work existed on *Synechococcus* response to

temperature (Moore et *al.* 1995). Therefore, there was no precise idea of the *Synechococcus* thermal *preferenda* and their possible variability among strains, and it was not possible to assess whether the wide latitudinal distribution of marine *Synechococcus* results from temperature acclimation plasticity, or whether there are, within some lineages, specific adaptations to thermal niches.

II.

CONNECTING THERMAL PHYSIOLOGY AND LATITUDINAL NICHE PARTITIONING IN MARINE *SYNECHOCOCCUS*

Résumé de l'article en français

Les *Synechococcus* marins forment un groupe monophylétique qui présente une large distribution latitudinale, de l'équateur jusqu'aux fronts polaires. Il n'existe actuellement aucune donnée permettant de déterminer si ces organismes présentent une grande plasticité d'acclimatation à la température ou s'il existe plusieurs lignées sténothermes aux capacités de croissance restreintes à une gamme de température. Nous avons soumis un panel de six souches, isolées le long d'un gradient latitudinal de l'Atlantique Nord, à des variations de température à court et long terme. Face à une diminution brutale de la température, les souches ont montré des capacités de résistance différentes, apparemment liées à leur latitude d'isolement. Ces réponses étaient associées à différentes performances photosynthétiques, les souches tropicales n'étant plus capables de maintenir leur croissance, alors que les souches de hautes latitudes maintenaient leur phase exponentielle de croissance. Les souches tropicales ont subi une photoinactivation rapide du photosystème II, accompagnée de la diminution d'un pigment antioxydant, le β-carotène, par rapport à la chl *a*, suggérant l'induction d'un stress oxydatif intense chez ces souches. Ces différentes réponses physiologiques sont liées aux *preferenda* thermiques des souches. En effet, alors que les souches de hautes latitudes sont capables de pousser à 10°C, les souches de plus basses latitudes ont montré une nette préférence pour des températures plus élevées. De plus, notre étude met en évidence une correspondance entre la température d'isolement des souches et leur phylogénie. En particulier, les températures d'isolement des souches des clades I et IV sont plus froides que celles des autres clades. Nous montrons toutefois que les *Synechococcus* du clade I présentent différents degrés d'adaptation, apparemment liées à leur latitude d'isolement. Cette étude révèle l'existence de lignées au sein des *Synechococcus* marins physiologiquement spécialisées dans des niches thermales distinctes, et suggère ainsi l'existence d'écotypes de température au sein de la radiation des *Synechococcus* marins.

Article published in *ISME Journal*

The ISME Journal
Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology

Supplementary information

Supplementary tables

Table S1: Time (days) needed for recovery of initial values of photosynthetic parameters (photosystem II quantum yield, F_V/F_M; non photochemical quenching associated to state transitions, NPQ_{ST}; and phycoerythrin to phycocyanin fluorescence emission ratio, PE:PC) and to reach stationary phase at 22°C, after 6 days of cold stress at 13°C, for *Synechococcus* spp. M16.1, WH7803 and ROS8604. *Synechococcus* sp. A15-37 was not able to recover from cold stress when replaced under initial conditions.

Strain	F_V/F_M	NPQ_{ST}	PE:PC
M16.1	13.0 ± 1.4	14 ± 2.0	13.0 ± 1.7
WH7803	5.0 ± 1.8	5.5 ± 1.9	5.0 ± 0.8
ROS8604	5.7 ± 1.1	5.3 ± 0.6	4.3 ± 0.6

Supplementary Figures

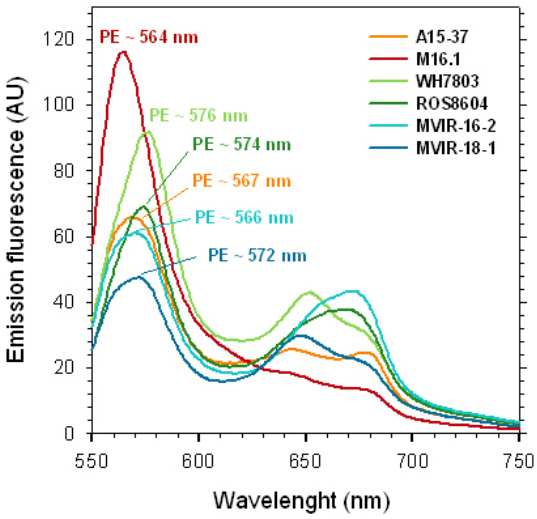


Figure S1: Fluorescence emission spectra (excitation at 530 nm) of the six *Synechococcus* strains used in this study. Wavelengths of phycoerythrin (PE) maxima are indicated on the figure, while phycocyanin emission maxima are 650, 644, 652, 655, 652 and 656 nm respectively for *Synechococcus* spp. A15-37, M16.1, WH7803, ROS8604, MVIR-16-2 and MVIR-18-1

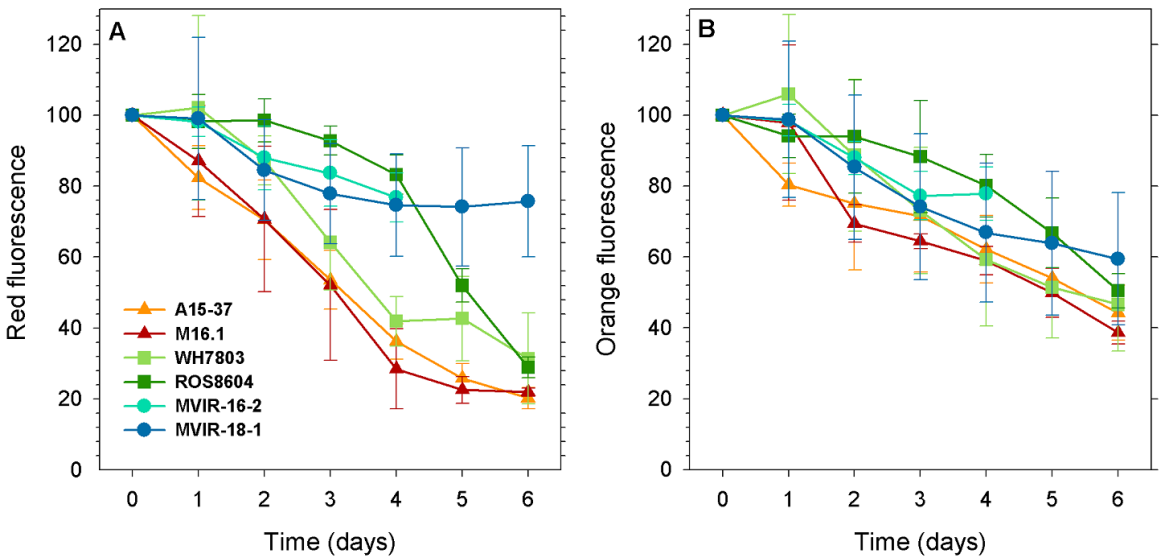


Figure S2: Variations of red (A) and orange (B) fluorescence in the tropical (triangles), mid-latitude (squares) and high latitude (circles) marine *Synechococcus* strains during six days of cold stress.

Table S2: Characteristics of marine *Synechococcus* strains (including isolation sites, dates and temperatures) and accession numbers of 74 sequences strains used in the phylogenetic study

Strain name	RCC number	Isolation latitude (°N)	Isolation longitude (°E)	Isolation ocean	Isolation region	Isolation date	Isolation depth (m)	Isolation temperature (°C)	Seawater thermal amplitude (°C)	*petB* Accession number
A15-11	2569	45.58	-18.23	North Atlantic	Eastern to the MAR [1]	06/06/1981	58	18.25	4.03	JF307472
A15-19	2525	38.53	-20.21	North Atlantic	Eastern to the MAR [1]	09/24/2004	75	22.02	4.48	JF307478
A15-22	1097	35.50	-20.51	North Atlantic	Northern gyre (edge)	09/25/2004	15	23.78	4.07	JF307480
A15-28	2556	31.15	-20.43	North Atlantic	Northern gyre (edge)	09/25/2004	10	25.15	3.08	JF307482
A15-29	2536	31.15	-20.43	North Atlantic	Northern gyre (edge)	09/26/2004	15	25.15	3.08	JF307483
A15-34	1101	29.70	-16.58	North Atlantic	Morocco upwelling	09/27/2004	40	24.61	2.50	JF307485
A15-37	2526	23.33	-19.59	North Atlantic	Morocco upwelling	09/29/2004	10	24.53	1.64	JF307486
A15-44	2527	21.41	-17.50	North Atlantic	Morocco upwelling	10/01/2004	20	22.61	2.09	KF443066
A15-46	2375	21.22	-18.49	North Atlantic	Morocco upwelling	09/30/2004	70	23.30	1.78	JF307490
A15-60	2554	17.37	-20.57	North Atlantic	Cabo Verde islands	10/04/2004	10	26.02	1.32	JF307495
A15-62	2374	17.37	-20.57	North Atlantic	Cabo Verde islands	10/04/2004	15	26.02	1.27	JF307497
ALMO3	2432	36.11	-1.51	Mediterranean sea	Alboran sea	05/01/1991	0	17.51	7.64	JF307500
BIOS-E4-1	2534	-31.52	-91.25	South Pacific	Gyre	11/28/2004	40	16.56	3.32	JF307519
BIOS-H3-1	1018	-9.40	-136.59	South Pacific	Central HNLC area	11/02/2004	100	28.08	0.32	JF307514
BIOS-H3-2	1030	-9.40	-136.59	South Pacific	Central HNLC area	11/04/2004	30	28.08	0.32	JF307521
BIOS-S15-1	1023	-30.47	-95.26	South Pacific	Gyre	11/24/2004	100	18.66	4.07	JF307516
BIOS-U3-1	2533	-33.60	-73.22	South Pacific	Chile upwelling	12/06/2004	40	16.56	3.32	JF307517
BIOS-U3-2	2532	-33.00	-73.20	South Pacific	Chile upwelling	12/08/2004	30	16.56	3.32	JF307511
BL107	515	41.43	3.33	Mediterranean sea	Balearic sea	03/15/2001	1800	13.89	9.00	AATZ00000000
BL1237	-	41.40	2.48	Mediterranean sea	Balearic sea	12/22/2000	-	15.25	9.45	JF307501
BL164	-	41.40	2.48	Mediterranean sea	Balearic sea	24/12/2000	3	15.25	9.45	JF307503
BL36	508	41.40	2.48	Mediterranean sea	Balearic sea	12/24/2000	0	15.25	9.45	JF307531
BL8		41.40	2.48	Mediterranean sea	Balearic sea	12/21/2000	-	15.25	9.45	JF307506
CC9311	1086	31.90	-124.16	North Pacific	California current	12/26/2000	95	16.59	2.29	CP000435
CC9605	753	30.41	-123.98	North pacific	California current	01/01/1993	-	18.02	2.03	CP000110
CC9902	2673	32.90	-117.25	North pacific	California current	10/01/1996	5	15.56	4.38	CP000097
M16.1	791	27.42	-91.18	North Altantic	Gulf of Mexico	02/09/2004	275	24.15	5.45	JF307548
M16.3	792	27.42	-91.18	North Altantic	Gulf of Mexico	02/09/2004	275	24.15	5.45	JF307549
MEDNS5	2368	41.00	6.00	Mediterranean sea	Balearic sea	07/01/1993	80	21.75	8.80	JF307539
MinSyn016	307	39.10	6.10	Mediterranean sea	Balearic sea	06/20/1996	15	21.08	8.80	CT978603
MVIR-16-1	2570	60.19	-3.29	North Atlantic	North sea	07/21/2007	10	11.99	3.06	KF443070
MVIR-16-2	3010	60.19	-3.29	North Atlantic	North sea	07/21/2007	10	11.99	3.06	KF443071
MVIR-7-1	1648	53.90	2.47	North Atlantic	North sea	07/10/2007	10	15.69	8.06	KF443073
MVIR-1-1	1708	48.46	-3.56	North Atlantic	North sea	07/04/2007	10	16.14	5.54	KF443067
MVIR-11-1	1695	56.56	3.59	North Atlantic	North sea	07/14/2007	10	15.09	5.24	KF443069
MVIR-10-1	1688	55.40	2.16	North Atlantic	North sea	07/13/2007	55	15.02	7.44	KF443068
MVIR-18-1	2385	61.00	1.59	North Atlantic	North sea	07/23/2007	25	13.98	6.01	KF443072
NOUM97010	66	0.00	-180.00	South pacific	Eastern HNLC area	11/04/1996	80	28.65	.70	JF307546

NOUM97012	67	-22.20	166.20	South pacific	New Caledonia coast	11/19/1996	70	24.42	3.31	JF307547
OLI31	44	-5.60	-150.00	South pacific	Central HNLC area	11/11/1994	70	28.56	0.33	JF307510
PROS-3-1	321	38.00	3.50	Mediterranean sea	Balearic sea	09/16/1999	5	25.79	8.84	JF307529
PROS-3-2	316	38.00	3.50	Mediterranean sea	Balearic sea	09/16/1999	110	25.79	8.84	JF307524
PROS-5-1	318	36.29	13.19	Mediterranean sea	Thyrrhenian sea	09/18/1999	65	26.41	8.32	JF307526
PROS-5-2	374	36.29	13.19	Mediterranean sea	Thyrrhenian sea	09/18/1999	25	26.41	8.32	JF307537
PROS-5-3	528	33.60	22.10	Mediterranean sea	Ionian sea	09/20/1999	50	26.59	7.36	JF307545
PROS-7-1	2381	37.24	15.37	Mediterranean sea	Thyrrhenian sea	09/26/1999	5	25.99	9.33	JF307531
PROS-7-2	317	37.24	15.37	Mediterranean sea	Thyrrhenian sea	09/26/1999	90	25.99	9.33	JF307525
PROS-8-1	527	39.70	14.50	Mediterranean sea	Thyrrhenian sea	09/27/1999	110	25.41	10.08	JF307544
PROS-8-2	523	39.70	14.50	Mediterranean sea	Thyrrhenian sea	09/27/1999	70	25.41	10.08	JF307541
PROS-D-1	319	43.24	7.49	Mediterranean sea	Gulf of lion	09/30/1999	15	23.72	8.81	JF307469
PROS-M-1	324	36.29	13.19	Mediterranean sea	Ionian sea	09/18/1999	5	26.41	8.32	JF307470
PROS-U-1	2369	30.80	-10.30	North Atlantic	Maroccan upwelling	09/12/1999	5	21.51	2.80	JF307538
PROS-U-2	442	30.80	-10.30	North Atlantic	Maroccan upwelling	09/12/1999	5	21.51	2.80	JF307540
ROS8604	2380	48.43	-3.59	North Atlantic	English Channel	11/24/1986	0	12.81	5.10	JF307527
RS9901	2529	29.28	34.55	Indian ocean	Red Sea	03/29/1999	1	21.07	5.64	JF307552
RS9902	2376	29.28	34.55	Indian ocean	Red Sea	03/23/1999	1	21.07	5.64	JF307553
RS9904	543	29.28	34.55	Indian ocean	Red Sea	06/14/1999	10	25.69	5.64	JF307554
RS9908	2530	31.28	34.55	Indian ocean	Red Sea	09/07/1999	-	28.37	5.64	JF307558
RS9911	550	29.28	34.55	Indian ocean	Red Sea	05/11/1999	10	23.77	5.64	JF307561
RS9914	553	29.28	34.55	Indian ocean	Red Sea	10/18/1999	10	26.98	5.64	JF307564
RS9915	2553	29.28	34.55	Indian ocean	Red Sea	10/18/1999	10	23.98	5.64	JF307565
RS9916	555	29.28	34.55	Indian ocean	Red Sea	11/22/1999	10	25.67	5.64	AAUA00000000
RS9921	559	29.28	34.55	Indian ocean	Red Sea	11/22/1999	150	25.67	5.64	JF307567
SYN20	2035	60.37	5.41	North Atlantic	North Sea	-	0	9.99 [2]	6.97	JF307568
TAK9802	2528	-14.30	-145.20	South Pacific	Takapoto atoll	02/06/1998	7	29.81	1.10	JF307523
WH5701	1084	41.05	-72.75	North Atlantic	Sargasso sea	01/01/1957	-	6.03	13.31	AANO00000000
WH7803	752	33.45	-67.30	North Atlantic	Sargasso sea	07/03/1978	25	25.85	5.88	CT971583
WH7805	1085	33.44	-67.30	North Altantic	Sargasso Sea	06/30/1978	-	25.85	5.88	AAOK00000000
WH8016	2535	41.53	-70.67	North Altantic	Sargasso Sea	06/01/1980	-	17.83	12.06	JF307569
WH8020	2437	38.41	-69.19	North Altantic	Sargasso Sea	06/16/1980	50	16.89	8.37	JF307571
WH8101	2555	41.53	-70.67	North Altantic	Sargasso Sea	01/01/1981	-	5.77	11.90	JF307572
WH8102	539	22.29	-65.36	North Altantic	Carribean Sea	03/15/1981	-	25.78	2.55	BX548020
WH8103	29	28.30	-67.23	North Altantic	Sargasso Sea	03/17/1981	-	25.45	2.90	JF307573
WH8109	2033	39.29	-70.28	North Altantic	Sargasso sea	06/01/1981	-	21.60	10.19	ACNY00000000

[1] MAR : Mid Atlantic Ridge

[2] Annual mean of sea surface temperature at the isolation site over the past 10 years (see methods).

III.

WIDENING THE *SYNECHOCOCCUS* THERMOTYPE PICTURE

Since January 2014, the research of a large part of the 'Marine Phototrophic Prokaryotes' group focuses on the ANR project *SAMOSA* (*Synechococcus* As a Model Organism to Study phytoplankton Adaptation facing environmental changes, 2014 - 2018), led by Laurence Garczarek (see http://www.sb-roscoff.fr/fr/projet-anr-bioadapt-samosa and http://www.agence-nationale-recherche.fr/?Projet=ANR-13-ADAP-0010). This project aims at developing a systemic approach to characterize and model the main acclimation (*i.e* physiological) and adaptation (*i.*e evolutionary) mechanisms involved in the differential response of *Synechococcus* clades/ecotypes to environmental fluctuations, focusing on temperature, light irradiance and UV. The project is expected to give new insights in the respective adaptability of marine *Synechococcus* and hence the dynamics of their distribution in the context of global change. One of the main and most ambitious objectives is to identify, in a selection of strains of different clades/ecotypes, the genes which have the greatest adaptive value to a given environmental parameter, and then to build physiological models of gene regulation.

Since the beginning of the project, I have been strongly involved in several aspects of the project, mainly concerning the response to temperature, with the perspectives to go further in the understanding of the *Synechococcus* thermotypic differentiation pointed out in Pittera et *al.* (2014). In this context, I have established the thermal *preferenda* of 14 marine *Synechococcus* strains isolated from a variety of ecological niches of the World Ocean, and belonging to different clades of the *Synechococcus* radiation. In addition, in the frame of a tight teamwork, we have initiated the study of the response to thermal stress of the model strain *Synechococcus* sp. WH7803, acclimated to LL and HL.

1. Marine *Synechococcus* strains selection

The first step of the *SAMOSA* project was the selection of the strains studied. The selection was carried out among the strains whose entire genomic sequence is available (http://application.sb-roscoff.fr/Phyto/cyanorak/;jsessionid=6F09A7ED9CB974672D1CBB5C8C4F1E99?execution=e1s1). Strains from the most ecologically relevant clades, *i.e.* clades I, II, III and IV have been targeted in priority, in addition with clade CRD-1, which has recently been described as dominant in many areas of the World Ocean such as the Costa-Rica Dome (Ahlgren & Rocap 2012), HNLC zones (Sohm et *al.* 2015), and upwelling ecosystems (Ahlgren et *al.* 2014, Farrant, Doré et *al.* submitted). Three representative strains per clade were selected, and one strain was selected for the clades CRD-1 and V (Table 3, Fig. 55). The strains were also selected based on their geographical origin and preliminary or published data on their physiology. The strain *Synechococcus* sp. WH7803 (clade V) was added to the selection because it is the most studied marine strain in the literature, and will be considered in the project as a model strain.

2. Experimental design and flow cytometry analysis

The strains were grown in the same conditions as in Pittera et *al.* (2014), except that the light was provided by a combination of LEDs (Alpheus; white, green and blue) providing constant light at 20 µmol photons m^2 s^{-1}. The strains were fully acclimated to a range of temperatures and the cell density of four replicate cultures per strain was daily measured by flow cytometry, in order to calculate the growth rates (see Pittera et *al.* 2014). We are grateful to Oliver Bernard and David Demory, who allowed us obtaining preliminary fits of modeled temperature growth curves for the 14 *Synechococcus* strains, following this equation (Bernard & Rémond 2012):

$$\mu max = \mu opt \times \left\{ \frac{(T - Tmax) \times (T - Tmin)^2}{(Topt - Tmin) \times [(Topt - Tmin) \times (T - Topt - (Topt - Tmax) \times (Topt + Tmin - 2T)]} \right\}$$

where μ_{max} is the modeled maximal growth rate, μ_{opt} is the modeled optimal growth rate, T_{min} is the temperature below which the growth is assumed to be zero, T_{max} is the temperature above which there is no growth, and T_{opt} occurs at μ_{opt}.

Cytometry fluorescence and scatter measurements were normalized to fluorescence beads (0.95 µm), and analyzed with Flowing Software.

Table 3 | Information regarding the fourteen marine *Synechococcus* strains used in the SAMOSA project. The clade, pigment type and information regarding the isolation site are mentioned.

Strain	Clade	Subclade	Pigment type	Axenic	Isolation latitude (°N)	Isolation longitude (°E)	Isolation depth (m)	Isolation T°C	Ocean	Region	Isolation date
CC9311	I	b	3d	Yes	31° 90'	-124° 16'	95	16.59	Pacific	California Current	01/01/93
ROS8604	I	a	3a	No	48° 43'	-3° 59'	0	12.81	Atlantic	English Channel	24/11/86
MVIR-18-1	I	a	3a	No	61° 00'	1° 59'	25	13.98	Atlantic	North Sea	23/07/07
A15-62	II	c	3d	No	17° 37'	-20° 57'	15	26.02	Atlantic	Mauritanian upwelling	04/10/04
M16.1	II	a	3a	No	27° 42'	-91° 18'	275	24.15	Atlantic	Gulf of Mexico	09/02/04
PROS-U-1	II	h	3d	No	30° 80'	-10°30'	5	21.51	Atlantic	Marocan upwelling	12/09/99
A15-28	III	b	3c	No	31° 15'	-20° 43'	15	25.15	Atlantic	Northern gyre	25/09/04
RS9915	III	a	3d	Yes	29° 28'	34°55'	10	23.98	Red Sea	Gulf of Aqaba	18/10/99
WH8102	III	a	3c	No	22° 29'	-65° 36'	-	25.78	Atlantic	Carribean Sea	15/03/81
BL107	IV	a	3d	No	41° 43'	3° 33'	1800	13.89	Mediterranea	Spanish coast	15/03/01
MVIR-11-1	IV	a	3a	No	56° 56'	3° 59'	-	15.09	Atlantic	North Sea	14/07/07
MVIR-16-1	IV	a	3d	No	60° 19'	-3° 29'	-	11.99	Atlantic	North Sea	21/07/07
WH7803	V	-	3a	Yes	33° 45'	-67° 30'	25	25.85	Atlantic	Sargasso Sea	03/07/78
BIOS-U3-1	CRD-1	b	3d	No	-33° 60'	-73° 22'	5	16.56	Pacific	Chile upwelling	06/12/04

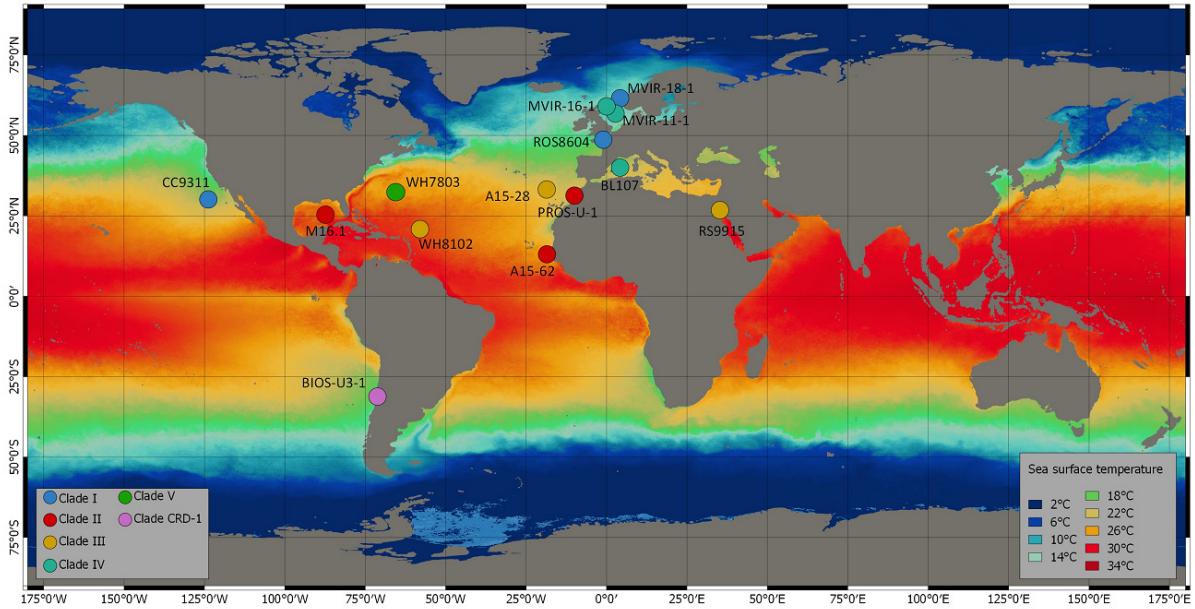


Figure 55 | Location of the isolation sites of the 14 marine *Synechococcus* strains selected for the SAMOSA project. Dot colors correspond to the clades. Sea surface temperature is represented from annual satellite data from MODIS, averaged on the 2004-2014 period.

3. First results and discussion

The 14 strains were acclimated to a wide range of temperature, from 13°C to 32°C. Most of the strains showed similar maximum growth rates, at about 0.50 d^{-1}, which is quite congruent with values reported in the literature for this light irradiance (20 µmol photons m^{-2} s^{-1}, Fig. 56; Moore et *al.* 1995, Six et *al.* 2004). Two strains had however the capacity to grow at higher rate, *Synechococcus* M16.1 and WH7803, which grew respectively at 0.64 ± 0.03 d^{-1} and 0.60 ± 0.01 d^{-1} at 30 °C and 28 °C. These results are similar to the ones described by Pittera and coworkers (2014), who also reported a faster growth rates for these two strains, even though culture conditions were a little different (light quantity and quality). The model generated microbial growth *vs*. temperature fitting curves showing a typical asymmetrical shape, as described in the literature (Dauta et *al.* 1990, Moore et *al.* 1995, Pittera et *al.* 2014, Tang et *al.* 1997, Dill et *al.* 2011).

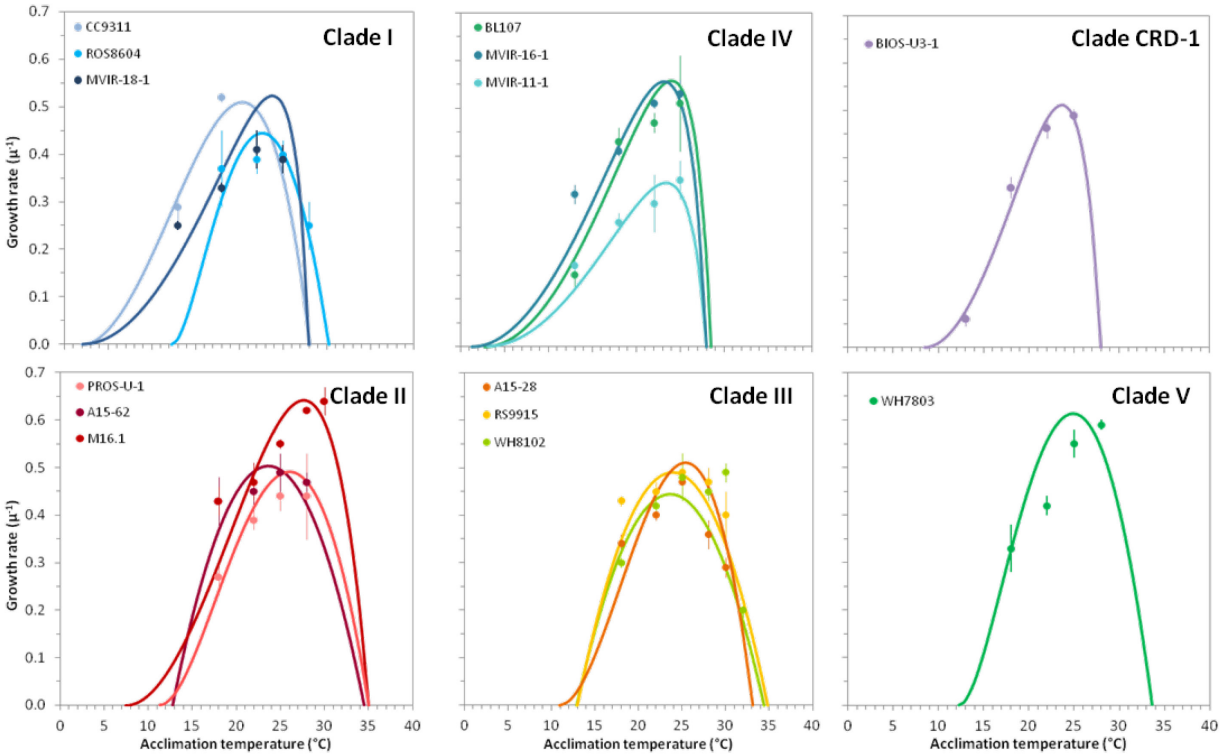


Figure 56 | Growth rates as a function of temperature for the 14 marine *Synechococcus* strain representatives of clades I, II, III, IV, V and CRD-1. A model of temperature-growth response was fitted on the data (Bernard & Rémond 2012). Errors bars are standard deviation calculated from the mean based on three to four replicates.

The model outputs were quite congruent with our observations in the lab, highlighting differences among strains and clades. It however appears that the T_{min} values should be considered with caution, more qualitatively than quantitatively.

Additional growth rate data at colder temperatures for strains belonging to clades I and IV would have probably allowed a more accurate prediction of this variable. The optimal (T_{opt}) and maximal (T_{max}) growth temperature, however, seem to be fairly reliable variables.

Even though these data definitely need to be completed and improved, a preliminary conclusion is that the strains do show quite distinct acclimation capacities to temperature. The large majority of the strains belonging to clade I and IV, and the representative of the CRD-1 clade *Synechococcus* sp. BIOS-U3-1, were able to grow at 13 °C but not above 25 °C. The model predicts that these strains display a T_{opt} between 20°C and 23°C and that most of them would still be able to show measurable growth at temperatures ~7 °C. None of these *Synechococcus* can however be considered as psychrophilic, since such organisms usually show their temperature *optimum* for growth below 15 °C (Lovejoy et *al.* 2007, Vincent 2000). By contrast, strains from clades II, III and V were not able to grow below 16-18 °C, but for some of them could grow at temperature as high as 32 °C (and maybe beyond, this remains to be tested). Accordingly, the model predicts that the T_{min}, T_{opt} and T_{max} parameters are shifted toward warmer temperatures for these strains than for cold temperate strains. Our results show that the minimal and maximal temperatures tolerated by marine *Synechococcus* strains decrease with latitude, reinforcing the idea that the environment temperature is an important factor that has shaped marine *Synechococcus* physiology during evolution (Thomas et *al.* 2012, Boyd et *al.* 2013, Chen & Liu 2015). It is however worth noting that these observations are in sharp contrast to studies of other phytoplankters such as the green alga *Micromonas*, which is widespread in temperate and tropical waters and has differentiated an Arctic thermotype (Lovejoy et *al.* 2007, Balzano et *al.* 2010). Whereas the temperate and tropical strains show T_{opt} values in the 28-30 °C range (Demory & Baudoux, *pers. com*.), the Arctic thermotype grows optimally at ~12 °C and dies above 15 °C. The model moreover suggests that, in these culture conditions, T_{opt} varies in a defined range of temperatures among *Synechococcus* strains (Fig. 57; Anova, $F(3, 8) = 3.18$, $p = 0.08$). This suggests that the physiology of marine *Synechococcus* cells would be designed to work efficiently at a given temperature range that can only be moderately changed. These results, obtained on cultures acclimated to low light, are somewhat different than the ones obtained in the Pittera et *al.* (2014) study, in which the strains were grown under a threefold higher light irradiance. In the latter study, the range of T_{opt} is significantly wider, suggesting that under higher light irradiance, temperature might impact more markedly the cell thermophysiology. This hypothesis should be explored more deeply when the dataset will be complete.

For marine *Synechococcus*, the model thus suggests that the main differences rely on the thermal growth limits (Fig. 57; Anova, $F(3, 8) = 57.25$, $p = 9.48\ 10^{-6}$), suggesting the existence of physiological hindrances that prevent acclimation of clades I and IV to warm temperature, and clade II and III to low temperature. In the past few years, some authors proposed that the upper thermal limit

of Life for a specific organism coincides with a denaturation catastrophe of its proteome (Dill et *al.* 2011).

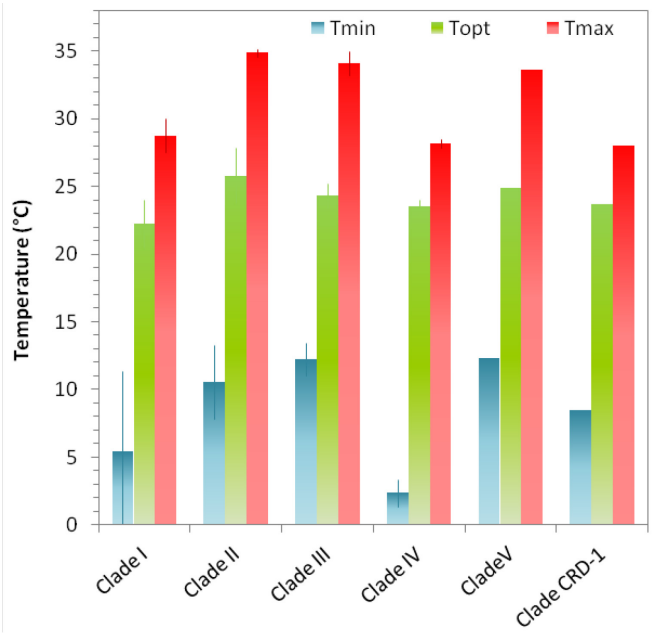


Figure 57 | Temperature variables output from the model function of clades for the fourteen marine *Synechococcus* strains studied. Minimum (blue), optimal (green), and maximum (red) temperature calculated by the growth model for the *Synechococcus* strains representatives of the six clades studied. Errors bars are standard deviation from the mean bases on the three strain representative of the four clades dominant in the environment, and no error bars are represented for clade V and CRD-1 which are represented by one strain.

This study proposes that the upper limit of life is constrained by a sudden protein unfolding, that they defined at 50°C for *Escherichia coli*. Therefore, one may speculate that the thermotypes have specific proteomic adaptations that somehow shift the temperature at which the massive proteome denaturation occurs. Among the many possibilities, these distinct thermal *preferenda* might rely on the modulation of the thermal range of the activity of major enzymes such as for example, the RuBisCO. Indeed, this key enzyme of the Calvin cycle is known to be temperature sensitive (Salvucci et *al.* 2001, 2004). The rather similar temperature *preferenda* between clade I and clade IV strains are consistent with their isolation site temperature (Pittera et *al.* 2014), but also their field distribution and co-occurrence in the environment (Zwirglmaier et *al.* 2007, 2008, Huang et *al.* 2011, Shom et *al.* 2015). Clade I and IV exhibit other common characteristics. For example, a genomic study of the clade I *Synechococcus* sp. CC9311 (Palenik et *al.* 2006) revealed several features including a restricted phosphate regulatory and scavenging system, as well as a greater capacity for uptake, use and storage of several metals, notably copper and iron. Interestingly, it seems that the clade IV *Synechococcus* sp. BL107 displays very similar features (Scanlan et *al.* 2009). These observations raise the question, whether clades I and IV compete for the same ecological niche or if, for example, there are synergistic effects between these two clades promoting the growth of each other (Zwirglmaier et *al.* 2008). These

two cold adapted clades however belong to separated lineages within the marine *Synechococcus* radiation. This suggests that the adaptation traits of the marine *Synechococcus* inhabiting cold waters may have independently arisen at least twice in the evolution and represent an example of parallel evolution (Freeman et *al.* 2007, Shom et *al.* 2015). This parallel evolution of ecotypes might also have been promoted by horizontal adaptative gene transfer between *Synechococcus* but also from other bacteria (Kettler et *al.* 2007, Dufresne et *al.* 2008, Scanlan et *al.* 2009). Such gene cross transfer can also be partially mediated by cyanophages which can cross infect multiple *Synechococcus* ecotypes (Sullivan et *al.* 2006).

The question can also be raised for clades II and III which also displays rather similar thermal *preferenda*. However, clade II is clearly the dominant clade of *Synechococcus* radiation in the environment (Shom et *al.* 2015), especially abundant in tropical/subtropical waters, usually in coastal/continental shelf zones, whereas clade III appears to be confined to oligotrophic waters. The oligophylic features of clade III strains are moreover supported by genomic data such as the study of *Synechococcus* sp. WH8102, which unveiled a plethora of nutrient transporters but little regulatory machinery, suggesting adaptation to a fairly stable, low nutrient environment (Palenik et *al.* 2003, Zwirglmaier et *al.* 2008). Therefore, despite their similar temperature *preferenda*, these two clades do not occupy the same ecological niche.

The low number of strains studied for clade V and CRD-1 prevent making strong conclusions. Some authors suggested that members of clade V could be rather generalistic or opportunistic cells (Zwirglmaier et *al.* 2008) and the global flexibility of *Synechococcus* sp. WH7803 to temperature in the different experiments exposed in this chapter is in agreement with these hypotheses. The CRD1 representative strain, *Synechococcus* sp. BIOS-U3-1, isolated in the Chile upwelling (cold waters) seems to present cold physiological adaptation. This poorly known clade is of interest because it appears to be important in the Pacific Ocean, and its abundance has been so far clearly underestimated (Shom et *al.* 2015, Farrant, Doré et *al.* submitted, Ahlgren et *al.* 2014). However, this clade appears to gather strains from quite distinct environments, such as upwelling, Pacific gyres and low iron habitats (HLNC zones) and it is difficult, given the current lack of data, to portend possible environmental preferences.

IV.

BIOVOLUME AND PIGMENT CONTENT RESPONSE TO TEMPERATURE

1. Side scatter, biovolume and latitude

The large differences in pigment content observed among the six *Synechococcus* (Pittera et *al.* 2014) cultivated under identical conditions caught our attention. Interestingly, the side scatter (SSC) values of the different strains, as measured by flow cytometry, were correlated to pigment content. This parameter is widely used in the literature as a proxy of cell size/morphology (se *e.g.* Marie et *al.* 2005, Shalapyonok et *al.* 2001, Lebaron et *al.* 2002) but, however, the influence of different pigment cell contents on this parameter is poorly known. In order to ascertain whether the large pigment content differences observed among the strains originate in different cell pigment concentration or in distinct cell sizes, we carried out a series of direct biovolume measurements on living cultures.

a. Methods

Synechococcus cultures were acclimated at 22°C under 80 µmol photons m^{-2} s^{-1}. For each of the six strains, measurements of about 200 cells were realized on three distinct replicate cultures in mid exponential growth phase. For this, we used an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i), at the x100 objective and excited the cells with green light, which then emitted natural orange PE fluorescence (Fig. 58). High resolution photos were taken using a Spot camera and analysed with the SpotAdvanced software. Only cell presenting a planar orientation, allowing reliable width and length measurements were considered, and we avoided including the fluorescence halo in the measurement as much as possible. We then compiled the length and width measurements and calculated the *Synechococcus* cell biovolume, assuming a Tic-Tac® cell shape:

$$V = (L - w) \times \pi \times (\frac{L}{w})^2 + \left[\frac{4}{3} \times \pi \times (\frac{w}{2})^3\right]$$

where *V* is the cell biovolume (µm^3), *L* the cell length (µm) and *w* the cell width (µm).

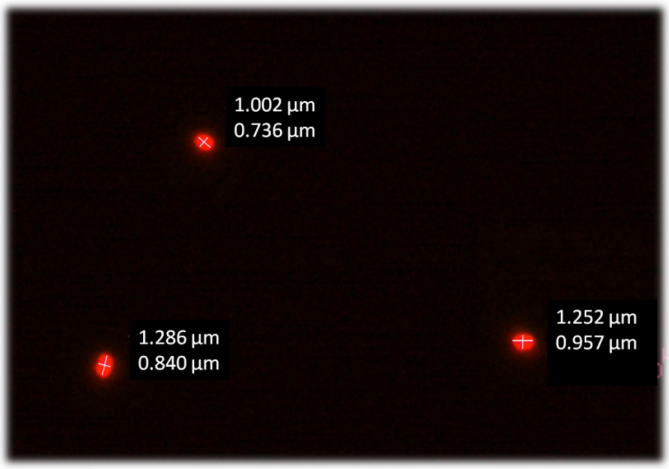


Figure 58 | *Synechococcus* cell size measurements under epifluorescence microscopy. Example of cell size measurements under an epifluorescence microscope for *Synechococcus* sp. ROS8604 . For each strain, cell length and width were measured for about 200 cells exhibiting correct orientation.

b. ***Results and discussion***

The comparison of the cell size showed that the strains do exhibit significantly different metrics (Fig. 59 ; Kruskal-wallis, length: X^2 =1007.98, df = 5, *p-value* < 2.2 10^{16}; width: X^2 =1042.85, df = 5, p-*value* < 2.2 10^{16} ; biovolume: X^2 =1084.46, df = 5, *p-value* < 2.2 10^{16}). Temperate strains *Synechococcus* spp. WH7803 and ROS8604 displayed the larger cell biovolume, while the tropical strains A15-37 and M16.1 were the smallest cells.

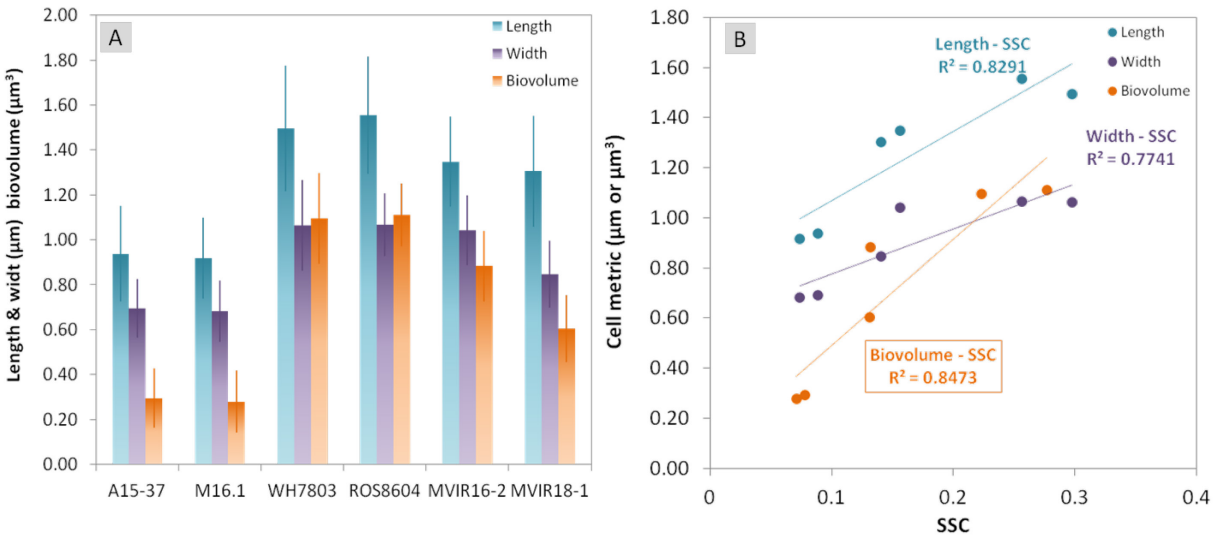


Figure 59 | Biometrics of several marine *Synechococcus* strains. Length, width (µm) and biovolume (µm^3) of the six marine *Synechococcus* studied in Pittera et *al.* 2014. Errors bars are standard deviation from the mean based on about 200 measurements (**A**). Length, width and biovolume function of SSC, as measured by flow cytometry, for the six marine *Synechococcus* characterized in Pittera et *al.* 2014 (**B**).

Cell size variables, and especially biovolume, showed significant correlation (R^2 = 0.84; correlation of Pearson, t = 5.59, df = 4, *p-value* = 0.005) to the cytometry SSC parameter, suggesting that it could indeed be used as a reliable cell biovolume proxy in the study by Pittera et *al.* (2014). Therefore, our results suggest that based on these 6 strains, temperate marine *Synechococcus* are bigger than high latitudes and tropical strains. However, it should be noted that pigment content also correlated to SSC and biovolume and that extrapolating the SSC *vs.* biovolume correlation to other strains and/or other culture conditions should be considered with caution.

We have then widened our vision, by measuring the SCC of other marine *Synechococcus* isolated at distinct latitudes in the North Atlantic Ocean and the Red Sea. These 18 supplemental strains were also acclimated at 22°C under the same light conditions before SSC measurement with flow cytometry.

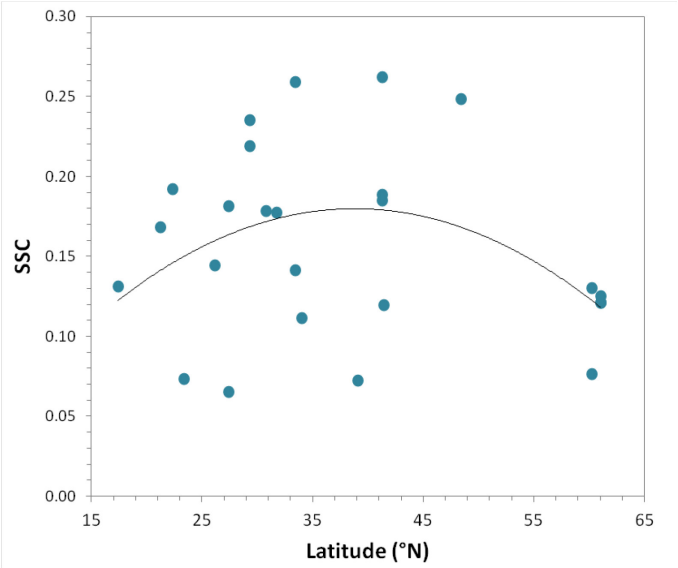


Figure 60 | Side scattering values of marine *Synechococcus* function of their isolation latitude. Side scattering values for 24 strains of marine *Synechococcus* function of their isolation latitude.

Keeping in mind that these data are really preliminary and should be repeated and refined, it appears that the trend we reported for the six strains might be also observed over a larger dataset, and that temperate strains often display a larger biovolume than low and high latitude strains (Fig. 60).

While the advantageous of minimalism has been shown in tropical, often nutrient poor waters (Partensky & Garczarek 2010), the reason for a decrease in size at high latitude remains unclear. It has been proposed that being small is possibly beneficial in a light limiting environment such as high latitude, as absorption efficiency is higher than in larger cells with the same pigment cell concentration (Finkel et *al.* 2009). However, at a global scale, literature usually reports that phytoplankton size decreased from high latitudes to tropics (Marañón et *al.* 2001).The link between *Synechococcus*

biovolume and latitude is not easy to understand and the observed variations, if they are confirmed, probably originate in multifactorial selective pressures.

Future works should aim at studying the possible variations of the biovolume of cells acclimated to, for example, different temperatures. As temperature may induce strong changes in pigment content and therefore probably in cell light diffusion properties, it will be interesting to assess whether the relationship between SSC and cell biovolume is still conserved.

2. Fluorescence and scattering function of growth temperature

In the frame of SAMOSA project, we have also measured the cytometric orange (FL2) and red (FL3) cell fluorescences, which are used as proxys for PE and chl *a* cell content, respectively, in order to characterize their variations function of growth temprature. The 14 strains displayed different orange fluorescence levels, which did not appear to be phylogeny or latitude related. However, in most strains, the orange fluorescence increased with increasing growth temperature (about 3 fold), suggesting thermal modulation of the PE cell content (Fig. 61).

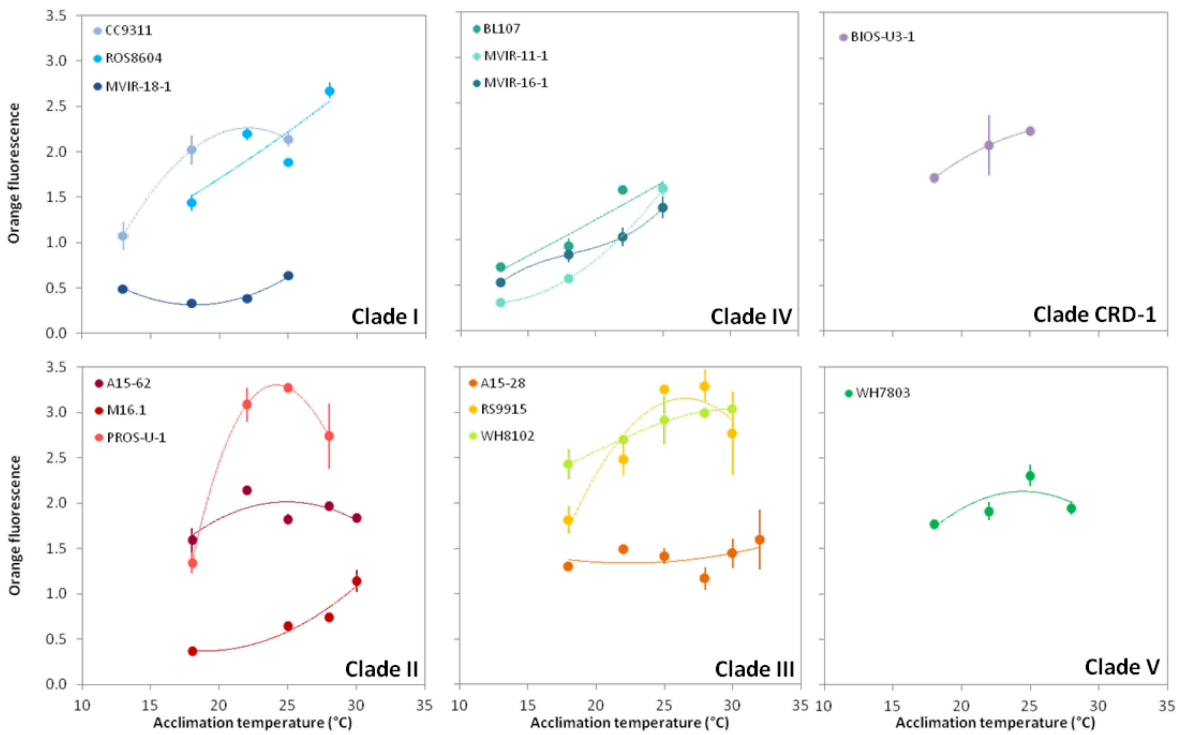


Figure 61 | Orange fluorescence (FL2) variations along acclimation temperature for the 14 marine *Synechococcus* strains. The orange fluorescence reflects phycoerythrin fluorescence, and strains are gathered by clades, and errors bars are standard deviations from the mean based on three replicated.

The red fluorescence displayed the same trend (not shown), suggesting variations in chl cell content and therefore in PS cell content. These results are in agreement with the Pittera et *al.* (2014) study that showed that during acclimation to cold temperature, temperate marine *Synechococcus* strains change the orange and red fluorescences down to a lower level. These observations are also congruent with previous works reporting that acclimation of the photosynthetic apparatus to low temperature presents strong similarities to HL acclimation processes, as it is also based on an imbalance between light energy absorption and its utilization kinetics (Oquist, 1983; Maxwell et *al.* 1994; Huner et *al.* 1998). Recently, Mackey and coworkers have notably shown that between 15°C and 23°C, *Synechococccus* sp. WH8102 reduces the content of proteins involved in the PBS complex (Mackey et *al.* 2013). The reduction of PE fluorescence at low temperature may originate from several processes such as the reduction of PBP rod length by the excision of radial PBP hexamers, as shown for *Synechococcus* sp. WH8102 exposed to HL (Six et *al.* 2004, 2005), or a global reduction in PBS cell content (Six et *al.* 2004, Mackey et *al.* 2013). Future work could include quantitative western blots against PBS proteins (for example MpeA, MpeB, CpeA and CpeB, and linkers such as MpeC, MpeE, MpeD and CpeE) to better understand their variations with temperature among thermotypes. A reduction in photosynthetic membrane cell content would also be in agreement with the chl and PE fluorescence variations as it would imply a decreased number of PSI and PSII and PBS, similarly to previous observations on HL acclimated cells (Fig. 62).

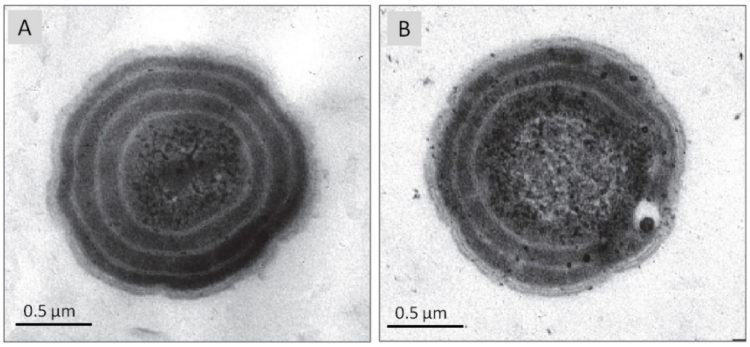


Figure 62 | Ultrastructure and thylakoid number in *Synechococcus* sp. BA-120 (freshwater strain) grown at two light irradiances. *Synechococcus* sp. BA-120 was grown at 10 (**A**) and 145 µmol photons m^{-2} s^{-1} (**B**). Three thylakoidal membrane systems are observable at low irradiance, while only two are present under higher light irradiance. Micrographs were taken at 15 500 x magnification (Jodlowska et *al.* 2014).

On the other hand, a higher PE cell content at high temperatures is coherent with a higher cell metabolic rate and growth rate at these temperatures. This increase in the antenna size could indeed provide more energy to the cell and allow increasing the growth rate. We have previously demonstrated that SSC can be a reliable *proxy* to cell biovolume for six marine *Synechococcus* grown at 22°C. The 14 strains showed distinct SSC values at 22°C that did not appear to be related to clades or latitude (Fig 63). The results show that, for most strains, SSC increases with increasing growth

temperature, suggesting that cell biovolume increases with acclimation temperature. If one considers that the relationship between SSC and biovolume (see annexe) is conserved at any temperature, cells acclimated to the colder part of their thermal *preferenda* would be rather small whereas they would get bigger at higher temperatures.

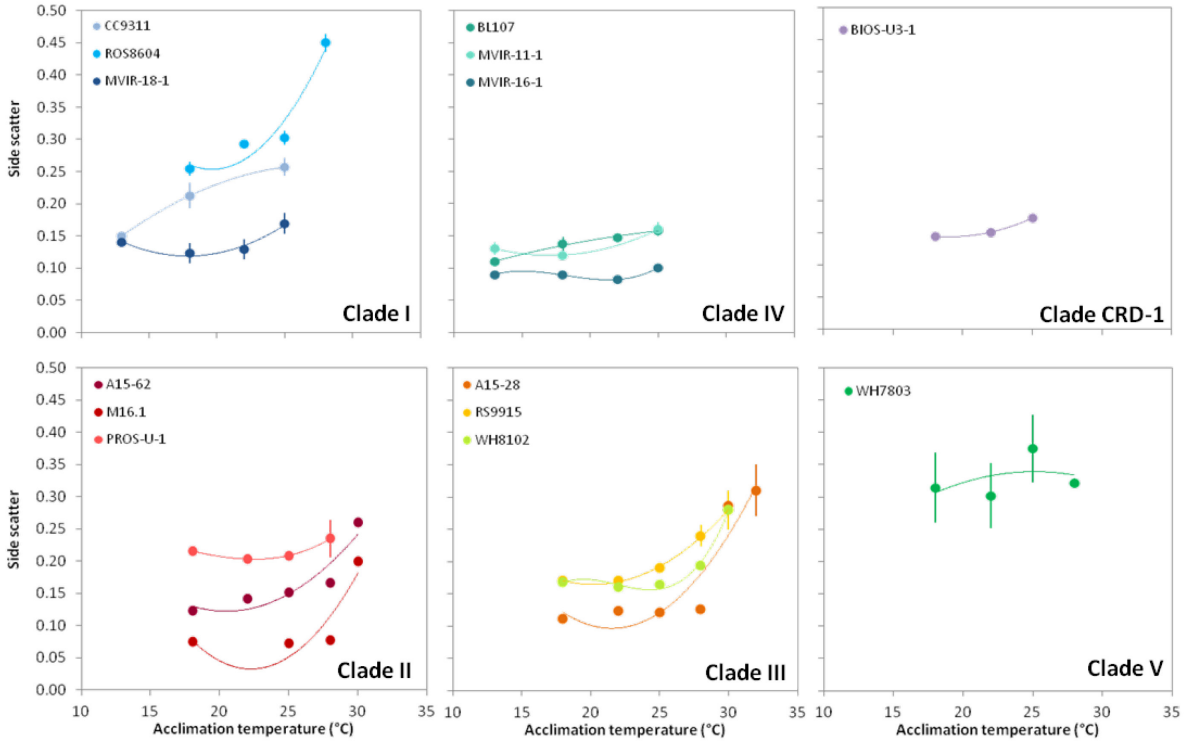


Figure 63 | Side Scatter (SSC) variations along acclimation temperature for the 14 marine *Synechococcus* strains. Strains are gathered by clades, and errors bars are standard deviation from the mean based on three replicates.

The high orange and red fluorescence levels at warm temperature, suggesting a higher cell content in thylakoid membranes, would be consistent with a larger biovolume. On another hand, it is also possible that the change in SSC is linked to changes in thylakoid membrane and pigment concentration in the cell, which would possibly impact the light scattering, but not necessarily the cell biovolume. These results suggest that marine *Synechococcus* would not follow the so-called "temperature-size rule" of eukaryotes, which is an intraspecific phenomenon describing the phenotypic plastic response of an organism size to temperature: 'individuals reared at colder temperature mature to be larger than those reared at warmer temperatures' (Forster et *al.* 2002). In this sense, Atkinson reported that protists from the taxa amoebae, ciliates, diatoms, dinoflagellates and flagellates display a cell-size reduction of 2.5 % for 1 °C increase (Atkinson et *al.* 2003). It is proposed that one of the possible evolutionary causes for cell size reduction include adaptation to decreased oxygen, CO_2, or other nutrient concentrations associated with faster generation times (Atkinson et *al.* 2003, Falkowski & Olivier 2007). It would be necessary to confirm the SSC results for a

number of *Synechococcus* strains through microscopic *in vivo* cell size measurements in order to confirm or deny the "non temperature-size rule" trend in marine *Synechococcus*.

CHAPTER 2

Thermoadaptation of the photosynthetic apparatus among marine *Synechococcus*

I.

CONTEXT OF THE WORK

Photosynthesis is a highly sensitive process which, during stress conditions, is generally inhibited before most of the other cell functions (Berry & Bjorkman 1980, Yordanov et *al.* 1986, Mathur et *al.* 2014). Photosynthesis serves as a primary global sensor of environmental stress, inducing a number of subsequent responses that allow counteracting the stress effects. Indeed, when absorbed light exceeds the photosynthetic capacity, the thylakoïd lumen pH drops and there is a marked increase in the reduction state of the plastoquinone pool (Li et *al.* 2009), which are both thought to be indicators for potential oxidative stress induction. Along the photosynthetic chain, PSII, the entrance door of the energy into the cell of phototrophic organisms, is considered as the most sensitive site of the photosynthetic machinery (Aro et *al.* 1993, Carpentier 1999, Nishiyama et *al.* 2005, Murata et *al.* 2007, Allakverdiev 2008). In the previous study, we have shown that, in marine *Synechococcus*, PSII is indeed highly temperature sensitive and that the regulation of its activity likely plays a key role in the thermal acclimation capacity (Pittera et *al.* 2014). Indeed, in response to a sudden temperature decrease, high latitude strains were able to maintain the integrity and activity of the whole PSII and growth whereas in low latitude strains, the PBS underwent strong uncoupling and the RCII got photoinactivated with drastic D1 damages. In these strains, it is very likely that light-induced oxidative stress occurred. It therefore appears that *Synechococcus* thermotype acclimation capacities to a range of temperature is, at least partly, linked to the capacity to optimize the functionality of the photosynthetic apparatus in a given temperature range. Our aim, in this second chapter, is to better understand the potential adaptations set by marine *Synechococcus* thermotypes to efficiently carry out the photosynthesis process in their respective thermal niche.

There are a number of different factors that might be involved in the regulation of the PSII complex activity in response to temperature variations. Among them, the involvement of HSP should be mentioned. Indeed, these proteins involved in the recovery of unfolded proteins are notably synthesized in response to temperature changes, and could therefore be involved in the stabilization of the PBS and RCII proteins (Sato et *al.* 2010). In addition, a strong induction of the ROS scavenging system, which is mainly based on antioxidant molecules and enzymes such as catalases, peroxidases and the superoxyde dismutase, could also contribute to reduce the photoinhibition risk under stressful conditions (Nishiyama et *al.* 2011). Another necessity for optimizing photosynthesis in temperature

changing conditions is the regulation of membrane fluidity. Several photosynthetic processes indeed require membrane fluidity adjustments such as, for example, the state transition mechanism, which is thought to require protein diffusion along the thylakoids, or the activity of liposoluble such as the plastoquinone between PSII and cytochrome b_6f, which often constitutes one of the photosynthesis rate limiting steps (Hirano et *al.* 1980).

At last, another possibility to somewhat secure the photosynthetic process in response to downward temperature variations could be to increase the stability of the photosynthetic complex itself. This type of processes is generally the result of a long term evolution of protein variants, which then exhibit thermostability properties adapted to specific thermal niches. To test this hypothesis, we investigated different aspects of the thermostability of the PBS and the RCII in marine *Synechococcus* strains isolated at different latitudes and belonging to warm- and cold-adapted clades. We discuss the role of such evolutionary process as a possible mechanism that would allow/prevent marine *Synechococcus* to occupy a given thermal niche.

II.

ADAPTIVE THERMOSTABILITY OF LIGHT-HARVESTING COMPLEXES IN MARINE *SYNECHOCOCCUS* CYANOBACTERIA

Résumé de l'article en français

Les cyanobactéries marines du genre *Synechococcus* jouent un rôle clef dans la productivité primaire océanique à l'échelle globale. Leur large distribution latitudinale a récemment été attribuée à l'existence de thermotypes, *i.e.* des lignées adaptées à différentes niches thermiques, mais les bases physiologiques et moléculaires de cette différenciation restent inconnues. En comparant 6 souches isolées à des latitudes contrastées, nous avons montré que la thermostabilité de leur phycobilisome, le gigantesque complexe antennaire photosynthétique des cyanobactéries, varie en fonction de la température moyenne de l'eau au site d'isolement des souches. L'analyse de courbes de dénaturation thermique des trois phycobiliprotéines constituant les bras du phycobilisome a montré que ces différences reposent notamment sur des propriétés distinctes de thermostabilité de ces composants. La phycocyanine est la moins thermostable des trois phycobiliprotéines et constitue un point de fragilité du phycobilisome sous stress thermique. Les analyses de la composition en acides aminés et d'homologie de modèles structuraux ont révélé plusieurs variations de la structure de la phycocyanine entre les thermotypes dont la modulation du contenu en alanine et la présence de deux substitutions d'acides aminés, probablement impliquées dans la thermostabilité différentielle des phycobiliprotéines. Ces données suggèrent que durant la colonisation des niches thermiques froides de haute latitude, les *Synechococcus* marins ont augmenté la flexibilité moléculaire des phycobiliprotéines pour maintenir des capacités optimales de l'absorption de la lumière, mais que ceci a engendré une diminution de leur thermostabilité. Ces adaptations moléculaires sont probablement déterminantes dans la thermoadaptabilité des Synechococcus marins et aident à expliquer la remarquable ubiquité des ces organismes.

Article submitted in *PNAS of the United States of America*

Supplementary Information

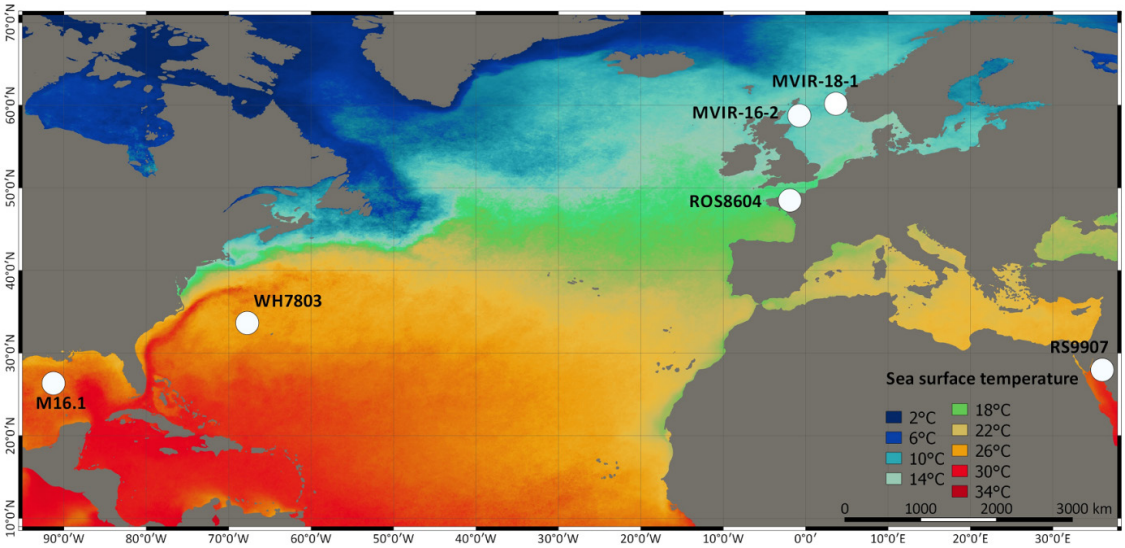


Figure S1: Isolation sites of the six marine *Synechococcus* strains used in this study. Squares, diamonds and circles correspond to subtropical, temperate and subpolar strains, respectively. Colors indicate the average annual sea surface temperature (MODIS) over the 2004-2014 period (QGIS 2.10.1).

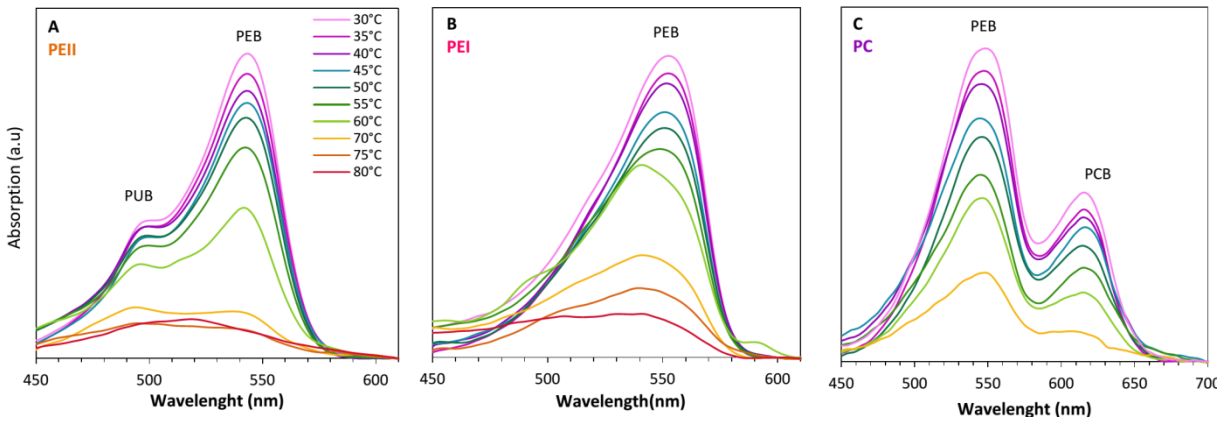


Figure S2: Absorption spectra of phycoerythrin II (PE; **A**) phycoerythrin I (**B**) and phycocyanin (PC; **C**) from the subtropical clade II *Synechococcus* sp. strain M16.1 measured over a thermal denaturation curve. PCB, Phycocyanobilin; PEB, Phycoerythrobilin; PUB, Phycourobilin.

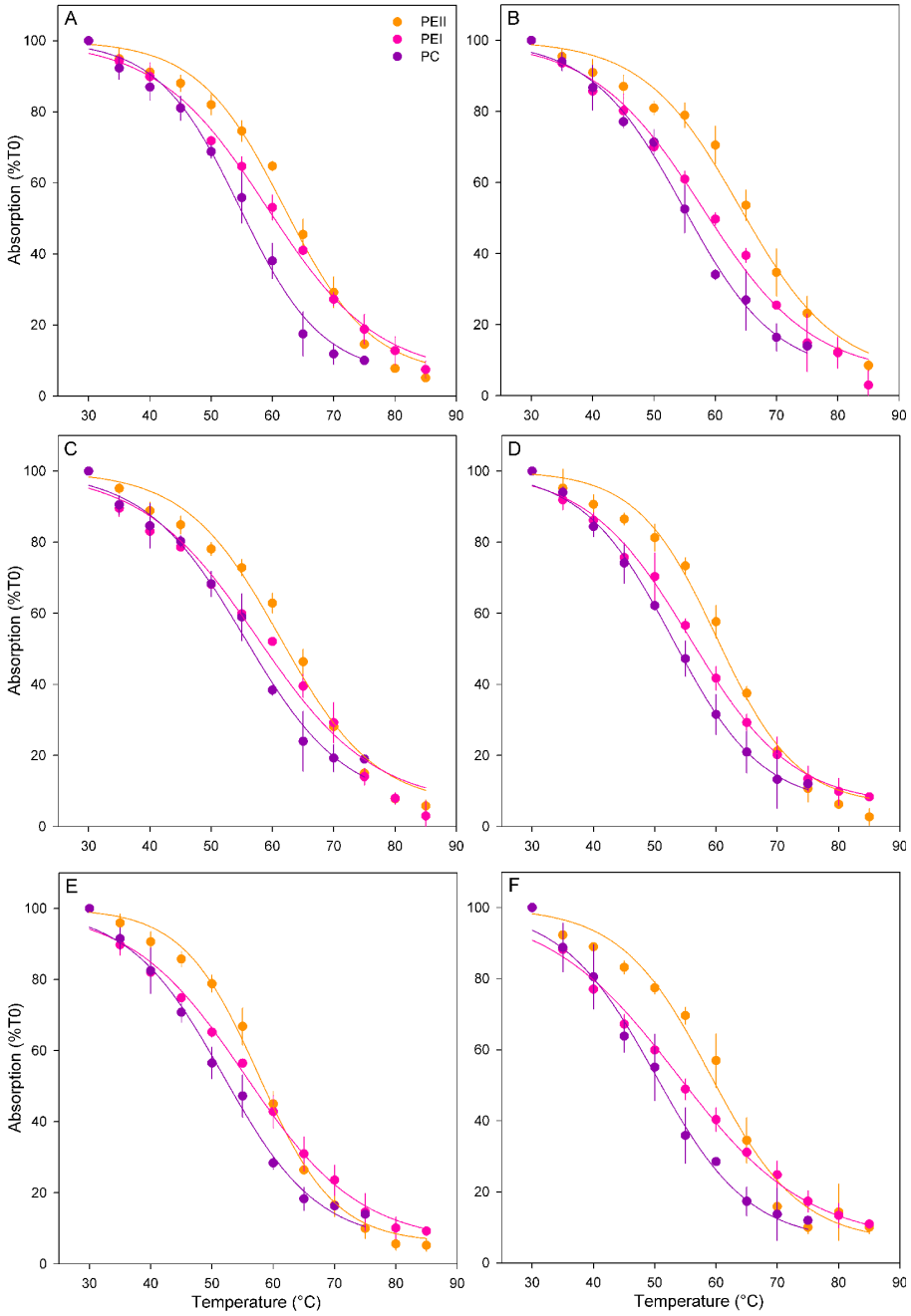


Figure S3: Temperature-induced decay of phycobiliprotein absorbance for six marine *Synechococcus* strains. Phycoerythrin II (orange), phycoerythrin I (pink) and phycocyanin (purple) absorption at 545 nm for the phycoerythrins and 620 nm for phycocyanin along thermal denaturation curves in marine *Synechococcus* spp. M16.1 (**A**), RS9907 (**B**), WH7803 (**C**), ROS8604 (**D**), MVIR-16-2 (**E**) and MVIR-18-1 (**F**). Unfolding curves allow the determination of $T_{50\%}$, defined as the temperature at which the phycobiliprotein has lost half of its absorption capacities. Standard deviations are calculated from the mean of three replicates.

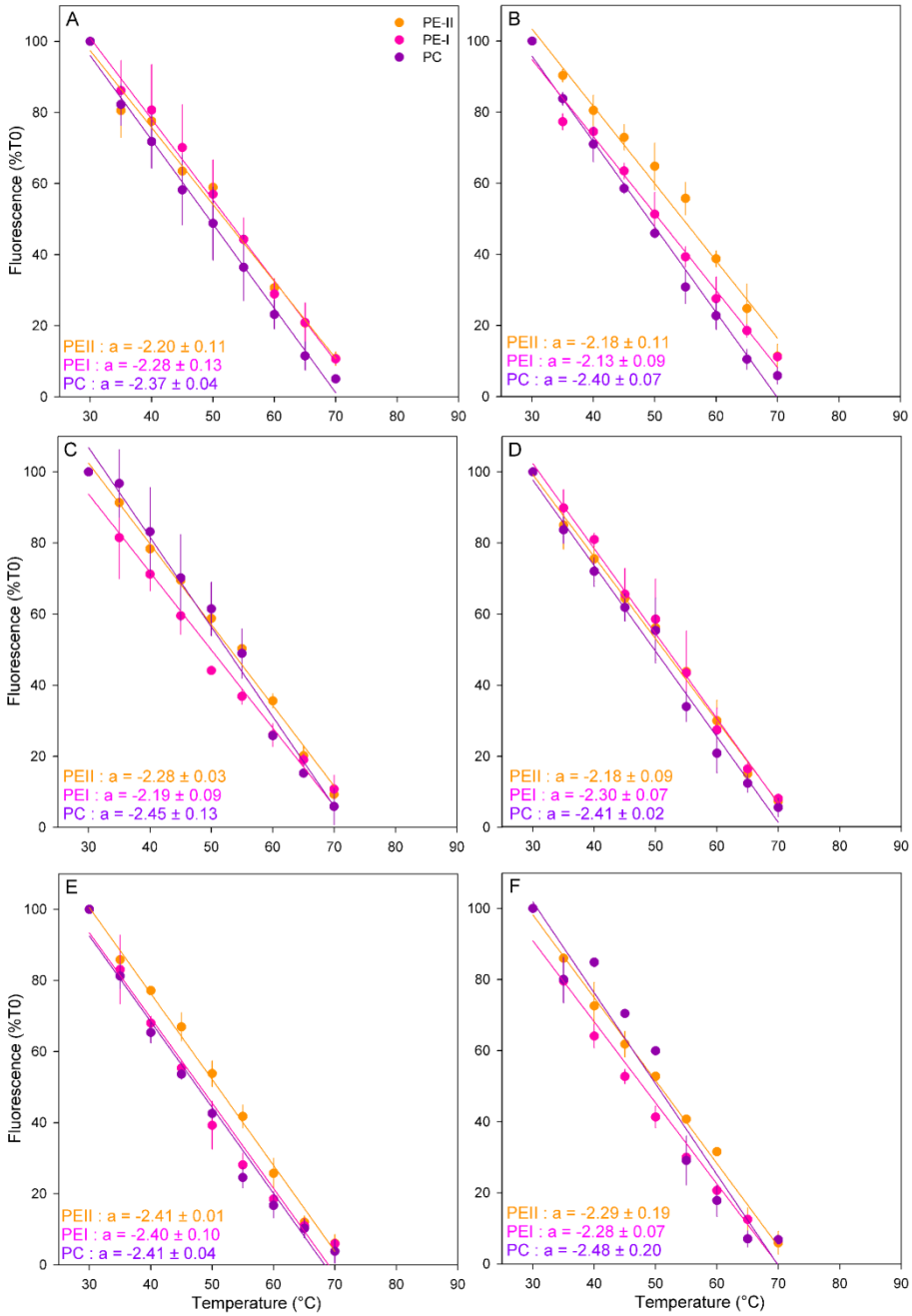


Figure S4: Variation of phycoerythrin II (orange) and I (pink) and phycocyanin (purple) fluorescence emission properties, upon excitation at 545 nm for phycoerythrins and 620 nm for phycocyanin, along thermal denaturation curves in marine *Synechococcus* spp. M16.1 (**A**), RS9907 (**B**), WH7803 (**C**), ROS8604 (**D**), MVIR-16-2 (**E**) and MVIR-18-1 (**F**). The extinction fluorescence slope for each phycobiliprotein is mentioned in inserts. Standard deviations are calculated from the mean of three replicates.

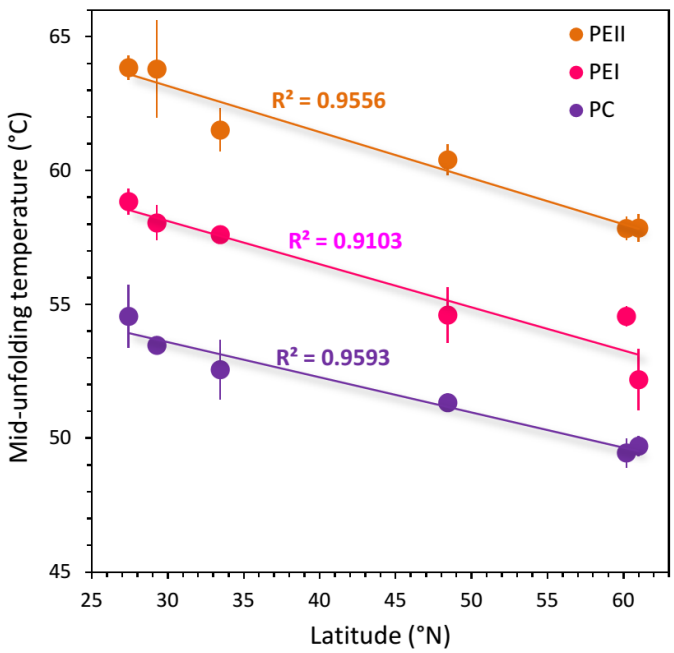


Figure S5: Mid-unfolding temperature ($T_{50\%}$) of phycoerythrin (PE) II, phycoerythrin I and phycocyanin (PC) as a function of isolation latitude of the six marine *Synechococcus* strains studied in this paper. For each phycobiliprotein and each strain, standard deviations are calculated from the mean based on three replicates.

```
RpcA                1                                                  50
    ROS8604         MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKGLTAKADS
    MVIR-18-1       MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAQASLEAAKGLTAKADS
    WH8016          MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKGLTAKADS
    WH8020          MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKGLTAKADS
    CC9311          MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLDAAKGLTAKADA
    BL107           MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKGLTSKAEA
    CC9902          MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKGLTSKADA
    M16             MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKALTSKADS
    TAK9802         MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKALTSKADS
    RS9902          MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKALTSKADS
    RS9907          MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKALTSKADS
    A15-44          MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEIQGAFGRFNRAKAALEAAKALTTKADT
    CC9605          MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKALTGKADS
    A15-62          MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKALTSKADS
    WH8109          MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKALTSKADS
    PROS-U-1        MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKALTSKADS
    WH8102          MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKALTSKADS
    WH8103          MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKALTSKADS
    A15-28          MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKALTSKADA
    BOUM118         MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKALTSKADS
    RS9915          MKTPLTEAVAAADSQGRFLSNTEVQAASGRFNRAKASLEAAKALTSKADS
RpcB
    ROS8604         MFDAFTKVVAQADARGQFISSSEIDALSAMVSDSDKRLDSVSRLSSNAST
    MVIR-18-1       MFDAFTKVVAQADARGQFISANEIDALAAMVSGSNKRLDAVSRISNNAST
    WH8016          MFDAFTKVVAQADARGQFISSSEIDALSAMVSDSDKRLDSVSRLSSNAST
    WH8020          MFDAFTKVVAQADARGQFISTSEIDALAAMVSGSNKRLDAVSRISNNAST
    CC9311          MFDAFTKVVAQADARGQFISASEIDALAAMVSGSNKRLDAVSRISNNAST
    BL107           MFDAFTKVVAQADARGQFISTSEIDALAAVVSDSNKRLDAVSRISSNAST
    CC9902          MFDAFTKVVAQADARGQFISTSEIDALAAVVSDSNKRLDAVSRISSNAST
    M16             MFDAFTKVVAQADARGQFISTSEIDALAAMVSDSNKRLDAVNRISSNAST
    TAK9802         MFDAFTKVVAQADARGQFISTSEIDALAAMVSDSNKRLDAVNRISSNAST
    RS9902          MFDAFTKVVAQADARGQFISTSEIDALAAMVSDSNKRLDAVNRISSNASS
    RS9907          MFDAFTKVVAQADARGQFISTSEIDALAAMVSDSNKRLDAVNRISSNAST
    A15-44          MFDAFTKVVAQADARGQFLNASEIDALAAMVSESNKRLDAVNRITSNASS
    CC9605          MFDAFTKVVAQADARGQFISTSEIDALAAMVSDSNKRLDAVNRISSNASS
    A15-62          MFDAFTKVVAQADARGQFISTSEIDALAAMVSDSNKRLDAVNRISSNASS
    WH8109          MFDAFTKVVAQADARGQFISTSEIDALAAMVSDSNKRLDAVNRISGNASS
    PROS-U-1        MFDAFTKVVAQADARGQFISTSEIDALASMVSDSNKRLDAVNRISSNASS
    WH8102          MFDAFTKVVAQADARGQFISTSEIDALAAMVSDSNKRLDAVNRISSNAST
    WH8103          MFDAFTKVVAQADARGQFISTSEIDALAAMVSDSNKRLDAVNRISSNAST
    A15-28          MFDAFTKVVAQADARGQFISTSEIDALAAMVSDSNKRLDAVNRISSNAST
    BOUM118         MFDAFTKVVAQADARGQFISTSEIDALAAMVSDSNKRLDAVNRISSNAST
    RS9915          MFDAFTKVVAQADARGQFISTSEIDALAAMVSDSNKRLDAVNRISSNAST
```

Figure S6: Amino acid sequences alignment of phycocyanin α and β-subunits showing the substitution of alanine in the warm-adapted clades II and III to glycine in the cold-adapted clades I and IV on residue 43 of RpcA (A) and asparagine to serine on residue 42 of RpcB (B). Substitutions are indicated by yellow highlighting, and clades are differently colored : clade I, light blue ; clade II, red ; clade III, orange ; clade IV, dark blue.

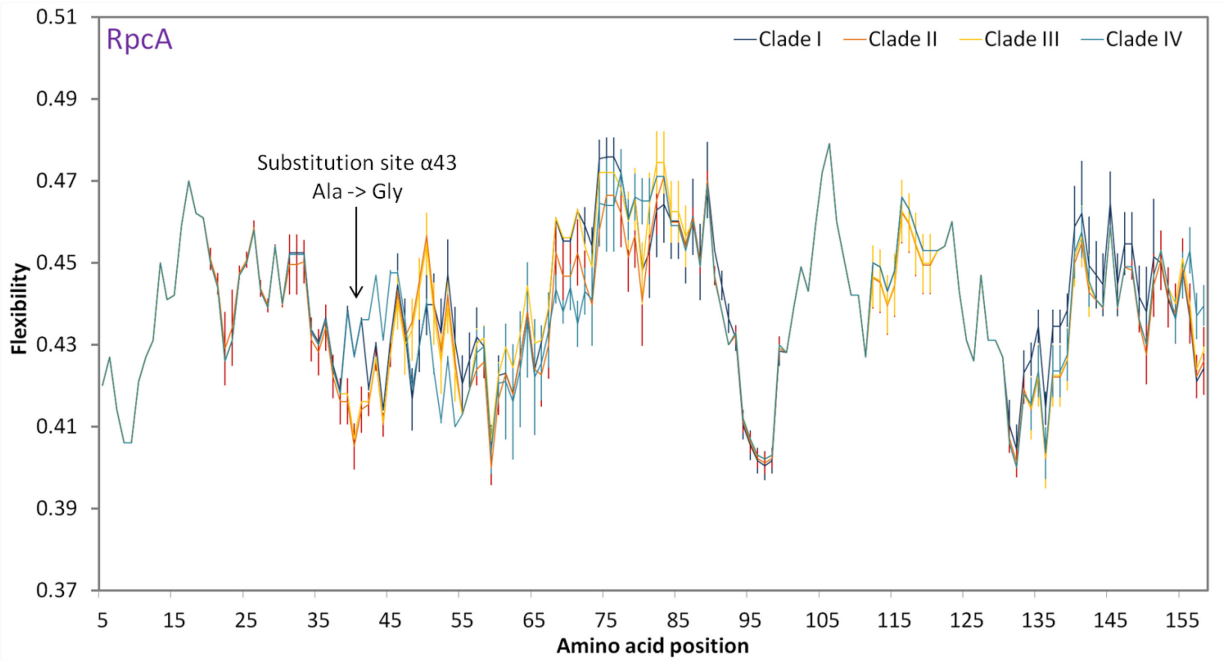


Figure S7: Average flexibility along the amino acid sequence of phycocyanin α-subunit (RpcA) for clades I (dark blue), II (red) III (yellow) and IV (light blue). Error bars are calculated from the mean of 5, 9, 5 and 2 sequences for clades I, II, III and IV, respectively. Flexibility was calculated using the Expasy tool ProtScal (1).

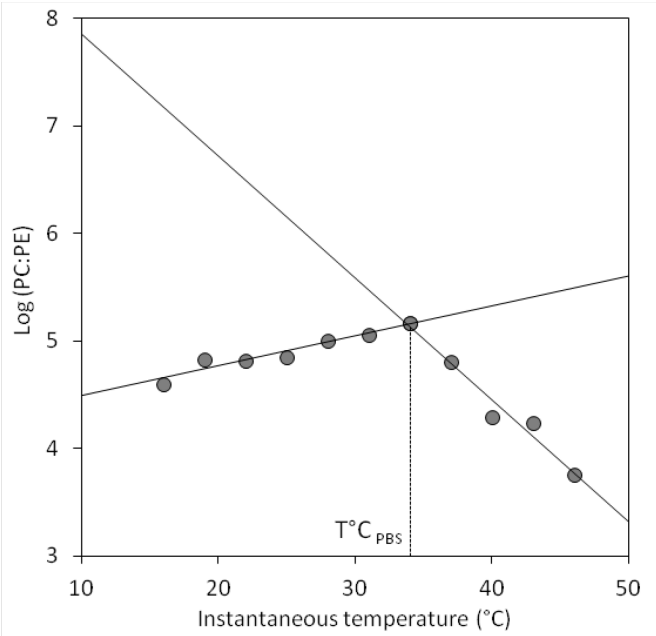


Figure S8: Example of determination of the phycobilisome (PBS) breaking temperature (T_{PBS}) of *Synechococcus* sp. MVIR-16-2 grown at 18°C. The logarithm of the phycocyanin to phycoerythrin fluorescence emission ratio (PC:PE) is related to rod phycobiliprotein coupling. The temperature at which PBS breaks down (T_{PBS}), determined in a similar way as Arrhenius calculation (2, 3) constitutes a proxy for assessing phycobilisome thermostability.

Table S1: Phycobiliprotein sequences used for comparative amino acid and structural analyses. The database compiled encompasses the sequences of the two subunits of 21 phycocyanin (RpcA, RpcB), 21 phycoerythrin I (CpeA, CpeB) and 20 phycoerythrin II (MpeA, MpeB). Accession numbers of the amino acid sequences are reported, and previously unpublished sequences are in bold.

Strain name	Clade	Pigment Type[1]	RCC[2] number	Iso. lat.	Iso. long.	Iso. temp.	RpcA	RpcB	CpeA	CpeB	MpeA	MpeB
CC9311	I	3dA	1086	31.9	-12.46	16.59	ABI45378	ABI47294	ABI45327	ABI46374	ABI45816	ABI45939
WH8016	I	3aA	2535	41.53	-70.67	17.83	EHA59372	EHA59373	EHA59379	EHA59378	EHA59384	EHA59385
ROS8604	I	3a	2380	48.43	-3.59	12.81	AHF23553	AHF23552	AHF23616	AHF23615	**KT955729**	**KT955719**
MVIR-18-1	I	3aA	2385	61.00	1.59	13.98	AGX70106	AHF23550	AHF23614	AHF23613	AGX70093	AGX70092
WH8020	I	3dA	2437	38.41	-69.19	16.89	AHF23549	AHF23548	AHF23612	AHF23611	AAA27333	AAA273332
M16.1	II	3a	791	27.42	-91.18	24.15	AHF23571	AHF23570	AHF23634	AHF23633	**KT955731**	**KT955721**
A15-44	II	2	2527	21.41	-17.50	22.61	AHF23587	AHF23586	AHF23650	AHF23649	n.a.	n.a.
RS9902	II	3c	2376	29.28	34.55	21.07	AHF23579	AHF23578	AHF23642	AHF23641	**KT955728**	**KT955718**
RS9907	II	3a	2382	29.28	34.55	28.99	AHF23573	AHF23572	AHF23636	AHF23635	**KT955727**	**KT955717**
TAK9802	II	3a	2528	-14.30	-145.2	29.81	AHF23575	AHF23574	AHF23638	AHF23637	**KT955725**	**KT955715**
WH8109	II	3bB	2033	39.29	-70.28	21.60	AHF62838	AHF62839	AHF62845	AHF62844	AHF62860	AHF62861
A15-62	II	3dB	2374	17.37	-20.57	26.02	AHF23577	AHF23576	AHF23640	AHF23639	**KT955733**	**KT955723**
CC9605	II	3c	753	30.41	-123.98	18.02	ABB34196	ABB34197	ABB34210	ABB34211	ABB34210	ABB34211
PROS-U-1	II	3dB	2369	30.80	-10.30	21.51	AHF23581	AHF23580	AHF23644	AHF23643	**KT955730**	**KT955720**
BOUM118	III	3c	2379	33.38	32.38	25.20	AHF23563	AHF23562	AHF23626	AHF23625	**KT955732**	**KT955722**
RS9915	III	3dB	2553	29.28	34.55	26.98	AHF23567	AHF23566	AHF23630	AHF23629	**KT955726**	**KT955716**
WH8102	III	3c	539	22.29	-65.36	25.78	CAE08538	CAE08537	CAE08531	CAE08532	CAE08524	CAE08523
WH8103	III	3cA	29	28.30	-67.23	25.45	AHF23565	AHF23564	AHF23628	AHF23627	CRY93003	CRY93002
A15-28	III	3c	2556	31.15	-20.43	25.15	AHF23569	AHF23568	AHF23632	AHF23631	**KT955734**	**KT955724**
CC9902	IV	3dA	2673	32.90	-117.25	15.56	ABB26866	ABB26865	ABB26851	ABB26850	ABB26851	ABB26850
BL107	IV	3dA	515	41.43	3.33	13.89	EAU70259	EAU70260	EAU70266	EAU70265	EAU70274	EAU70275

n.a.: not applicable (subunit not present in this strain).

[1] According to 4, 5

[2] RCC: Roscoff Culture Collection (http://roscoff-culture-collection.org/)

References cited in supplemental information

1. Gasteiger E*, et al.* (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The Proteomics Protocols Handbook*, ed Walker J (Humana Press), pp 571-607.
2. Stillman J & Somero G (1996) Adaptation to temperature stress and aerial exposure in congeneric species of intertidal porcelain crabs (genus Petrolisthes): correlation of physiology, biochemistry and morphology with vertical distribution. *The Journal of Expe Biol* 199(8):1845-1855.
3. Dahlhoff E, O'Brien J, Somero GN, & Vetter RD (1991) Temperature effects on mitochondria from hydrothermal vent invertebrates: evidence for adaptation to elevated and variable habitat temperatures. *Physiol Zool* 64(6):1490-1508.
4. Humily F*, et al.* (2013) A Gene Island with two possible configurations is involved in chromatic acclimation in marine *Synechococcus*. *Plos One* 8(12):e84459.
5. Six C*, et al.* (2007) Diversity and evolution of phycobilisomes in marine *Synechococcus* spp. - a comparative genomics study. *Genome Biol* 8(12):R259.

Annexe: Purifying phycobiliproteins

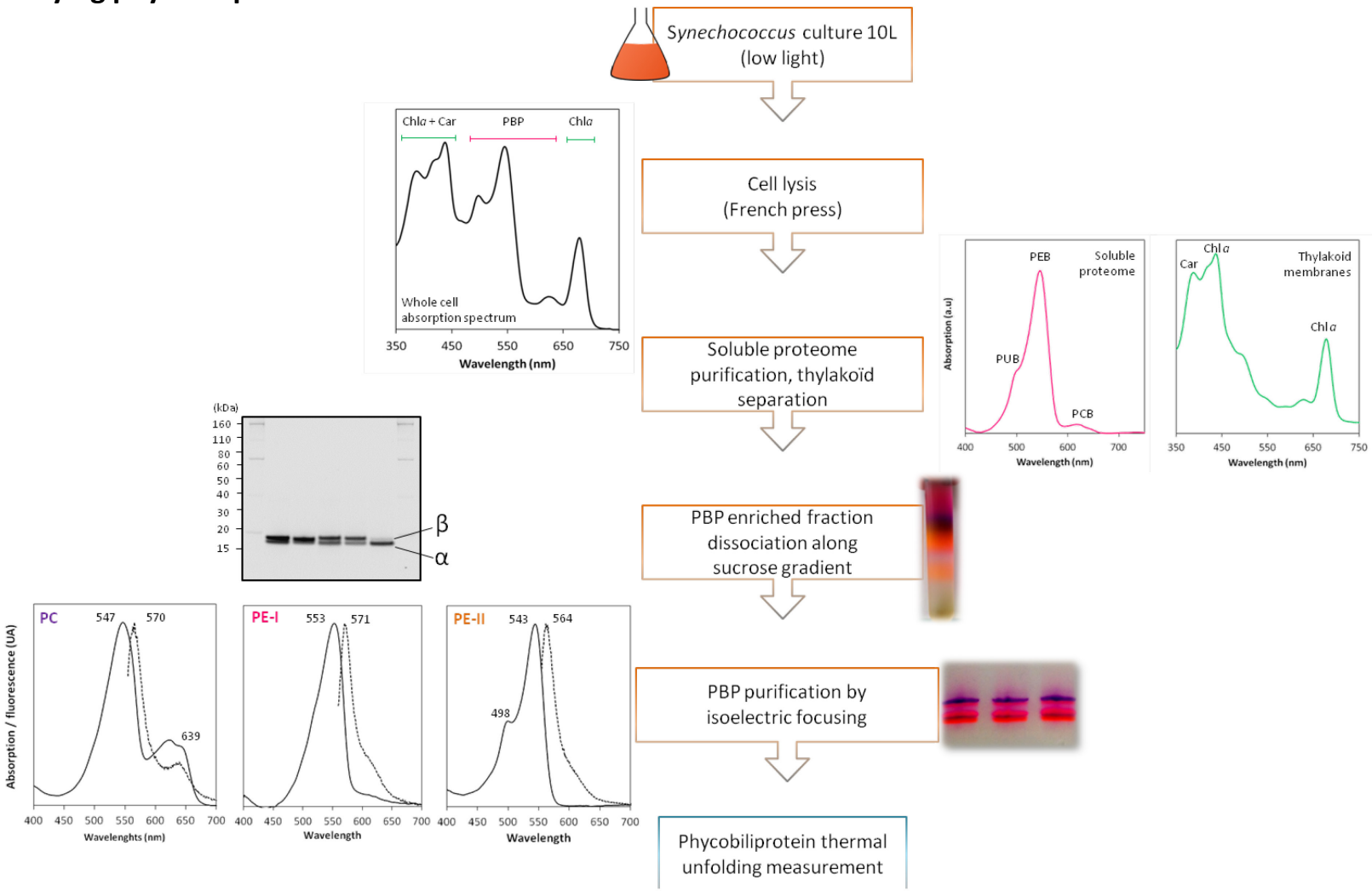


Figure 64| Phycobiliprotein purification steps in marine *Synechococcus* displaying pigment type 3a. *Synechococcus* cells were cultivated in 10L carboys. Cell pellets were harvested and then lysed using a French press system. Then, the soluble proteome fraction was separated from the thylakoid membranes by ultracentrifugation on a sucrose cushion. The proteome fraction was dissociated along a 5-30% sucrose gradient and the distinct phycobiliproteins were further purified by isoelectric focusing. The degree of purity was assessed by SDS-page and by absorption spectra. PBP, phycobliliprotein; Car, carotenoid.

III.

FUNCTIONAL THERMOSTABILITY OF THE REACTION CENTER II

1. Context of the work

The light energy harvested by the PBS is devoted to be transferred to the RCII, which carries out the charge separation that induces the photosynthetic electron transport. The RCII is a large homodimeric protein-cofactor complex located in the photosynthetic thylakoïds membrane that acts as light-driven plastoquinone oxidoreductase (*cf.* introduction). It includes 35 chl *a*, 12 carotenoid molecules, 25 lipids and about 20 protein subunits (Guskov et *al.* 2009). Among them, 16 are transmembrane proteins located within the thylakoids and are largely conserved from cyanobacteria to vascular plants.

A number of studies have investigated the effect of heat on the RCII (Aminaka et *al.* 2006, Rokka et *al.* 2000, Inoue et *al.* 2001, Kimura et *al.* 2002, Nishiyama et *al.* 2006). These works reported relatively low capacities of acclimation of the RC activity in response to temperature changes in *Synechocystis* sp. PCC6803 (Inoue et *al.* 2001), and proposed that heat induces inactivation of the RCII primarily by OEC disruption (Thompson et *al.* 1989). However, no investigation has never been lead on marine *Synechococcus*. Our previous works suggest that the regulation of PSII activity is crucial for temperature acclimation during cold stress (Pittera et *al.* 2014). In addition, during temperature response curves, RCII appears to be the first PSII complex whose functioning is affected (Pittera et *al.* submitted). To better understand the importance of RCII stability and physiology in the response to temperature, we have compared the functional stability of RCII activity among the same six marine *Synechococcus* strains isolated at different latitudes. In a second part, we used the *Synechococcus* sp. WH7803 model strain to study the general regulation of RCII light utilization and repair cycle in response to a sharp increase and decrease of temperature. In the frame of these preliminary results, we then discuss possible hypotheses involved in the RCII thermoadaptation in marine *Synechococcus*, and provide future interesting research directions that would be worth exploring.

2. Methodological approach

The marine *Synechococcus* strains used here were the same as in Pittera et *al.* (submitted), grown in identical conditions. For each acclimation temperature, *Synechococcus* cultures in mid exponential growth phase were placed in a temperature controlled bath at growth temperature, in the dark, and temperature was progressively increased by 3°C steps of 10 min, up to 46°C. At the end of each temperature level, the *in vivo* RCII quantum yield (F_V/F_M) was measured upon weak modulated light excitation at 520 nm, using a Pulse Amplitude Modulation fluorimeter (Phyto-PAM, Walz) equipped with a temperature controlled cuvette holder and connected to a chart recorder (Labpro, Vernier). The maximal fluorescence level (F_M) was measured under bright red light (655 nm, 2000 µmol photons m^{-2} s^{-1}; F_M) in the presence of 100 µM of the PSII blocker (DCMU) by triggering saturating light pulses (655 nm; 5000 µmol photons m^{-2} s^{-1}). The RCII quantum yield was calculated as:

$$F_V/F_M = \frac{(F_M - F_0)}{F_M}$$

where F_0 is the basal fluorescence level and F_V is the variable fluorescence (Campbell et *al.* 1998, Six et *al.* 2007, 2009). PSII quantum yield was plotted against instantaneous temperature and a sigmoid curve was fitted using the following equation:

$$y = \mathrm{b} + \frac{a - \mathrm{b}}{1 + 10^{(\log T_{50\%})s}}$$

where *a* is the maximum quantum yield, *b* the minimum one, and *s* the slope. The RCII mid-inactivation temperature, RCII T50%, *i.e* the temperature at which the RCII has lost half of its efficiency, was determined using the Sigma plot software 10.0 (Fig. 65).

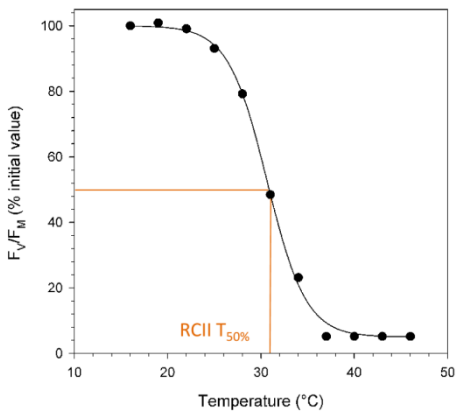


Figure 65 | Variations of reaction center II efficiency along a rapid temperature increase allowing the determination of RCII $T_{50\%}$. The example presented here is *Synechococcus* sp. WH7803 acclimated at 22°C.

3. First results and discussion

Prior to the rapid temperature increase, RCII quantum yield was measured at each acclimation temperature for the six strains (Fig. 66). Plotting F_V/F_M over acclimation temperature revealed that RCII efficiency is optimal in a specific and rather narrow range of temperature. While the optimal F_V/F_M value was similar for the six strains (~0.60), the optimal temperature for RCII efficiency was different. The tropical and temperate strains *Synechococcus* spp. M16.1, RS9907, WH7803 and ROS8604 displayed optimal RCII efficiency at 25-28°C whereas the optimal temperature of the subpolar strains was located 16-22°C (Fig. 66).

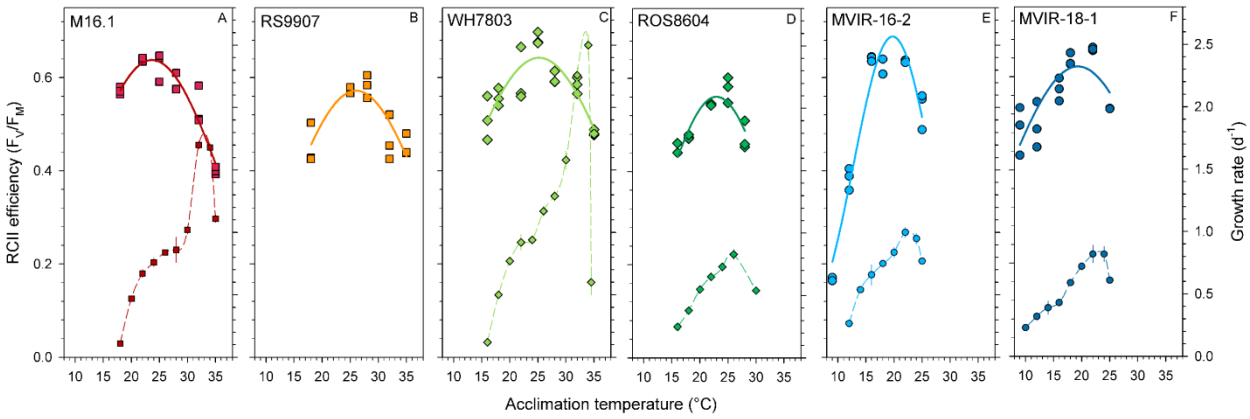


Figure 66 | Reaction center II efficiency and growth rates as a function of growth temperature in six marine *Synechococcus* strains. When available, the growth rate values are indicated (retrieved from Pittera et *al.* 2014.) Three replicates are shown for the reaction center II photosynthetic efficiency (F_V/F_M). Tropical strains are represented by squares, temperate ones by diamonds, and subpolar strains by circles.

For the tropical and subtropical strains, the F_V/F_M increased and reached near maximal values at lower temperatures than growth rates did. This trend is similar to the results of Mackey and collaborators (2013), who also reported a lag between optimal temperature for RCII efficiency and optimal growth (Fig. 66AC). This suggests that at temperatures where growth is optimal even if the RCII efficiency decreases, the photosynthetic electron transport does not limit the growth in these strains. By contrast, in cold-adapted clade I strains, the maximal RCII efficiency was quite coordinated with the optimal growth temperature (Fig. 66DEF). This indicates that, in these strains, the regulation of photosynthesis is tightly coordinated with the variations in metabolic needs induced by temperature, providing more electrons when growth can be rapid and less when growth is lowered (Mackey et *al.* 2013). However, for all strains, low and high temperatures induce a significant decrease of the RCII quantum yield. This can be interpreted as the result of stress induced photoinhibition, and/or the induction of processes such as state transitions and OCP-mediated non photochemical

quenching of fluorescence, which can quench the excessive energy and reduce PSII excitation, therefore reducing PSII efficiency.

Likewise, the decrease in RCII efficiency observed in the six marine *Synechococcus* strains in the low temperature range might be due to the D1 isoform switch (see introduction), with a higher proportion of D1:2 at low temperature. Most of the studies on D1 isoform function in response to temperature have indeed shown that D1:2 isoform increases relative to D1:1 at low temperature (Campbell et *al.* 1996). Given that the D1:2 isoform is induced in HL (Campbell et *al.* 1996, Garczarek et *al.* 2008), it is indeed not surprising that it is expressed at low temperature, a condition which is photophysiologically similar. Interestingly, looking at the number of gene copies encoding the D1:2 isoform in the genome of the marine *Synechococcus* studied here, it appears that clade I strains have a higher number of D1 encoding genes (respectively 7 and 5 for *Synechococcus* spp. ROS8604 and MVIR-18-1; the genome of MVIR-16-1 has not been sequenced) than the low latitude strains (respectively 3-4 for *Synechococcus* spp. WH7803, M16.1 and RS9907).This trend is further extendable at the clade level as a preliminary inspection of 42 *Synechococcus* genomes suggests that all clade I and IV strains have 3 to 6 copies of the genes encoding D1:2 (Fig. 67; with respective means of 3.83 ± 1.17 and 3.5 ± 0.71), while strains from clades II and III have 2-3 copies (Fig. 67; respective means 2.27 ± 0.48 and 2.38 ± 0.52)., It should however be noted that the low number of clade IV genomes (2) does not allow reliable statistics on this clade. Clade I has however a significantly higher number of D1:2 gene copies than clade II and III (Anova, F = 7.33, *pvalue* = 0.0013). The D1:2 amino acid sequences copies are nearly identical among marine *Synechococcus* strains (99 – 100 % identity; Garczarek et *al.* 2008) and show both in marine and freshwater cyanobacteria an extremely low level of divergence within genomes (Garczarek et *al.* 2008). According to these authors, this shows that D1:2 have undergone concerted evolution, which refers to the tendency of the different genes in a gene family to evolve simultaneously. This would have lead to the presence of multi-copies of D1:2 encoding *psbA* genes, which allow sudden and drastic increase of the *psbA* transcript pool under the conditions requiring efficient PSII repair (Garcarek et *al.* 2008, Kos et *al.* 2008). Therefore, the fact that clades I and IV have a higher number of gene copies encoding D1:2 could constitute an adaptation, possibly allowing the RC to counteract photoinhibition at lower temperature than clade II and III can do.

Furthermore, the topology of the D1:2 phylogeny is distinct from the *Synechococcus* core phylogeny. Indeed, while the clades II, III and IV are still forming the monophyletic sub-cluster 5.1B, the groups 5.1A is paraphyletic with clade I and cluster 5.3 branching away from clades V, VI, VIII and CRD-1 suggesting the possibility for recombination events such as lateral gene transfer between strains. Previous studies have shown that most *Synechococcus* cyanophages genomes contain a *psbA* gene, closely related to the one of their host, suggesting that phage mediated genetic exchanges could have occurred among strains (Zeidner et *al.* 2005, Sullivan et *al.* 2006). Sullivan and coworkers suggest that

such lateral *psbA* transfers could be one of the reasons explaining the incongruent phylogeny of *Synechococcus psbA* genes compared to the one of housekeeping genes such as the ribosomal protein ones.

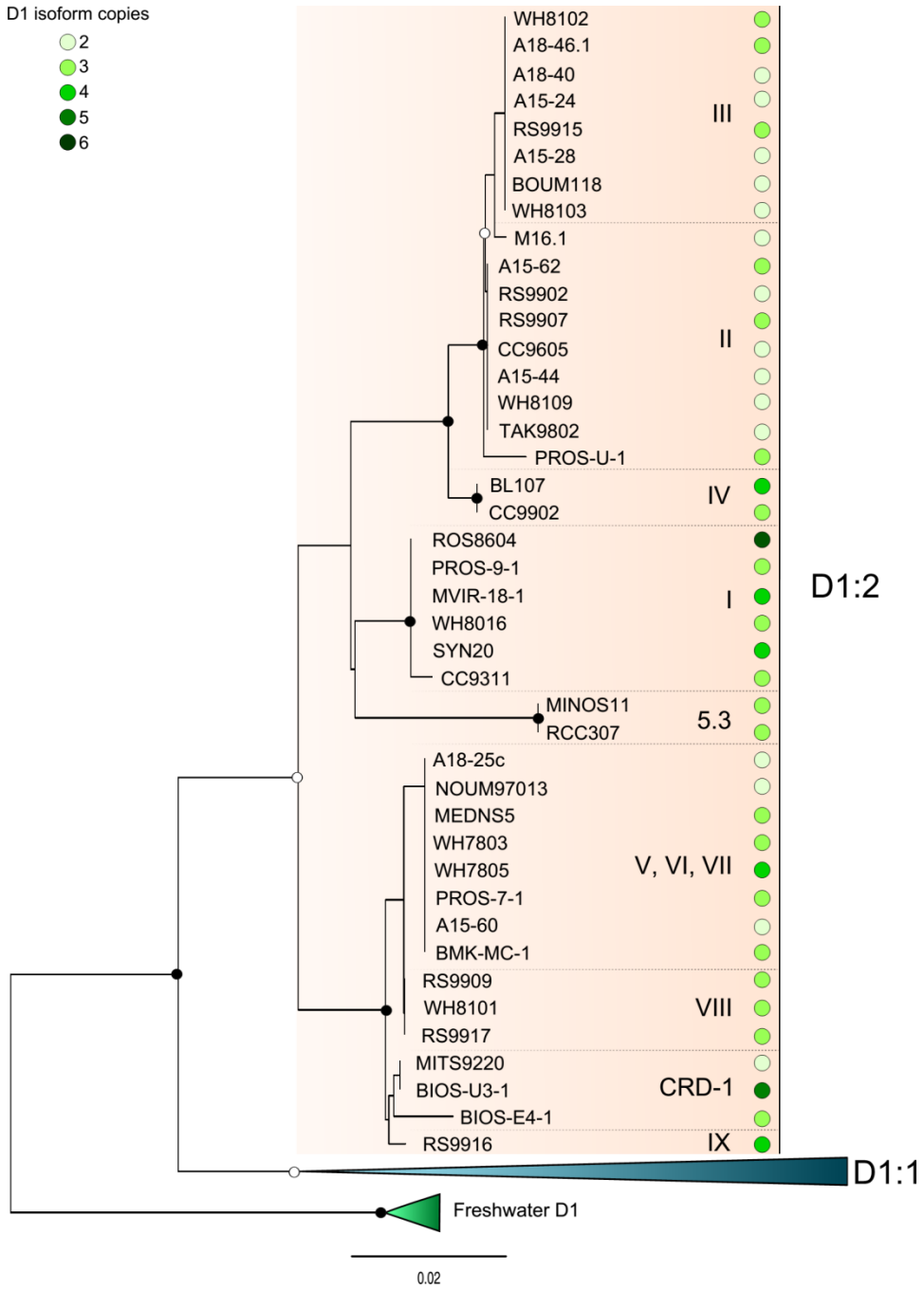


Figure 67 | Neighbor joining analysis of the aminoacid sequences of the D1 isoform proteins in marine *Synechococcus*. This phylogeny is based on the alignment of 84 amino acids sequences retrieved from the marine *Synechococcus* genomes available in the Cyanorak v2 database. Bootstraps values are based on 500 repetitions. Empty circles correspond to nodes supported by values higher than 70% and filled circles to nodes supported at 100%. The amino acid sequences from the freshwater cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 were retrieved from Cyanobase (http://genome.microbedb.jp/cyanobase/) and used as outgroup. The colored dots show the number of gene copies of the D1:2 isoform.

There is unfortunately a lack of data concerning the function of cyanobacterial D1 isoforms in the response to high temperature. The PSII repair mechanism, however, is an enzymatic process that is notably controlled by two key proteases: DegP2, performing the primary D1 protein cleavage (Haußühl et *al.* 2001), and FtsH, which removes the damaged protein (Lindahl et *al.* 1996, 2000). These enzymes probably work optimally within a specific thermal range, which could be different among the *Synechococcus* thermotypes. When grown at temperature far from the optimum, the efficiency of these enzymes could be severely reduced, thereby limiting the PSII repair cycle and leading to an accumulation of inactivated PSII.

For each acclimation temperature, we measured the RCII thermal stability. When measured in the dark, temperature response curves can provide indications on the thermostability of the RCII under resting conditions, without any interference with the complex photochemical reactions. Along a rapid temperature increase, the RCII efficiency decreased following a sigmoid curve (*cf.* methods Fig. 65), allowing the calculation of the RC mid inactivated temperature, RCII $T_{50\%}$, used as a *proxy* for its thermal stability. The decrease in RCII photosynthetic efficiency might be attributable to the OEC susceptibility to high temperature (Enami et *al.* 1994, Kimura et *al.* 2002), which is thought to be a primarily affected site during heat stress. Indeed, successive detachment of proteins constituting the OEC leads to the inactivation of the RCII (*cf.* introduction). The functional thermostability increased with acclimation temperature, without reaching any plateau (Fig.68). Similar variations were shown in *Synechocystis* sp. PCC 6803, which increased the RCII thermostability when acclimated at 25°C and 35°C (Inoue et *al.* 2001).

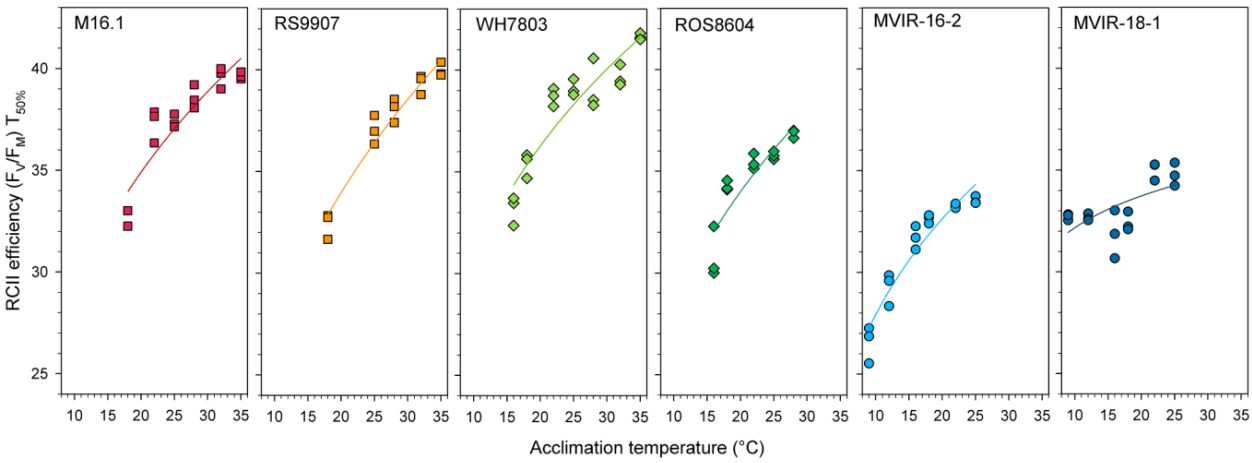


Figure 68 | Reaction center II mid-inactivation temperature function of acclimation temperature. The reaction center mid inactivation temperature $T_{50\%}$ was determined along temperature response curves, as a function of growth temperature in the six marine *Synechococcus* strains. For each acclimation temperature, three replicates are shown. Tropical strains are represented by squares, temperate ones by diamonds, and subpolar strains by circles.

Besides this process common to all strains, it is worth noting that the six marine *Synechococcus* displayed distinct $T_{50\%}$ values, with the low latitude ones exhibiting the highest RCII thermotolerance, with a minimum value at about 32°C in cultures acclimated at 18°C, and a maximum RCII $T_{50\%}$ of 40-41°C for cultures acclimated to 35°C. The RCII of the cold temperate strain ROS8604 displayed intermediate thermotolerance, ranging from 31°C when acclimated to 16°C to 37°C when acclimated to 28°C. The subpolar strains MVIR-16-2 and MVIR-18-1 exhibited the most heat sensitive RC, displaying RCII $T_{50\%}$ ranging from 26°C in cultures acclimated at 9°C to 34°C at 25°C.

The precise molecular process(es) explaining the observed increase in RC thermostability function of temperature remain(s) mysterious, and this is probably one of the key issues for future research. Among the possible hypotheses, the involvement of strain specific protein factor(s) synthesized in response to warm temperatures, which would enhance the thermal stability of the oxygen evolving machinery, should be considered (Kimura et *al.* 2002). In addition, given that small proteins such as PsbU, PsbV and PsbQ are involved in the stabilization of the RC (Kashino et *al.* 2006), and that deletion of PsbU in *Synechococcus* sp. PCC 7002 results in a complete loss of the ability to enhance OEC thermal stability (Nishiyama et *al.* 1999), we hypothesize that the rate of synthesis of these low molecular mass polypeptides could increase under warm temperature and therefore further stabilize the OEC. Another possible hypothesis that could influence the RCII thermostability is again the D1 isoform switch. Indeed, previous data reported D1:2 induction in cold conditions (Campbell et *al.* 1995, Sane et *al.* 2002), at which we show here that RCII $T_{50\%}$ is the lowest (Fig. 68). Therefore one may hypothesize that this isoform would be less thermostable than the counterpart D1:1. The D1:2 would then provide more resistance to photoinactivation than D1:1, but less photosynthetic efficiency and thermostability.

At last, another plausible hypothesis is the involvement of HSPs. These proteins constitute a widespread and diverse class of molecular chaperone proteins that assist the covalent folding/unfolding and the assembly/disassembly of macromolecular structures (see introduction). In cyanobacteria, two HSPs seem to be particularly important in the acquired thermotolerance of a given strain: HtpG (a homologue of HSP90; Sato et *al.* 2010), and ClpB (a homologue of HSP100; Porankiewicz & Clarke 1997), as their deletion severely decreased cyanobacteria innate and acquired thermotolerance (Tanaka & Nakamoto 1999, Rajaram et *al.* 2014). It has been suggested that these polypeptides are involved in the PBS stabilization (Sato et *al.* 2010), that could then possibly influence the RC efficiency. Preliminary investigations in the Cyanorak v2 database suggest that all the *Synechococcus* genomes encode these two HSP. However it is possible that the thermal range activity of these enzymes vary among different thermotypes.

IV.

REACTION CENTER II REPAIR CAPACITY IN RESPONSE TO TEMPERATURE

In the frame of the ANR project *SAMOSA*, we have studied the response of the model strain *Synechococcus* sp. WH7803 to short term temperature variations, as a first step towards the study of different strains/ecotypes. To go further in the understanding of the PSII acclimation capacities to temperature, in the following section we focus our interpretation and discussion on the variations of the RCII photoinactivation and repair rates in response to temperature variations.

1. Strain selection and experimental design

a. *Strain selection*

The strain *Synechococcus* sp. WH7803 has been selected for several reasons, including the availability of its complete genome sequence (Dufresne et *al.* 2008), the numerous published physiology studies on this strain (*e.g.* Kana & Glibert 1987, Kana et *al.* 1988, Donald et *al.* 1997, Moore et *al.* 2005, Jia et *al.* 2010, Pittera et *al.* 2014) including a number of transcriptomic studies (Blot et *al.* 2011, Garczarek et *al.* 2008, Mella-Flores et *al.* 2012), which makes it the best physiologically characterized marine *Synechococcus* strain to date. Furthermore, *Synechococcus* sp. WH7803 was isolated at mid-latitude from mesotrophic waters in the North Atlantic Ocean, an isolation site exhibiting intermediate characteristics along coast-offshore and equator-pole gradients. This strain belongs to a lineage that is not seemingly very abundant *in situ* (Zwirglmaier et *al.* 2007, 2008, Sohm et *al.* 2015) and several ecologically more relevant strains will be also studied later on.

b. *Experimental design and flow cytometry analysis*

Synechococcus sp. WH7803 was grown in 10 L carboys, under low light (LL, 20 µmol photons m^2 s^{-1}) and high light (HL, 250 µmol photons m^2 s^{-1}) at 22°C. Once the mid-exponential growth phase

was reached, the culture was split into 500 mL aliquots, one for each sampling time point. These subcultures were then submitted to several sharp environmental variations: low (13°C) and high (30°C) temperature, UV (3 W m^{-2} UV-A and 0.3 W m^{-2} UV-B) and HL. Here we discuss only the temperature results. The strategy of sampling was adjusted depending on the predicted kinetics of the response to stress, which mostly depended on light irradiance. Therefore, temperature experiments under LL lasted 96h, while HL experiments were achieved in 24h. At each time point, a panel of live measurements and samplings were realized in order to assess a number of physiological measurements (Table 4). In this section, only the variations in cell density, photosynthesis biophysics, (PBS energy transfer efficiency, PSII efficiency and PSII repair) are discussed.

Table 4 | Physiological measurements carried out during low and high temperature shifts on *Synechococcus* sp. WH7803 cultures acclimated to low or high light. Only the results from the measurements mentioned in bold are discussed in this section. Results of lipid analyses are discussed in chapter III. PAM: Pulse Amplitude Modulated; LC: Liquid Chromatography; MS: Mass Spectrometry; GC: Gas Chromatography; FID: Flame Ionization Detection; HPLC: High Pressure Liquid Chromatography; RNA seq: RNA sequencing.

Physiological measurement	Instrument	Analyzed
Cell concentration	Flow cytometry	Yes
PBS energy transfer efficiency	Spectrofluorimetry	Yes
PSII efficiency (F_V:F_M)	PAM fluorimetry	Yes
PSII repair	Lincomycin-PAM fluorimetry	Yes
Lipid Polar heads	LC-MS/MS	On going
Fatty acids	GC-FID	Yes
Proteins	Quantitative immunology	No
Chl *a* and carotenoids	HPLC	No
Whole Transcriptome	RNA Seq	No

The cytometry and fluorimetry measurements were assessed in the same way as previously described (Six et *al.* 2007, Mella-Flores et *al.* 2012, Pittera et *al.* 2014). For the PSII repair rate measurements, a culture aliquot was sampled at each time point and brought up to 500 µg mL^{-1} lincomycin, an inhibitor of the prokaryotic protein translation, blocking the D1 protein synthesis and therefore the PSII repair (Six et *al.* 2007, Mella Flores 2012). The culture aliquot was then placed back under light and the F_V:F_M parameter was measured at 0, 15, 30 and 60 minutes of incubation in the presence/absence of lincomycin, in order to determine the photoinactivation rate. The PSII repair rate was calculated as the difference between the exponential PSII efficiency decay rates with and without PSII repair (Fig. 69 ; Six et *al.* 2007, Mella Flores 2012).

For each time point, the photoinactivation cross section σ_i, which reflects the probability for a photon to photoinactivate one RCII, was calculated on lincomycin-treated cultures as the RCII efficiency decay function of the cumulated photon irradiance over one hour.

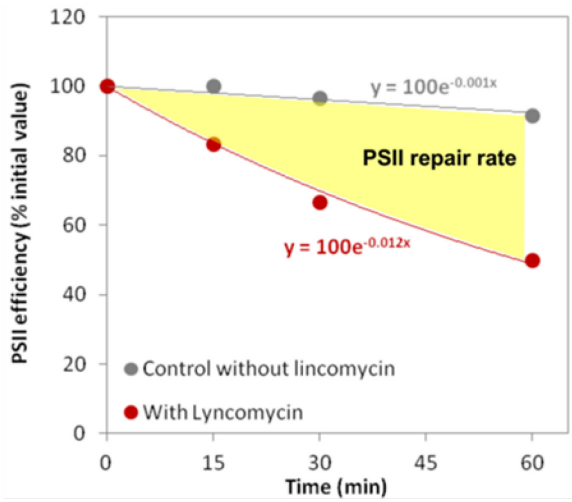


Figure 69 | Calculation of photosystem II repair rate. The photosystem II repair rate is calculated as the difference of photosystem II efficiency between cultures with active photosystem II repair and cultures with inhibited PSII repair (lincomycin treated).

2. Results

When the LL and HL acclimated cultures were transferred to LT, the cell density decreased during all the experiment, dropping to 27 ± 20 % of the initial cell density after 96 hours for LL cultures, and to 50 ± 25 % after 24 hours for HL cultures. The LL and HL cultures displayed mortality rates of about 0.45 ± 0.15 d^{-1} and 0.95 ± 0.38 d^{-1}, respectively. By contrast, when shifted to HT, *Synechococcus* sp. WH7803 cultures reached cell densities 373 ± 223 % and 346 ± 110 % higher than at the initial conditions, after 4 and 1 days for LL and HL cultures, respectively. This corresponded to growth rates of 0.37 ± 0.04 d^{-1} and 1.13 ± 0.35 d^{-1}. These values are similar to growth rate values of WH7803 cells acclimated to 22°C under LL (0.42 ± 0.03 d^{-1}) and HL (1.15 ± 0.03 d^{-1}).

The PE:PC *ratio*, used as a *proxy* of the energy transfer efficiency along the PBS rod, strongly increases until 250% in LT in the first 24h for LL cultures and 12h for HL cultures. This increase in PE:PC originates in a large increase in the PE fluorescence, revealing strong fluorescence leaks at the PE to PC junction. At the end of the experiment, the PBS fluorescence emission spectra were identical to pure PE fluorescence spectra, indicating the disconnection of this PBP from the PBS and the probable dismantling of the whole complex. No PBS structural changes were observed following the transfer to HT, indicating that the PBS energy transfer and the PBP coupling was not affected. RCII efficiency was measured by PAM fluorimetry upon the temperature changes. During the downward temperature shift, RCII efficiency decreased in both LL and HL cultures, but following distinct rates. Indeed, in LL cultures, the PSII efficiency decreased to a minimum value of 55% of the initial efficiency after 2 days at 13°C and then somewhat stabilized until the end of the experiment. In HL cultures, the F_V:F_M

decreased along all the experiment down to 28% of its initial value. By contrast, cells transferred to HT kept near optimal PSII efficiency (Fig. 70).

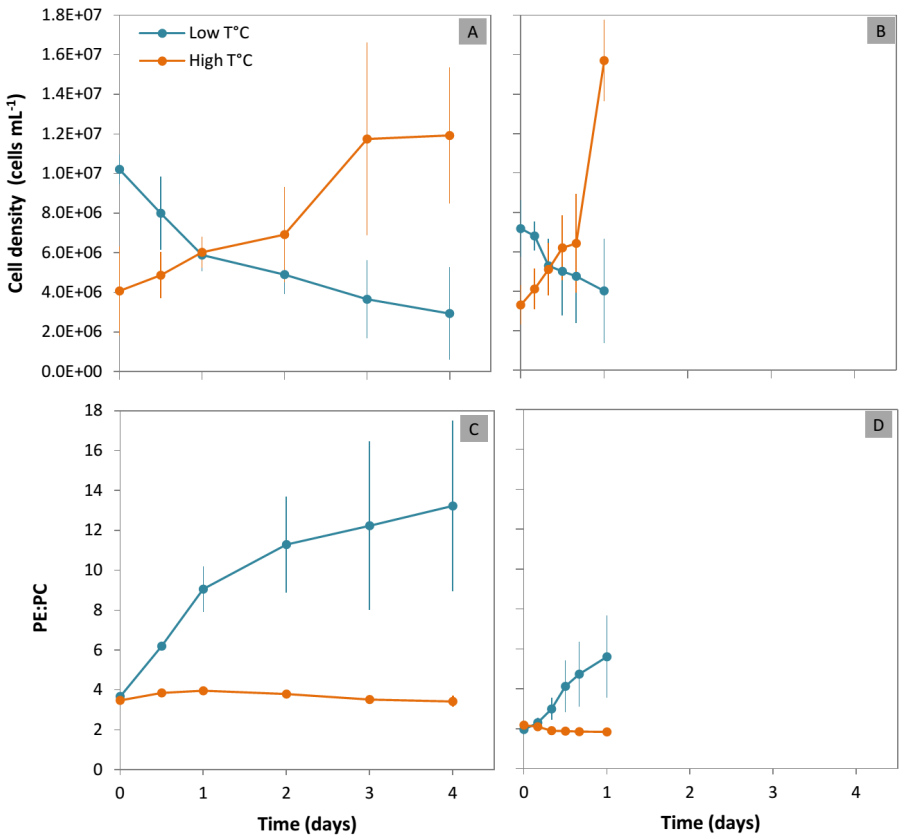


Figure 70 | Cell density and photophysiological measurements along low and high temperature shifts for low and high light acclimated cultures of *Synechococcus* sp. WH7803. Cell density and Phycoerythrin to Phycocyanin fluorescence emission ratio are represented along low (blue) and high (orange) temperature shift experiment for cultures acclimated under low light (left panels **A**, **C**)) and high light (right panels **B**, **D**).

Once transferred to LT, the PSII repair rate remained fairly stable during the 4 days of experiment in the LL cultures but dramatically dropped after 12 hours in HL cultures (Fig. 71). Upon the shift to 30°C the PSII repair rate increased in both the LL and HL cultures, with a much stronger increase under high irradiance (Fig. 71).

The PSII photoinactivation cross section σ_i displayed only moderate variations along the temperature experiments at the two light regimes. Under LL, the variations were difficult to measure because of the very low photon flux and the results show non significant differences. This suggests that the RCII susceptibility to light driven inactivation remained fairly constant over the four days. In HL cultures, there was a decrease of the RCII photoinactivation cross section following the transfer to LT, and a slight increase in the HL cultures transferred at 30°C.

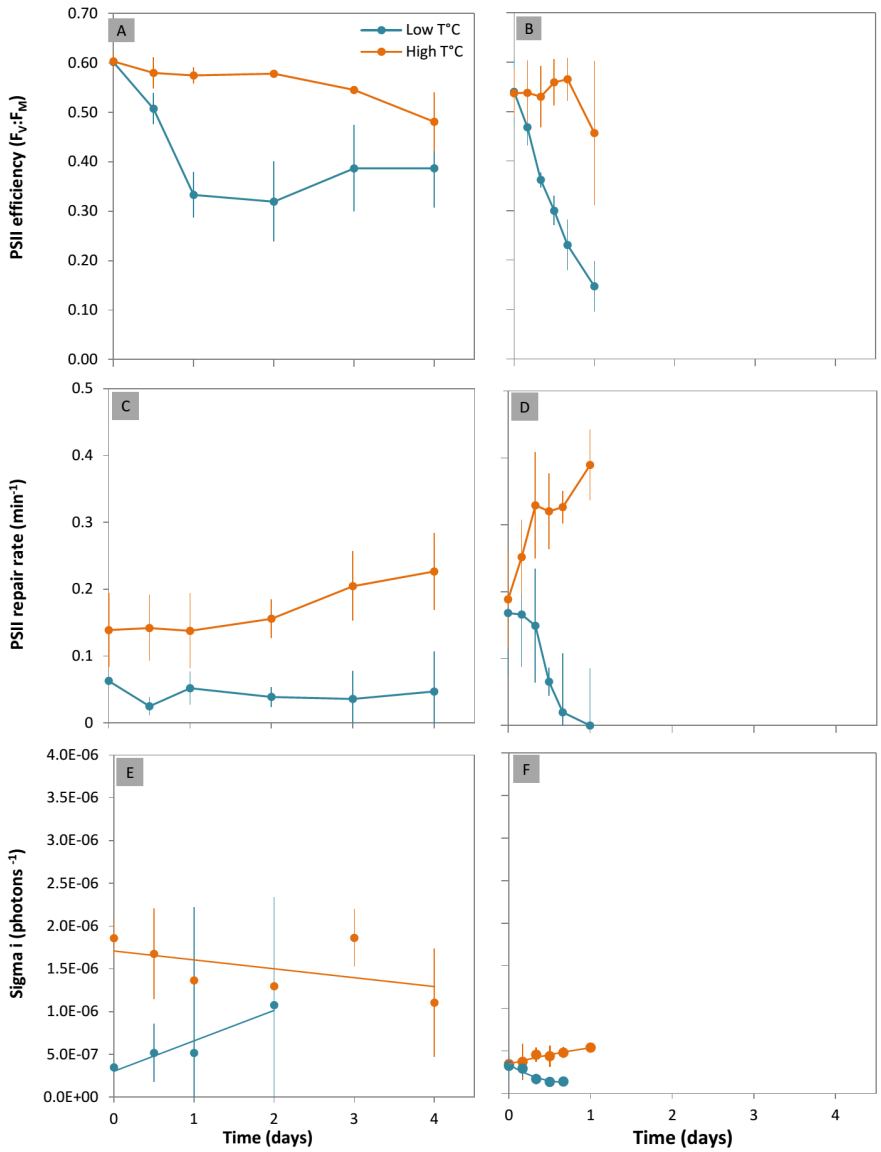


Figure 71 | Photosystem II photoinactivation cross section (σ_i) variations after a low and high temperature shift for in low and hight light acclimated cultures of *Synechococcus* sp. WH7803. This parameters, which reflects the PSII complex sensitivity to light driven inactivation was measured during the low (blue, LT) and high (orange, HT) temperature experiments in *Synechococcus* sp. WH7803 cultures acclimated to low (LL) and high (HL) light.

3. Discussion

a. Photosystem II response to a temperature decrease

These experiments show that *Synechococcus* sp. WH7803 was strongly sensitive to the LT shift to 13°C, independently of the irradiance acclimation. Indeed, the cell density variations unambiguously showed that the cultures did not handle the temperature drop. Instead, *Synechococcus* sp. WH7803 suffered strong PBS impairing, leading to a strong reduction of the light absorption capacities, similarly to the Pittera and *al.* (2014) study. Very similar PBS damages, following

the same succession of steps, were previously characterized in the *Synechococcus* sp. WH8102 strain under UV stress (Six et *al.* 2007). During the LT experiments, the PBS was not only damaged, but the PSII efficiency was also severely reduced.

The observed decrease in PSII efficiency might originate from several processes. During the first day following the shift, cells may have induced fluorescence quenching mechanisms to dissipate excessive light, in order to adjust the amount of photons reaching the RCII to the metabolic slowing down (see introduction). However, the main cause of PSII efficiency decrease at low temperature was most probably PSII photoinactivation. The σ_i parameter variations showed that the RCII did not become intrinsically much more sensitive to photoinactivation under LT, in both HL and LL cultures, therefore showing that the measured photoinactivation arose most probably from a deficient PSII repair cycle. Indeed, in LL cultures, the constitutively slow PSII repair could not be induced, leading to a 50% decrease of the PSII efficiency, while in HL cultures, the initial high repair rate was strongly inhibited (Fig. 71) with F_V:F_M values decreasing down to *ca.* 20% (Fig. 71). This inhibition of the PSII repair was probably linked to an oxidative stress induction in the cells, which may have inhibited the translation of D1 proteins (Farewell & Neidhardt 1998, Nishiyama et *al.* 2004, 2006, Takahashi & Murata 2008). This could also be linked to a temperature induced decrease in the activity of proteins such as DepgP2 and FtsH (see introduction).

It should be however noted that in these experiments, the WH7803 strain was brought outside of its growth temperature limits and that it could not achieve durable acclimation to 13°C after the shift. It would be interesting to determine at which temperature the PSII repair can be induced and counterbalance the increase in the PSII photoinactivation rate. This is probably one of the key mechanisms that allow/limit acclimation in a given temperature range.

b. Photosystem II response to a temperature increase

Synechococcus sp. WH7803 did not have any trouble acclimating from 22 to 30°C. The shift from 22°C to 30°C did not decrease the growth rate at all. Interestingly, the shift induced an increase in the PSII repair rate, suggesting that the rate of PSII inactivation increased upon the temperature change. Although it was moderate, the increase in the inactivation cross section σ_i supports this idea.

The latter observation is apparently in contradiction with the Mn model (*cf.* introduction), which proposes that the photoinactivation cross section is unaffected by environmental stress because it relies exclusively on the incident photon flux reaching the OEC, and that only the PSII repair rate amplitude is environmental factor dependent (Takahashi & Murata 2008). The other hypothesis proposes that RCII photoinactivation raises from the ROS synthesized at a rate mostly dependent of the charge separation rate in the RCII (Vass et *al.* 1992, Vass & Cser 2009). The results shown in

chapter 1 (Fig. 61, chapter 1) suggest that marine *Synechococcus* increase their pigment content upon a temperature increase, a response that can quite increase the functional photosynthetic antenna size and therefore the charge separation rate in the RCII. If the RCII inactivation rate is tightly related to the amount of energy arriving from the antenna (and not to the incident photon flux like in the Mn model), then *Synechococcus* sp. WH7803 shifted to HT probably compensated the detrimental effect of the increase in pigment cell content by increasing the PSII repair rate, in order to sustain optimal growth. The higher induction of PSII repair of HL cultures (high photon flux and high charge separation rate) compared to LL ones (low photon flux and low charge separation rate) can be explained by both the Mn and the charge separation models.

c. Conclusion

The study of the effect of the variations of two abiotic factors, temperature and light, on *Synechococcus* sp. WH7803 provides new insights on how the response to one factor can be affected by another one. Light irradiance modifies the kinetic of the acclimation processes induced in response to a temperature shift. Under HL, the rate of photons processed by the PSII is high, and leads to efficient CO_2 fixation resulting in fast growth. In this condition, the whole cellular machinery is going faster, as so the D1 turnover (Fig. 71). By contrast, upon a sudden transfer to LT, the electron transport rate outpaces the quantity of energy necessary for a lower CO_2 fixation rate. This induces an imbalance of energy flow between the photophysical/photochemical processes that convert light and the metabolic sinks that consume the energy (Öquist & Hunner 2003). This non-photostasis state, which is more pronounced in HL conditions, induces stronger damages compare to the slower metabolism rate in LL (Fig. 72).

The analysis of the samples stored in our freezers for protein (*e.g* D1, L_{CM}, PE, OCP, *etc*) and pigment (carotenoids and chl *a*) quantifications will help confirm (or not) our hypotheses. The whole transcriptome data will allow unveiling the gene regulation that underlies the physiological response of *Synechococcus* sp. WH7803 to short term temperature variations. Previous transcriptomic analyses regarding the response of *Synechococcus* sp. PCC 7002 to temperature reported that, below its optimal growth temperature, genes for chaperones and fatty acids desaturases were among the genes showing the greatest increase (Ludwig & Bryant 2012). In contrast, HT conditions induced heat shock response, with strong increase of genes such as *hspA* (Ludwig & Bryant 2012).

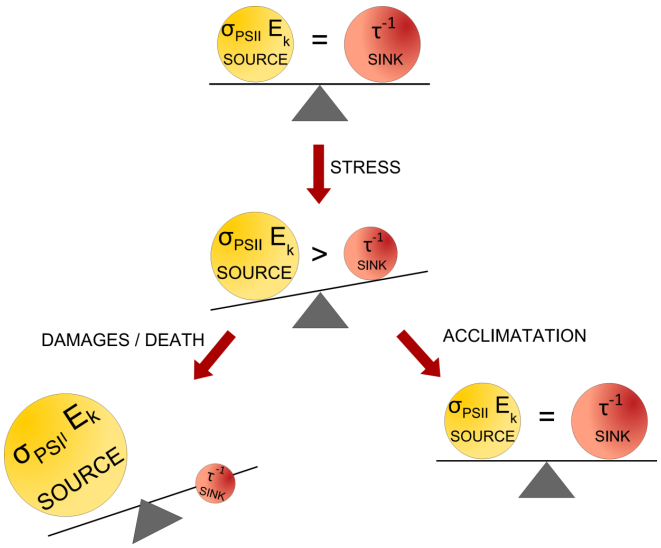


Figure 72 | Representation of the balance between the rate of energy reaching the RCII (σ_{PSII} E_k : source) and the rate of energy used for the global metabolism (τ^{-1}: sink). σ_{PSII} is the effective absorption cross section of PSII, E_k the irradiance at which the photosynthetic quantum yield is maximum, and τ^{-1} the rate at which the photosynthetically produced electrons are consumed under light saturated conditions. Acclimation can be achieved if there is energetical photostasis (modified from Biswal et *al.* 2011).

Furthermore, in complement to the physiological and transcriptomic data, we hope that the systematic comparison of the 54 genomes of marine *Synechococcus* currently available will allow to define and analyze not only the core (*i.*e common to all strains) and pan (*i.e* global) genomes for the marine *Synechococcus* radiation, but also to highlight the genes specific of each thermotype that are directly involved in niche adaptation.

CHAPTER 3

Membrane lipid thermoregulation in marine *Synechococcus*

I.

CONTEXT OF THE WORK

1. Membranes: the place of key metabolic reactions affected by temperature

It has been shown for a long time that temperature strongly impacts membranes by causing alterations in their physical properties (Cossins et *al.* 1977, Pehowich et *al.* 1988). Low temperatures reduce membrane fluidity, defined as the molecular disorder and motion within a lipid bilayer, and can lead to membrane gelation. Conversely, high temperature induces membrane fluidification and can result in the disintegration of the lipid bilayer (Cossins et *al.* 1977, Pehowich et *al.* 1988, Los & Murata 2004). In order to maintain the activity of the proteins imbedded into the lipid matrix, cells have evolved sensing mechanisms that perceive the environment modification *via* sensor proteins embedded into the membranes. These sensing proteins then transfer the environmental signal to networks of signal-transduction pathways which induce the eventual adjustment of the membrane fluidity through e.g. the modification of the fatty acid composition. Thus, cells try to continuously maintain the fluidity of the membranes in adequation with the ambient temperature, a mechanism crucial to maintain the activity of membrane proteins such as those involved in molecule transport, respiration and photosynthesis.

Photosynthesis takes place in endomembrane systems, the thylakoïds (see introduction), whose lipidome has been remarkably conserved in the course of evolution from cyanobacteria to chloroplast-containing eukaryotes (Jouhet et *al.* 2007, Douce et *al.* 1990, Petroutsos et *al.* 2014). Cyanobacteria thylakoidal lipids include mostly glycerolipids, known as MGDG, DGDG, and SQDG but also a significant amount of PG, the only phospholipid present in these membranes. The physical state of the thylakoids is essential to the motility and flexibility of the photosynthetic proteins. Among them, there is notably the plastoquinone that diffuses between PSII and cytochrome b_6f and which therefore requires a certain degree of fluidity of the thylakoids (Dekker & Boekema 2005). During the synthesis and final assemblage of the photosynthetic complexes, the different proteins are transported to the thylakoids, and even though the assembly steps are not fully understood yet, their

incorporation into the membrane to form a functional photosynthetic apparatus must surely involve diffusion processes within the thylakoidal membrane system (Mullineaux & Kirchoff 2010). Last but not least, the turnover and repair of thylakoidal membrane proteins also require adequate membrane fluidity. Furthermore, it has been suggested that lipids influence the biophysical properties of RC cofactors, and so may affect the rate of electron transfer through the complex (Jones et *al.* 2007). Among the four main cyanobacteria lipids, PG appears to be essential to the PSII stabilization in the membrane (Loll et *al.* 2007, Laczkó-Dobos et *al.* 2008, Wada & Murata 2007).

These observations show that the membrane composition may influence a number of different cell functions, including major metabolic processes such as photosynthesis. To better understand the potential capacities of marine *Synechococcus* to adjust the lipid composition of their membranes, I have first studied the biosynthesis pathways of the main cyanobacterial membrane lipids.

2. Lipid biosynthesis

Lipid synthesis pathways have never been investigated yet in detail in marine *Synechococcus*. The current knowledge about cyanobacterial lipids is mostly based on the most studied cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803.

a. Fatty acids

Fatty acid synthetic (FAS) pathways are divided into two distinct molecular forms called types I and II. While FAS I (mammals and fungi) utilizes a single, large multi-functional and multi-enzyme polypeptide, bacterial fatty acid synthesis is achieved by a much conserved set of genes, gathered under the name FAS II, each of which encodes an enzyme that catalyses an individual biosynthesis step. All the proteins involved in this latter pathway are located in the cytosol.

i. Initiation of fatty acid biosynthesis and elongation in prokaryotes

The first group of enzymes involved in fatty acid synthesis constitutes the initiation module. The acetyl-coenzyme A (CoA) carboxylase (ACC) complex catalyzes the conversion of acetyl-CoA to malonyl-CoA by addition of a carboxylic group. The overall ACC reactions require the coordinated action of four gene products, AccA, B, C and D. The malonyl-CoA is transferred to the acyl-carrier protein (ACP), a low molecular mass protein that carries all the intermediate molecules of the FAS II pathway. This reaction is catalyzed by the Malonyl-CoA-ACP Transacylase (MCAT) and produces

malonyl-ACP. The β-Ketoacyl-ACP Synthase III (KASIII) is the enzyme that initiates the condensation of the first acyl group and the malonyl-CoA-ACP, *i.e* the addition of one carbon atom, in order to start the synthesis of a fatty acid molecule. The β-ketaoacyl-ACP produced by KASIII then enters the elongation cycle (Fig. 73).

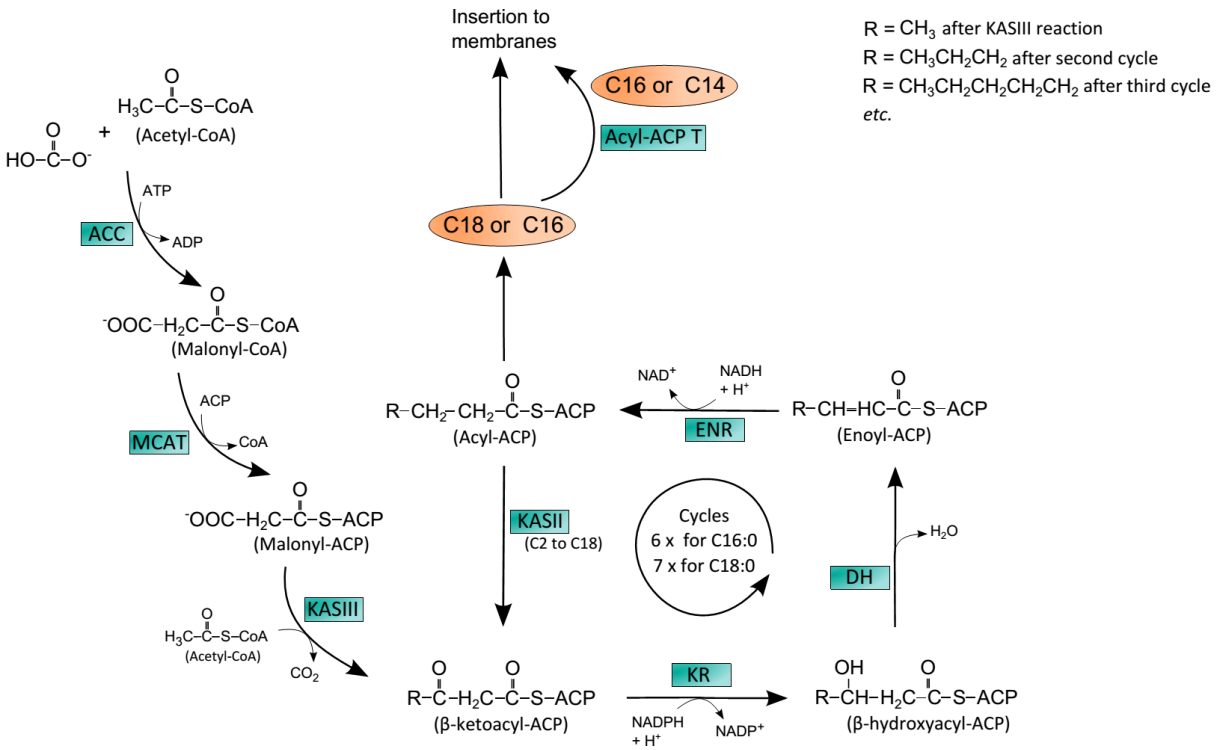


Figure 73 | Enzymatic pathways for fatty acid synthesis II (FAS II) in cyanobacteria. The cyclic reactions of the fatty acid synthesis add two carbons each time and are repeated until the appropriate chain length is reached. Enzyme abbreviations: ACC, acetyl-CoA carboxylase ; MCAT, malonyl-CoA transacylase ; KASIII, β-ketoacyl-ACP synthase III ; KR, β-ketoacyl-ACP reductase ; DH, β-hydroxyacyl-ACP dehydratase ; ENR, enoy-ACP reductase; KASII, β-ketoacyl-ACP synthase II ; Acyl-ACP T, acyl-ACP thioesterase.

The elongation cycle is driven by four core enzymes that progressively elongate the acyl chain attached to the ACP, adding two carbons at each cycle revolution. The β-ketoacyl-ACP intermediate is reduced by the β-ketoreductase (KR), which gives rise to β-hydroxyacyl-ACP. This intermediate is dehydrated by the β-hydroxyacyl-ACP dehydratase (DH) and produces enoyl-ACP. The cycle is pulled to completion by the enoyl-ACP reductase (ENR). While in higher plant and *Escherichia Coli* subsequent rounds of elongation are initiated by two condensing enzymes KASI, from C4 to C16, and KASII, from C16 to C18, no KASI enzyme have been so far evidenced in cyanobacteria, suggesting that KASII is responsible for the entire elongation, producing either 16:0 or 18:0 (Wada & Murata 2007). The enzyme condenses the growing acyl-ACP with malonyl-ACP to extend the fatty acid chain by adding two carbons at each cycle (Fig. 73; White et *al.* 2005, Wada & Murata 2010), the so-called Claisen condensation reactions. Once the elongated acyl-ACP is formed, two alternative reactions are

possible: the acyl group can be cleaved to form a shorter fatty acid by acyl-ACP thioesterase, or be incorportated into the membranes (Fig. 73).

ii. Transfer of fatty acids into membranes

The first step in the formation of a membrane glycolipid is the incorporation of fatty acid molecules into a membrane, through the acylation of a glycerol-3-phosphate (G3P) molecule (Fig. 74). In cyanobacteria, this reaction is catalyzed by the PlsX-GPAT system. Using the cytosolic acyl-ACP, a soluble protein associated to the membrane, PlsX, catalyses the formation of an acyl-phosphate (Acyl-P) into the membrane.

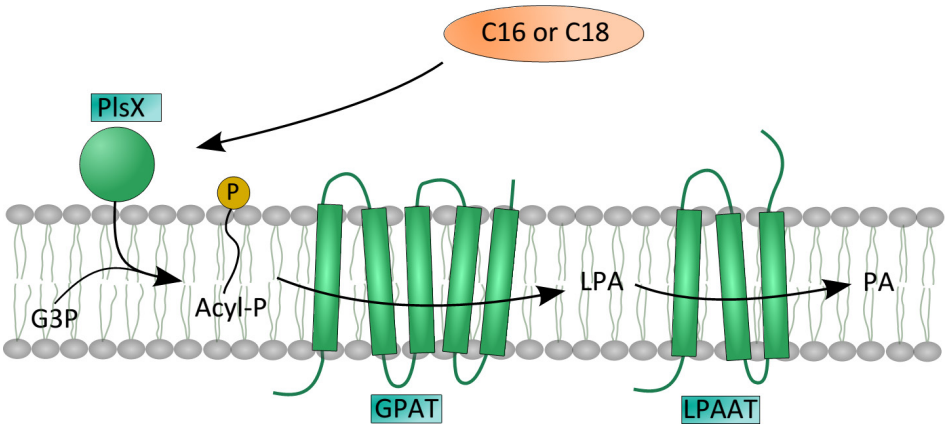


Figure 74 | Enzymatic pathways of the insertion of fatty acids in the membrane in cyanobacteria until the synthesis of phosphatidyl acid. The transfer of free fatty acids to membranes necessitates the reaction of key enzymes PlsX, GPAT and LPAAT. Enzyme abbreviations: GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase ; LPAAT, lysophosphatidic acid acyltransferase. Products abbreviations: G3P, glycerol-3-phosphate ; acyl-P, acyl-phosphate ; LPA, lysophosphatidic acid ; PA, phosphatidic acid (modified from Zhang et *al.* 2008).

The G3P acyltransferase (GPAT) then uses the acyl-P to acylate the 1-position of G3P to form a lysophosphatidic acid (LPA) molecule. At last, the LPA acyltransferase (LPAAT) acylates the 2-position of LPA to form a phosphatidic acid (PA), the central intermediate of the formation of membrane glycerolipids. It has been proposed that cyanobacterial G3P acyltransferase and LPA acyltransferase preferentially utilize 18:0-ACP and 16:0-ACP, respectively, as donors of the acyl moiety (Lem and Stumpf 1984).

b. *Lipid classes*

PA is a crossroad of the synthesis pathways of all the classes of membrane lipids (Nishida and Murata 1996, Wada & Murata 1998). After the synthesis of PA, the biosynthetic pathways of membrane lipids in cyanobacteria divide into two branches (Wada & Murata 1998), as in chloroplasts (Browse and Somerville 1991). One leads to the synthesis of the glycolipids (galactolipids and sulfoquinolipids) while the other one conducts to the synthesis of phospholipids.

iii. Galactolipids

In the galactolipid pathway, PA is dephosphorylated by the PA phosphatase to yield diacylglycerol (DG ; Fig. 75). The DG produced is used as a substrate for the synthesis of monoglycosyldiacylglycerol (MGlcDG), *via* the transfert of glucose from uridine 5'-diphosphate-1α-glucose (UDP-1α-glucose) to the *sn*-3 position of the DG in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Sato and Murata 1982, Awai et *al.* 2007).

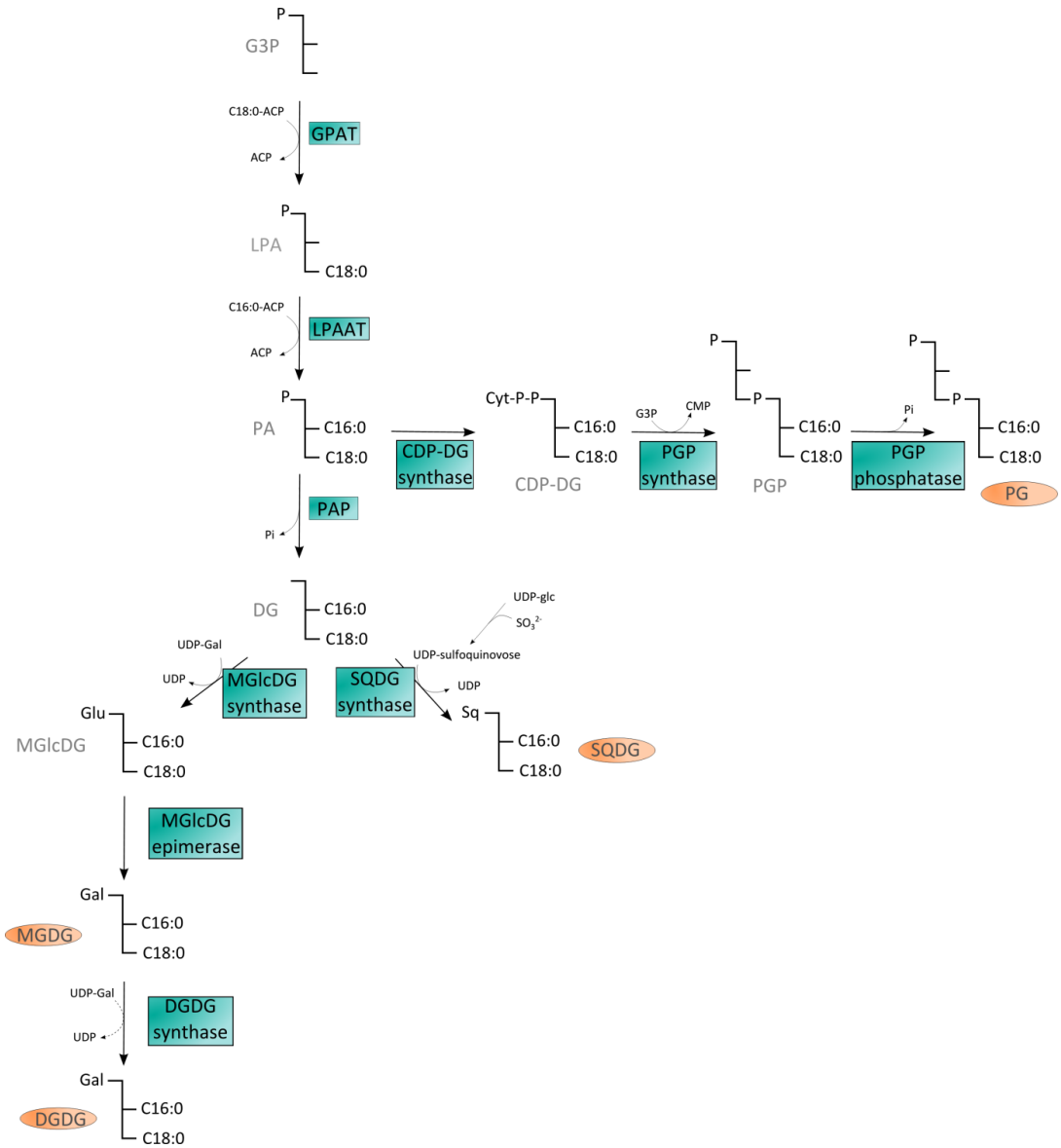


Figure 75 | Enzymatic pathways for lipid polar head diversification in cyanobacteria. Biosynthetic pathways leading to the synthesis, from glycerol-3-phosphate (G3P) to the four dominant glycerolipids found in cyanobacterial membranes. Enzyme abbreviations: GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase; LPAT, lysophosphatidic acid acyltransferase; PAP, phosphatidic acid phosphatase ; MGlcDG synthase, monoglucosyldiacylglycerol synthase ; DGDG synthase, diagalactosyldiacylglycerol synthase; SQSG synthase, sulfoquinovosyldiacylglycerol synthase; CDP-DG synthase, cytidine-5'-diphosphate diacylglycérol synthase ; PGP synthase, phosphatidylglycerophosphate synthase.

It is then assumed that MGDG is synthesized by epimerization of the glucose moiety into galactose by an epimerase enzyme which is still unknown. At last, although the molecule that donates galactose to DGDG synthase still needs to be formely identified in cyanobacteria, it is likely to be UDP-1α-galactose, as in chloroplasts (Kelly & Dörmann, 2002). A candidate gene (*dgdA*) for a cyanobacterial DGDG synthase was identified in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by comparative genomic analysis (Awai et *al.* 2007, Sakurai et *al.* 2007).

iv. Sulfoquinovosyldiacyl glycerol

UDP-6-sulfo-6-deoxy-1α-glucose (UDP-sulfoquinovose), which is the donor of sulfoquinovose for the synthesis of SQDG, is synthesized from UDP-glucose and sulfite by the UDP-sulfoquinovose synthase (Sanda et *al.* 2001). SQDG is then synthesized *via* the transfer of sulfoquinovose from UDP-sulfoquinovose to DG in a reaction catalyzed by the SQDG synthase (Fig. 75).

v. Phosphatidylglycerol

The synthesis of PG involves the second PA transformation pathway. In *Escherichia coli*, it involves three reactions and it is probably the same in cyanobacteria (Wada & Murata 1998). First, the transfer of cytidine 5'-monophosphate to PA yields CDP-DG in a reaction catalyzed by the CDP-DG synthase. Then, the conversion of CDP-DG to phosphatidyl-glycerophosphate (PGP) is the result of the transfer of G3P to the PA moiety of CDP-DG, catalysed by the PGP synthase and the dephosphorylation of PGP is carried out by the PGP phosphatase (Fig. 75 ; Dowhan, 1997, Wada & Murata 1998).

3. Desaturation of fatty acids

Cyanobacterial desaturases are ferric enzymes, integrated to both the cytoplasmic and the thylakoidal membranes, which introduce double bonds in the fatty acid molecules esterified to the glycerol backbone (Los et *al.* 2013). On amino acid sequences, their catalytic site is materialized by three highly conserved motifs, the histidine boxes (Murata & Wada 1995), localized at strongly conserved positions in the amino acid sequence, and which are the ligands to ferric iron (Shanklin et *al.* 1994). The acyl desaturation reaction consumes electrons, which may be provided by the ferredoxin enzyme, and is based on the interaction between the iron atom with O_2 and the saturated fatty acid. A double bond is then formed and two water molecules are released. Desaturations are thought to occur exclusively on fatty acids bound to lipids other than DGDG (Murata & Wada 1995, Wada & Murata 1998).

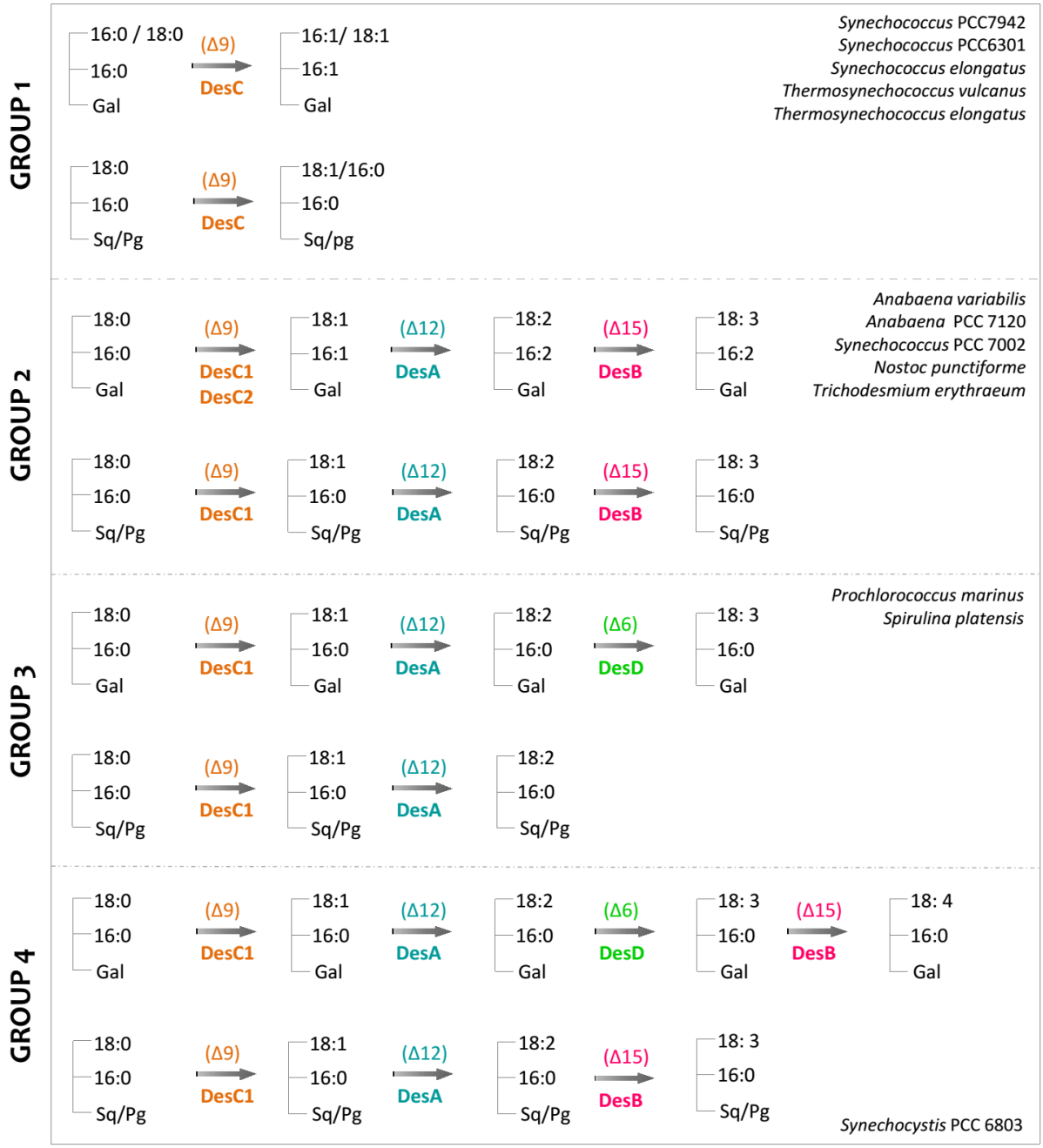


Figure 76 | Main pathways for fatty acids desaturation in freshwater cyanobacteria, and the corresponding groups defined from Murata et al 1992. Desaturation at the Δ9, Δ12, Δ15 and Δ6 positions are catalysed by the desaturases DesC, DesA, DesB and DesD, respectively. DesC enzymes are further classified in DesC1 and DesC2. Gal, galactose ; Pg, phoshphoglycerol ; Sq, sulfoquinovose (modified from Sato & Wada 2010). The main representatives of each group are mentioned.

The desaturases are regiospecific enzymes, *i.e.* they act at a specific site of a given glycerolipid. Therefore, there exist different site-specific categories of desaturases, recognizable by their specific histidine box configurations. Murata and colleagues have proposed functional groups of freshwater cyanobacteria, based on their modes of fatty acid desaturation (Fig. 76 ; Murata et *al.* 1992, Murata & Wada 1995, Wada & Murata 1998). The strains from group 1 possess only one *desC* gene, therefore

introducing a double bond at the Δ9 position of C16 and C18 fatty acyl chains of the four polar lipids. Strains representatives of group 2 can desaturate lipid in Δ9, Δ12 and Δ15 on the C18 chain of MGDG, SQGDG and PG, and in Δ9 and Δ12 of the MGDG C16 acyl chain (Fig. 76).

Cyanobacteria strains from group 3 can only desaturate the C18 acyl chain introducing double bonds at the position Δ6, Δ9 and Δ12 of MGDG, and Δ9 and Δ12 of SQDG and PG. At last, group 4 representatives display tetra-insaturation on the C18 chain of MGDG and three desaturations at Δ9, Δ12 and Δ15 positions on the C18 chain of SQDG and PG. The order in which the desaturase operate is very strictly determined. The first double bonds is introduced by the Δ9 desaturase and then Δ12 and Δ6 introduce a double bond into fatty acids that have been unsaturated by DesC. The Δ15 desaturases only introduce unsaturation into fatty acids that have a double bond at the Δ12 position (Higashi & Murata, 1993).

Furthermore, with the purification and the biochemical characterization of the action sites of several cyanobacteria desaturases, the classification of DesC has been further precised. While group 1 strains encode only one DesC desaturase that can act both on sn-1 and sn-2, the other groups possess a specific acyl chain DesC. DesC1 can act on the 18:0 at the sn-1 position, and DesC2 introduces double bonds at the Δ9 positions of fatty acids bounds to the sn-2 position of MGDG. So far, *desC1* and *desC2* genes have been reported only in group 2 strains, group 3 and 4 carrying only *desC1* gene (Chintalapati et *al.* 2006). The model strain *Synechocystis* sp. PCC 6803, is equipped with the four desaturase DesA, B, C and D, and belongs to the group 4 as defined by Murata and Wada (1995).

4. Objectives

We have shown that marine *Synechococcus* display distinct thermostabilities and regulation capacities regarding PBS and RCII, depending on the temperature acclimation. A part of these capacities originate in the complexes themselves but it is also very likely that adjustments of the membrane lipid composition are also involved in the response of the photosynthetic apparatus (see introduction). In this final chapter, we aim at studying and better understanding the lipid regulation capacities of marine *Synechococcus*.

One way to modulate membrane fluidity involves the fatty acids. Fatty acid can act on membrane fluidity through modification of the carbon acyl length, *i.e* the shorter the fatty acids, the thinner the membrane, and the higher the fluidity. In addition, to compensate the membrane ridigification at low temperature, desaturases can introduce double bonds along the acyl chain. To

determine whether marine *Synechococcus* are capable of such physiological responses, we investigated the potential modification of the fatty acid composition in response to temperature in the model strain *Synechococcus* sp. WH7803.

Secondly, in order to compare the whole biosynthesis process of membrane lipids in different clades/thermotypes, we have carefully analyzed the 54 marine *Synechococcus* genomes available in the Cyanorak v2 database and reconstructed the lipid synthesis pathways. This genomic study was carried out in order to give new insights in the potential adaptive traits to temperature regarding membrane lipids, and to try to understand whether and how the thermal niche might have shaped the membrane lipidome.

This final chapter of my Ph.D thesis, gathering *in vivo* and *in silico* analyses, aims at exploring the diversity of membrane regulation strategies in marine *Synechococcus*, and at highlighting the potential role of these compounds in the latitudinal niche partitioning of marine *Synechococcus*.

II.

TEMPERATURE INDUCED MODIFICATION OF MEMBRANE ACYL CHAINS IN *SYNECHOCOCCUS* SP. WH7803

1. Context of the work

Since the effects of temperature on photosynthesis and membrane lipids are thought to be tightly linked (Boudière et *al.* 2014, Jones et *al.* 2007, Loll et *al.* 2007, Laczkó-Dobos et *al.* 2008) and given the scarcity of complete data in the literature, it appeared very interesting to start a global study of the membrane lipidome of marine *Synechococcus*, with the aim to possibly unveil temperature adaptations strategies. Lipidomics has been a brand new approach in our group, which I have been developing during the past two years. As a first step, we chose to focus on the understanding on the lipid regulation *vs.* temperature in the model strain *Synechococcus* sp. WH7803. This study, led in the frame on the ANR *SAMOSA*, has been carried out in collaboration with Juliette Jouhet and Eric Marechal from the Biogenesis, dynamics and homeostasis of membrane lipids team of the CEA in Grenoble (http://irtsv.cea.fr/dsv/irtsv/english/Pages/PCV/Team-02/Welcome.aspx).

2. Experimental approach

a. Strain conditions and sampling strategy

Quite similarly to the experiments previously described in Chapter 2, the marine *Synechococcus* strain sp. WH7803 was acclimated under LL (20 µmol photons m^{-2} s^{-1}) to a wide range of temperature: 16, 18, 22, 25, 28 and 30°C. For each acclimation temperature, three replicates were harvested.

b. *Fatty acids analysis*

i. Lipid extraction

At each acclimation temperature, a volume of 30 mL of culture was centrifuged (exept for extreme temperatures, 16°C and 30°C where 100 mL of culture were harvested) and the cell pellets were stored at -80°C until analysis. Fatty acids were extracted following a slightly modified version of the well known Bligh & Dyer phase separation procedure (Fig. 77; Bligh & Dyer, 1959). Methanol, dichloromethane and water were successively added on the cell samples following the ratio MeOH:CH_2Cl_2:H_20 1.1:1:1.4. Before adding dichloromethane, samples were transferred in glass tubes in order to avoid plastic-induced contaminations. Samples were then vortexed for 30 sec, and centrifuged for six minutes at 1500*g* at room temperature. The upper methanol phase was discarded and the lower phase, enriched in lipids (including the membrane pigments) was carefully harvested with a Pasteur pipette and transferred to new glass tubes. Samples were then evaporated under nitrogen at 40°C and stored at -20°C.

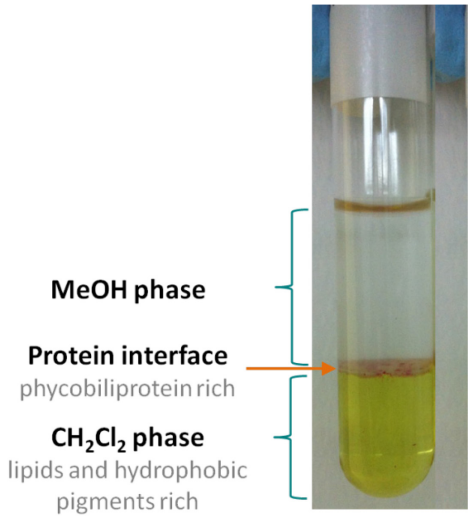


Figure 77 | Extraction of lipid in marine *Synechococcus* sp. WH7803 following the protocol of Bligh & Dyer (1959). The addition of water to the methanol-dichloromethane mixture induces a sharp phase separation. The upper methanol-water phase notably contains DNA while the dichloromethane lower phase is rich in lipids and hydrophobic pigments imbedded into the membranes. The proteins are trapped at the interface. In cyanobacteria, these protein aggregates are vividly colored because of the high abundance of phycobiliproteins.

ii. Lipid class dissociation and identification

Lipids samples were resuspended in 40 µL of chloroform, and lipid class were dissociated and identified through two dimensions thin layer chromatopgraphy (TLC). Lipid samples were deposited on silica plates (20 x 20 cm) and migrations were realized in solvents described in Table 5.

Table 5 | Solvents use for two dimensions thin layer chromatography to dissociate lipid classes in *Synechococcus* sp. WH7803 samples. The second dimension migrations were realized 12h later than the first one.

Dimension	Solvents	Ratio
1 dimension	$CHCl_3$: MeOH : H_20	1 : 2.6 : 16.25
2 dimension	$CHCl_3$: C_3H_6O : MeOH : $C_2H_4O_2$: H_2O	1 : 2.5 : 5 : 5 : 10

The first dimension migrations were last during 1h30, then plates were dryed during 12h, and the day after the second dimension migration were realized during 1h20. Finally, revelations were done using aniline-naphtalene-sulfonate (ANS, 0.2%), under UV excitation at 254 and 366 nm.

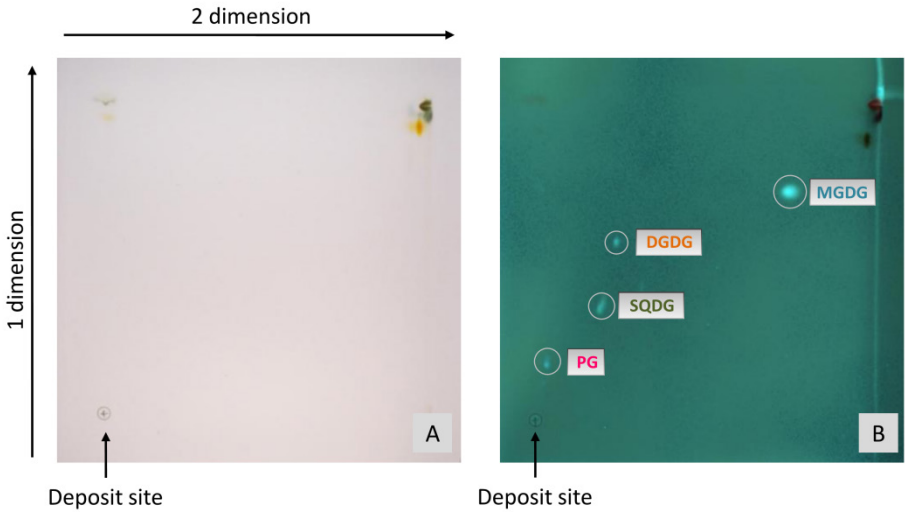


Figure 78 | Dissociation of polar lipid class by thin layer chromatography on *Synechococcus* sp. WH7803 acclimated to 22°C. Visible light do not allow lipid identification (A), only hydrophobic pigments are visible. The excitation in UV (here 254 nm) allow the identification of the four distinct cyanobacterial lipid classes, MGDG, DGDG, SQDG and PG (B). MGDG: monogalactosyldiacylglycerol, DGDG: digalactosyldiacylglycerol, SQDG: sulfoquinovosyldiacylglycerol, PG: phosphatidylglycerol.

Then, for each lipid class spot, silica gel plate is gently scrubbed and then lipids bound to the silice were extracted following Bligh & Dyer (1959).

iii. Lipid and fatty acid analysis

Lipids were analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). This technique is widely used to identify and quantify molecules of interest function of their mass to weight ration (m/*z*). Molecules separation is based on the interaction of a C18 column and a mobile phase. Molecules of interest are progressively elutated by the mobile phase whose polarity decreases along analysis. Gradually, molecules arrive in the mass spectrometer and are ionized by electrospray (ESI). To compensate the distinct ionization capacitiy of MGDG, DGDG, SQDG and PG, a correctional factor is applied to each of these lipid classes.

3. Results and discussion

The membrane lipid composition of *Synechococcus* sp. WH7803 revealed that membranes are composed of the four lipid class previsously identified in cyanobacteria, *i.e* MGDG, DGDG, SQDG and PG (Merritt et *al.* 1991, Wada & Murata 1998).

Furthemore, the analysis of the lipid polar head composition in *Synechococcus* sp. WH783 revealed that proportions of these latters appear to be fairly constant with acclimation temperature (Fig. 79). Indeed, MGDG is the majority lipid, contributing to about 43% of the total membrane lipids, consistent with the previsous work of Wada & Murata (1998) and Merritt (1991) lead on freshwater cyanobacteria. Then DGDG and SQDG contribute respectively to 26 and 25 % of the membrane lipid composition, and PG is the minority lipid, representing 6%. Our results are consistent with literature on freshwater cyanobacteria, but are different from the recent study of Van Mooy and collaborators (2009) suggesting that SQDG is the dominant lipid class in marine *Synechococcus*. However, it is worth noting that this lipid class displays the highest ionization efficiency on the mass spectrometer, and therefore a correction factor need to be applied to readjust its contribution to the membrane lipidome over the other lipid classes. More recent work of Biller and coworkers (2014) on *Prochlorococcus* also revealed that MGDG is the dominant lipid in these picocyanobacteria, contributing to about 50% of the membrane lipids.

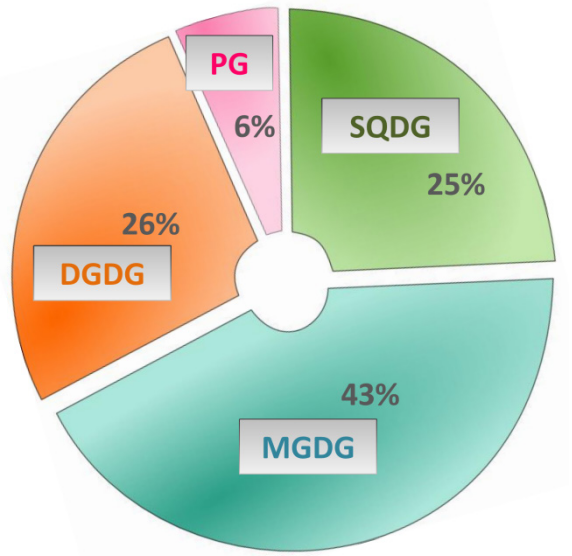


Figure 79 | Proportion of the lipid classes in the membranes of the model strain *Synechococcus* sp. WH7803. The contribution of MGDG, DGDG, SQDG and PG is fairly constant with acclimation temperature between 16°C and 30°C. MGDG: monogalactosyldiacylglycerol, DGDG: digalactosyldiacylglycerol, SQDG: sulfoquinovosyldiacylglycerol, PG: phosphatidylglycerol.

The fatty acid analyses of *Synechococcus* sp. WH7803 revealed up to six distinct types of acyl chains in the membranes (Table 6). Fatty acid identified were saturated, monounsaturated or polyunsaturated (Table 6). This fatty acid composition has already been reported in literature (Gombos et *al.* 1992, Wada & Murata 2004, Chintalapati et *al.* 2006, Kenyon et *al.* 1972, Merritt et *al.* 1991). The presence of polyunsaturated chains, essentially 16:2, has been commonly reported in freshwater cyanobacteria, but appears less common in marine picocyanobacteria, and has been only reported in *Prochlorococococcus* MED4 and MIT9313 before (Biller et *al.* 2014).

Table 6 | Fatty acid esterified on polar lipid head identified in *Synechococcus* sp. WH7803. Fatty acids identified were wether fully saturated, or binding one (monounsaturated) or two (polyunsaturated) double bonds.

Saturated	Monounsaturated	Polyunsaturated
14:0	14:1	16:2
16:0	16:1	
	18:1	

The proportion of saturated and unsaturated fatty acids is changing with temperature. Indeed, at the lowest temperature, 16°C, usnsaturated fatty acids are dominant, contributing to 55 % of the total fatty acid. When temperature increases, the proportion of unsaturated *vs.* saturated fatty acids get reversed, with unsaturated fatty acid representing no more than 35 % at 30°C (Fig. 80).

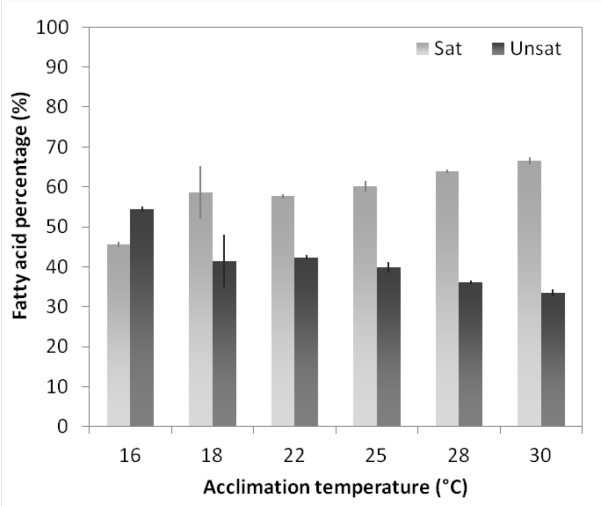


Figure 80 | Proportion of total saturated and unsaturated fatty acid in *Synechococcus* sp. WH7803 acclimated to a range of temperature. Saturated fatty acids are represented in light grey while unsaturated fatty acids are displayed in dark grey.

The proportion of unsaturated to saturated fatty acid also varies within each lipid class (Fig. 81). Concerning MGDG, unsaturated fatty acids contribute to 60 % of the total MGDG fatty acid at 16°C, and their contribution decrease to 40 % at 30°C. The polar head lipid DGDG and SQDG display the

largest saturated *vs.* unsaturated fatty acid variations with temperature. Concerning DGDG, unsaturated fatty acids represent 45 % of the total fatty acids at 16°C, and represent only 5 % at 30°C. A similar trend is observed for SQDG for which unsaturated fatty acids represent 40 % at 16°C and no more than 20 % at 30°C. Only fatty acid estherified on PG do no seem to vary with temperature, with unsaturated fatty acid contributing to 80 to 90 % of the fatty acids whatever the temperature.

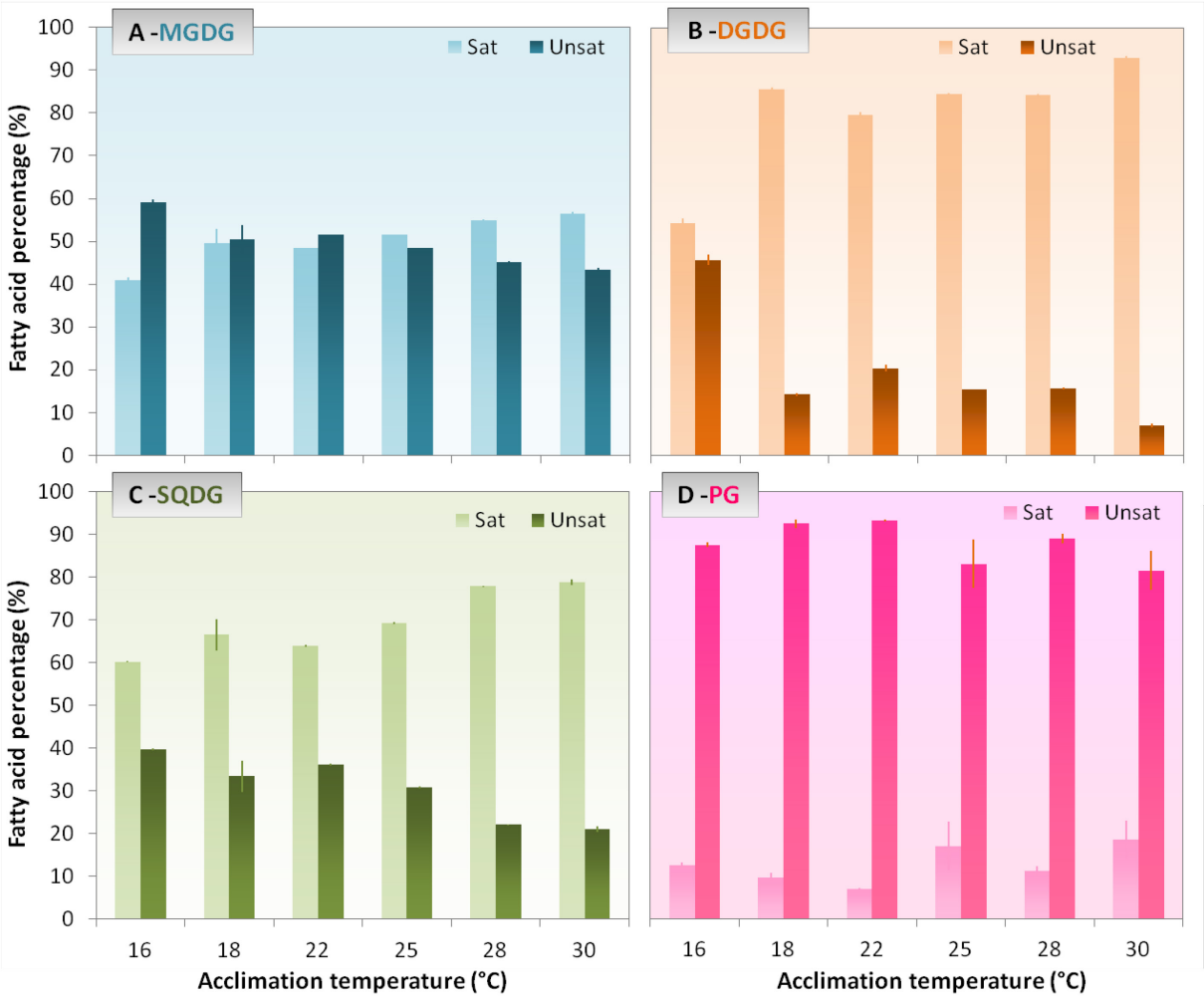


Figure 81 | Proportion of total saturated and unsaturated fatty acids for each lipid class in *Synechococcus* sp. WH7803 acclimated to a range of temperature. Saturated fatty acids are represented in light color while unsaturated fatty acids are displayed in dark. MGDG: monogalactosyldiacylglycerol (blue), DGDG: digalactosyldiacylglycerol (orange), SQDG: sulfoquinovosyldiacylglycerol (green), PG: phosphatidylglycerol (pink).

Low temperature is well known to induce the rigidification of the lipid matrix (Chintalapati et *al.* 2006, Gombos et *al.* 1994, Los & Murata 1999, Varkey et *al.* 2015). Therfore, through the insertion of double bonds along the acyl chains at cold temperatures, *Synechococcus* sp. WH7803 is maintaining its membrane fluiditiy and also the essential function of proteins embedded into it. Similar changes in saturated *vs.* unsaturated proportions with temperature have been reported in *Synechococcus* BL107 while strains WH8102 and WH8109 do not appear to follow the same pattern. Here, we further highlight that lipid classes are differentially unsaturated with temperature.

Future analysis would aim to analysis lipid regulation following a transfer to HT and LT. Indeed, these new data would maybe allow to unveil change sin the lipid polar head proportion under a sudden temperature change in order to better adjust membrane fluidity and protein function. Also, future analysis of the quantification of each fatty acid would allow to better estimate the regulation of each species with temperature. The induction of unsaturation in cold is possible through the action of desaturase, a specific enzyme family which is strongly involved in temperature acclimation.

III.

COMPARATIVE GENOMIC STUDY OF LIPID SYNTHESIS PATHWAYS AND REGULATION IN MARINE *SYNECHOCOCCUS*

1. Context of the work

In parallel to the study of the fatty acid regulation capacities of the *Synechococcus* sp. WH7803 strain and in the wait to extend it to different thermotypes, we used a wider approach to estimate the potential capacities of different marine *Synechococcus* to regulate their membrane lipid composition. Using *in silico* analyses, the entire pathways of lipid synthesis were retrieved and reconstructed for a large number of strains. The phylogenies and the phyletic profiles for the different enzymes were compared and analyzed.

This study has been possible thanks to a recent large sequencing effort (PELICAN and PHYCOSYN projects led by Laurence Garczarek and Frédéric Partensky; http://www.sb-roscoff.fr/fr/projet-anr-genomique-microbienne-pelican), which increased the number of available complete genomic sequences to 54 for marine *Synechococcus*. The exploration of these genomes is eased by the Cyanorak v2 interface, a bioinformatic tool dedicated to the expert curation and annotation of clusters of orthologous sequences from marine picocyanobacteria (developed by F. Partensky, L. Garczarek, G. Farrant & A. Bisch in collaboration with the ABiMS bioinformatic platform of the Station Biologique de Roscoff; www.sb-roscoff.fr/cyanorak/). This tool allows performing extensive genomic comparisons with the aim to better understand the physiology, the ecology and evolution of these very abundant photosynthetic microbes. The database currently gathers the genomic sequences of 97 cyanobacteria, including 54 *Synechococcus* and 43 *Prochlorococcus*.

2. Methodological approach

The Cyanorak v2 mediated annotation is essentially realized at the gene cluster level and can be manually curated. Analyses were done on the 54 genomes of *Synechococcus*, often neglecting the *Synechococcus* sp. WH8020 sequence that appear of poor quality. Cluster of genes encoding enzymes involved in the membrane lipid synthesis pathways, and fatty acid regulation were carefully annotated after amino acid BLAST in Cyanobase, a popular database gathering 39 genomes of freshwater and marine cyanobacteria (http://genome.microbedb.jp/cyanobase), and the Uniprot (http://www.uniprot.org/) and NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) databases. Phylogenetic patterns were analyzed in order to confirm the belonging of the sequences to a defined cluster. The occurrence of gene clusters in different strains belonging to different clades led to the determination of gene phyletic patterns. When it appeared interesting to study in more detail the phylogeny of a protein, multiple alignments of amino acid sequences were generated with Bioedit using ClustalW multiple alignment (Hall 1999) and phylogenetic reconstruction using MEGA 5.2 (Tamura et *al.* 2011), were performed on the aligned amino acid using Maximum likelihood method with 500 bootstrap replications.

3. Fatty acid synthase and polar head diversification pathways

a. Results

The biochemical characterization of the cyanobacterial FAS enzymes is rather limited as it has been studied only for the MCAT, ACP and KASII enzymes of *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Stapleton & Jaworski 1984, Froehlich et *al.* 1990, Moche et *al.* 2001). The genes that encode proteins homologous to the FASII components in well-known other prokaryotic organisms are however retrieved in most cyanobacterial genomes. We first looked for the complete set of lipid enzyme genes in the genome of the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in the Cyanobase database (Table 7).

Among the 23 enzymes known to be involved in the membrane lipid biosynthetic pathways, 20 of them have been identified in *Synechocystis* sp. PCC 6803. The genes encoding the FAS enzymes are the best characterized, while the enzymes involved in the whole complex lipid assemblage have been so far less studied. Although a bit distant from known prokaryotic sequences, there are two candidate genes for membrane-bound LPAATs enzymes in the *Synechocystis* genome, which both harbor a characteristic acyl transferase motif (Weier et *al.* 2005, Okazaki et *al.* 2006). Furthermore, the gene encoding the enzyme finalizing the synthesis of MGDG, which arises most probably from the

epimerization of a glucose moiety into galactose, is still unknown. Similarly, the gene encoding PGP phosphatase has been characterized in *Escherichia coli*, but no homolog has been found so far in *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Based on the enzyme genes identified in the *Synechocystis* genome, we looked for these amino acid sequences by BLAST searches in Cyanorak to identify the clusters of genes encoding these enzymes. Once putative clusters were identified, the sequences were retrieved in the Uniprot database, and phylogenetic analyses were realized to verify the relationships among sequences. New clusters were created for divergent sequences. The clusters were then curated in order to fix the exact length of the amino acid sequences.

Table 7 | Genes encoding the enzymes involved in the fatty acid synthesis and the polar head diversification of membrane lipids in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and clusters annotated in *Synechococcus* genomes. Genes encoding the enzymes and the locus tag in the *Synechocystis* genome are mentioned and have been retrieved from the Cyanobase database. Unkown genes are the one not identified yet in cyanobacteria. PA: phosphatidic acid.

***Synechocystis* sp. PCC 6803**				
Synthesis step	**Enzyme**	**Gene**	**Locus tag**	**Homologous Cluster in *Synechococcus***
FATTY ACID SYNTHASE II	ACCA	*accA*	sll0728	670
	ACCB	*accB*	slr0435	342
	ACCC	*accC*	sll0053	1134
	ACCD	*accD*	sll0336	978
	MCAT	*fabD*	slr2023	222
	KASIII	*fabH*	slr1511	221
	KR	*fabG*	slr0886	59
	DH	*fabZ*	sll1605	1081
	ENR	*fabI*	slr1051	261
	KASII	*fabF*	sll1069	666
		fabF2	slr1332	9077
MEMBRANE INTEGRATION - PA SYNTHASE	PlsX	*plsX*	slr1510	200
	GPAT	*pslY*	sll1973	1072
	LPAAT	*pslC1*	sll1848	223
		pslC2	sll1752	746
POLAR HEAD DIVERSIFICATION	PA phosphatase	putative *PAH1*	sll0545	1999/57084
	MGlcDG synthase	putative *MgdA*	sll1377	327/57086
	MGlcDG epimerase	unknown	-	-
	DGDG synthase	*dgdA*	slr1508	1040
	UDP-SG synthase	*sqdB*	slr1020	123
	SQDG synthase	*sqdX*	slr0384	333
	CDP-DG synthase	*cdsA*	slr1369	760
	PGP synthase	*pgsA*	sll1522	991
	PGP phosphatase	unknown	-	-
CLEAVAGE	Acyl-ACP thioesterase	putative *fatB*	-	-

A total of 11 gene clusters were manually annotated for the enzymes involved in the fatty acid synthesis. All the genes involved in FASII were retrieved in the marine *Synechococcus* genomes. While most enzymes are encoded by only one gene, two clusters were created for KASII. Indeed, as previously observed in *Synechocystis* sp. PCC 6803, this enzyme can be potentially encoded by two

genes (Klähn et *al.* 2015). The possible differential function of the two gene products, possibly two isoforms, remains to be determined.

In the same way, I have manually annotated 13 clusters of enzymes enrolled in the lipid polar head diversification (Table 7). Here again, all the enzyme genes necessary for the synthesis of MGDG, DGDG, SQDG and PG have been retrieved in the marine *Synechococcus* genomes. Two clusters of genes encoding LPAAT have been created, just as in the *Synechocystis* sp. PCC 6803 genome, and all marine *Synechococcus* strains possess the two genes.

From PA, the lipid biosynthetic pathway splits in two routes. The one invovled in the synthesis of PG is driven by the enzymes CDP-DG synthase, PGP synthase and PGP phosphatase. The genes encoding the former enzymes have been retrieved, annotated and are conserved among the 54 marine *Synehcococcus* genomes. The genes encoding the PGP phosphatase is still unknwown in cyanobacteria and could therefore not be searched. The second route is the one leading to the synthesis of the two galactolipids on one hand, and SQDG on the other hand. This pathway is first initiated by the transformation of PA to DG by the PAP phosphatase. The gene encoding this key enzyme, necessary to the synthesis of three out of the four membrane lipids, has been retrieved only in a few *Synechococcus* genomes (Table 7). The following steps consist in the sulfoquinovose synthesis involving notably the UDP-SQ and SQDG synthases. The genes encoding these two enzymes are present in the 54 marine *Synechococccus* genomes, with the strains A15-62, MEDSN5 and RCC307 characterized by two identical copies of the gene encoding UDP-SQ synthase. Marine *Synechococcus* all possess the same gene equipment for the PG synthesis pathway. At last, the genes involved in the synthesis of galactolipids are distributed in a more variable fashion among the genomes.

Table 8 | Phyletic profiles of fatty acid synthesis enzymes (FASII). Distribution of the different fatty acid synthesis enzyme genes among the 54 genomes of marine *Synechococcus* organized by clades. The enzymes mentioned in bold orange are those whose phyletic profile varies among *Synechococcus* genomes. The number of genes encoding the enzyme is indicated as 0, 1 or 2. Clades are mentioned for each strain. At the bottom of the table, the cluster created in Cyanorak is indicated, as the state of the cluster (annotated, curated). ACC: acetyl-CoA carboxylase ; MCAT: malonyl-CoA transacylase ; KAS: β-ketoacyl synthase ; KR: β-ketoacyl reductase ; DH: β-hydroxyacyl dehydratase ; ENR: enoyl-ACP reductase.

Table 9 | Phyletic profiles of the genes encoding the enzymes involved in lipid polar head diversification. Distribution of the different enzyme genes involved in the distinct steps leading to the synthesis of MGDG, DGDG, SQDG in the 54 genomes of *Synechococcus* available organized by clades. The enzymes in bold orange are those that display a distinct phyletic profile. The number of genes encoding the enzyme is indicated as 0, 1 or 2. Clades are mentioned for each strain, and the final row is the cluster number created in Cyanorak. GPAT: glycerol-3-phosphate acyltransferase ; LPAAT: lysophosphatidic acid acyltransferase ; Gal: galactolipid; PAP: phosphatidic acid phosphatase ; MGlcDG synthase : monoglucosyldiacylglycerol synthase ; DGDG synthase : digalactosyldiacylglycerol synthase; UDP-SQ synthase: UDP-sulfoquinonvose synthase ; SQDG synthase : sulfoquinovosyldiacylglycerol synthase ; CDP-DG synthase: cytidine-5'-diphosphate diacylglycérol synthase; PGP synthase: phosphatidylglycerol synthase.

Clade	Strain	FATTY ACID SYNTHASE									
		ACCA	ACCB	ACCC	ACCD	MCAT	KASIII	KR	DH	ENR	KASII
I	CC9311	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	MVIR-18-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	PROS-9-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	ROS8604	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	SYN20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	WH8016	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
II	A15-44	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	KORDI-52	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	M16.1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	RS9902	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	RS9907	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	TAK9802	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	WH8109	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A15-62	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	CC9605	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	PROS-U-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
III	A15-24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	A18-40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	A18-46.1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	BOUM118	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	RS9915	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	WH8102	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	WH8103	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	A15-28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Iva	BL107	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	CC9902	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
V	BMK-MC-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	WH7803	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
VI	MEDNS5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	WH7805	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	PROS-7-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
VII	A15-60	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	A18-25c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	NOUM97013	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
VIII	RS9909	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	RS9917	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	WH8101	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
IX	RS9916	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CRD1	BIOS-U3-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	MITS9220	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	BIOS-E4-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
WPC1	A15-127	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	KORDI-49	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Envc	CC9616	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
UC-A	KORDI-100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
5.2	CB0101	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	CB0205	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	NS01	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	PCC6307	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	PCC7001	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	WH5701	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5.3	MINOS11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	RCC307	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cluster		670	342	1134	978	222	221	59	1081	261	666/9077

Clade	Strain	PA synthase			Gal synthase			SQDG synthase		PG synthase	
		PlsX	GPAT	LPAAT	PAP	MGlcDG synthase	DGDG synthase	UDP-SQ synthase	SQDG synthase	CDP-DG synthase	PGP synthase
I	CC9311	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	MVIR-18-1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1
	PROS-9-1	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	ROS8604	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	SYN20	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	WH8016	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
II	A15-44	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	KORDI-52	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	M16.1	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	RS9902	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	RS9907	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	TAK9802	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	WH8109	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	A15-62	1	1	2	0	1	1	2	1	1	1
	CC9605	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	PROS-U-1	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
III	A15-24	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	A18-40	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	A18-46.1	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	BOUM118	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	RS9915	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	WH8102	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	WH8103	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	A15-28	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
IV	BL107	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	CC9902	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
V	BMK-MC-1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	WH7803	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
VI	MEDNS5	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1
	WH7805	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	PROS-7-1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
VII	A15-60	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	A18-25c	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	NOUM97013	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1
VIII	RS9909	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	RS9917	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	WH8101	1	1	2	0	2	1	1	1	1	1
IX	RS9916	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
CRD1	BIOS-U3-1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	MITS9220	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	BIOS-E4-1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
WPC1	A15-127	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
	KORDI-49	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
Envc	CC9616	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
UC-A	KORDI-100	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
5.2	CB0101	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	CB0205	1	1	2	1	1	0	1	1	1	1
	NS01	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	PCC6307	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	PCC7001	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	WH5701	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
5.3	MINOS11	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1
	RCC307	1	1	2	0	1	1	2	1	1	1
Cluster		220	1072	223	1999 /57084	327/57086	1040	123	333	760	991

Indeed, MGlcDG synthase is encoded in most cases by one gene, except in the WH8101 strain, which possesses two genes encoding the enzymes. The gene encoding the acyl-ACP thioesterase have not been identified yet, and therefore no cluster has been annotated.

b. ***Discussion***

The annotation of 11 clusters of genes involved in the synthesis of fatty acids has allowed estimating the degree of conservation of these genes in the marine *Synechococcus* genomes (Table 8). The FAS enzymes, essential to the synthesis of the membrane carbonic acyl chains, are present in almost the 53 *Synechococcus* genomes, with the exception of *Synechococcus* spp. PCC 7001, for which the gene encoding respectively the ENR enzymes was not found, probably due to sequencing mistakes or the incompleteness of these genomes. The large majority of these enzymes are encoded by only one gene. However, KASII, the enzyme that forms the β-ketoacyl-ACP and therefore allows the fatty acid elongation from C2 to C16 or C18, is encoded by two genes in some *Synechococcus* strains, as in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Nanjo et *al.* 2010). While the 53 strain possess one *fabF*, 22 of them possess a second gene, potentially encoding another version of the KASII enzyme (Klähn et *al.* 2015). As in *Synechocystis* these two genes are indeed distinct, displaying 40% of similarities in *Synechococcus*, whereas sll1069 and slr1332 of *Synechocystis* are at 30% identical. Interestingly, strains encoding the two KASII genes are the strains from the sub-cluster 5.1A (composed of clades II, III, IV, EnvC and WPC1), and two strains of cluster 5.2. Two evolutionary hypotheses are then possible, either the subscluster 5.1A and cluster 5.2 have acquired the putative second *fabF* gene independently along evolution, or the common ancestor had the gene and it has been lost in the strains of sub-cluster 5.1B (clades I, V, VI, VII, VIII, IX and CRD1) and cluster 5.3. The first hypotheses would involve horizontal gene transfer, while the second one suggests gene duplication events in the common ancestor. This could suggest that these clades have a faster translational rate of *fabF* genes, suggesting that they can produce more efficiently fatty acyl chain than clades possessing only one *fabF* gene. Also, it can be hypothesized than, with regard to the amino acid divergence between these two KASII enzymes, these isoforms could produce preferentially a given acyl chain length. It is not likely that this genomic feature is related to temperature adaptation as the sub-cluster 5.1A, include warm (II, III, EnvC, WPC-1) and cold (IV) clades.

At last, the fatty acid synthase pathway is completed by the potential action of an acyl-ACP thioesterase which cleaves the acyl chain to different length (Jones et *al.* 1995). However, this enzyme has not been yet identified in cyanobacteria. It could however have an interesting role with regard to the temperature induced variations observed in fatty acid length, and the regulation of the synthesis of the C14 chains.

The annotation of 13 gene clusters involved in the lipid polar head diversification revealed some variations among *Synechococcus* genomes (Table 9). The genes involved in the biosynthesis of PA, the precursor of all polar lipids, are identically distributed among the 53 genomes. Notably, LPAAT enzymes may be encoded by two *plsC* genes, showing 20% identity. The following pathways are more variable. Indeed, the gene encoding the PAP enzyme, catalyzing the formation of DG, precursor of the MGDG, DGDG and SQDG have not been found in 33 *Synechococcus* genomes. However, in regard to the key position of the PAP enzyme in the pathway, the absence of this gene is surprising, considering that these strains possess the enzymes involved in the subsequent steps of the galacto- and sulfoquinovo lipid synthesis. Some key enzymes have still not been identified in cyanobacteria and further studies should aim at identifying these genes coding for MGlcDG epimerase, PGP phosphatase, and PA phosphatase.

In a evolutionary perspective, phylogenetic pattern highlights that most of these genes are congruent with the genome core phylogeny, suggesting that these genes are ancestral. The genomic context of these genes is also highly conserved, and often composed of conserved genes. Furthermore, genes encoding the FASII are spread into the genomes and do not constitute a genomic island. Altogether, this strongly supports that these genes are part of the core genome, and have not diverged that much from the common ancestor.

Noteworthy, some enzymes are encoded by two genes, such as *plsC* (LPATT), as it is also the case in *Synechocystis*. The phylogenies of the latter enzymes are also congruent with the core phylogeny. The percentage of identity between the two amino acid sequences is rather low, about 20 %, therefore suggesting that these two genes originate from a very ancient duplication event. Other enzymes are encoded by two genes, but these genes are shared by a restricted number of strains, *i.e* KASII, PAP or UDP-SQ synthase. The case of KASII has already been discussed, but for the other enzymes these supplementary genes may originate from erratic gene transfers, are accessory genes.

4. Desaturase enzymes in marine *Synechococcus*

a. *Results*

In *Synechocystis* sp. PCC 6803, the synthesis of unsaturated fatty acids is catalyzed by four desaturase enzymes: DesA, B, C and D. In the same way as for the FAS and polar head enzymes, we searched for the genes encoding these desaturases in the marine *Synechococcus* genomes (Table 10) and identified four clusters of genes.

Table 10 | Desaturase genes in the genome of *Synechocystis* sp. PCC 6803. The genes encoding the enzymes and the locus tags are mentioned for the strain *Synechocystis* sp. PCC 6803 and have been retrieved from Cyanobase.

***Synechocystis* sp. PCC6803**				***Synechococcus* Clusters**
Desaturation site	**Enzymes**	**Gene**	**Locus tag**	
Δ12	DesA	*desA*	slr1350	1875/1343/6606
Δ15	DesB	*desB*	sll1441	-
Δ9	DesC	*desC*	sll0541	43/8117/8116
Δ6	DesD	*desD*	sll0262	-

To identify the genes and elucidate the relationships among these four marine *Synechococcus* gene clusters, we constructed and analyzed protein sequence phylogenies using Neighbor Joining and Maximum Likelihood methods, including well characterised desaturases of freshwater cyanobacteria. Fatty acid desaturase genes retrieved in the *Synechococcus* genomes range from 280 aa to 380 aa, while *Synechocystis* desaturases are usually 360 aa length. They appear to be all membranar as revealed by the presence of several successive transmembranar helix domains, as computed using the TMHMM prediction software. The number of transmembranar helices vary between four and six function of the desaturases.

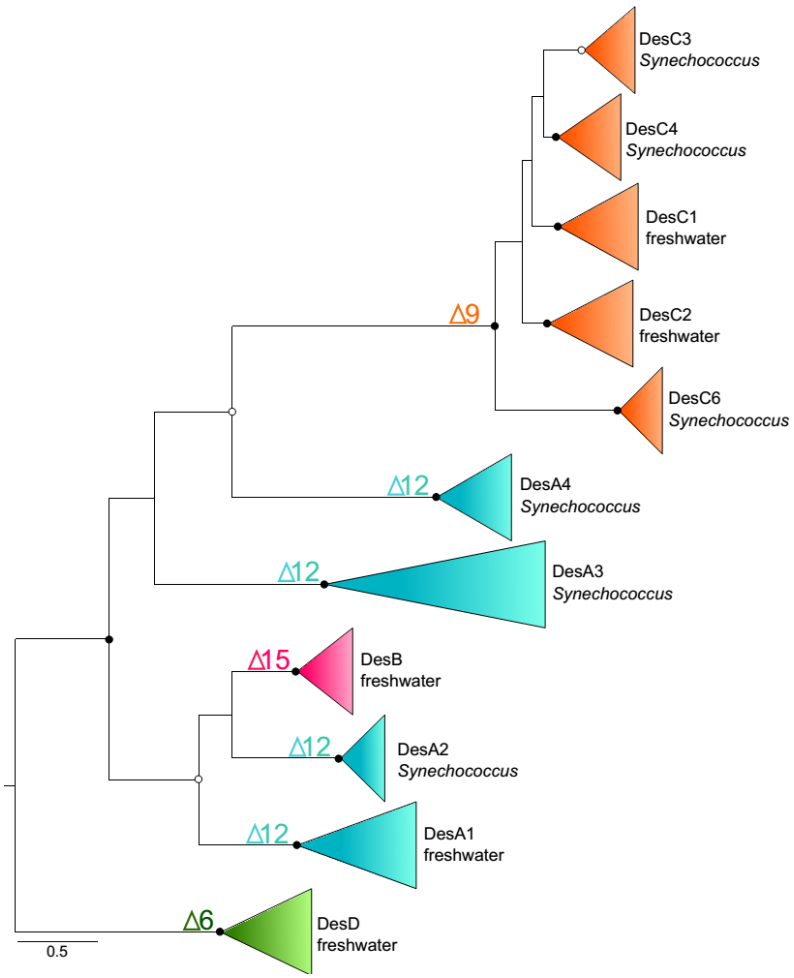


Figure 82 | Maximum likelihood analysis of aligned amino acid sequences of desaturases in marine *Synechococcus* and freshwater cyanobacteria, retrieved from Cyanorak v2 and Cyanobase. Marine

cyanobacteria are shown in blue color while freshwater cyanobacteria are in green. Only boostrap values above 70% are shown, empty circles represent values supported between 70-90%, and full circles values supported above 90%. DesC desaturases are shown in orange, DesA in blue, DesB in pink and DesD in green. The amino acid sequences DesD from freshwater cyanobacteria have been used as outgroup.

The phylogenetic analyses revealed that all cyanobacterial DesC protein sequences form a well supported monophyletic group, within which fall three out of the five newly annotated marine *Synechococcus* gene clusters encoding desaturases. These three new clusters of DesC genes form robust group supported with bootstrap values of 100%, and each of the desC clades show highly supported bootstrap values (Fig. 82). These observations are congruent with the study of Chi et *al.* (2008), who analysed 37 cyanobacterial genomes and reported that cyanobacterial Δ9 desaturases form a clear monophyletic group. By comparison to the histidine box motifs mentioned by these authors, it appears that the three new DesC clusters from marine *Synechococcus* possess distinct histidine motifs, but however typical of Δ9 signatures. Chi et *al.* (2008) defined 5 distinct possible histidine boxes in cyanobacterial DesC desaturases. While freshwater cyanobacteria encoding DesC1 and C2 have histidine boxes corresponding to Δ9-1 and Δ9-2, two of the marine *Synechococcus* clusters show motifs corresponding to the Δ9-3 and Δ9-4 types, as defined by Chi et *al.* (2008). We therefore named these clusters DesC3 and DesC4 (Fig. 82, Fig. 83)

	H-BOX 1	H-BOX 2	H-BOX 3
Δ9-1	GICLGYHRLLXHKSF	WXXXHRXHHAXXXD	YGEGWHNNHHXXPXXXXXGXXWWE
Δ9-2	GXTLGXHRXXXHRSF	WXXXHRXHHAXXXD	GEGWHNNHHXXXXSARHGXXWWE
Δ9-3	TVLGVTLGLHRLXAHRS	WXXLHRHHHXXSDQ	WVAXLSFGEGWHNNHHAXPXSARHGL
Δ9-4	CLGVTXGYHRLLXHRXX	WXGLHRHHHXFSDT	WVAALTFGEGWHNNHHAXPXSA
Δ9-5	GXXXXGXHRXFXHXXF	WXXXHRXHHXXXD	GESWHNNHHXFXXXAXXG
Δ12a	FVXGHDCGHRSF	WRXXHXXHHXXTN	HXPHHXXXXIPXYNLR
Δ12b	WVXAHECGHXAFH	WXXSHXXHHXXXN	HXXHHXXXXPHYXA
Δ12c	FSLMHDCGHXSLF	WSXXHAXHHXXNG	HXXHHLXERIPNYX
Δ15	FWXLFVVGHDCGHXSFS	HGWRISHRTHHXNTGN	IHHXIGTHVAHHIF
DesC3	TVLGVTLGLHRLVAHRS	WVGLHRHHHRFSDQ	WVALLSFGEGWHNNHHAHPASARHGL
DesC4	CLGVTXGYHRLLXHRXX	WXGLHRHHHKFSDT	WVAALTFGEGWHNNHHAXPHSA
DesC6	MLXTTAIYHRLXTHGSY	WKKAHHLAHHRHVD	XPXRXLMXXMPFHXEHHXFXSV
DesA2	WVXAHECGHXAFH	WARSHXVHHAXCN	HVCHHXNSXXIPHYNAW
DesA3	FSLMHDCGHQSLF	WSRGHAFHHKHNG	HHIHHLSERIPNYL
DesA4	FXXXHECXHRTAF	YRRYHQWHHRFTH	HXXHHLYXSXPFHAL

Figure 83 | Histidine boxes in cyanobacterial desaturase enzymes. In the upper panel are represented the five Δ9, two Δ12 and the Δ15 histidine boxes classically retrieved in cyanobacteria. The lower panel corresponds to the highly conserved motif observed in the desaturase gene clusters defined in marine *Synechococcus*. The red letters are the conserved histidine residues and "X" correspond to variable residues.

Beside the DesC3, C4 and C6 enzymes, two other clusters of desaturase genes have been evidenced. While one appears to be close to the known DesB group of freshwater cyanobacteria, the other group is not stable within the desaturase phylogeny, with poorly a supported node (Fig. 82). Exploring the histidine boxes of the two *Synechococcus* clusters, it appears that they possess motifs of the types Δ12b and Δ12c, as defined by Chi et *al.* (2008).The DesA4 cluster displays more variable histidine boxes but the positions of the key histidines are conserved. As these boxes are thought to determine the function of the active site and the regiospecificity of the protein, we based our annotation on the motif identification, rather than on the phylogenetic position of the groups. We thus propose that these protein clusters encode desaturases acting on the C12, and we therefore named them DesA2, DesA3 and DesA4. These clades are also highly supported, with bootstrap values of 100%.

Looking in more details at the phylogenies allowed observing the desaturase phyletic patterns. The DesC radiation includes the characterised DesC1 and DesC2 enzymes from freshwater cyanoabacteria, the latter being more closely related to DesC6 which is present only in the halotolerant cluster 5.2 *Synechococcus* strains (Fig. 82, Fig. 84, Table 10). The DesC3 and DesC4 groups, commonly present in marine *Synechococcus*, form a monophyletic cluster but are well separated from each other. DesC4 is present in all strains from the clusters 5.3, 5.2 clusters and the 5.1B subcluster, *i.e* clades I, V, VI, VII, VIII, IX, CRD-1, and the clade IV from the sub-cluster 5.1A (*i.e* clades II, III, IV, WPC-1, UC-A and EnvC). DesC3 is the only desaturase being present in all the 54 investigated *Synechococcus* genomes.

The DesA radiation shows the four distinct monophyletic groups, with the freshwater cyanobacteria DesA quite distinct from the DesA2, A3, A4, which forms a monophyletic cluster (Fig 84). Whereas clades I and IV do not possess DesA2, DesA3 is represented in all the clades and DesA4 is represented only by the sub-cluster 5.2.

b. Discussion

i. Diversity and putative functions of the desaturases of marine *Synechococcus*

The study of the desaturase gene diversity in marine *Synechococcus* revealed distinct enzymes compared to the well known *Synechocystis* sp. PCC 6803. Indeed, the latter cyanobacterium encodes four desaturases, DesA, B, C1 and D whereas, based on the phylogeny and the histidine box motifs, marine *Synechococcus* possess DesC3, DesC4, DeC6 and DesA2, DesA3 and DesA4 desaturases. In comparison to the Chi et *al.* (2008) study, our approach has allowed proposing names and putative functions for these desaturases following the already published nomenclature. We have moreover identified two novel desaturases apparently specific to cluster 5.2 strains (Fig. 84, Table 11).

Our function identifications imply that, in marine *Synechococcus*, a membrane acyl chain could not bear more than two desaturations, located at the Δ9 and Δ12 carbons.

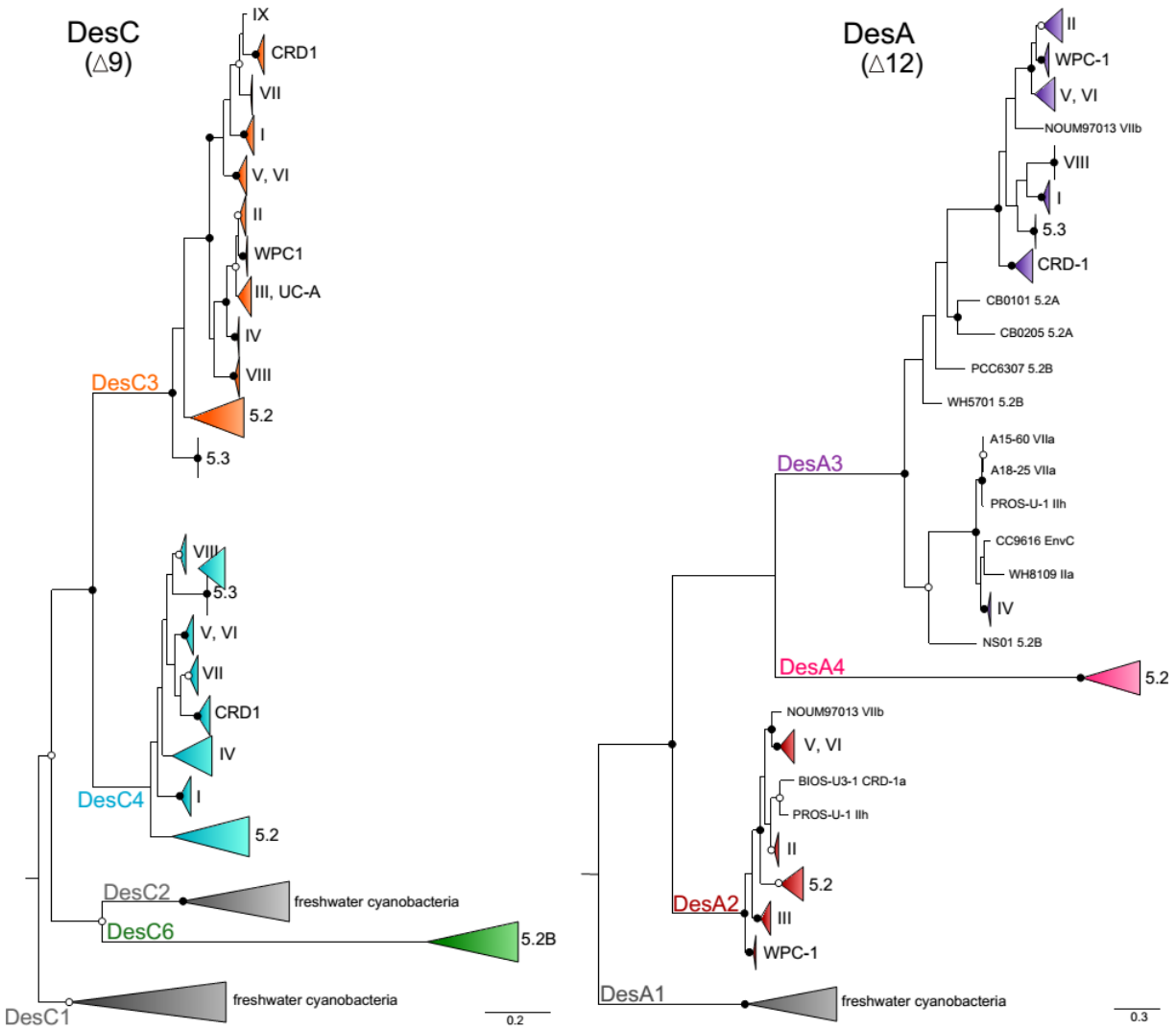


Figure 84 | Maximum-likelihood analysis of amino acid sequences of desaturases DesC (Δ9) and DesA (Δ12) in marine *Synechococcus*. The analysis is based on the alignment of amino acid sequences retrieved from the 54 marine *Synechococcus* genomes. Bootstrap values have been calculated over 500 repetitions. Only bootstrap values above 70 % are shown, nodes supported at 100 % are shown by black circles, and nodes supported between 70 – 90 % by white circles.

Many different hypotheses regarding the precise action sites of the six marine *Synechococcus* desaturases can be raised. Indeed, it has been shown that the reaction catalysed by these enzymes can be specific of certain lipids (SQDG, PG, MGDG or DGDG) or/and of certain *sn*-positions (*sn*-1 or *sn*-2), or/and of certain acyl chain lengths (C14, C16 or C18; Sato & Wada 2010). There are therefore a high number of site possibilities.

Table 11 | Phyletic profiles of desaturase encoding genes in marine *Synechococcus* genomes. Distribution of the different genes coding for the enzymes involved in the introduction of double bonds into the acyl chain of

membrane lipids, in 54 genomes of marine *Synechococcus*Clades are mentioned for each strain, and the final row is the cluster number created in Cyanorak.

Clade	Strain	DESATURASES					
		DesC3 (Δ9)	DesC4 (Δ9)	DesC6 (Δ9)	DesA2 (Δ12)	DesA3 (Δ12)	DesA4 (Δ12)
I	CC9311	1	1	0	0	1	0
	MVIR-18-1	1	1	0	0	1	0
	PROS-9-1	1	1	0	0	1	0
	ROS8604	1	1	0	0	1	0
	SYN20	1	1	0	0	1	0
	WH8016	1	1	0	0	1	0
II	A15-44	1	0	0	1	0	0
	KORDI-52	1	0	0	0	0	0
	M16.1	1	0	0	1	0	0
	RS9902	1	0	0	1	0	0
	RS9907	1	0	0	1	0	0
	TAK9802	1	0	0	1	0	0
	WH8109	1	0	0	1	1	0
	A15-62	1	0	0	1	0	0
	CC9605	1	0	0	1	0	0
	PROS-U-1	1	0	0	1	1	0
III	A15-24	1	0	0	1	1	0
	A18-40	1	0	0	1	0	0
	A18-46.1	1	0	0	1	1	0
	BOUM118	1	0	0	1	1	0
	RS9915	1	0	0	1	1	0
	WH8102	1	0	0	1	1	0
	WH8103	1	0	0	1	1	0
	A15-28	1	0	0	1	1	0
IV	BL107	1	1	0	0	1	0
	CC9902	1	1	0	0	1	0
V	BMK-MC-1	1	1	0	1	1	0
	WH7803	1	1	0	1	1	0
VI	MEDNS5	1	1	0	1	1	0
	WH7805	1	1	0	1	1	0
	PROS-7-1	1	1	0	1	1	0
VII	A15-60	1	1	0	0	1	0
	A18-25c	1	1	0	0	1	0
	NOUM97013	1	1	0	1	1	0
VIII	RS9909	1	1	0	0	1	0
	RS9917	1	1	0	0	1	0
	WH8101	1	1	0	0	0	0
IX	RS9916	1	1	0	0	1	0
CRD-1	BIOS-U3-1	1	1	0	1	1	0
	MITS9220	1	1	0	0	1	0
	BIOS-E4-1	1	1	0	0	1	0
WPC-1	A15-127	1	0	0	1	1	0
	KORDI-49	1	0	0	1	1	0
EnvC	CC9616	1	0	0	0	1	0
UC-A	KORDI-100	1	0	0	0	0	0
5.2	CB0101	1	1	0	1	1	1
	CB0205	1	1	0	1	1	1
	NS01	1	1	1	0	1	1
	PCC6307	1	1	1	0	1	1
	PCC7001	1	1	1	0	0	1
	WH5701	1	1	1	0	1	1
5.3	MINOS11	1	1	0	0	1	0
	RCC307	1	1	0	0	1	0
Cluster		43	8117	8116	1875	1343	6606

For instance, in *Nostoc* sp., the DesC1 desaturase acts on the C18 fatty acid esterified at the *sn*-1 position, whereas DesC2 can desaturate the fatty acid bound to the *sn*-2 position (Chintalapati et *al.* 2006). Similarly, one might hypothesise that the action of the distinct forms of the DesC and DesA of marine *Synechococcus* could be specific of certain acyl chain. In this contexte, it is thus hardly possible to precisely determine the specificities of these three Δ9 and Δ12 desaturase enzymes only based on genomic data, and a biochemical characterisation is definitely needed.

The model strain *Synechococcus* sp. WH7803, which we analyzed in the first part of this chapter, possesses four desaturases: the two Δ9 desC3, C4 and the two Δ12 . It is worth noting that we detected three types of Δ9 desaturations (C16:1, C18:1 and C14:1) and no Δ12 ones. It is probable that the 16:1 monounsaturation, which is the most common in membranes, is catalysed by DesC3, as this enzyme is present in all strains. The presence of two others types of Δ9 desaturations suggests that this enzyme or the desC4 one can act on two sites. The ongoing analyses of the stereolocalization of the unsaturations on the different complex lipid classes of *Synechococcus* sp. WH7803 will give some new insights on the possible function of the two desaturase enzymes.

Interestingly, in *Synechocystis* sp. PCC6803, only three of the four desaturase genes are cold inducible, *desA, B* and *D* (Los et *al.* 1997). The synthesis of DesC was not induced under cold conditions and the amount of Δ9 monounsaturated acyl chains remained fairly constant (Nanjo et *al.* 2011, Wada & Murata 1990). It is then possible that DesC desaturases do not have a specific function in the response to temperature variations, but rather introduces “constitutive” desaturations that are always present in the membranes. This is supported by the fact that the attempts to construct DesC mutants have so far failed, the mutation being seemingly lethal (Tasaka et *al.* 1996). By contrast, when *desA* and *desD* were inactivated, *Synechocystis* suffered from a dramatic decrease in membrane fluidity (Tasaka et *al.* 1996, Szalontail et *al.* 2000), and lost its ability to acclimate to low temperature. Accordingly, and even though these results need to be confirmed, the lipidomic data presented in this chapter do not show any change in the Δ9 unsaturation level of *Synechococcus* sp. WH7803 in response to low temperature.

In contrast to the lipid biosynthesis machinery, the acyl desaturation enzymatic equipment of marine *Synechococcus* obviously differs from freshwater cyanobacteria, reflecting the divergences in the phylogenetic history and the ecological niches between these organisms. The unique desaturase composition might lead to reconsider the desaturation classification of cyanobacteria proposed by Sato and Wada (2009). Indeed, these authors proposed the distinction of four cyanobacteria groups (Fig. 76). The first group possesses only DesC (Δ9), the second group is characterized by the presence of DesC1 and DesC2, as DesA and DesB, the group 3 possesses also three desaturases, DesC1, DesB and DesD, while the fourth group uses the four enzymes. In this configuration, the marine

Synechococcus desaturase equipment, DesC and DesA does not match any of these groups and a novel group could be created. Further investigations should explore other marine cyanobacteria (*e.g. Prochlorococcus*, *Crocosphaera*, *Trichodesmium*) in order to assess whether *Synechococcus* is the only marine cyanobacterium encoding these specific desaturases, or whether the classification based on freshwater cyanobacteria desaturation capacities does not apply to the marine cyanobacteria in general, which would have evolved their own desaturation modalities.

ii. Clade distribution and geographic distribution of the desaturases of marine *Synechococcus*

The phyletic profiles revealed by this study show that some of the desaturase genes are differentially distributed among the 54 genomes. Representative strains of clade II are characterized by the lower number of genes encoding desaturase (Fig. 85). Clade III strains possess in average 2.87 desaturase genes and all the strains from clades I and IV encode 3 desaturases. Clade V and VI strains possess the 4 enzymes. The sub-cluster 5.2 shows the most orginal fatty acid desaturase composition, including up to six genes.

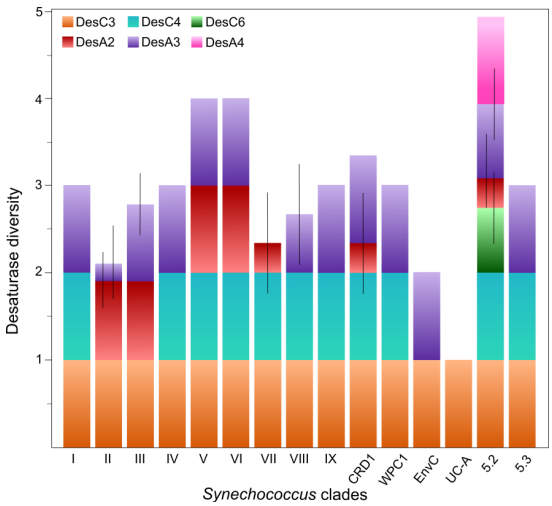


Figure 85 | Clade phyletic profile of desaturase genes in marine *Synechococcus*. Mean of the number of desaturase types (DesC3, DesC4, DesC6, DesA2, DesA3 and DesA4) in marine *Synechoocccus* clades are shown with standard deviation calculated on the number of genomes available for each clade (DesC2, orange ; DesC3: blue ; DesC6, green ; DesA2, red; DesA3, purple ; DesA4: pink).

The cold-adapted clades I and IV strains possess DesC3, DesC4 and DesA3, suggesting that, in these organisms, there can be at least three different types of desaturations: one at a Δ12 carbon, and two at Δ9 carbons of either different acyl chains (*sn* position and/or length) or/and on different lipids. This desaturase composition is consistent with the recent study of Varkey et *al.* (2015), which reported the occurrence of three homologous genes in the clade I strain CC9311 and the clade IV strain BL107, without identifiying them. The Δ12 desaturase DesA3 can act only after the intervention of either

DesC3 or DesC4, *i.e.* on an acyl chain monosaturated at the Δ9 carbon (Higashi & Murata 1993). By contrast, the warm-adapted clades II and III strains possess the *desC3*, *desA2* and *desA3* genes, but none of these strains possess *desC4*, similarly to the genes reported in *Synechococcus* spp. WH8109 (clade II) and WH8102 (clade III; Varkey et *al.* 2015). This suggests that, in these organisms, there can also be at least three different types of desaturations in the membranes, but only one desaturation type at a Δ9 carbon and two different ones at Δ12 carbons.

If, as suggested in freshwater cyanobacteria, DesC enzymes introduce constitutive Δ9 desaturations (see above; Higashi & Murata), it is possible that the three marine *Synechococcus* Des, C3, C4 and C6, are not directly involved in the dynamic membrane acclimation process to low temperature. Instead, they would form constitutive desaturations, which are prerequisites to the introduction of additional Δ12 desaturations (Higashi & Murata 1993). In this case, the cold-adapted clades I and IV would have two "constitutive" Δ9 desaturations in their membranes, whereas the warm-adapted clade II and III strains would have only one. The latter strains could however induce the formation of two types of Δ12 desaturation types in response to a decrease in temperature, whereas for clade I and IV strains, which inhabit cold waters, a single Δ12 desaturase would be sufficient. Therefore, in this context, the main membrane adaptation traits differentiating the cold- and warm-adapted clades would be a higher constitutive Δ9 desaturation level in the former ones, and a higher capacity of induction of Δ12 desaturations in the second ones. Noteworthy, the second DesA3 Δ12 desaturase is present in most clade III strains but is absent of many clade II strains, which in turn would have very low desaturation induction capacities. This is quite in agreement with the apparent specialization of this clade to warm thermal niches.

Using the isolation site coordinates of the *Synechococcus* strains, we have completed our analysis with a view of the geographic distribution of the different desaturases (Fig. 86). As DesC3 is present in all marine *Synechococus*, it is present in all the distribution area of this cyanobacterium, from tropical waters to high latitudes. The DesC4 desaturase is found in most clades but in the warm-adapted clades II and III strains (and the *Synechococcus* sp. CC9916 and KORDI-49, the unique representatives of clades EnvC and UC-A, respectively). This desaturase is therefore essentially found at latitudes above 30°N/S, with few exceptions such as three Red Sea strains *Synechococcus* spp. RS9909, RS9917 and RS9916. This is in agreement with the hypothesis that this Δ9 desaturase plays a role in the adaptation of marine *Synechococcus* to cold waters. By contrast, the Δ12 desaturase DesA2 is clearly a low latitude desaturase, as it is absent above 40°N/S. This is also in agreement with the idea that this Δ12 desaturase is an inducible enzyme helping warm-adapted *Synechococcus* to deal with a decrease in temperature. The desA3 distribution is seemingly wider, suggesting that this Δ12 desaturase is a less specialized inducible enzyme used by many marine *Synechococcus* to respond to temperature changes (Fig. 86).

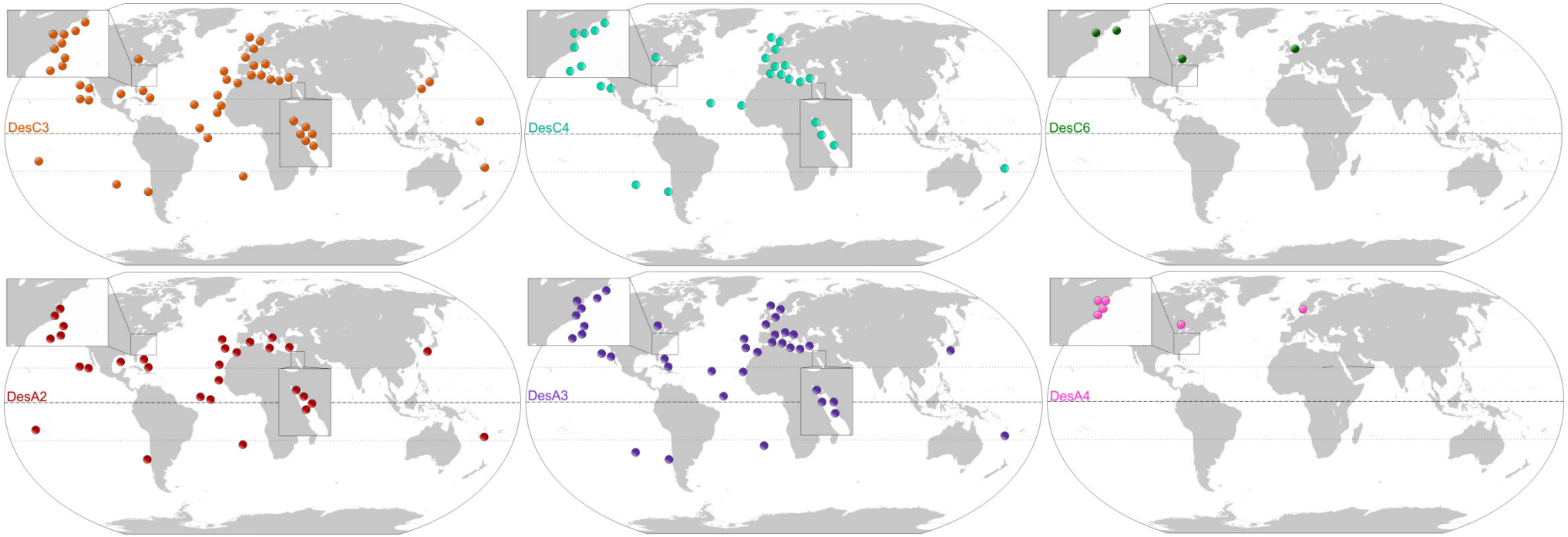


Figure 86 | Geographic distribution of desaturases of marine *Synechoocccus* whose genome has been entirely sequenced. Each map represents the distribution of a desaturase, as derived from the isolation site coordinates of the *Synechococcus* whose genome has been sequenced., Δ9 DesC3 (orange), Δ9 DesC4 (blue), Δ9 DesC6 (green), Δ12 DesA2 (red), Δ12 DesA3 (purple) and Δ12 DesA4 (pink).

In addition, it is remarkable that most of the strains that possess only two desaturases are distributed within the tropical latitudinal band (not shown). In these warm waters, having a high number of desaturases indeed seem rather useless. By contrast, strains isolated outside of this area generally have three or four desaturase genes (sometimes five or six in coastal areas).

Strains using four desaturases are all found in temperate and coastal waters (Mediterranean Sea and North-East Atlantic Ocean; except for NOUM97013). Living in these environments which display large temperature variations and which are less stable than open ocean waters, may necessitate a larger range of desaturases in order to finely and rapidely regulate membrane fluidity.

The DesC6 and DesA4, found only in the cluster 5.2 is then distributed only at high latitudes, in a very coastal environments where the abiotic parameters are usually highly variable. It is the possible that a large panel of desaturase is necessary to adjust membrane fluidity function of these conditions.

iii. Evolution of the desaturase enzymes in marine *Synechooccus*

The diversity and the clade distribution of the desaturase genes in the *Synechococcus* radiation shows that most of these genes, with the exception of DesC3, are not included in the core genome and are therefore part of the accessory genome. They are expected to contribute to the specificity of the strains, and the enzymatic capacities they provide probably improve their competitiveness in a given thermal niche. It is possible to try to understand some aspects of the evolutionary history of these enzymes within the *Synechococcus* radiation.

The *desC3* and *desC4* genes are most often closely located on the genome, separated by only one gene encoding an unknown protein, while the other *des* genes are rather spread in the genomes. This suggests that genes *desC3* and *C4* originate from a quite recent gene duplication event and that they are probably specific of the marine *Synechococcus* radiation. Furthermore, with regard to the phylogeny (Fig. 82 and 84) and the amino acid sequence BLAST results (50% of similarities between DesC3 and DesC1 from *Synechocystis* sp. PCC 6803, and 70% between the latter and DesC4), it appears that DesC4 is the closest desaturase to the freshwater DesC1. Interestingly, the gene of this enzyme is also present in all the *Prochlorococcus* genomes of the Cyanorak v2 database (not shown), which may suggest that it was present before the divergence of the *Prochlorococcus* radiation from the marine *Synechococcus* group. As a working hypothesis, we propose that the *desC4* gene is, derived from an old duplication event of the freshwater *desC1* gene, and would have then duplicated to give rise to *desc3* genes.

Althought this scenario might appear counterintuitive, since the *desC3* genes is part of the marine *Synechococcus* core genome, it does fit well with the different bioinformatic analyses. This hypothesis would imply that there were subsequent *desC4* gene losses in strains of the sub-cluster 5.1A (*i.e.* clades II, III, IV and WPC1 and UC-A), and that the gene was secondarily reacquired only by

clade IV strains. This is congruent with the unexpected phyletic position of clade IV sequences in the DesC4 phylogenetic tree (Fig. 87). Indeed, the phylogenetically position of clade IV DesC4, located close to clade I is not consistent with the core phylogeny that shows a significant distance between these two clades.

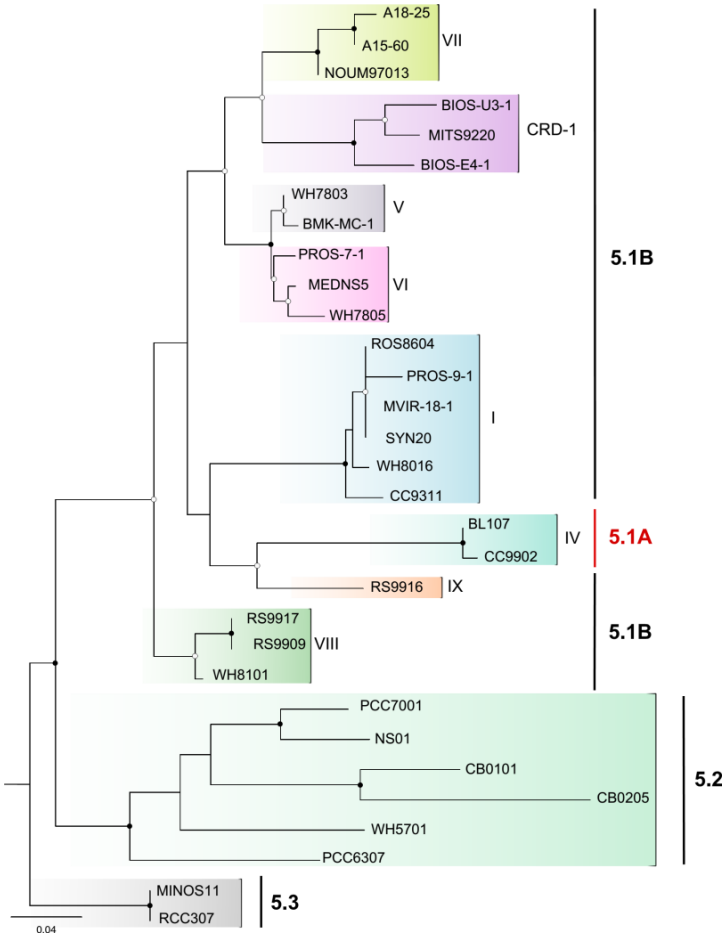


Figure 87 | Maximum likelihood analysis of DesC4 amino acid sequences in *Synechococcus* genomes. Bootstraps have been calculated from 500 repetitions. The two strains *Synechococcus* spp. MINOS11 and RCC307 (cluster 5.3) have been used as an outgroup. DesC4 is encoded by all the *Synechococcus* belonging to clades from the sub-cluster 5.1B, *i.e.* I, V, VI, VII, VIII, IX and CRD-1, but also by only one clade of the sub-cluster 5.1A: the clade IV. Only bootstraps values higher than 70 % are represented, the ones between 70-90 % are represented by empty circles, and values higher than 90 % by full circles.

Morevoer, a thourough inspection of the genomic environment of the *desC3 and C4* genes suggest that, despite the overall high degree of gene conservation around them, the probability of gene recombination around *desC4* is likely to be high. Indeed, the genomic region between *desC3* and *rpll* is variable, in contrast with the very conserved order of the other genes (Fig. 88). For example, *Synechococcus* sp. PROS-U-1, which does not have *desC4*, has integrated instead a giant gene encoding an unknown protein. Interestingly, compared to the 5.1B clades, the clade IV strains do not have the gene (in grey) inserted between *desC3* from *desC4*, just like the other clades of the 5.1A radiation. Therefore one may hypothesize that the *desC4* loss in the 5.1B was accompagnied by the loss of the hypothetical gene,that clade IV would have secondarily reacquired only the *desC4* gene.

This evolutive scenario illustrates the distinct evolutionary history of the *desC4* gene in clade IV compared to the other clades. This possible secondary acquisition of a Δ9 desaturase have probably played a role in the colonisation of cold environments by clade IV *Synechococcus*, while the other clades from the sub-cluster 5.1A (II, III, UC-A and WPC-1) would not suffer of the loss since they inhabit warmer waters. The origin of this secondary acquisition is not clear, but *desC4* gene of clade IV strains may have been acquired from clade I or IX, both closely related in the DesC4 phylogeny.

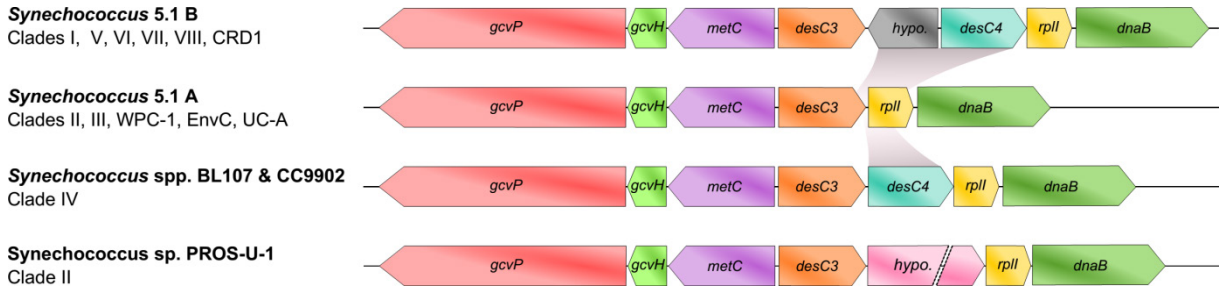


Figure 88 |Different genomic region configurations of the *desC3* and *desC4* genes in the marine *Synechococcus* cluster 5.1. Most *Synechococcus* belonging to the 5.1B subclusters have a gene encoding a hypothetical protein (grey *hypo*.) inserted between the two *desC* genes whereas the *Synechococcus* 5.1A strains have probably lost this gene along with *desC4*. Clade IV may have however secondarily reacquired only the desC4 gene. Indeed, lateral gene transfert appears possible in this region with regard, for example, to the massive insertion of a giant gene encoding a hypothetical protein (pink *hypo.*) in *Synechococcus* sp. PROS-U-1 (the giant gene is cut). Genomic context: *gcbP* encoding glycine dehydrogenase, *gcvH* for glycine cleavage system H protein, *metC* cysthationine beta-lyase family involved in aluminium resistance, *rplI* encoding 50S ribosomal protein, *dnaB* replicative DNA helicase.

A second hypothesis can however not be ignored. This scenario would suggest that despite its longer phylogenetic distance (Fig. 82 and 84) and lower identity percentage with DesC1, DesC3 would actually be the ancestor desaturase of marine picocyanobacteria, and that the gene would have been lost in all the *Prochlorococccus* radiation along its genome reduction.

The *desC* radiation also contains a specific cluster, *desC6*, which is present only in strains belonging to the 5.2 cluster. This group, phylogenetically distant from the other DesC, most likely arised from lateral gene transfer. BLAST analyses of these divergent sequences revealed that their closer homologues (64% identity) are Δ9 fatty acid desaturases from the freshwater and halotolerant cyanobacteria such as *Lyngbya aestuarii* and marine *Rivularia* sp. PCC 7116. This desaturase, specific to the halotolerant *Synechococcus* from the cluster 5.2 is probably required for the adaptation to their specific environmental niche.

The study of the evolutive history of Δ12 desaturases suggests a stormy past. The variable genomic context of these desaturases highlights this complex evolution history. The DesA2 group is the most closely related to the DesA enzymes from freshwater cyanobacteria and is present in the large majority of *Prochlorococcus* genomes available in the Cyanorak v2 database.

This would suggest that this desaturase is the oldest DesA of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*, but would have been subsequently massively lost in many *Synechooccus* clades I, IV, VIII, 5.3 and some strains of CRD-1, and clade II, VII and 5.2. DesA3 desaturase has a complex phylogenetic pattern, with long phylogenetic distance between clades, suggesting many possible recombination events along evolution. This desaturase is related to the DesA4, which is found only in cluster 5.2 strains.

The evolution pattern of marine *Synechococcus* desaturase suggests that, during the evolution, these enzymes have been probably the subject of many recombination events and marked by losses among *Synechococcus* picocyanobacteria. Through their apparent facility for being exchanged, they probably are among the important genes that have allowed the colonisation of different thermal latitudinal niches by marine *Synechococcus*.

Discussion Generale & Perspectives

Rôle de la température dans la diversification des Synechococcus *marins*

Mon travail de thèse, à travers l'étude de souches de *Synechococcus* marins disponibles en culture, bien que représentant une vision restreinte de la diversité présente dans l'environnement, a permis des avancées importantes dans la compréhension de l'importance du facteur température dans la diversification de la radiation des *Synechococcus* marins, et soulève de nouvelles hypothèses et pistes de recherche à explorer dans les années à venir.

Les travaux présentés dans le premier chapitre visaient à déterminer s'il existait, au sein de la radiation des *Synechococcus* marins, des lignées spécialisées dans des niches thermiques distinctes. L'étude comparative de la physiologie de souches de *Synechococcus* marins, isolées à différentes latitudes et appartenant à des clades dominants dans l'environnement, a mis en évidence des différences claires de *preferenda* thermiques et de capacités de réponse à un stress thermique. Ces capacités d'acclimatation à la température sont liées à la latitude d'isolement des souches, qui est directement liée à la température de l'eau de mer. Alors que la majorité des clades de *Synechococcus* marins est retrouvée dans les eaux chaudes, tropicales et intertropicales (dont les clades II et III), les clades I et IV se sont différenciés au cours de l'Evolution du reste de la radiation par des adaptations spécifiques qui leurs ont permis de coloniser des niches thermiques froides de hautes latitudes. De façon intéressante, ces deux clades appartiennent à des lignées distantes au sein de la radiation des *Synechococcus* marins, 5.1A et 5.1B. Des études antérieures ont proposé qu'au regard de leur histoire évolutive commune, les clades de *Synechococcus* marins d'un même sous-cluster (5.1A et 5.1B) pourraient avoir des niches écologiques similaires ; ces sous-clusters avaient d'ailleurs été initialement décrits comme « oligotrophique/spécialiste » pour le 5.1A (formé par les clades II, III et IV) et « généraliste/opportuniste » pour le 5.1B (formé par les clades I, V, VI, VII, VIII). Cette proposition avait émergé notamment du fait que les souches appartenant au sous-cluster 5.1A avaient significativement moins de gènes d'enzymes impliquées dans la détection et la réponse aux variations de l'environnement que leur cousines appartenant au 5.1B (Palenik et *al.* 2006, Dufresne et *al.* 2008). La radiation des *Synechococcus* marins nous apparait à présent plus complexe que cela. La colonisation de niches écologiques similaires par des clades distants pourrait en effet avoir eu lieu plusieurs fois et de façon indépendante (Sohm et *al.* 2015). Cette adaptation aux niches froides, qui s'est faite par la sélection de traits adaptatifs spécifiques aux clades I et/ou IV, illustre probablement un exemple de convergence évolutive chez les *Synechococcus* marins, *i.e* le résultat de l'évolution au sein de lignées distinctes soumises à un même problème adaptatif, vers une réponse similaire. La convergence évolutive a été très probablement facilitée par de multiples évenements de transferts latéraux de gènes adaptatifs, provenant par exemple de bactéries hétérotrophes et/ou d'autres picocyanobactéries (Kettler et *al.* 2007, Dufresne et *al.* 2008, Scanlan et *al.* 2009, Zhaxybayeva et *al.*

2009, Biller et *al.* 2014). Il a été montré que ces échanges génétiques sont également arbitrés par des cyanophages capables d'infecter de multiples clades de *Synechococcus* (Sullivan et *al.* 2006, Beja et *al.* 2012). Ainsi, des gènes adaptatifs spécifiques de la tolérance au froid auraient pu être transférés chez les clades I et IV, comme cela a été le cas pour les gènes photosynthétiques (RC, PBS, *etc*.), transférés horizontalement entre *Synechococcus* et qui ont permis l'établissement d'une grande diversité pigmentaire dans toute la radiation (Six et *al.* 2007, Humily et *al.* 2013).

La co-occurrence des clades I et IV soulève la question de savoir si ces clades sont en compétition pour la même niche ou s'il existe un effet synergétique entre ces derniers (Zwirglmaier et *al.* 2008). Dans le milieu océanique, la co-occurrence d'espèces ou d'écotypes peut être considérée comme inattendue selon la théorie du *plankton paradox*, qui prédit que deux espèces ne peuvent coexister de manière stable si ces dernières utilisent les mêmes ressources, et aboutit généralement à la persistance d'une seule d'entre elles (Hutchinson 1961). Ainsi, il est fort probable que des facteurs de type *bottom-up* autres que la température influencent la distribution de ces clades, tels que par exemple l'utilisation du phosphore ou de l'azote organique, mais également des pressions de type *top-down* telles que le broutage (Apple et *al.* 2011), les infections des cyanophages (Suttle et *al.* 2007) et l'allélopathie (Paz-Yepes et *al.* 2013).

Plus récemment, une étude a proposé que la multiplicité d'écotypes au sein d'un biome contribue à sa stabilité en constituant un réservoir de diversité génétique à partir duquel certaines souches adaptées peuvent émerger avec succès si l'environnement venait à changer (Biller et *al.* 2014). La perte potentielle d'un écotype, pourrait également être contrebalancée par la persistance d'un autre, soutenant alors l'écosystème (Sohm et *al.* 2015). Au regard de la très fréquente co-distribution des clades I & IV, il se pourrait en effet qu'il existe des effets synergiques, et que la présence de l'un promeut le développement de l'autre. De plus dans un contexte plus large, il est possible que les cas de co-occurrence d'écotypes de *Synechococcus* dans les océans (clades I & IV, II & III, V & VI, *etc*) créent un potentiel de résilience au sein des microorganismes marins. Ce réservoir de diversité se révèlera probablement utile dans le contexte de changement climatique, assurant ainsi le maintien du succès écologique des *Synechococcus* marins (Sohm et *al.* 2015).

Il est probable qu'il existe également au sein des clades d'environnements froids, une microdiversité taxonomique et fonctionnelle, induisant des distributions différentielles d'organismes d'un même clade. Par exemple, les souches du clade I ont montré différentes capacités d'acclimatation aux basses températures et des réponses graduelles à un stress froid, qui correspondent à leur latitude d'isolement dans la zone de distribution du clade I (Pittera et *al.* 2014). Ainsi, il est possible que les souches du clade IV présentent également un tel gradient de thermophysiologie qui reflète le gradient latitudinal de température. L'étude de ces souches qui ont

probablement mis au point durant l'Evolution différents degrés d'adaptation au froid permettrait probablement de disséquer les traits adaptatifs qui ont permis la colonisation progressive des eaux tempérées froides et subpolaires.

L'abondance des *Synechococcus* marins à PE chute drastiquement au delà de 65 °N (Cottrell et *al.* 2008), et ils ne sont plus détectés en deçà de 2 °C (Doolittlle et *al.* 2008). Cela suggère l'existence de filtres écologiques et/ou de barrières géographiques, à l'origine des patrons de biogéographie des microbes marins. Les caractéristiques thermophysiologiques font ainsi des *Synechococcus* des clades I & IV des organismes psychotolérants plutôt que de réels psychrophiles (Tang et *al.* 1997). Cependant, l'existence de vrais psychrophiles chez les *Synechococcus* marins n'est pas à exclure. La présence de cellules du cluster 5.2, dépourvues de PE et par conséquent difficiles à identifier au cytomètre, a d'ailleurs été détectée par des techniques de biologie moléculaire dans l'océan subarctique et arctique (Huang et *al.* 2011), mais aucune culture n'a pu être mis en place. Au delà des cercles polaires, d'autres microorganismes semblent avoir développé des stratégies très efficaces pour être compétitifs dans les eaux très froides tels que la picoalgue verte *Micromonas* (Lovejoy et *al.* 2007), l'un des organismes photosynthétiques les plus abondants à ces latitudes, ou encore la bactérie photohétérotrophe SAR11 (Rappé et *al.* 2002). Il est étonnant de constater que les picocyanobactéries sont pourtant dominantes dans quasiment tous les systèmes polaires d'eau douce (Vincent et *al.* 2012). Cette grande différence d'abondance entre picocyanobactéries d'eau douce et marines à ces latitudes soulève la question des raisons de l'aversion des *Synechococcus* marins pour le froid polaire, et suggère l'existence de verrous physiologiques empêchant l'adaptation aux niches polaires chez les *Synechococcus* marins.

L'appareil photosynthétique : un des verrous physiologiques de la distribution latitudinale ?

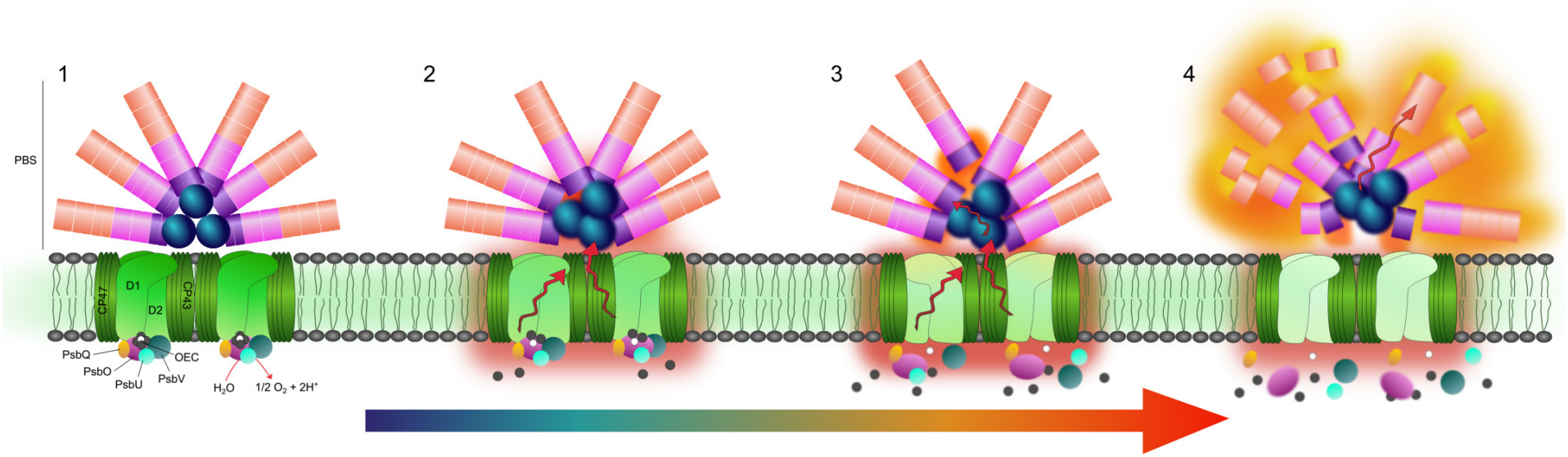
La photosynthèse pouvant potentiellement constituer l'un des mécanismes physiologiques limitant la distribution des *Synechococcus* marins, le second chapitre de cette thèse présente une étude comparative de la thermostabilité du PSII chez différents thermotypes de *Synechococcus* marins.

En premier lieu, l'étude approfondie du PBS a révélé des cinétiques de perturbations lors de stress thermiques distinctes face au froid et au chaud, qui semblent communes à toutes les souches de *Synechococcus*. L'exposition des *Synechococcus* marins à un stress froid en conditions illuminées

induit en premier lieu des modifications de la partie distale du bras du PBS, qui aboutissent au détachement des PE et à leur dégradation (Pittera et *al.* 2014, Chapitre 2. III, Six et *al.* 2007). Le détachement et la dégradation, notamment des PE-II, semblent être une des réponses génériques des *Synechococcus* marins face à un stress brutal, qui a d'ailleurs déjà été caractérisée en réponse à des stress UV (Six et *al.* 2007), et HL (non représentées). Ce mécanisme, dont on ne sait s'il est passif ou coordonné par des protéases, pourrait constituer une stratégie de photoprotection en induisant la dissipation de l'énergie incidente sous forme de fluorescence, empêchant ainsi les photons excédentaires d'atteindre le RC. La PE-II étant une protéine relativement stable par rapport aux autres PBP (Pittera et *al. soumis*), il est possible que le détachement de la PE-II lors d'un stress froid résulte d'un changement conformationnel des polypeptides de liaisons qui stabilisent l'association des différents hexamères. Ainsi, un PBS aux bras plus courts, possédant par conséquent moins de *linkers,* pourrait être moins sensible à ce mécanisme de démantèlement du PBS dans le froid. La majorité des *Synechococcus* du cluster 5.2 possèdent des projections radiaires courtes, souvent dépourvues de PE. Il est ainsi possible que les cellules appartenant à ce cluster, detectés dans les océans polaires possèdent également cette pigmentation (type pigmentaire 1, Six et *al.* 2007).

Lorsque le PSII est exposé à une augmentation rapide de la température, en condition d'obscurité, les premières perturbations trouvent leur origine au niveau du RCII, qui induit alors la déstabilisation de la partie proximale des bras du PBS, la PC, ainsi que probablement le cœur d'APC (Pittera et *al. soumis*, Chapitre 2). L'étude conjointe du PBS et du RCII nous permet de proposer un modèle hypothétique résumant les différentes étapes possibles des réajustements/perturbations structurales et fonctionnelles du complexe lors d'une augmentation rapide de température dans l'obscurité (Fig. 89).

Les différentes approches physiologiques, biochimiques et bioinformatiques entreprises dans ce chapitre soulignent l'existent de différents éléments clé impliqués dans la stabilité du PSII en réponse à la température. Ces travaux ont en effet tout d'abord montré qu'au cours de l'évolution, les souches du clade I ont évolué des PBPs (PC, PE-I et PE-II) globalement moins thermostables que celles des clades II et V. La PC, en particulier, semble avoir été le sujet de plusieurs modifications aboutissant à des différences structurales entre PC des souches des clades I & IV *vs.* II & III. En effet, les souches d'eau froide semblent avoir mis au point des adaptations moléculaires spécifiques, telles qu'une diminution du contenu en alanine au profit de la glycine, mais également la présence de substitutions spécifiques d'acides aminés sur une hélice structuralement importante, notamment à un site très proche d'un des chromophores, pouvant donc affecter directement la fonction de collecte de l'énergie lumineuse de la protéine .



<u>Figure 89</u> | Modèle putatif des différentes étapes de perturbations du centre réactionnel II et du phycobilisome induites par une augmentation rapide de la température à l'obscurité chez les *Synechococcus* marins. Les perturbations structurales et fonctionnelles pourraient se dérouler comme ceci : (**1**) le phycobilisome (PBS) et le centre réactionnel II, sur lequel est fixé l'*oxygen evolving complex* (OEC) sont intacts et fonctionnels : quand il est éclairé, l'énergie lumineuse récoltée par le phycobilisome est transférée efficacement à travers le bras jusqu'au cœur, et *in fine* à la paire spéciale de chl associée aux protéines cœurs D1/D2 du centre réactionnel, où la séparation de charge aura lieu. La dissociation des molécules d'eau au niveau de l'*oxygen evolving complex* génère un flux de transport d'électrons, induisant la synthèse d'ATP et de NADPH dans le cytosol (non représenté). (**2**) Selon la littérature, l'augmentation de température induirait en premier lieu la libération de deux atomes de manganèse du reste de l'*oxygen evolving center* induisant les premiers dommages au centre réactionnel (Kimura et *al.* 2002). Le centre réactionnel, endommagé fluoresce alors plus intensément (lueur rouge), et l'efficacité photosynthétique diminue. A son tour, le cœur du phycobilisome, l'allophycocyanine, est perturbée (lueur rouge). (**3**) Lorsque la température continue d'augmenter, l'*oxygen evolving complex* se dissocie entièrement du centre réactionnel, inhibant définitivement la dissociation des molécules d'eau (Enami et *al.* 1994). Le centre réactionnel fluoresce alors de façon intense, et l'efficacité photosynthétique est quasiment nulle. Les perturbations se propagent également à travers les bras du phycobilisome, induisant une forte diminution du degré de couplage de la phycocyanine et ainsi de l'efficacité du transfert de l'énergie. (**4**) Lorsque la température de rupture du phycobilisome est atteinte, la récolte et le transfert de l'énergie n'est alors plus possible, les phycobiliprotéines sont déconnectées les unes des autres, et des phycoérythrines sont libérées dans le cytosol et fluorescent fortement (Six et *al.* 2007). La connexion entre le phycobilisome et le centre réactionnel, assurée par le polypeptide de liaison L_{CM} est probablement rompue. Le centre réactionnel n'est alors plus fonctionnel, les protéines constituant l'*oxygen evolving complex* sont libres dans le cytosol, et la protéine D1 est très probablement dégradée.

L'activité optimale de la protéine est conditionnée par l'équilibre entre d'une part la flexibilité, nécessaire à l'optimisation de l'activité protéique à travers des ajustements conformationnels, et d'autre part la stabilité, permettant le maintien de la conformation planaire du chromophore et diminuant les risques de dénaturation (Fields 2001). Les modifications adaptatives révélées sur les PC des souches de clades froids tendent à augmenter la flexibilité de la protéine, essentielle au maintien de son activité à basse température, au détriment cependant d'une diminution de stabilité. Il apparait donc que les souches des clades chauds et froids aient adapté leur PBP pour qu'elles soient capables de fonctionner de façon optimale dans des niches thermiques distinctes, en jouant sur le compromis entre flexibilité et stabilité (Fig. 90).

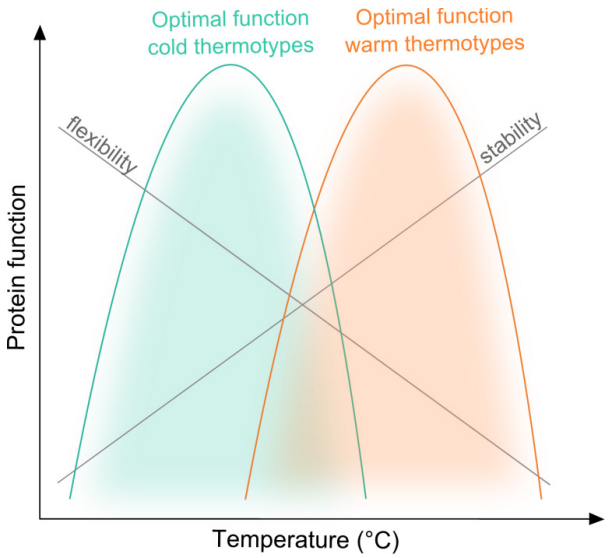


Figure 90 | Différentes gammes thermiques d'activité de la phycocyanine entre les thermotypes chauds et froids de *Synechococcus*. Le fonctionnement protéique optimal est contrainte par l'équilibre entre deux composantes indispensables, la flexibilité de la chaîne polypeptidique, et sa stabilité.

Au travers des adaptations structurales de la PC, nos travaux suggèrent que la thermostabilité des protéines du PBS constitue une des stratégies adaptatives à la distribution des clades de *Synechococcus*. En effet, à l'exception des clades I et IV, la stabilité de la PC chez les autres clades empêcherait ou réduirait son activité d'absorption dans les environnements plus froids, réduisant ainsi la quantité d'énergie transférée au RCII, et ainsi limitant la quantité d'énergie produite nécessaire à la croissance cellulaire.

D'autres spécificités clades froids *vs.* clades chauds existent probablement au sein du PBS. En effet, à l'heure actuelle, le rôle et la contribution de l'APC dans la thermostabilité du PBS restent encore à déterminer. Présente en plus faible concentration que les PBP des projections radiaires, l'APC fluoresce peu, et son émission de fluorescence (665 nm) se confond avec la fluorescence plus forte de la PC (650 nm), et de la chl *a* (680 nm). Un travail de purification de cette PBP permettrait de savoir si

le cœur du PBS est plus ou moins thermostable que les bras, et ainsi d'affiner le modèle de perturbations du PBS (Fig. 89).

L'étude de la thermostabilité structurale des PBP a été réalisée sur des protéines purifiées sans leurs polypeptides de liaisons. Chez les six souches de *Synechococcus* étudiées dans cette partie, les bras du PBS sont composées de PC, PE-I et PE-II, stabilisées par les *linkers* CpcG1 ou CpcG2, CpeC, CpeE, MpeD et MpeE. Il est très probable que ces protéines, dont la fonction est d'optimiser l'absorption et le transfert de l'énergie lumineuse à travers le PBS, aient une influence sur la thermostabilité structurale du complexe. La réponse des PBPs *in vivo* à des variations de température est donc potentiellement tamponnée par d'autres paramètres tels que la thermostabilité de ces *linkers* eux-mêmes. Cependant, des premières analyses comparatives *in silico* des séquences d'acides aminés de ces polypeptides de liaisons ne révèlent pas de tendances clade-spécifiques dans la composition en acides aminés.

Cette étude s'est focalisée sur un seul type de PBS, le type pigmentaire 3a, qui possède des caractéristiques précises telles que des bras assez courts et une faible quantité de PUB. La comparaison de la thermostabilité de PBP portant différents pigments, tels que des PE-II à deux ou trois PUB, permettrait par exemple de comprendre l'influence de la nature des chromophores sur la stabilité de la protéine. De plus, l'étude de la thermostabilité des PBS des rares *Synechococcus* du cluster 5.2 (type pigmentaire 1 pour la plupart) retrouvées aux hautes latitudes pourrait expliquer qu'ils soient, à l'heure actuelle, les seules détectés au delà de 65° N.

Alors que l'étude réalisée dans le chapitre 2 s'est attachée à étudier la stabilité fonctionelle du PBS *in vivo* et la stabilité structurale des PBP, *in vitro,* l'étude du niveau intermédiaire, *i.e.* la stabilité du complexe entier purifié se révélerait également très intéressante. En effet, la comparaison des ces résultats avec la thermostabilité des PBP in *vitro* permettrait de mieux caractériser le rôle des *linkers*, et de comprendre si la cinétique de perturbations des PBP assemblées se fait selon les mêmes étapes que lorsque ces dernières sont purifiées.

Les premiers résultats sur l'étude de la thermostabilité du RCII soulèvent également de nouvelles pistes de recherche. En effet, la thermostabilité du RCII est différente entre les souches de *Synechococcus* marins, suggérant que ces derniers ont également mis au point des adaptations spécifiques à leurs niches thermales. Parmi celles-ci, l'isoforme D1:2 de la protéine clé du RCII préférentiellement induite en situation de stress, notamment lors de basses températures, est codée par un plus grand nombre de gènes chez les clades I et IV par rapport aux autres clades. Cela permettrait une augmentation du taux de traduction de la protéine en cas de stress, comme observé chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, permettant de contrebalancer le risque élevé de photoinhibition lors des déséquilibres énergétiques induits par le froid. La multiplicité des gènes *psbA* codant l'isoforme

D1:2 apparait comme une adaptation possible permettant le maintien du fonctionnement du centre réactionnel dans des conditions où les autres clades souffrent de stress oxydatif. La mise au point de méthodes de quantification des isoformes de la protéine D1 se révèle donc indispensable à la compréhension du rôle de cette protéine dans la thermostabilité. Ces analyses ne sont cependant techniquement pas simples, étant donné qu'il n'existe pas d'anticorps spécifiques des deux isoformes des *Synechococcus* marins, et que les quantifications en spectrométrie de masse sont très délicates, quand elles sont possibles. Parallèlement, les futures études de transcriptomique pourront aussi aider à déterminer à quelles températures les différents gènes *psbA* sont induits.

Afin de mieux caractériser les différences de thermostabilité du RCII chez les *Synechococcus* marins, une analyse détaillée de la composition protéique du complexe à différentes températures et chez plusieurs souches est nécessaire. Le complexe peut être relativement assez facilement purifié en conditions natives sur gel d'agarose ou sur gradient de saccharose, et sa composition peptidique déterminée par SDS-PAGE et spectrométrie de masse. Des immunoblots quantititatifs contre les protéines de l'OEC pourraient aussi probablement fournir des informations importantes.

Les premiers résultats de la caractérisation de la réponse physiologique de la souche *Synechococcus* sp. WH7803 à un transfert à basse et haute température, réalisés dans le cadre du projet ANR SAMOSA, suggèrent que le taux de réparation du RCII joue un rôle important dans la capacité d'acclimatation à la température. En effet, la réparation de la protéine D1 est peut être complètement inhibée suite au transfert à basse température, inhibant ainsi la croissance. Une partie du cycle de réparation de la protéine D1 étant contrôlé par deux métalloprotéases, FtsH et DegP2, il est possible que leur gamme thermique d'activité optimale détermine le taux de réparation de D1 en fonction de la température d'acclimatation.

L'essentiel des travaux de photophysiologie comparative dans le cadre de l'adaptation à la température de cette thèse s'est concentré sur le PSII. Cependant, les réactions claires initiées par le super-complexe PBS-RCII, formant le PSII, nécessitent ensuite l'activité synchrone de trois autres complexes protéiques, le cytochrome b_6f, le PSI et l'ATP synthase. Que ce soit à travers l'implication de molécules, ou *via* des facteurs intrinsèques aux protéines, il est possible que ces complexes soient caractérisés par des thermostabilités fonctionnelles et structurales distinctes entre thermotypes, représentant d'autres adaptations moléculaires à la niche thermique.

Parmi les futures pistes intéressantes, les réactions sombres de la photosynthèse méritent également d'être mises en lumière. L'enzyme clé de cette phase, la RuBisCO, a été décrite comme étant sensible à la température (Salvucci et *al.* 2001, 2004). Les températures supérieures à 30°C réduisent en effet son efficacité en augmentant son affinité pour l'oxygène, ce qui favorise son activité d'oxygénase au détriment de celle de carboxylase, et génère de la photorespiration. De ce fait, une

plus grande capacité de concentration du CO_2 est nécessaire pour compenser ce phénomène (Salvucci et *al.* 2004). Au contraire, le froid tendrait à favoriser la capacité de la RuBisCO à fixer le CO_2, mais ralentirait son activité (Salvucci et *al.* 2004). Des travaux sur des *Synechococcus* thermophiles ont mis en évidence des adaptations spécifiques au sein des séquences protéiques de la RuBisCO (acides aminés plus hydrophobes, substitutions, GC% des séquences ADN plus élevé; Miller 2003), qui rendent l'enzyme des thermophiles plus stable que celle des mésophiles. Il est ainsi envisageable que les différents thermotypes de *Synechococcus* marins aient, eux aussi, évolué des adaptations sur la RuBisCO afin d'optimiser son fonctionnement au sein d'une niche thermale précise, et ainsi augmenter le taux de fixation du CO_2, nécessaire à la synthèse de matière organique.

La régulation des lipides membranaires, une des clés de la distribution latitudinale des Synechococcus *marins ?*

De nombreuses études ont montré que, des bactéries aux métazoaires, l'adaptation et l'acclimatation à des variations de température impliquent la régulation de la fluidité des systèmes membranaires. Chez les organismes phototrophes, la régulation des membranes thylacoïdiennes, au sein desquelles sont insérés les complexes photosynthétiques, est particulièrement importante pour le maintien de la croissance en réponse à des variations de température. Le dernier volet de ma thèse constitue une première étude de la composition et de la régulation des systèmes membranaires en fonction de la température chez les *Synechococcus* marins.

A travers l'utilisation de la souche modèle *Synechococcus* sp. WH7803, nous avons initié les analyses lipidiques au sein du laboratoire, et mis en évidence une composition en acides gras avérée cohérente avec les descriptions faites sur les cyanobactéries d'eau douce. Nos résultats soulignent également que la proportion des acides gras saturés et insaturés de *Synechococcus* sp. WH7803 varie en fonction de la température, suggérant le rôle clé d'enzymes spécifiques, les désaturases. En effet, lorsqu'exposée à des temperatures basses, la souche WH7803 tend à compenser la rigidification de ses membranes *via* l'insertion de doubles liaisons, contribuant à une meilleure fluidité des membranes. Ce mécanisme représente probablement une des stratégies adaptatives clé permettant le maintient de l'acitivité des protéines cles inserés au sein de ces membranes à des températures plus froides.

Prochainement, l'analyse de la contribution de chaque especes d'acides gras permettra de mieux comprendre les mécanismes de regulation de la fluidité membranaire aux températures elevées,

notamment à travers l'étude des teneurs en C14, C16 et C18. En effet, des travaux antérieurs ont montré que le nombre de carbones d'un groupement acyl variaient avec la température, agissant ainsi potentiellement sur la fluidité des membranes (Wada & Murata 1998). Ces variations peuvent representer une des stratégies adaptative à la température permettant de limiter le phénome d'hyperfluidisation des membranes, qui pourrait entrainer la désintegration de la bicouche lipidique (Los & Murata 2004). Le nombre de carbones estérifiés sur un acide gras est contrôlé par l'enzyme KASII, responsable de la synthèse des C16 et C18. Cependant, une seconde enzyme, intervenant à la fin du cycle de biosynthèse, peut également être impliquée dans la régulation de la longueur des acides gras, l'acyl-ACP thioesterase. Cette enzyme, bien que restant non identifiée chez les cyanobactéries, serait responsable de la scission des chaînes carbonées. Ainsi, les futurs travaux pourront permettre de mieux comprendre l'éventuelle implication de ces enzymes dans la régulation de la composition membranaire. Les futures analyses comparatives de la composition en acides gras chez les souches de thermotypes froids *vs*. chauds permettront également de comparer les systèmes de régulation et de déterminer si l'amplitude de ce mécanisme pourrait constituer une des limitations inhibant leur croissance, notamment à haute température.

L'étude des variations du degré d'insaturation aux températures basses, induites par les enzymes désaturases et largement mise en évidence dans la littérature (Varkey et *al.* 2015, Gombos et *al.* 1992, Nanjo et *al.* 2011), demande encore du travail puisque nos premiers résultats ne permettent pas encore de conclure sur les capacités de désaturation de *Synechococcus* sp. WH7803. De nouvelles expériences sont actuellement en cours, afin d'affiner et compléter les données sur les acides gras et de générer un nouvel ensemble de données décrivant les variations des différentes têtes polaires en fonction de la température.

L'étude de génomique comparative développée dans le troisième chapitre a aussi permis l'exploration de la diversité des équipements en désaturases chez les *Synechococcus* marins. En fonction de leur distribution latitudinale, les *Synechococcus* possèdent des ensembles distincts de désaturases, notamment entre les clades I & IV *vs.* II & III. Ces désaturases semblent être préférentiellement distribuées en fonction de la latitude. Ainsi, DesC4 est quasiment absente aux basses latitudes, alors que DesA2 n'est pas retrouvée aux plus hautes latitudes. Au-delà de ces tendances latitudinales, certains clades se différencient au regard du nombre de gènes codant pour des désaturases d'acides gras dans leur génome. C'est notamment le cas des clades V et VI, dont toutes les souches possèdent quatre desaturases, suggérant une certaine plasticité potentielle de la fluidité des membranes chez ces organismes. Les souches de ces clades purement marins pourraient alors être des opportunistes et/ou plus compétitives dans des milieux où la température est particulièrement variable. Le cluster 5.2, qui rassemble des souches souvent estuariennes, présente

quant à lui la composition en désaturase la plus complexe, avec jusqu'à six enzymes différentes. Cet équipement atypique et diversifié pourrait refléter sa capacité à habiter des environnements froids de très haute latitude où l'insertion de nombreuses doubles liaisons serait indispensable à la régulation membranaire. Ce grand nombre de désaturases peut aussi être utile dans les niches écologiques très côtières où la température est connue pour être variable.

La fonction précise de chacune des désaturases, *i.e.* leur site d'action et leurs modalités d'activité, restent à déterminer. En effet, pour l'instant leur identification repose uniquement sur la structure séquentielle de leur site catalytique, les *histidin boxes*, et leur position phylogénétique par rapport aux autres groupes de désaturases. Une étude d'enzymologie poussée incluant la caractérisation de leurs cinétiques d'activités et de leur gamme de températures permettra de mieux comprendre le rôle de ces désaturases dans l'adaptation à la température des *Synechococcus* marins.

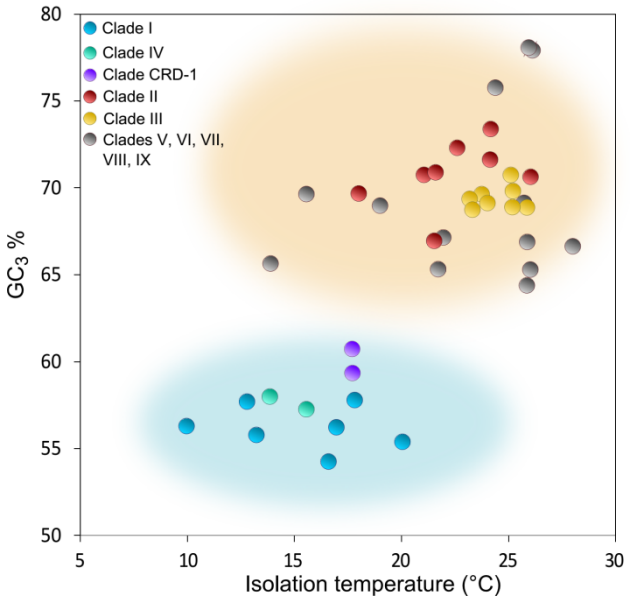
En conclusion, ces trois années de travail auront permis, au travers d'une approche qui s'inscrit dans la biologie des systèmes, de révéler pour la première fois l'existence de thermotypes au sein de la radiation des *Synechococcus* marins, *i.e* l'existence de lignées physiologiquement spécialisées dans des niches thermales distinctes, et de caractériser certains des mécanismes moléculaires adaptatifs associés à cette différenciation.

Génomes et adaptation à la niche

La mise en évidence de l'existence de thermotypes va permettre dans les prochaines années des recherches plus ciblées dans les 54 génomes de *Synechococcus* marins, et la délimitation du génome accessoire propre à chacun des thermotypes et donc des gènes impliqués directement dans l'adaptation à des niches thermiques différentes. Les premières explorations de ces génomes suggèrent que la taille des génomes ne varie pas de façon considérable entre les clades. Cependant, environ 300 gènes spécifiques du clade I ont été identifiés, alors que ce nombre s'élève à 200 et 400 pour les clades II et III respectivement (Farrant, Doré et *al. en prep.*). Ces travaux doivent encore être approfondis, afin de chiffrer les gènes accessoires du clade IV, puis par la suite déterminer le nombre de gènes communs aux clades I & IV, et II & III. C'est au sein de cet ensemble de gènes thermotype spécifiques, qu'il faudra rechercher les gènes directement impliqués dans l'adaptation à la niche thermale, et ainsi mieux comprendre les phénomènes d'évolution impliqués dans le façonnement des thermotypes tels que la convergence vers la niche tempérée froide. Ces gènes pourraient notamment coder pour des protéines de choc thermique (*cold shock protein*), des enzymes antioxydantes de type

superoxyde dismutase ou catalase. Une des nombreuses pistes de recherche intéressantes consisterait en l'identification des senseurs de température chez les *Synechococcus* marins. Parmi les candidats potentiels se trouvent notamment les histidines kinases, qui ont été décrites comme des percepteurs de changements environnementaux (Stock et *al.* 2000). Alors que chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, l'histidine kinases Hik33 apparait comme le senseur de stress thermique froid et osmotique (Mikami et *al.* 2002 , Sakamoto et *al.* 2002), les travaux sur les histidines kinases senseurs de changements environnementaux chez les *Synechococcus* se limitent à KaiC et SasA, senseurs du cycle circadien et PhoR sensible aux phosphates (Iwasaki et *al.* 2000, Los & Murata 2000, Moore et *al.* 2005)

L'analyse de la composition en nucléotides de ces génomes révèle de plus que les génomes des souches des clades I & IV possèdent un contenu en guanine-cytosine sur la troisième base du codon, GC_3% significativement plus faible que celui des clades II et III (Farrant, 2015 ; le GC_3 est préférentiellement utilisé au GC% dans les analyses génomiques parce que le troisième codon est souvent dégénéré et moins contraint à la sélection). De plus, il apparait clairement que les variations du GC_3% sont corrélées à la température d'isolement (Fig. 91). Bien que les variations en GC soient influencées par de multiples facteurs, tels que les biais de mutation intrinsèque ou les facteurs de l'environnement extrinsèque, cette caractéristique génomique pourrait représenter une adaptation à l'environnement chez ces clades.



<u>Figure 91</u> | Pourcentage des bases azotées guanine-cytosine chez les *Synechococcus* marins en fonction de la température d'isolement. Le pourcentage de guanine-cytosine est calculée sur la troisième base du codon (GC_3%) et est présenté uniquement pour les génomes des souches de *Synechococcus* du cluster 5.1, en fonction de leur température au site d'isolement (d'après Farrant, Doré et *al. en prep.*).

En effet, alors que trois liaisons unissent les bases azotées GC, seulement deux lient les bases adénine-thymine, rendant ainsi la liaison GC thermiquement plus stable (Wada & Suyama 1986). Ainsi, il est possible que les organismes se développant dans les environnements plus chauds possèdent une plus grande proportion de GC que les organismes des environnements froids, hypothèse validée chez certains groupes de procaryotes (Musto et *al.* 2004, Zheng & Wu 2010). Il semble donc que la température exerce une pression sur l'ensemble du chromosome cyanobactérien.

L'implication de l'équipe dans l'analyse des données de métagénomique générées au cours de la campagne *TARA Ocean* va permettre d'analyser la distribution de ces gènes accessoires dans l'environnement, et ainsi de mieux caractériser leur rôle potentiel dans l'adaptation à la niche. De plus, les futures données de métagénomique de la campagne *Tara Arctic* offriront un jeu de données unique à la compréhension de la distribution des *Synechococcus* à ces hautes latitudes.

Parallèlement, alors que l'ensemble des travaux présentés ici concernent la température, les années à venir révéleront peut-être l'existence d'autres écotypes spécialisés dans des niches différentes, par exemple en lumière, en teneurs en azote, fer, phosphore *etc.* mettant ainsi en évidence toute la diversité des procaryotes, encore sous estimée à l'heure actuelle.

Ecotypes et concept d'espèce chez les procaryotes

L'identification de thermotypes distincts au sein de la radiation des *Synechococcus* pose la question de la notion d'espèce chez ces organismes. Alors que chez les plantes vasculaires et les métazoaires la distinction des espèces est souvent liée à l'isolement sexuel, les espèces procaryotes sont à l'heure actuelle définies sur la base de leur similarité ou dissemblance génomique. Cependant, au regard de leurs échanges génétiques très permissifs, la notion d'espèce ne semble pas être l'unité taxonomique la plus à même à refléter la diversité qui se cache dans les genres bactériens. Typiquement, chez les *Synechococcus* marins, le seuil classique de 94% d'identité moyenne des nucléotides (ANI) impliquerait, dans la plupart des cas, que chaque souche correspondrait à une espèce (Dusfresne et *al.* 2008, Farrant 2015). Ainsi, l'utilisation d'unité plus fonctionelle, tels que les écotypes, basée sur des traits combinatoires, écologiques et physiologiques, offre une vision plus intégrée de la biologie de ces organismes en révélant la complexité à la fois de leur taxinomie et de leur écophysiologie.

Mécanismes évolutifs de la spécialisation écologique chez les picocyanobactéries marines

Ces travaux sur l'adaptation à la niche thermique chez les *Synechococcus* marins viennent compléter les quelques précédents travaux sur l'adaptation à la niche écologique de *Synechococcus* qui concernent essentiellement les variations de qualité de la lumière. La comparaison des histoires évolutives qui ont mené à la colonisation de différentes niches thermiques et de qualité spectrales de la lumière révèlent des processus distincts.

La colonisation de niches lumineuses aux qualités spectrales différentes s'est principalement faite par la complexification de l'antenne collectrice de lumière, le PBS, le long des gradients côte-large et surface-profondeur des océans. Les différentes sous-unités et classes de PBP sont apparues au fil de l'évolution par l'intermédiaire de processus de duplications de gènes (Apt et *al.* 1995). L'origine de la PE, qui est probablement née chez des cyanobactéries d'eau douce émane ainsi de la duplication et de la divergence des gènes codant pour la PC (Six et *al.* 2007). La PE-II est apparue uniquement dans la radiation des *Synechococcus* marins, peut-être *via* la duplication et divergence des gènes codant pour la PE-I (Six et *al.* 2007), et a permis la complexification ultime du PBS et la colonisation des eaux riches en lumière bleue. L'absence de conformité entre la phylogénie cœur des *Synechococcus* marins et la phylogénie de leurs gènes de PBS suggère fortement que l'adaptation à la qualité de la lumière chez ces organismes s'est déroulée essentiellement à travers de nombreux échanges horizontaux, apparemment très permissifs, de gènes ou cluster de gènes qui ont eu lieu d'une lignée de *Synechococcus* à une autre (la région génomique du PBS est d'ailleurs considérée comme un îlot génomique ; voir introduction). Ces transferts de gènes ont ainsi généré une grande diversité de types pigmentaires dans toute la radiation, qui a permis une adaptation rapide aux niches de qualité spectrale de la lumière.

L'histoire évolutive de l'adaptation des *Synechococcus* marins à la température, que nous commençons à peine à entrevoir, semble s'être déroulée différemment. En effet, la mise en évidence de lignées spécialisées suggère que la transmission verticale des caractères adaptatifs, de cellules mères à cellules filles, a joué un rôle beaucoup plus important dans l'adaptation à la température (Fig. 92). Cette transmission verticale de caractères adaptatifs est similaire à la différenciation écotypique vis-à-vis de la lumiere (LL et HL) et la température (HLI et HLII) observé chez *Prochlorococcus*. Ce type de mécanisme évolutif est probablement plus lent que celui qui met en œuvre les transferts horizontaux. Dans les évolutions verticales, une grande partie de l'innovation génétique repose en effet sur les processus de sélection de mutation et de réarrangements génétiques. Nous avons

toutefois aussi mis en lumière certains traits d'adaptation à la température typiques d'une évolution par transfert horizontal de matériel génétique. Par exemple, l'évolution convergente des clades I et IV vers les environnements froids, est en partie basée sur le transfert de gènes à grande valeur adaptative tels que *desC4*.

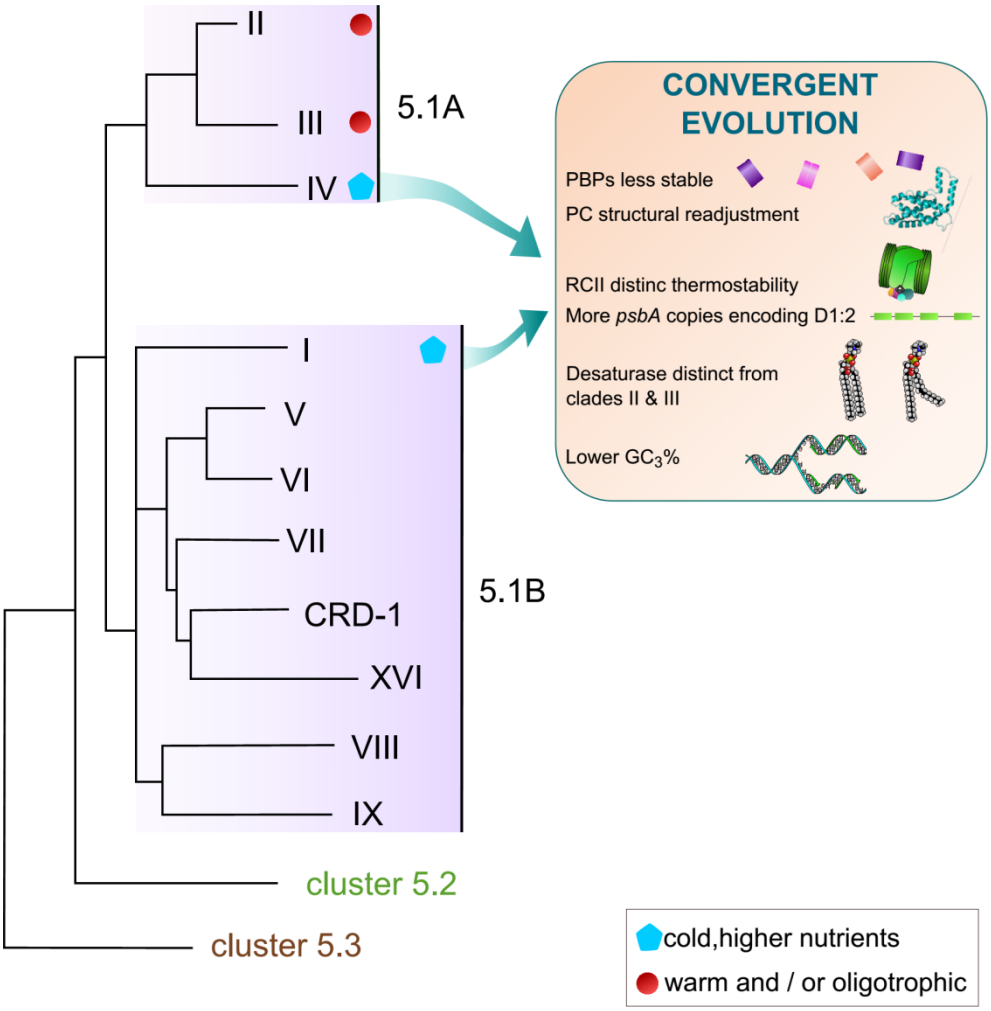


Figure 92 | Phylogénie des *Synechococcus* marins et hypothèse d'évolution convergente entre les clades I et IV. Les clades I et IV, distribués dans les environnements froids représentent un groupe paraphylétique, suggérant une évolution convergente entre ces deux clades. Les différentes adaptations possibles aux clades I et IV, impliquées dans la colonisation des hautes latitudes sont representées. sont listées. Les cinq premières ont été mises en évidence dans cette thèse. La topologie de la phylogénie est d'après Shohm *et al.* 2015 (séquences concaténées de gènes cœur).

Ainsi, il apparait que, au cours de l'Evolution, la spécialisation des picocyanobactéries marines à leur niche environnementale se soit déroulée selon différents mécanismes évolutifs, impliquant des échelles de temps distinctes. Ces processus de spécialisations restent encore très largement à explorer, et représentent un enjeu pour de futures recherches, notamment dans le contexte de changement climatique.

REFERENCES

A

Adam Z. & Clarke A.K. (2002). Cutting edge of chloroplast proteolysis. *Trends in plant science*, 7, 451-456.

Adir N. (2005). Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant. *Photosynthesis research*, 85, 15-32.

Ahlgren N.A**.**, Noble A., Patton A.P., Roache-Johnson K., Jackson L., Robinson D., McKay C., Moore L.R., Saito M.A. & Rocap G. (2014). The unique trace metal and mixed layer conditions of the Costa Rica upwelling dome support a distinct and dense community of *Synechococcus*. *Limnol. Oceanogr*, 59, 2166-2184.

Ahlgren N.A. **& Rocap G.** (2006). Culture isolation and culture-independent clone libraries reveal new marine *Synechococcus* ecotypes with distinctive light and N physiologies. *Appl Environ Microb*, 72, 7193-7204.

Ahlgren N.A. & Rocap G. (2012). Diversity and Distribution of marine *Synechococcus*: multiple gene phylogenies for consensus classification and development of qPCR assays for sensitive measurement of clades in the ocean. *Frontiers in microbiology*, 3, 213-213.

Allakhverdiev S.I., Kreslavski V.D., Klimov V.V., Los D.A., Carpentier R. & Mohanty P. (2008). Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 98, 541-550.

Allakhverdiev S.I. & Murata N. (2004). Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage–repair cycle of Photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1657, 23-32.

Allen A.P., Brown J.H. & Gillooly J.F. (2002). Global biodiversity, biochemical kinetics, and the energetic-equivalence rule. *Science*, 297, 1545-1548.

Allen J.F. & Forsberg J. (2001). Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends in Plant Science*, 6, 317-326.

Amann R.I., Ludwig W. & Schleifer K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59, 143-169.

Aminaka R., Taira Y., Kashino Y., Koike H. & Satoh K. (2006). Acclimation to the growth temperature and thermosensitivity of photosystem II in a mesophilic cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant and Cell Physiology*, 47, 1612-1621.

Anderson J.M. (1986). Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Annual Review of Plant Physiology*, 37, 93-136.

Andersson A., Haecky P. & Hagström Å. (1994). Effect of temperature and light on the growth of micro-nano-and pico-plankton: impact on algal succession. *Marine Biology*, 120, 511-520.

Andersson B. & Aro E.-M. (2001). Photodamage and D1 protein turnover in photosystem II. In: *Regulation of photosynthesis*. Springer, pp. 377-393.

Apple J.K., Strom S.L., Palenik B. & Brahamsha B. (2011). Variability in protist grazing and growth on different marine Synechococcus isolates. *Appl Environ Microb*, 77, 3074-3084.

Apt K.E., Collier J.L. & Grossman A.R. (1995). Evolution of the phycobiliproteins. *Journal of Molecular Biology*, 248, 79-96.

Aro E.-M., Virgin I. & Andersson B. (1993). Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1143, 113-134.

Arteni A.A., Ajlani G. & Boekema E.J. (2009). Structural organisation of phycobilisomes from *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and their interaction with the membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787, 272-279.

Awai K., Watanabe H., Benning C. & Nishida I. (2007). Digalactosyldiacylglycerol is required for better photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803 under phosphate limitation. *Plant and cell physiology*, 48, 1517-1523.

Awramik S.M. (1992). The oldest records of photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 33, 75-89.

B

Bakermans C. & Skidmore M.L. (2011). Microbial metabolism in ice and brine at–5 C. *Environmental microbiology*, 13, 2269-2278.

Balzano S., Sarno D. & Kooistra W.H. (2010). Effects of salinity on the growth rate and morphology of ten Skeletonema strains. *Journal of plankton research*, fbq150.

Barber J., Morris E. & Büchel C. (2000). Revealing the structure of the photosystem II chlorophyll binding proteins, CP43 and CP47. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1459, 239-247.

Barber J. & Nield J. (2002). Organization of transmembrane helices in photosystem II: comparison of plants and cyanobacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357, 1329-1335.

Battistuzzi F.U., Feijao A. & Hedges S.B. (2004). A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC evolutionary biology*, 4, 44.

Béjà O., Fridman S. & Glaser F. (2012). Viral clones from the GOS expedition with an unusual photosystem-I gene cassette organization. *The ISME journal*, 6, 1617-1620.

Bekker A., Holland H., Wang P.-L., Rumble D., Stein H., Hannah J., Coetzee L. & Beukes N. (2004). Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature*, 427, 117-120.

Benson A. & Maruo B. (1958). Plant phospholipids I. Identification of the phosphatidyl glycerols. *Biochimica et biophysica acta*, 27, 189-195.

Benton M.J. (2009). The Red Queen and the Court Jester: species diversity and the role of biotic and abiotic factors through time. *Science*, 323, 728-732.

Bernard O. & Rémond B. (2012). Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth. *Bioresource technology*, 123, 520-527.

Berry J. & Bjorkman O. (1980). Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 31, 491-543.

Berube P.M., Biller S.J., Kent A.G., Berta-Thompson J.W., Roggensack S.E., Roache-Johnson K.H., Ackerman M., Moore L.R., Meisel J.D. & Sher D. (2015). Physiology and evolution of nitrate acquisition in Prochlorococcus. *The ISME journal*, 9, 1195-1207.

Bibby T.S., Nield J., Partensky F. & Barber J. (2001). Oxyphotobacteria: Antenna ring around photosystem I. *Nature*, 413, 590-590.

Biller S.J., Berube P.M., Lindell D. & Chisholm S.W. (2014a). *Prochlorococcus*: the structure and function of collective diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 13-27.

Biller S.J., Schubotz F., Roggensack S.E., Thompson A.W., Summons R.E. & Chisholm S.W. (2014b). Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science*, 343, 183-186.

Biswal B., Joshi P., Raval M. & Biswal U. (2011). Photosynthesis, a global sensor of environmental stress in green plants: stress signalling and adaptation. *Current Science(Bangalore)*, 101, 47-56.

Blank C. & Sanchez-Baracaldo P. (2010). Timing of morphological and ecological innovations in the cyanobacteria–a key to

understanding the rise in atmospheric oxygen. *Geobiology*, 8, 1-23.

Blank C.E. (2004). Evolutionary timing of the origins of mesophilic sulphate reduction and oxygenic photosynthesis: a phylogenomic dating approach. *Geobiology*, 2, 1-20.

Bligh E.G. & Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37, 911-917.

Blöchl E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch H.W. & Stetter K.O. (1997). Pyrolobus fumarii, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 C. *Extremophiles*, 1, 14-21.

Blot N., Mella-Flores D., Six C., Le Corguille G., Boutte C., Peyrat A., Monnier A., Ratin M., Gourvil P., Campbell D.A. & Garczarek L. (2011). Light history influences the response of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp WH7803 to oxidative stress. *Plant Physiology*, 156, 1934-1954.

Boekema E., Hifney A., Yakushevska A., Piotrowski M., Keegstra W., Berry S., Michel K.-P., Pistorius E. & Kruip J. (2001). A giant chlorophyll–protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria. *Nature*, 412, 745-748.

Bonaventura C. & Myers J. (1969). Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 189, 366-383.

Bonilla T.D., Nowosielski K., Cuvelier M., Hartz A., Green M., Esiobu N., McCorquodale D.S., Fleisher J.M. & Rogerson A. (2007). Prevalence and distribution of fecal indicator organisms in South Florida beach sand and preliminary assessment of health effects associated with beach sand exposure. *Marine pollution bulletin*, 54, 1472-1482.

Boudière L., Michaud M., Petroutsos D., Rébeillé F., Falconet D., Bastien O., Roy S., Finazzi G., Rolland N. & Jouhet J. (2014). Glycerolipids in photosynthesis: composition, synthesis and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837, 470-480.

Boulay C., Wilson A., D'Haene S. & Kirilovsky D. (2010). Identification of a protein required for recovery of full antenna capacity in OCP-related photoprotective mechanism in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 11620-11625.

Boyd P.W., Rynearson T.A., Armstrong E.A., Fu F., Hayashi K., Hu Z., Hutchins D.A., Kudela R.M., Litchman E., Mulholland M.R., Passow U., Strzepek R.F., Whittaker K.A., Yu E. & Thomas M.K. (2013). Marine Phytoplankton Temperature versus Growth Responses from Polar to Tropical Waters – Outcome of a Scientific Community-Wide Study. *Plos One*, 8, e63091.

Brahamsha B. (1996). A genetic manipulation system for oceanic cyanobacteria of the genus *Synechococcus*. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 1747-1751.

Braslavsky S., Gartner W. & Schaffner K. (1997). Phytochrome photoconversion. *Plant Cell and Environment*, 20, 700-706.

Brejc K., Ficner R., Huber R. & Steinbacher S. (1995). Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of allophycocyanin from the cyanobacterium Spirulina platensis at 2.3 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 249, 424-440.

Brock T.D. (1967). Life at high temperatures. *Science*, 158, 1012-1019.

Brock T.D. (2012). Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. *Springer Science & Business Media.*

Brown J.H., Gillooly J.F., Allen A.P., Savage V.M. & West G.B. (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology*, 85, 1771-1789.

Brown J.H. & Lomolino M.V. (2000). Concluding remarks: historical perspective and the future of island biogeography theory. *Global Ecology and Biogeography*, 9, 87-92.

Brown M.V. & Fuhrman J.A. (2005). Marine bacterial microdiversity as revealed by internal transcribed spacer analysis. *Aquatic Microbial Ecology*, 41, 15-23.

Browse J. & Somerville C. (1991). Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation. *Annual review of plant biology*, 42, 467-506.

Bryant D.A., Glazer A.N. & Eiserling F.A. (1976). Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp. *Archives of Microbiology*, 110, 61-75.

Buchanan R. & Gibbons N. (1974). Bergey's manual of determinative bacteriology., The Williams and Wilkins Co. *Baltimore, Md*, 1-1268.

Bunchan A., LeCleir G., Gulvik C. & Gonzalz J. (2014). Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nature* 12, 668-698.

Burns R.A., MacDonald C.D., McGinn P.J. & Campbell D.A. (2005). Inorganic carbon repletion disrupts photosynthetic acclimation to low temperature in the cyanobacterium *Synechococcus* elongatus. *Journal of Phycology*, 41, 322-334.

Bustos S., Schaefer M. & Golden S. (1990). Different and rapid responses of four cyanobacterial psbA transcripts to changes in light intensity. *Journal of bacteriology*, 172, 1998-2004.

Butcher R. (1952). Contributions to our knowledge of the smaller marine algae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 31, 175-191.

C

Cai H., Wang K., Huang S., Jiao N. & Chen F. (2010). Distinct patterns of picocyanobacterial communities in winter and summer in the Chesapeake bay. *Applied Environmental Microbiology*, 76, 2955-2960.

Campbell D., Bruce D., Carpenter C., Gustafsson P. & Öquist G. (1996). Two forms of the Photosystem II D1 protein alter energy dissipation and state transitions in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Photosynthesis Research*, 47, 131-144.

Campbell D., Eriksson M.J., Oquist G., Gustafsson P. & Clarke A.K. (1998). The cyanobacterium Synechococcus resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 364-369.

Campbell D. & Oquist G. (1996). Predicting light acclimation in cyanobacteria from nonphotochemical quenching of photosystem II fluorescence, which reflects state transitions in these organisms. *Plant physiology*, 111, 1293-1298.

Campbell D., Zhou G., Gustafsson P., Oquist G. & Clarke A.K. (1995). Electron transport regulates exchange of two forms of photosystem II D1 protein in the cyanobacterium *Synechococcus*. *The EMBO journal*, 14, 5457.

Campbell D.A. & Tyystjärvi E. (2012). Parameterization of photosystem II photoinactivation and repair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817, 258-265.

Caron D.A., Countway P.D., Jones A.C., Kim D.Y. & Schnetzer A. (2012). Marine protistan diversity. *Annual Review of Marine Science*, 4, 467-493.

Caron D.A., Worden A.Z., Countway P.D., Demir E. & Heidelberg K.B. (2009). Protists are microbes too: a perspective. *The ISME journal*, 3, 4-12.

Carpentier R. (1999). Effect of high temperature stress on the photosynthetic apparatus. *Handbook of Plant and Crop stress*, 337-349.

Carter H., Johnson P. & Weber E. (1965). Glycolipids. *Annual review of biochemistry*, 34, 109-142.

Castenholz R. & Waterbury J. (1989). Oxygenic photosynthetic bacteria. Group I. Cyanobacteria. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 3, 1710-1789.

Castenholz R.W. (1969). Thermophilic blue-green algae and the thermal environment. *Bacteriological Reviews*, 33, 476.

Castenholz R.W., Wilmotte A., Herdman M., Rippka R., Waterbury J.B., Iteman I. & Hoffmann L. (2001). *Phylum BX. Cyanobacteria*. Springer.

Chang L., Liu X., Li Y., Liu C.-C., Yang F., Zhao J. & Sui S.-F. (2015). Structural organization of an intact phycobilisome and its association with photosystem II. *Cell research*.

Chen B. & Liu K. (2015). Responses of autotrophic and heterotrophic rates of plankton from a subtropical coastal site to short-term temperature modulations. *Marine Ecology Progress Series*, 527, 59-71.

Chi X., Yang Q., Zhao F., Qin S., Yang Y., Shen J. & Lin H. (2008). Comparative analysis of fatty acid desaturases in cyanobacterial genomes. *Comparative and Functional Genomics*, 2008.

Chintalapati S., Prakash J.S.S., Singh A.K., Ohtani S., Suzuki W., Murata N. & Shivaji S. (2007). Desaturase genes in a psychrotolerant *Nostoc* sp are constitutively expressed at low temperature. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362, 81-87.

Chintalapati S., Shyam Sunder Prakash J., Gupta P., Ohtani S., Suzuki I., Sakamoto T., Murata N. & Shvaji S. (2006). A novel Delta(9) acyl-lipid desaturase, DesC2, from cyanobacteria acts on fatty acids esterified to the sn-2 position of glycerolipids. *Biochemical Journal*, 398, 207-214.

Chisholm S.W., Frankel S.L., Goericke R., Olson R.J., Palenik B., Waterbury J.B., West-Johnsrud L. & Zettler E.R. (1992). *Prochlorococcus* marinus nov. gen. nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll a and b. *Archives of Microbiol*, 157, 297-300.

Chisholm S.W., Olson R.J., Zettler E.R., Goericke R., Waterbury J.B. & Welschmeyer N.A. (1988a). A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 334, 340-343.

Chisholm S.W., Olson R.J., Zettler E.R., Goericke R., Waterbury J.B. & Welschmeyer N.A. (1988b). A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone.

Choi D.H. & Noh J.H. (2009). Phylogenetic diversity of *Synechococcus* strains isolated from the East China Sea and the East Sea. *FEMS Microbiology Ecology*, 69, 439-448.

Choi D.H., Noh J.H., Hahm M.-S. & Lee C.M. (2011). Picocyanobacterial abundances and diversity in surface water of the northwestern Pacific Ocean. *Ocean Science Journal*, 46, 265-271.

Chow W.S. & Aro E.-M. (2005). Photoinactivation and mechanisms of recovery. In: *Photosystem II*. Springer, pp. 627-648.

Chung C.-C., Chang J., Gong G.-C., Hsu S.-C., Chiang K.-P. & Liao C.-W. (2011). Effects of Asian dust storms on *Synechococcus* populations in the subtropical Kuroshio Current. *Marine biotechnology*, 13, 751-763.

Clarke A.K., Hurry V.M., Gustafsson P. & Oquist G. (1993). Two functionally distinct forms of the photosystem II reaction-center protein D1 in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 11985-11989.

Clarke S. (1993). Protein methylation. *Current opinion in cell biology*, 5, 977-983.

Coleman M.L. & Chisholm S.W. (2007). Code and context: Prochlorococcus as a model for cross-scale biology. *Trends in Microbiology*, 15, 398-407.

Conley P.B., Lemaux P.G. & Grossman A.R. (1985). Cyanobacterial light-harvesting complex subunits encoded in two red light-induced transcripts. *Science*, 230, 550-553.

Cossins A.R. (1977). Adaptation of biological membranes to temperature. The effect of temperature acclimation of goldfish upon the viscosity of synaptosomal membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 470, 395-411.

Cottrell M.T. & Kirchman D.L. (2009). Photoheterotrophic microbes in the Arctic ocean in summer and winter. *Appl Environ Microb*, 75, 4958-4966.

D

D'Cruz P.M., Yasumura D., Weir J., Matthes M.T., Abderrahim H., LaVail M.M. & Vollrath D. (2000). Mutation of the receptor tyrosine kinase gene Mertk in the retinal dystrophic RCS rat. *Human molecular genetics*, 9, 645-651.

Dagan T., Roettger M., Stucken K., Landan G., Koch R., Major P., Gould S.B., Goremykin V.V., Rippka R. & de Marsac N.T. (2013). Genomes of Stigonematalean cyanobacteria (subsection V) and the evolution of oxygenic photosynthesis from prokaryotes to plastids. *Genome biology and evolution*, 5, 31-44.

Dauta A., Devaux J., Piquemal F. & Boumnich L. (1990). Growth rate of four freshwater algae in relation to light and temperature. *Hydrobiologia*, 207, 221-226.

de Vargas C., Audic S., Henry N., Decelle J., Mahé F., Logares R., Lara E., Berney C., Le Bescot N. & Probert I. (2015). Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science*, 348, 1261605.

Deeming-Adams B. & Adams W. (1993). The xanthophylls cycles. *Alscher RC, Hess JL [eds] Antioxydants in higher plants* 91-110.

Dekker J.P. & Boekema E.J. (2005). Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1706, 12-39.

Dill K.A., Ghosh K. & Schmit J.D. (2011). Physical limits of cells and proteomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 17876-17882.

Diner B.A. & Rappaport F. (2002). Structure, dynamics, and energetics of the primary photochemistry of photosystem II of oxygenic photosynthesis. *Annual review of plant biology*, 53, 551-580.

Donald K.M., Scanlan D.J., Carr N.G., Mann N.H. & Joint I. (1997). Comparative phosphorus nutrition of the marine cyanobacterium *Synechococcus* WH7803 and the marine diatom Thalassiosira weissflogii. *Journal of plankton research*, 19, 1793-1813.

Doolittle D.F., Li W.K. & Wood A.M. (2008). Wintertime abundance of picoplankton in the Atlantic sector of the Southern Ocean. *Nova Hedwigia*, 133, 147-160.

Douce R. & Joyard J. (1990). Biochemistry and function of the plastid envelope. *Annual review of cell biology*, 6, 173-216.

Dowhan W. (1997). Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annual review of biochemistry*, 66, 199-232.

Dowle E., Morgan-Richards M. & Trewick S. (2013). Molecular evolution and the latitudinal biodiversity gradient. *Heredity*, 110, 501-510.

Drake M.J. & Righter K. (2002). Determining the composition of the Earth. *Nature*, 416, 39-44.

Drews G. & Nultsch W. (1962). Spezielle Bewegungsmechanismen von Einzellern (Bakterien, Algen). In: *Physiology of Movements/Physiologie der Bewegungen*. Springer, pp. 876-919.

Dufresne A., Garczarek L. & Partensky F. (2005). Accelerated evolution associated with genome reduction in a free-living prokaryote. *Genome biology*, 6, R14.

Dufresne A., Ostrowski M., Scanlan D.J., Garczarek L., Mazard S., Palenik B.P., Paulsen I.T., de Marsac N.T., Wincker P., Dossat C., Ferriera S., Johnson J., Post A.F., Hess W.R. & Partensky F. (2008). Unraveling the genomic mosaic of a ubiquitous genus of marine cyanobacteria. *Genome Biol*, 9, R90.

Dufresne A., Salanoubat M., Partensky F., Artiguenave F., Axmann I.M., Barbe V., Duprat S., Galperin M.Y., Koonin E.V. & Le Gall F. (2003). Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus* marinus SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 10020-10025.

Durrant J.R., Klug D.R., Kwa S.L., Van Grondelle R., Porter G. & Dekker J.P. (1995). A multimer model for P680, the primary electron donor of photosystem II. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 4798-4802.

Dyer D.L. & Gafford R.D. (1961). Some characteristics of a thermophilic blue-green alga. *Science*, 134, 616-617.

E

Eddy B. (1960). The use and meaning of the term 'psychrophilic'. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 189-190.

Edelman M. & Mattoo A.K. (2008). D1-protein dynamics in photosystem II: the lingering enigma. *Photosynthesis Research*, 98, 609-620.

El Bissati K., Delphin E., Murata N., Etienne A.L. & Kirilovsky D. (2000). Photosystem II fluorescence quenching in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: involvement of two different mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1457, 229-242.

Emlyn-Jones D., Ashby M.K. & Mullineaux C.W. (1999). A gene required for the regulation of photosynthetic light harvesting in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Molecular Microbiology*, 33, 1050-1058.

Enami I., Kitamura M., Tomo T., Isokawa Y., Ohta H. & Katoh S. (1994). Is the primary cause of thermal inactivation of oxygen evolution in spinach PS II membranes release of the extrinsic 33 kDa protein or of Mn? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1186, 52-58.

Enami I., Suzuki T., Tada O., Nakada Y., Nakamura K., Tohri A., Ohta H., Inoue I. & Shen J.R. (2005). Distribution of the extrinsic proteins as a potential marker for the evolution of photosynthetic oxygen-evolving photosystem II. *FEBS Journal*, 272, 5020-5030.

Eriksson M.-J. & Clarke A.K. (1996). The heat shock protein ClpB mediates the development of thermotolerance in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Journal of bacteriology*, 178, 4839-4846.

Everroad C., Six C. & Six C. (2006). Biochemical bases of type IV chromatic adaptation in marine *Synechococcus* spp. *Journal of Bacteriology*, 188, 3345-56.

F

Falkowski P.G. (1994). The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynthesis research*, 39, 235-258.

Farewell A. & Neidhardt F.C. (1998). Effect of temperature on in vivo protein synthetic capacity in *Escherichia* coli. *Journal of bacteriology*, 180, 4704-4710.

Farrant G. (2015). Etude génomique et métagénomique de la diversité génétique, la distribution écologique et l'évolution

des picocyanobactéries marines. In Paris 6.

Farrant G., Doré H., Cornejo-Castillo F.M., Partensly F., Ratin MI, Ostrowski M., Scanlan D., Iudicorne D., Follows M., Arcinas S. & Garczarek L. (*submitted*). PNAS Plus

Feller G. & Gerday C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews Microbiology*, 1, 200-208.

Ferreira K.N., Iverson T.M., Maghlaoui K., Barber J. & Iwata S. (2004). Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science*, 303, 1831-1838.

Ferris M.J. & Palenik B. (1998). Niche adaptation in ocean cyanobacteria. *Nature*, 396, 226-228.

Ficner R. & Huber R. (1993). Refined crystal structure of phycoerythrin from Porphyridium cruentum at 0.23-nm resolution and localization of the γ subunit. *European journal of biochemistry*, 218, 103-106.

Field C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T. & Falkowski P. (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281, 237-240.

Fields P.A. (2001). Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 129, 417-431.

Finkel Z.V., Beardall J., Flynn K.J., Quigg A., Rees T.A.V. & Raven J.A. (2009). Phytoplankton in a changing world: cell size and elemental stoichiometry. *Journal of Plankton Research*, fbp098.

Flombaum P., Gallegos J.L., Gordillo R.A., Rincón J., Zabala L.L., Jiao N., Karl D.M., Li W.K., Lomas M.W. & Veneziano D. (2013). Present and future global distributions of the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 9824-9829.

Freeman S., Herron J.C., HHodin J.A., Miner B. & Sidor C. (2007). *Evolutionary analysis*. Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, NJ.

Froehlich J.E., Poorman R., Readon E., Barnum S.R. & Jaworski J.G. (1990). Purification and characterization of acyl carrier protein from two cyanobacteria species. *European journal of biochemistry*, 193, 817-825.

Füglistaller P., Rümbeli R., Suter F., & Zuber H. (1984). Minor polypeptides from the phycobilisome of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. Isolation, characterization and amino-acid sequences of a colourless 8.9-kDa polypeptide and of a 16.2-kDa phycobiliprotein. *Hoppe-Seyler´ s Zeitschrift für physiologische Chemie*, 365, 1085-1096.

Fujita Y., Murakami A., Aizawa K. & Ohki K. (1994). Short-term and long-term adaptation of the photosynthetic apparatus: homeostatic properties of thylakoids. In: *The molecular biology of cyanobacteria*. Springer, pp. 677-692.

Fujiwara S., Tsuzuki M., Kawachi M., Minaka N. & Inouye I. (2001). Molecular phylogeny of the haptophyta based on the rbcL gene and sequence variation in the spacer region of the Rubisco operon. *Journal of phycology*, 37, 121-129.

Fuller N.J., Marie D., Partensky F., Vaulot D., Post A.F. & Scanlan D.J. (2003). Clade-specific 16S ribosomal DNA oligonucleotides reveal the predominance of a single marine *Synechococcus* clade throughout a stratified water column in the Red Sea. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 2430-2443.

Fuller N.J., Tarran G.A., Yallop M., Orcutt K.M. & Scanlan D.J. (2006). Molecular analysis of picocyanobacterial community structure along an Arabian Sea transect reveals distinct spatial separation of lineages. *Limnology and Oceanography*, 51, 2515-2526.

Funk C. & 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.

G

Gantt E. (1980). Structure and function of phycobilisomes : light harvesting pigment complexes in red and blue green algae. *International review of cytology*, 66.

Gantt E. (1994). Supramolecular membrane organization. In: *The molecular biology of cyanobacteria*. Springer, pp. 119-138.

Gantt E. & Conti S. (1965). The ultrastructure of Porphyridium cruentum. *The Journal of cell biology*, 26, 365-381.

Gantt E. & Conti S. (1966). Granules associated with the chloroplast lamellae of Porphyridium cruentum. *The Journal of cell biology*, 29, 423-434.

Gao X., Wei T.D., Zhang N., Xie B.B., Su H.N., Zhang X.Y., Chen X.L., Zhou B.C., Wang Z.X. & Wu J.W. (2012). Molecular insights into the terminal energy acceptor in cyanobacterial phycobilisome. *Molecular Microbiology*, 85, 907-915.

García-Fernández J.M., de Marsac N.T. & Diez J. (2004). Streamlined regulation and gene loss as adaptive mechanisms in *Prochlorococcus* for optimized nitrogen utilization in oligotrophic environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 630-638.

Garczarek L. (2011). Diversité génétique des picocyanobactéries marines et stratégies d'adaptation aux variations des facteurs environnementaux. *Habilitation à diriger la Recherche - Université Pierre et Marie Curie*.

Garczarek L., Dufresne A., Blot N., Cockshutt A.M., Peyrat A., Campbell D.A., Joubin L. & Six C. (2008a). Function and evolution of the psbA gene family in marine *Synechococcus*: *Synechococcus* sp. WH7803 as a case study. *ISME J*, 2, 937-953.

Garczarek L., Dufresne A., Rousvoal S., West N.J., Mazard S., Marie D., Claustre H., Raimbault P., Post A.F., Scanlan D.J. & Partensky F. (2007). High vertical and low horizontal diversity of *Prochlorococcus* ecotypes in the Mediterranean Sea in summer. *FEMS Microbiology Ecology*, 60, 189-206.

Garczarek L., Hess W.R., Holtzendorff J., van der Staay G.W. & Partensky F. (2000). Multiplication of antenna genes as a major adaptation to low light in a marine prokaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 4098-4101.

Ghanotakis D.F., Demetriou D.M. & Yocum C.F. (1987). Isolation and characterization of an oxygen-evolving photosystem II reaction center core preparation and a 28 kDa Chl-a-binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 891, 15-21.

Gindt Y.M., Zhou J., Bryant D.A. & Sauer K. (1994). Spectroscopic studies of phycobilisome subcore preparations lacking key core chromophores: Assignment of excited state energies to the Lcm, β18 and αAP-B chromophores. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1186, 153-162.

Giorgio M., Trinei M., Migliaccio E. & Pelicci P.G. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nature reviews Molecular cell biology*, 8, 722-728.

Glauser M., Bryant D.A., Franck G., Wehrli E., Rusconi S.S., Sidler W. & Zuber H. (1992a). Phycobilisome structure in the cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Anabaena* sp. PCC 7120. *European Journal of Biochemistry*, 205, 907-915.

Glauser M., Sidler W.A., Graham K.W., Bryant D.A., Frank G., Wehrli E. & Zuber H. (1992b). Three C-phycoerythrin-associated linker polypeptides in the phycobilisome of green-light-grown *Calothrix* sp. PCC 7601 (cyanobacteria). *FEBS letters*, 297, 19-23.

Glazer A.N. (1985). Light Harvesting by Phycobilisomes. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 14, 47-77.

Glazer A.N. (1989). Light guides - Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 1-4.

Goericke R. & Repeta D. (1992). The pigments of *Prochlorococcus* marinus: The presence of divinylchlorophyll a and b in a marine procaryote. *Limnology and Oceanography*, 37, 425-433.

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

Golecki J.R. (1979). Ultrastructure of cell wall and thylakoid membranes of the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus lividus* under the influence of temperature shifts. *Archives of Microbiology*, 120, 125-133.

Gombos Z., Wada H. & Murata N. (1992). Unsaturation of fatty-acids in membrane-lipids enhances tolerance of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 to low temperature inhibition *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 9959-9963.

Gombos Z., Wada H. & Murata N. (1994). The recovery of photosynthesis from low - temperature photoinhbition accelerated by the unsaturation of membrane-lipids : a mechnisms of chilling tolerance *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 8787-8791.

Goodchild A., Saunders N.F., Ertan H., Raftery M., Guilhaus M., Curmi P.M. & Cavicchioli R. (2004). A proteomic determination of cold adaptation in the Antarctic archaeon, Methanococcoides burtonii. *Molecular Microbiology*, 53, 309-321.

Gounaris K. & Barber J. (1983). Monogalactosyldiacylglycerol: The most abundant polar lipid in nature. *Trends in Biochemical Sciences*, 8, 378-381.

Gram C. (1884). The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschritte der Medizin*, 2, 185-9.2185.

Greenwood D.R. & Wing S.L. (1995). Eocene continental climates and latitudinal temperature gradients. *Geology*, 23, 1044-1048.

Gruber N. & Galloway J.N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451, 293-296.

Guillou L., Eikrem W., Chrétiennot-Dinet M.-J., Le Gall F., Massana R., Romari K., Pedrós-Alió C. & Vaulot D. (2004). Diversity of picoplanktonic prasinophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems. *Protist*, 155, 193-214.

Guskov A., Kern J., Gabdulkhakov A., Broser M., Zouni A. & Saenger W. (2009). Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nature structural & molecular biology*, 16, 334-342.

Gwizdala M., Wilson A. & Kirilovsky D. (2011). In vitro reconstitution of the cyanobacterial photoprotective mechanism mediated by the Orange Carotenoid Protein in Synechocystis PCC 6803. *The Plant Cell*, 23, 2631-2643.

H

Hakala M., Tuominen I., Keränen M., Tyystjärvi T. & Tyystjärvi E. (2005). Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1706, 68-80.

Hall T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Han T.-M. & Runnegar B. (1992). Megascopic eukaryotic algae from the 2.1-billion-year-old Negaunee Iron-Formation, Michigan. *Science*, 257, 232-235.

Haque M.A. & Russell N.J. (2004). Strains of *Bacillus cereus* vary in the phenotypic adaptation of their membrane lipid composition in response to low water activity, reduced temperature and growth in rice starch. *Microbiology*, 150, 1397-1404.

Harwood J.L. (1988). Fatty acid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39, 101-138.

Haußühl K., Andersson B. & Adamska I. (2001). A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *The EMBO journal*, 20, 713-722.

Hazel J.R. & Williams E.E. (1990). The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in lipid research*, 29, 167-227.

He Q., Dolganov N., Björkman O. & Grossman A.R. (2001). The high light-inducible polypeptides in *Synechocystis* PCC 6803 expression and function in high light. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 306-314.

Hellmich J., Bommer M., Burkhardt A., Ibrahim M., Kern J., Meents A., Müh F., Dobbek H. & Zouni A. (2014). Native-like photosystem II superstructure at 2.44 Å resolution through detergent extraction from the protein crystal. *Structure*, 22, 1607-1615.

Hensen V. (1887). Über die Bestimmung des Planktons oder des im Meere treibenden Materiales anPflanzen und Tieren. *Ber Komm Wiss Untersuch Deutsch Meere* 5, 1-109.

Herdman M., Castenholz R.W., Waterbury J.B. & Rippka R. (2001). Form-genus XIII. *Synechococcus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (eds. Boone DR & Castenholz RW). Springer-Verlag New York, pp. 508-512.

Herrero A., Muro-Pastor A.M. & Flores E. (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, 183, 411-425.

Hess W.R., Partensky F., Van Der Staay G., Garcia-Fernandez J.M., Börner T. & Vaulot D. (1996). Coexistence of phycoerythrin and a chlorophyll a/b antenna in a marine prokaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 11126-11130.

Hess W.R., Rocap G., Ting C.S., Larimer F., Stilwagen S., Lamerdin J. & Chisholm S.W. (2001). The photosynthetic apparatus of *Prochlorococcus*: Insights through comparative genomics. *Photosynthesis Research*, 70, 53-71.

Hess W.R., Steglich C., Lichtlé C. & Partensky F. (1999). Phycoerythrins of the oxyphotobacterium *Prochlorococcus* marinus are associated to the thylakoid membrane and are encoded by a single large gene cluster. *Plant molecular biology*, 40, 507-521.

Hideg É., Spetea C. & Vass I. (1994). Singlet oxygen production in thylakoid membranes during photoinhibition as detected by EPR spectroscopy. *Photosynthesis research*, 39, 191-199.

Higashi S. & Murata N. (1993). An in vivo study of substrate specificities of acyl-lipid desaturases and acyltransferases in lipid synthesis in *Synechocystis* PCC6803. *Plant physiology*, 102, 1275-1278.

Hirano M., Satoh K. & Katoh S. (1980). Plastoquinone as a common link between photosynthesis and respiration in a blue-green alga. *Photosynthesis research*, 1, 149-162.

Honda D., Yokota A. & Sugiyama J. (1999). Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. *Journal of Molecular Evolution*, 48, 723-739.

Horton P., Ruban A.V. & Walters R.G. (1994). Regulation of light harvesting in green plants (indication by nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence). *Plant Physiology*, 106, 415.

Huang S., Wilhelm S.W., Harvey H.R., Taylor K., Jiao N. & Chen F. (2011). Novel lineages of

Prochlorococcus and *Synechococcus* in the global oceans. *ISME J*, 6, 285-297.

Humily F., Partensky F., Six C., Farrant G.K., Ratin M., Marie D. & Garczarek L. (2013). A gene island with two possible configurations is involved in chromatic acclimation in marine *Synechococcus*. *Plos One*, 8, e84459.

Huner N.P.A., Oquist G. & Sarhan F. (1998). Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science*, 3, 224-230.

Hutchinson G.E. (1961). The paradox of the plankton. *American Naturalist*, 137-145.

I

Imlay J.A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology*, 57, 395-418.

Inoue N., Taira Y., Emi T., Yamane Y., Kashino Y., Koike H. & Satoh K. (2001). Acclimation to the growth temperature and the high-temperature effects on photosystem II and plasma membranes in a mesophilic cyanobacterium, *Synechocystis* sp PCC6803. *Plant and Cell Physiology*, 42, 1140-1148.

Iwasaki H., Williams S.B., Kitayama Y., Ishiura M., Golden S.S. & Kondo T. (2000). A KaiC-interacting sensory histidine kinase, SasA, necessary to sustain robust circadian oscillation in cyanobacteria. *Cell*, 101, 223-233.

J

Jallet D., Thurotte A., Leverenz R.L., Perreau F., Kerfeld C.A. & Kirilovsky D. (2014). Specificity of the cyanobacterial orange carotenoid protein: influences of orange carotenoid protein and phycobilisome structures. *Plant physiology*, 164, 790-804.

Javaux E.J., Knoll A.H. & Walter M.R. (2001). Morphological and ecological complexity in early eukaryotic ecosystems. *Nature*, 412, 66-69.

Jenkins B.D., Zehr J.P., Gibson A. & Campbell L. (2006). Cyanobacterial assimilatory nitrate reductase gene diversity in coastal and oligotrophic marine environments. *Environmental microbiology*, 8, 2083-2095.

Jia Y., Shan J., Millard A., Clokie M.R. & Mann N.H. (2010). Light-dependent adsorption of photosynthetic cyanophages to *Synechococcus* sp. WH7803. *Fems Microbiology Letters*, 310, 120-126.

Jia Z. & Davies P.L. (2002). Antifreeze proteins: an unusual receptor–ligand interaction. *Trends in biochemical sciences*, 27, 101-106.

Jing H., Zhang R., Pointing S.B., Liu H. & Qian P. (2009). Genetic diversity and temporal variation of the marine *Synechococcus* community in the subtropical coastal waters of Hong Kong. *Can J Microbiol*, 55, 311-318.

Jochem F. (1988). On the distribution and importance of picocyanobacteria in a boreal inshore area (Kiel Bight, Western Baltic). *Journal of plankton research*, 10, 1009-1022.

Jodłowska S. & Śliwińska S. (2014). Effects of light intensity and temperature on the photosynthetic irradiance response curves and chlorophyll fluorescence in three picocyanobacterial strains of *Synechococcus*. *Photosynthetica*, 52, 223-232.

Johnson Z.I. & Lin Y. (2009). Prochlorococcus: Approved for export. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 10400-10401.

Johnson Z.I., Zinser E.R., Coe A., McNulty N.P., Woodward E.M. & Chisholm S.W. (2006). Niche partitioning among *Prochlorococcus*

ecotypes along ocean-scale environmental gradients. *Science*, 311, 1737-40.

Jones A., Davies H.M. & Voelker T.A. (1995). Palmitoyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase and the evolutionary origin of plant acyl-ACP thioesterases. *The Plant Cell*, 7, 359-371.

Jones M.R. (2007). Lipids in photosynthetic reaction centres: Structural roles and functional holes. *Progress in lipid research*, 46, 56-87.

Jones S.L., Drouin P., Wilkinson B.J. & Morse P.D. (2002). Correlation of long-range membrane order with temperature-dependent growth characteristics of parent and a cold-sensitive, branched-chain-fatty-acid-deficient mutant of Listeria monocytogenes. *Archives Microbiology*, 177, 217-222.

Jordan P., Fromme P., Witt H.T., Klukas O., Saenger W. & Krauß N. (2001). Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, 411, 909-917.

Joshua S., Bailey S., Mann N.H. & Mullineaux C.W. (2005). Involvement of phycobilisome diffusion in energy quenching in cyanobacteria. *Plant physiology*, 138, 1577-1585.

Jouhet J., Maréchal E. & Block M.A. (2007). Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells. *Progress in lipid research*, 46, 37-55.

Jungblut A.D., Lovejoy C. & Vincent W.F. (2010). Global distribution of cyanobacterial ecotypes in the cold biosphere. *ISME J*, 4, 191-202.

Jürgens U. & Weckesser J. (1985). Carotenoid-containing outer membrane of *Synechocystis* sp. strain PCC6714. *Journal of bacteriology*, 164, 384-389.

K

Kana T.M. & Glibert P.M. (1987). Effect of irradiances up to 2000 µE m−2 s−1 on marine *Synechococcus* WH7803—I. Growth, pigmentation, and cell composition. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 34, 479-495.

Kana T.M., Glibert P.M., Goericke R. & Welschmeyer N.A. (1988). Zeaxanthin and Betha-Carotene in *Synechococcus* WH7803 Respond Differently to Irradiance. *Limnology and Oceanography*, 33, 1623-1627.

Kashefi K., Holmes D.E., Baross J.A. & Lovley D.R. (2003). Thermophily in the Geobacteraceae: *Geothermobacter ehrlichii* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic member of the Geobacteraceae from the “Bag City” hydrothermal vent. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 2985-2993.

Kashino Y., Inoue-Kashino N., Roose J.L. & Pakrasi H.B. (2006). Absence of the PsbQ protein results in destabilization of the PsbV protein and decreased oxygen evolution activity in cyanobacterial photosystem II. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 20834-20841.

Kashtan N., Roggensack S.E., Rodrigue S., Thompson J.W., Biller S.J., Coe A., Ding H., Marttinen P., Malmstrom R.R. & Stocker R. (2014). Single-cell genomics reveals hundreds of coexisting subpopulations in wild *Prochlorococcus*. *Science*, 344, 416-420.

Kates M., Pugh E. & Ferrante G. (1984). Regulation of membrane fluidity by lipid desaturases. In: *Membrane fluidity*. Springer, pp. 379-395.

Kato Y. & Sakamoto W. (2009). Protein quality control in chloroplasts: a current model of D1 protein degradation in the photosystem II repair cycle. *Journal of biochemistry*, 146, 463-469.

Keeling P.J. & Palmer J.D. (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics*, 9, 605-618.

Kelly A.A. & Dörmann P. (2002). DGD2, an *Arabidopsis* gene encoding a UDP-

galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 1166-1173.

Kempner E.S. (1963). Upper temperature limit of life. *Science*, 142, 1318-1319.

Kenyon C.N., Stanier R.Y. & Rippka R. (1972). Fatty-acid composition and physiological properties of some filamentous bue green algae. *Archiv Fur Mikrobiologie*, 83, 216-&.

Keren N., Berg A., Van Kan P.J., Levanon H. & Ohad I. (1997). Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 1579-1584.

Kerfeld C.A. (2004a). Structure and function of the water-soluble carotenoid-binding proteins of cyanobacteria. *Photosynthesis research*, 81, 215-225.

Kerfeld C.A. (2004b). Water-soluble carotenoid proteins of cyanobacteria. *Archives of Biochemistry and biophysics*, 430, 2-9.

Kettler G.C., Martiny A.C., Huang K., Zucker J., Coleman M.L., Rodrigue S., Chen F., Lapidus A., Ferriera S. & Johnson J. (2007). Patterns and implications of gene gain and loss in the evolution of *Prochlorococcus*. *PLoS Genet*, 3, e231.

Kimura A., Eaton-Rye J.J., Morita E.H., Nishiyama Y. & Hayashi H. (2002). Protection of the oxygen-evolving machinery by the extrinsic proteins of photosystem II is essential for development of cellular thermotolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant and Cell Physiology*, 43, 932-938.

Kirkham A.R., Lepère C., Jardillier L.E., Not F., Bouman H., Mead A. & Scanlan D.J. (2013). A global perspective on marine photosynthetic picoeukaryote community structure. *The ISME journal*, 7, 922-936.

Klähn S., Orf I., Schwarz D., Matthiessen J.K., Kopka J., Hess W.R. & Hagemann M. (2015). Integrated transcriptomic and metabolomic characterization of the low-carbon response using an ndhR mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant physiology*, pp. 114.254045.

Knight-Jones E. & Walne P.R. (1951). Chromulina pusilla Butcher, a dominant member of the ultraplankton.

Knoll A.H. (1994). Proterozoic and Early Cambrian protists: evidence for accelerating evolutionary tempo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 6743-6750.

Knoll A.H. (2008). Cyanobacteria and earth history. *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics, and Evolution*, 484.

Komenda J. & Masojídek J. (1995). Functional and structural changes of the photosystem II complex induced by high irradiance in cyanobacterial cells. *European journal of biochemistry*, 233, 677-682.

Konstantinidis K.T. & Tiedje J.M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 2567-2572.

Kós P.B., Deák Z., Cheregi O. & Vass I. (2008). Differential regulation of psbA and psbD gene expression, and the role of the different D1 protein copies in the cyanobacterium *Thermosynechococcus* elongatus BP-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777, 74-83.

Krieger-Liszkay A., Fufezan C. & Trebst A. (2008). Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research*, 98, 551-564.

Kruse O. & Schmid G. (1995). The role of phosphatidylglycerol as a functional effector and membrane anchor of the D1-core peptide from photosystem II-particles of the cyanobacterium *Oscillatoria chalybea*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 50, 380-390.

Kuosa H. (1991). Picoplanktonic algae in the northern Baltic Sea: seasonal dynamics and flagellate grazing. *Mar. Ecol. Prog. Ser*, 73, 269-276.

Kützing F.T. (1843). *Phycologia generalis: oder Anatomie, Physiologie und Systemkunde der Tange*. Brockhaus.

L

La Teana A., Brandi A., Falconi M., Spurio R., Pon C.L. & Gualerzi C. (1991). Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 10907-10911.

Laczkó-Dobos H., Ughy B., Tóth S.Z., Komenda J., Zsiros O., Domonkos I., Párducz Á., Bogos B., Komura M., Itoh S. & Gombos Z. (2008). Role of phosphatidylglycerol in the function and assembly of Photosystem II reaction center, studied in a cdsA-inactivated PAL mutant strain of *Synechocystis* sp. PCC6803 that lacks phycobilisomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777, 1184-1194.

Laksanalamai P. & Robb F.T. (2004). Small heat shock proteins from extremophiles: a review. *Extremophiles*, 8, 1-11.

Lantoine F. & Neveux J. (1997). Spatial and seasonal variations in abundance and spectral characteristics of phycoerythrins in the tropical northeastern Atlantic Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 44, 223-246.

Lea-Smith D.J., Ross N., Zori M., Bendall D.S., Dennis J.S., Scott S.A., Smith A.G. & Howe C.J. (2013). Thylakoid terminal oxidases are essential for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to survive rapidly changing light intensities. *Plant physiology*, 162, 484-495.

Lebaron P., Servais P., Baudoux A.-C., Bourrain M., Courties C. & Parthuisot N. (2002). Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry. *Aquatic microbial ecology*, 28, 131-140.

Lem N.W. & Stumpf P.K. (1984). *In vitro* fatty acid synthesis and complex lipid metabolism in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* I. Some characteristics of fatty acid synthesis. *Plant physiology*, 74, 134-138.

Leng J., Sakurai I., Wada H. & Shen J.-R. (2008). Effects of phospholipase and lipase treatments on photosystem II core dimer from a thermophilic cyanobacterium. *Photosynthesis research*, 98, 469-478.

Leverenz R.L., Sutter M., Wilson A., Gupta S., Thurotte A., de Carbon C.B., Petzold C.J., Ralston C., Perreau F. & Kirilovsky D. (2015). A 12 Å carotenoid translocation in a photoswitch associated with cyanobacterial photoprotection. *Science*, 348, 1463-1466.

Lewin R.A. (1976). Prochlorophyta as a proposed new division of algae. *Nature*, 261, 697-698.

Li W.K. (1998). Annual average abundance of heterotrophic bacteria and *Synechococcus* in surface ocean waters. *Limnology and Oceanography*, 43, 1746-1753.

Li Z., Wakao S., Fischer B.B. & Niyogi K.K. (2009). Sensing and responding to excess light. *Annual review of plant biology*, 60, 239-260.

Liberton M., Page L.E., O'Dell W.B., O'Neill H., Mamontov E., Urban V.S. & Pakrasi H.B. (2013). Organization and flexibility of cyanobacterial thylakoid membranes examined by neutron scattering. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 3632-3640.

Lindahl M., Spetea C., Hundal T., Oppenheim A.B., Adam Z. & Andersson B. (2000). The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *The Plant Cell*, 12, 419-431.

Lindahl M., Tabak S., Cseke L., Pichersky E., Andersson B. & Adam Z. (1996). Identification, characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial FtsH protease in chloroplasts of

higher plants. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 29329-29334.

Lindell D., Penno S., Al-Qutob M., David E., Rivlin T., Lazar B. & Post A.F. (2005). Expression of the nitrogen stress response gene ntcA reveals nitrogen-sufficient *Synechococcus* populations in the oligotrophic northern Red Sea. *Limnol Oceanogr*, 50, 1932-1944.

Lindquist S. (1986). The heat-shock response. *Annual review of biochemistry*, 55, 1151-1191.

Lindquist S. & Craig E. (1988). The heat-shock proteins. *Annual review of genetics*, 22, 631-677.

Liu L.-N., Chen X.-L., Zhang Y.-Z. & Zhou B.-C. (2005). Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1708, 133-142.

Liu S., Juneau P. & Qiu B. (2012). Effects of iron on the growth and minimal fluorescence yield of three marine *Synechococcus* strains (Cyanophyceae). *Phycological Research*, 60, 61-69.

Lokstein H., Steglich C. & Hess W.R. (1999). Light-harvesting antenna function of phycoerythrin in *Prochlorococcus* marinus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1410, 97-98.

Loll B., Kern J., Saenger W., Zouni A. & Biesiadka J. (2005). Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature*, 438, 1040-1044.

Los D.A. & Mironov K.S. (2015). Modes of fatty acid desaturation in cyanobacteria: an update. *Life*, 5, 554-567.

Los D.A., Mironov K.S. & Allakhverdiev S.I. (2013). Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynthesis research*, 116, 489-509.

Los D.A. & Murata N. (1999). Responses to cold shock in cyanobacteria. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1, 221-30.

Los D.A. & Murata N. (2000). Regulation of enzymatic activity and gene expression by membrane fluidity. *Sci STKE*, 62, PE1.

Los D.A. & Murata N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1666, 142-157.

Los D.A., Ray M.K. & Murata N. (1997). Differences in the control of the temperature-dependent expression of four genes for desaturases in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology*, 25, 1167-1175.

Lovejoy C., Galand P.E. & Kirchman D.L. (2011). Picoplankton diversity in the Arctic Ocean and surrounding seas. *Marine Biodiversity*, 41, 5-12.

Lovejoy C., Massana R. & Pedrós-Alió C. (2006). Diversity and distribution of marine microbial eukaryotes in the Arctic Ocean and adjacent seas. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 3085-3095.

Lovejoy C., Vincent W.F., Bonilla S., Roy S., Martineau M.-J., Terrado R., Potvin M., Massana R. & Pedrós-Alió C. (2007). Distribution, phylogeny, and growth of cold-adapted picoprasinophytes in Artic sea. *Journal of Phycology*, 43, 78-89.

Ludwig M. & Bryant D.A. (2012). Acclimation of the global transcriptome of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 to nutrient limitations and different nitrogen sources. *Frontiers in microbiology*, 3, 145-145.

Lukeš M., Procházková L., Shmidt V., Nedbalová L. & Kaftan D. (2014). Temperature dependence of photosynthesis and thylakoid lipid composition in the red snow alga *Chlamydomonas cf. nivalis* (Chlorophyceae). *FEMS microbiology ecology*, 89, 303-315.

Lundell D.J., Yamanaka G. & Glazer A.N. (1981). A terminal energy acceptor of the phycobilisome: the 75,000-dalton

polypeptide of *Synechococcus* 6301 phycobilisomes--a new biliprotein. *The Journal of cell biology*, 91, 315-319.

Lutts S., Kinet J. & Bouharmont J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (Oryza sativa L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78, 389-398.

M

MacColl R. (1998). Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology*, 124, 311-334.

Maccoll R., Csatorday K., Berns D.S. & Traeger E. (1981). The relationship of the quaternary structure of allophycocyanin to its spectrum. *Archives of biochemistry and biophysics*, 208, 42-48.

Mackey K.R.M., Paytan A., Caldeira K., Grossman A.R., Moran D., McIlvin M. & Saito M.A. (2013). Effect of Temperature on photosynthesis and growth in marine *Synechococcus* spp. *Plant Physiology*, 163, 815-829.

Madigan M.T. & Orent A. (1999). Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current opinion in microbiology*, 2, 265-269.

Malmstrom R.R., Coe A., Kettler G.C., Martiny A.C., Frias-Lopez J., Zinser E.R. & Chisholm S.W. (2010). Temporal dynamics of *Prochlorococcus* ecotypes in the Atlantic and Pacific oceans. *The ISME journal*, 4, 1252-1264.

Malmstrom R.R., Rodrigue S., Huang K.H., Kelly L., Kern S.E., Thompson A., Roggensack S., Berube P.M., Henn M.R. & Chisholm S.W. (2013). Ecology of uncultured *Prochlorococcus* clades revealed through single-cell genomics and biogeographic analysis. *The ISME journal*, 7, 184-198.

Manodori A., Alhadeff M., Glazer A.N. & Melis A. (1984). Photochemical apparatus organization in *Synechococcus* 6301 (Anacystis nidulans). Effect of phycobilisome mutation. *Archives in Microbiology*, 139, 117-123.

Manodori A. & Melis A. (1985). Phycobilisome-photosystem II association in *Synechococcus* 6301 (Cyanophyceae). *FEBS Letters*, 181, 79-82.

Marañón E., Holligan P.M., Barciela R., González N., Mouriño B., Pazó M.J. & Varela M. (2001). Patterns of phytoplankton size structure and productivity in contrasting open-ocean environments. *Marine Ecology Progress Series*, 216, 43-56.

Marie D., Simon N. & Vaulot D. (2005). Phytoplankton cell counting by flow cytometry. *Algal culturing techniques*, 253-268.

Martiny A.C., Kathuria S. & Berube P.M. (2009). Widespread metabolic potential for nitrite and nitrate assimilation among *Prochlorococcus* ecotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 10787-10792.

Martiny J.B.H., Bohannan B.J.M., Brown J.H., Colwell R.K., Fuhrman J.A., Green J.L., Horner-Devine M.C., Kane M., Krumins J.A., Kuske C.R., Morin P.J., Naeem S., Ovreas L., Reysenbach A.L., Smith V.H. & Staley J.T. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 102-112.

Máté Z., Sass L., Szekeres M., Vass I. & Nagy F. (1998). UV-B-induced Differential transcription of *psbA* genes encoding the D1 protein of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 17439-17444.

Mathur S., Agrawal D. & Jajoo A. (2014). Photosynthesis: Response to high temperature stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 137, 116-126.

Mattoo A.K., Hoffman-Falk H., Marder J.B. & Edelman M. (1984). Regulation of protein metabolism: coupling of photosynthetic electron transport to in vivo degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 81, 1380-1384.

Maxwell D.P., Falk S., Trick C.G. & Huner N.P. (1994a). Growth at low temperature mimics high-light acclimation in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiology*, 105, 535-543.

Mazard S., Ostrowski M., Partensky F. & Scanlan D.J. (2012). Multi-locus sequence analysis, taxonomic resolution and biogeography of marine *Synechococcus*. *Environmental Microbiology*, 14, 372-386.

McCarren J. & Brahamsha B. (2007). SwmB, a 1.12-megadalton protein that is required for nonflagellar swimming motility in *Synechococcus*. *Journal of bacteriology*, 189, 1158-1162.

McCarren J., Heuser J., Roth R., Yamada N., Martone M. & Brahamsha B. (2005). Inactivation of *swmA* results in the loss of an outer cell layer in a swimming *Synechococcus* strain. *Journal of bacteriology*, 187, 224-230.

McElhaney R.N. (1984). The relationship between membrane lipid fluidity and phase state and the ability of bacteria and mycoplasmas to grow and survive at various temperatures. In: *Membrane Fluidity*. Springer, pp. 249-278.

Melis A. (1989). Spectroscopic methods in photosynthesis: photosystem stoichiometry and chlorophyll antenna size. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 323, 397-409.

Mella-Flores D., Mazard S., Humily F., Partensky F., Mahe F., Bariat L., Courties C., Marie D., Ras J., Mauriac R. & Jeanthon C. (2011). Is the distribution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* ecotypes affected by global warming? *Biogeosciences*, 8, 2785-2804.

Mella-Flores D., Six C., Ratin M., Partensky F., Boutte C., Le Corguillé G., Blot N., Gourvil P., Kolowrat C., Garczarek L. & Marie D. (2012). *Prochlorococcus* and *Synechococcus* have evolved different adaptive mechanisms to cope with light and UV stress. *Frontiers in microbiology*, 3.

Merritt M.V., Rosenstein S.P., Loh C., Chou R.H.S. & Allen M.M. (1991). A comparison of the major lipid classes and fatty-acid composition of marine unicellular canobacteria with fresh-water species *Archives in Microbiology*, 155, 107-113.

Meyers L.A. & Bull J.J. (2002). Fighting change with change: adaptive variation in an uncertain world. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 551-557.

Mikami K., Kanesaki Y., Suzuki I. & Murata N. (2002). The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol*, 46, 905-915.

Miller S. (2003). Evidence for the adaptive evolution of the carbon fixation gene rbcL during diversification in temperature tolerance of a clade of hot spring cyanobacteria. *Molecular ecology*, 12, 1237-1246.

Mizusawa N. & Wada H. (2012). The role of lipids in photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, 1817, 194-208.

Moche M., Dehesh K., Edwards P. & Lindqvist Y. (2001). The crystal structure of β-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *Synechocystis* sp. at 1.54 Å resolution and its relationship to other condensing enzymes. *Journal of molecular biology*, 305, 491-503.

Moore L., Ostrowski M., Scanlan D., Feren K. & Sweetsir T. (2005). Ecotypic variation in phosphorus acquisition mechanisms within marine picocyanobacteria. *Aquatic Microbial Ecology*.

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

Moore L.R., Goericke R. & Chisholm S.W. (1995a). Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 116, 259-275.

Moore L.R., Goericke R. & Chisholm S.W. (1995b). Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Marine Ecological Progress Series*, 116, 259-275.

Moore L.R., Rocap G. & Chisholm S.W. (1998). Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature*, 393, 464-467.

Mora C., Tittensor D.P., Adl S., Simpson A.G.B. & Worm B. (2011). How many species are there on Earth and in the Ocean? *Plos Biology*, 9, e1001127.

Morán X.A.G. (2007). Annual cycle of picophytoplankton photosynthesis and growth rates in a temperate coastal ecosystem: a major contribution to carbon fluxes. *Aquatic Microbial Ecology*, 49, 267.

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

Morgan-Kiss R.M., Priscu J.C., Pocock T., Gudynaite-Savitch L. & Huner N.P.A. (2006). Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 222.

Morita R.Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological reviews*, 39, 144.

Mühling M., Fuller N.J., Millard A., Somerfield P.J., Marie D., Wilson W.H., Scanlan D.J., Post A.F., Joint I. & Mann N.H. (2005). Genetic diversity of marine *Synechococcus* and co-occurring cyanophage communities: evidence for viral control of phytoplankton. *Environmental Microbiology*, 7, 499-508.

Müller P., Li X.-P. & Niyogi K.K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant physiology*, 125, 1558-1566.

Mullineaux C.W. (1999). The thylakoid membranes of cyanobacteria: structure, dynamics and function. *Functional Plant Biology*, 26, 671-677.

Mullineaux C.W. (2008). Phycobilisome-reaction centre interaction in cyanobacteria. *Photosynthesis research*, 95, 175-182.

Mullineaux C.W. (2014a). Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837, 503-511.

Mullineaux C.W. (2014b). Electron transport and light-harvesting switches in cyanobacteria. *Frontiers in plant science*, 5.

Mullineaux C.W. & Emlyn-Jones D. (2004). State transitions: an example of acclimation to low-light stress. *Journal of Experimental Botany*, 56, 389-93.

Mullineaux C.W. & Kirchhoff H. (2010). Role of lipids in the dynamics of thylakoid membranes. In: *Lipids in Photosynthesis*. Springer, pp. 283-294.

Mullineaux C.W., Tobin M.J. & Jones G.R. (1997). Mobility of photosynthetic complexes in thylakoid membranes. *Nature*, 390, 421-424.

Murata N. (1969). Control of excitation transfer in photosynthesis I. Light-induced change of chlorophyll a fluoresence in *Porphyridium cruentum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 172, 242-251.

Murata N. (1989). Low-temperature effects on cyanobacterial membranes. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 21, 61-75.

Murata N. (2009). The discovery of state transitions in photosynthesis 40 years ago. *Photosynthesis research*, 99, 155-160.

Murata N., Takahashi S., Nishiyama Y. & Allakhverdiev S.I. (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767, 414-421.

Murata N. & Wada H. (1995). Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochemical Journal*, 308, 1-8.

Murata N., Wada H. & Gombos Z. (1992). Modes of fatty-acid desaturation in cyanobacteria. *Plant and Cell Physiology*, 33, 933-941.

Murphy L. & Haugen E. (1985). The distribution and abundance of phototrophic ultraplankton in the North Atlantic 1, 2. *Limnology and Oceanography*, 30, 47-58.

Musto - . & Bernardi G. (2004). Correlations between genomic GC levels and optimal growth temperatures in prokaryotes. *FEBS Letters*, 573, 73-77.

N

Nanjo Y., Mizusawa N., Wada H., Slabas A.R., Hayashi H. & Nishiyama Y. (2010). Synthesis of fatty acids de novo is required for photosynthetic acclimation of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to high temperature. *Biochimica Biophysica Acta*, 1797, 1483-90.

Nellaepalli S., Kodru S. & Subramanyam R. (2012). Effect of cold temperature on regulation of state transitions in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 112, 23-30.

Nichols C.M., Bowman J.P. & Guezennec J. (2005). Olleya marilimosa gen. nov., sp. nov., an exopolysaccharide-producing marine bacterium from the family Flavobacteriaceae, isolated from the Southern Ocean. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55, 1557-1561.

Nickelsen J. & Rengstl B. (2013). Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants. *Annual review of plant biology*, 64, 609-635.

Nikaido H. & Saier M. (1992). Transport proteins in bacteria: common themes in their design. *Science*, 258, 936-942.

Nishida I. & Murata N. (1996). Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. *Annual review of plant biology*, 47, 541-568.

Nishiyama Y., Allakhverdiev S. & Murata N. (2005). Inhibition of the repair of photosystem II by oxidative stress in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 84, 1-7.

Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. & Murata N. (2006). A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1757, 742-9.

Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. & Murata N. (2011). Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiologia Plantarum*, 142, 35-46.

Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I., Yamamoto H., Hayashi H. & Murata N. (2004). Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry*, 43, 11321-11330.

Nishiyama Y., Los D.A. & Murata N. (1999). PsbU, a protein associated with photosystem II, is required for the acquisition of cellular thermotolerance in *Synechococcus* species PCC 7002. *Plant Physiology*, 120, 301-308.

Nishiyama Y., Yamamoto H., Allakhverdiev S.I., Inaba M., Yokota A. & Murata N. (2001). Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *The EMBO journal*, 20, 5587-5594.

Not F., Latasa M., Marie D., Cariou T., Vaulot D. & Simon N. (2004). A single species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), dominates the eukaryotic picoplankton in the western English channel. *Applied*

Environmental Microbiology, 70, 4064-4072.

Not F., Massana R., Latasa M., Marie D., Colson C., Eikrem W., Pedros Alio C., Vaulot D. & Simon N. (2005). Late summer community composition and abundance of photosynthetic picoeukaryotes in Norwegian and Barents Seas. *Limnology and Oceanography*, 50, 1677-1686.

Nugent J.H. (2001). Photoreducible high spin iron electron paramagnetic resonance signals in dark-adapted Photosystem II: are they oxidised non-haem iron formed from interaction of oxygen with PSII electron acceptors? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1504, 288-298.

Omata T. & Murata N. (1984). Isolation and characterization of three types of membranes from the cyanobacterium (blue-green alga) *Synechocystis* PCC 6714. *Archives of Microbiology*, 139, 113-116.

Ong L.J. & Glazer A.N. (1987). R-phycocyanin II, a new phycocyanin occurring in marine *Synechococcus* species. Identification of the terminal energy acceptor bilin in phycocyanins. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 6323-6327.

Oquist G. (1983). Effetcs of low-temperature on photosynthesis. *Plant Cell and Environment*, 6, 281-300.

Öquist G. & Huner N.P. (2003). Photosynthesis of overwintering evergreen plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 329-355.

O

Oguchi R., Terashima I., Kou J. & Chow W.S. (2011). Operation of dual mechanisms that both lead to photoinactivation of photosystem II in leaves by visible light. *Physiologia Plantarum*, 142, 47-55.

Ohashi Y., Shi W., Takatani N., Aichi M., Maeda S.-i., Watanabe S., Yoshikawa H. & Omata T. (2011). Regulation of nitrate assimilation in cyanobacteria. *Journal of experimental Botany*, 62, 1411-1424.

Ohnishi N., Allakhverdiev S.I., Takahashi S., Higashi S., Watanabe M., Nishiyama Y. & Murata N. (2005). Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochemistry*, 44, 8494-8499.

Okazaki K., Sato N., Tsuji N., Tsuzuki M. & Nishida I. (2006). The significance of C16 fatty acids in the sn-2 positions of glycerolipids in the photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant physiology*, 141, 546-556.

P

Paerl R.W., Johnson K.S., Welsh R.M., Worden A.Z., Chavez F.P. & Zehr J.P. (2011). Differential distributions of *Synechococcus* subgroups across the California Current System. *Frontiers in microbiology*, 2.

Palenik B. (1994). Cyanobacterial community structure as seen from RNA polymerase gene sequence analysis. *Applied Environnmental Microbiology*, 60, 3212-3219.

Palenik B. (2001). Chromatic adaptation in marine *Synechococcus* strains. *Appl Environ Microb*, 67, 991-994.

Palenik B., Brahamsha B., Larimer F., Land M., Hauser L., Chain P., Lamerdin J., Regala W., Allen E. & McCarren J. (2003). The genome of a motile marine Synechococcus. *Nature*, 424, 1037-1042.

Palenik B., Ren Q., Dupont C.L., Myers G.S., Heidelberg J.F., Badger J.H., Madupu R., Nelson W.C., Brinkac L.M., Dodson R.J., Durkin A.S., Daugherty S.C., Sullivan S.A., Khouri H., Mohamoud Y., Halpin R. & Paulsen I.T. (2006). Genome sequence of *Synechococcus* CC9311: Insights into

adaptation to a coastal environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 13555-13559.

Partensky F., Blanchot J., Lantoine F., Neveux J. & Marie D. (1996). Vertical structure of picophytoplankton at different trophic sites of the tropical northeastern Atlantic Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 43, 1191-1213.

Partensky F., Blanchot J. & Vaulot D. (1999a). Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. In: *Marine Cyanobacteria*. Bulletin de l'Institut Oceanographique Monaco, pp. 457-475.

Partensky F. & Garczarek L. (2010). *Prochlorococcus*: Advantages and Limits of Minimalism. *Annual Review of Marine Sciences*, 2, 305-331.

Partensky F., Hess W.R. & Vaulot D. (1999b). *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 106-127.

Paz-Yepes J., Brahamsha B. & Palenik B. (2013). Role of a Microcin-C–like biosynthetic gene cluster in allelopathic interactions in marine *Synechococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 12030-12035.

Pehowich D., Macdonald P., McElhaney R., Cossins A. & Wang L. (1988). Calorimetric and spectroscopic studies of lipid thermotropic phase behavior in liver inner mitochondrial membranes from a mammalian hibernator. *Biochemistry*, 27, 4632-4638.

Perez-Cenci M., Caló G.F., Silva R.I., Negri R.M. & Salerno G.L. (2014). The first molecular characterization of picocyanobacteria from the Argentine sea. *Journal of Marine Biology*, 2014.

Peschek G., Obinger C. & Paumann M. (2004). The respiratory chain of blue-green algae (cyanobacteria). *Physiologia plantarum*, 120, 358-369.

Petroutsos D., Amiar S., Abida H., Dolch L.-J., Bastien O., Rébeillé F., Jouhet J., Falconet D., Block M.A. & McFadden G.I. (2014). Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways–From cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Progress in lipid research*, 54, 68-85.

Phadtare S. (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Current issues in molecular biology*, 6, 125-136.

Pittera J., Humily F., Thorel M., Grulois D., Garczarek L. & Six C. (2014). Connecting thermal physiology and latitudinal niche partitioning in marine *Synechococcus*. *ISME J*, 8, 1221-1236.

Pittera J., Partensky F. & Six C. (*submitted*). Adaptive thermsotability of light-harvesting complexesin marine *Synechococcus* cyanobacteria. *ISME Journal*

Porankiewicz J. & Clarke A.K. (1997). Induction of the heat shock protein ClpB affects cold acclimation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Journal of bacteriology*, 179, 5111-5117.

Post A.F., Penno S., Zandbank K., Paytan A., Huse S.M. & Welch D.M. (2011). Long term seasonal dynamics of *Synechococcus* population structure in the Gulf of Aqaba, Northern Red Sea. *Frontiers in microbiology*, 2.

Powles S.B. (1984). Photoinhibition of photosynthesis induced by visible-light *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 35, 15-44.

Price P.B. & Sowers T. (2004). Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 4631-4636.

Puthiyaveetil S., Ibrahim I.M. & Allen J.F. (2012). Oxidation–reduction signalling components in regulatory pathways of state transitions and photosystem stoichiometry adjustment in chloroplasts. *Plant, cell & environment*, 35, 347-359.

Q

Quoc K.P. & Dubacq J.-P. (1997). Effect of growth temperature on the biosynthesis of eukaryotic lipid molecular species by the cyanobacterium Spirulina platensis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1346, 237-246.

R

Rajaram H., Chaurasia A.K. & Apte S.K. (2014). Cyanobacterial heat-shock response: role and regulation of molecular chaperones. *Microbiology*, 160, 647-658.

Rakhimberdieva M.G., Bolychevtseva Y.V., Elanskaya I.V. & Karapetyan N.V. (2007). Protein–protein interactions in carotenoid triggered quenching of phycobilisome fluorescence in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Letters*, 581, 2429-2433.

Rappé M.S. & Giovannoni S.J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*, 57, 369-394.

Ratkowsky D.A., Olley J. & Ross T. (2005). Unifying temperature effects on the growth rate of bacteria and the stability of globular proteins. *Journal of theoretical biology*, 233, 351-362.

Resch C.M. & Gibson J. (1983). Isolation of the carotenoid-containing cell wall of three unicellular cyanobacteria. *Journal of bacteriology*, 155, 345-350.

Rhee K.-H., Morris E.P., Barber J. & Kühlbrandt W. (1998). Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature*, 396, 283-286.

Richardson T.L. & Jackson G.A. (2007). Small phytoplankton and carbon export from the surface ocean. *Science*, 315, 838-40.

Richardson T.L., Jackson G.A., Ducklow H.W. & Roman M.R. (2004). Carbon fluxes through food webs of the eastern equatorial Pacific: an inverse approach. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 51, 1245-1274.

Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M. & Stanier R.Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111, 1-61.

Ritter S., Hiller R.G., Wrench P.M., Welte W. & Diederichs K. (1999). Crystal structure of a phycourobilin-containing phycoerythrin at 1.90-Å resolution. *Journal of structural biology*, 126, 86-97.

Roach T. & Krieger-Liszkay A. (2012). The role of the PsbS protein in the protection of photosystems I and II against high light in Arabidopsis thaliana. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817, 2158-2165.

Robert F. (2001). The origin of water on Earth. *Science*, 293, 1056-1058.

Robertson B.R., Tezuka N. & Watanabe M.M. (2001). Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 861-871.

Rocap G., Larimer F.W., Lamerdin J., Malfatti S., Chain P., Ahlgren N.A., Arellano A., Coleman M., Hauser L., Hess W.R., Johnson Z.I., Land M., Lindell D., Post A.F., Regala W., Shah M., Shaw S.L., Steglich C., Sullivan M.B., Ting C.S., Tolonen A., Webb E.A., Zinser E.R. & Chisholm S.W. (2003). Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature*, 424, 1042-1047.

Rohde K. (1992). Latitudinal gradients in species diversity: the search for the primary cause. *Oikos*, 514-527.

Rokka A., Aro E.-M., Herrmann R.G., Andersson B. & Vener A.V. (2000). Dephosphorylation of photosystem II reaction center proteins in plant

photosynthetic membranes as an immediate response to abrupt elevation of temperature. *Plant Physiology*, 123, 1525-1536.

Roose J.L., Kashino Y. & Pakrasi H.B. (2007). The PsbQ protein defines cyanobacterial photosystem II complexes with highest activity and stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 2548-2553.

Roy K., Jablonski D. & Valentine J.W. (2000). Dissecting latitudinal diversity gradients: functional groups and clades of marine bivalves. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 267, 293-299.

Roy S., Llewellyn C.A., Egeland E.S. & Johnsen G. (2011). *Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*. Cambridge University Press.

Rusch D.B., Martiny A.C., Dupont C.L., Halpern A.L. & Venter J.C. (2010). Characterization of Prochlorococcus clades from iron-depleted oceanic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 16184-16189.

Russell N. & Fukunaga N. (1990). A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *Fems Microbiol Lett*, 75, 171-182.

S

Saito M.A., Rocap G. & Moffett J.W. (2005). Production of cobalt binding ligands in a *Synechococcus* feature at the Costa Rica upwelling dome. *Limnology and Oceanography*, 50, 279-290.

Sakamoto T. & Bryant D.A. (1998). Growth at low temperature causes nitrogen limitation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Archives in Microbiology*, 169, 10-19.

Sakamoto T. & Murata N. (2002). Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Current opinion in microbiology*, 5, 206-210.

Sakurai I., Mizusawa N., Wada H. & Sato N. (2007). Digalactosyldiacylglycerol is required for stabilization of the oxygen-evolving complex in photosystem II. *Plant physiology*, 145, 1361-1370.

Sakurai I., Shen J.-R., Leng J., Ohashi S., Kobayashi M. & Wada H. (2006). Lipids in oxygen-evolving photosystem II complexes of cyanobacteria and higher plants. *Journal of Biochemistry*, 140, 201-209.

Salvucci M.E. & Crafts-Brandner S.J. (2004). Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of Rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. *Plant Physiology*, 134, 1460-1470.

Salvucci M.E. & Crafts-Brandner S.J. (2004). Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 120, 179-186.

Salvucci M.E., Osteryoung K.W., Crafts-Brandner S.J. & Vierling E. (2001). Exceptional sensitivity of Rubisco activase to thermal denaturation in vitro and in vivo. *Plant physiology*, 127, 1053-1064.

Sanchez-Baracaldo P., Hayes P.K. & Blank C.E. (2005). Morphological and habitat evolution in the Cyanobacteria using a compartmentalization approach. *Geobiology*, 3, 145-165.

Sanda S., Leustek T., Theisen M.J., Garavito R.M. & Benning C. (2001). Recombinant Arabidopsis SQD1 converts UDP-glucose and sulfite to the sulfolipid head group precursor UDP-sulfoquinovose in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 3941-3946.

Sandmann G., Albrecht M., Schnurr G., Knörzer O. & Böger P. (1999). The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in Escherichia coli. *Trends in Biotechnology*, 17, 233-237.

Sane P., Ivanov A.G., Sveshnikov D., Huner N.P. & Öquist G. (2002). A transient exchange of the photosystem ii reaction center protein D1: 1 with D1: 2 during low temperature stress ofsynechococcus sp. pcc 7942 in the light lowers the redox potential of qb. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 32739-32745.

Sarcina M., Tobin M.J. & Mullineaux C.W. (2001). Diffusion of phycobilisomes on the thylakoid membranes of the Cyanobacterium *Synechococcus* 7942 effects of phycobilisome size, temperature and membrane composition. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 46830-46834.

Sato N. & Murata N. (1982). Lipid biosynthesis in the blue-green alga (cyanobacterium), *Anabaena variabilis* III. UDPglucose: diacylglycerol glucosyltransferase activity in vitro. *Plant and cell physiology*, 23, 1115-1120.

Sato N. & Wada H. (2010). Lipid biosynthesis and its regulation in cyanobacteria. In: *Lipids in photosynthesis*. Springer, pp. 157-177.

Sato T., Minagawa S., Kojima E., Okamoto N. & Nakamoto H. (2010). HtpG, the prokaryotic homologue of Hsp90, stabilizes a phycobilisome protein in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Mol Microbiol*, 76, 576-589.

Scanlan, Ostrowski M., Mazard S., Dufresne A., Garczarek L., Hess W.R., Post A.F., Hagemann M., Paulsen I. & Partensky F. (2009). Ecological genomics of marine picocyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 73, 249-99.

Scanlan & West N.J. (2002). Molecular ecology of the marine cyanobacterial genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *FEMS Microbiology and Ecology.*, 40, 1-12.

Schaefer M.R. & Golden S.S. (1989). Differential expression of members of a cyanobacterial *psbA* gene family in response to light. *Journal of bacteriology*, 171, 3973-3981.

Scheer H. & Kufer W. (1977). Conformational Studies on C-phycocyanin from *Spirulina* platensis. In: *Zeitschrift für Naturforschung C*, p. 513.

Schirmer T., Huber R., Schneider M., Bode W., Miller M. & Hackert M.L. (1986). Crystal structure analysis and refinement at 2·5 Å of hexameric C-phycocyanin from the cyanobacterium Agmenellum quadruplicatum. *Journal of Molecular Biology*, 188, 651-676.

Schirrmeister B.E., de Vos J.M., Antonelli A. & Bagheri H.C. (2013). Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 1791-1796.

Schmidt-Nielsen K., Schmidt-Nielsen B., Jarnum S.A. & Houpt T.R. (1956). Body temperature of the camel and its relation to water Economy. *American Journal of Physiology -- Legacy Content*, 188, 103-112.

Schopf J.W. (1993). Microfossils of the early Archean apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science*, 260, 640-646.

Schopf J.W. & Packer B.M. (1987). Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science*, 237, 70-73.

Selye H. (1973). The evolution of the stress concept: the originator of the concept traces its development from the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications of syntoxic and catatoxic hormones. *American scientist*, 692-699.

Shalapyonok A., Olson R.J. & Shalapyonok L.S. (2001). Arabian Sea phytoplankton during Southwest and Northeast Monsoons 1995: composition, size structure and biomass from individual cell properties measured by flow cytometry. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 48, 1231-1261.

Shanklin J., Whittle E. & Fox B.G. (1994). Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and

xylene monooxygenase. *Biochemistry*, 33, 12787-12794.

Shapiro L.P. & Haugen E.M. (1988). Seasonal distribution and temperature tolerance of *Synechococcus* in Boothbay Harbor, Maine. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 26, 517-525.

Sherman D.M., Troyan T.A. & Sherman L.A. (1994). Localization of membrane proteins in the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC7942 (radial asymmetry in the photosynthetic complexes). *Plant physiology*, 106, 251-262.

Shih P.M., Wu D., Latifi A., Axen S.D., Fewer D.P., Talla E., Calteau A., Cai F., de Marsac N.T. & Rippka R. (2013). Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 1053-1058.

Sicora C.I., Appleton S.E., Brown C.M., Chung J., Chandler J., Cockshutt A.M., Vass I. & Campbell D.A. (2006). Cyanobacterial *psbA* families in Anabaena and *Synechocystis* encode trace, constitutive and UVB-induced D1 isoforms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757, 47-56.

Sidler W. (1994). Phycobilisome and phycobiliprotein structures. *Bryant DA (ed) The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Chap 7, 139-216.

Sieburth J.M., Smetacek V. & Lenz J. (1978). Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions 1. *Limnol Oceanogr*, 23, 1256-1263.

Sinensky M. (1974). Homeoviscous adaptation - a homeostatic process that regulates viscosity of membranes lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 522-525.

Singer S. & Nicolson G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Day and Good Membranes and viruses in immunopathology*, 7-47.

Singh A.K. & Sherman L.A. (2007). Reflections on the function of IsiA, a cyanobacterial stress-inducible, Chl-binding protein. *Photosynthesis research*, 93, 17-25.

Singh M., Yamamoto Y., Satoh K., Aro E.-M. & Kanervo E. (2005). Post-illumination-related loss of photochemical efficiency of Photosystem II and degradation of the D1 protein are temperature-dependent. *Journal of plant physiology*, 162, 1246-1253.

Six C., Finkel Z.V., Irwin A.J. & Campbell D.A. (2007a). Light variability illuminates niche-partitioning among marine picocyanobacteria. *Plos One*, 2, e1341.

Six C., Joubin L., Partensky F., Holtzendorff J. & Garczarek L. (2007b). UV-induced phycobilisome dismantling in the marine picocyanobacterium *Synechococcus* sp. WH8102. *Photosynthesis Research*, 92, 75-86.

Six C., Sherrard R., Lionard M., Roy S. & Campbell D.A. (2009). Photosystem II and pigment dynamics among ecotypes of the green alga *Ostreococcus*. *Plant Physiology*, 151, 379-390.

Six C., Thomas J.C., Brahamsha B., Lemoine Y. & Partensky F. (2004). Photophysiology of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH8102, a new model organism. *Aquatic Microbial Ecology*, 35, 17-29.

Six C., Thomas J.C., Garczarek L., Ostrowski M., Dufresne A., Blot N., Scanlan D.J. & Partensky F. (2007c). Diversity and evolution of phycobilisomes in marine *Synechococcus* spp. - a comparative genomics study. *Genome Biology*, 8, 259.

Six C., Worden A.Z., Rodríguez F., Moreau H. & Partensky F. (2005). New insights into the nature and phylogeny of prasinophyte antenna proteins: Ostreococcus tauri, a case study. *Molecular biology and evolution*, 22, 2217-2230.

Sohm J.A., Ahlgren N.A., Thomson Z.J., Williams C., Moffett J.W., Saito M.A., Webb E.A. & Rocap G. (2015). Co-occurring *Synechococcus* ecotypes occupy four major oceanic regimes defined by

temperature, macronutrients and iron. *ISME Journal*.

Somero G.N. (2011). Comparative physiology: a "crystal ball" for predicting consequences of global change. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301, R1-R14.

Sorby H.C. (1875). On the Characteristic Colouring-matters of the Red Groups of Algæ. *Journal of the Linnean Society of London, Botany*, 15, 34-40.

Stanier R. & Bazine G. (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 31, 225-274.

Stanier R., Kunisawa R., Mandel M. & Cohen-Bazire G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological reviews*, 35, 171.

Stapleton S.R. & Jaworski J.G. (1984). Characterization and purification of malonyl-coenzyme A:[acyl-carrier-protein] transacylases from spinach and Anabaena variabilis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 794, 240-248.

Steglich C., Post A.F. & Hess W.R. (2003). Analysis of natural populations of *Prochlorococcus* spp. in the northern Red Sea using phycoerythrin gene sequences. *Environmental microbiology*, 5, 681-690.

Steiger S., Schäfer L. & Sandmann G. (1999). High-light-dependent upregulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 52, 14-18.

Stevens Jr S.E. & Nierzwicki-Bauer S.A. (1991). *The cyanobacteria*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Stock A.M., Robinson V.L. & Goudreau P.N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 69, 183-215.

Stokes G. (1854). Ueber die Metallreflexion an gewissen nichtmetallischen Substanzen. *Annalen der Physik*, 167, 300-314.

Stumpf P.K. (1980). Lipids structure and Function. *Yhe Biochemistry of plants*, Academic Press, New York, 177-204.

Sullivan M.B., Lindell D., Lee J.A., Thompson L.R., Bielawski J.P. & Chisholm S.W. (2006). Prevalence and evolution of core photosystem II genes in marine cyanobacterial viruses and their hosts. *Plos Biol*, 4, e234.

Sutter M., Wilson A., Leverenz R.L., Lopez-Igual R., Thurotte A., Salmeen A.E., Kirilovsky D. & Kerfeld C.A. (2013). Crystal structure of the FRP and identification of the active site for modulation of OCP-mediated photoprotection in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 10022-10027.

Suttle C.A. (2007). Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 801-812.

Szalontai B., Nishiyama Y., Gombos Z. & Murata N. (2000). Membrane dynamics as seen by Fourier transform infrared spectroscopy in a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803: the effects of lipid unsaturation and the protein-to-lipid ratio. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1509, 409-419.

Szilárd A., Sass L., Hideg E. & Vass I. (2005). Photoinactivation of photosystem II by flashing light. *Photosynthesis research*, 84, 15-20.

T

Tai V. & Palenik B. (2009). Temporal variation of *Synechococcus* clades at a coastal Pacific Ocean monitoring site. *ISME Journal*, 3, 903-15.

Takahashi H., Iwai M., Takahashi Y. & Minagawa J. (2006). Identification of the mobile light-harvesting complex II polypeptides for state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 477-482.

Takahashi S. & Murata N. (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science*, 13, 178-182.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28, 2731-2739.

Tanaka N. & Nakamoto H. (1999). HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria. *FEBS letters*, 458, 117-123.

Tandeau de Marsac N. (1977). Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *J Bacteriol*, 130, 82-91.

Tandeau de Marsac N. (2003). Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations. *Photosynthesis Research*, 76, 197-205.

Tang E.P.Y., Tremblay R. & Vincent W.F. (1997). Cyanobacterial dominance of polar freshwater ecosystems: Are high-latitude mat-formers adapted to low temperature? *Journal of Phycology*, 33, 171-181.

Tasaka Y., Gombos Z., Nishiyama Y., Mohanty P., Ohba T., Ohki K. & Murata N. (1996). Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis. *The EMBO journal*, 15, 6416.

Telfer A. (2005). Too much light? How β-carotene protects the photosystem II reaction centre. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 4, 950-956.

Tettelin H., Riley D., Cattuto C. & Medini D. (2008). Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Current opinion in microbiology*, 11, 472-477.

Thomas M.K., Kremer C.T., Klausmeier C.A. & Litchman E. (2012). A global pattern of thermal adaptation in marine phytoplankton. *Science*, 338, 1085-1088.

Thompson L.K., Blaylock R., Sturtevant J.M. & Brudvig G.W. (1989). Molecular basis of the heat denaturation of photosystem II. *Biochemistry*, 28, 6686-6695.

Thor J.v., Mullineaux C., Matthijs H. & Hellingwerf K. (1998). Light harvesting and state transitions in cyanobacteria. *Botanica Acta*, 111, 430-443.

Ting C.S., Hsieh C., Sundararaman S., Mannella C. & Marko M. (2007). Cryo-electron tomography reveals the comparative three-dimensional architecture of *Prochlorococcus*, a globally important marine cyanobacterium. *Journal of bacteriology*, 189, 4485-4493.

Ting C.S., Rocap G., King J. & Chisholm S.W. (2002). Cyanobacterial photosynthesis in the oceans: the origins and significance of divergent light-harvesting strategies. *Trends in microbiology*, 10, 134-142.

Toledo G. & Palenik B. (2003). A Synechococcus serotype is found preferentially in surface marine waters. *Limnology and Oceanography*, 48, 1744-1755.

Toledo G., Palenik B. & Brahamsha B. (1999). Swimming marine Synechococcus strains with widely different photosynthetic pigment ratios form a monophyletic group. *Applied Environmental Microbiology*, 65, 5247-5251.

Tomitani A., Knoll A.H., Cavanaugh C.M. & Ohno T. (2006). The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular–phylogenetic and paleontological perspectives. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 5442-5447.

Trebst A. (1986). The topology of the plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystem II in the thylakoid membrane. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 41, 240-246.

Tyystjärvi E. & Aro E.-M. (1996). The rate constant of photoinhibition, measured in lincomycin-treated leaves, is directly

proportional to light intensity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 2213-2218.

V

Van Meer G., Voelker D.R. & Feigenson G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews molecular cell biology*, 9, 112-124.

Van Mooy B.A., Fredricks H.F., Pedler B.E., Dyhrman S.T., Karl D.M., Koblížek M., Lomas M.W., Mincer T.J., Moore L.R. & Moutin T. (2009). Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature*, 458, 69-72.

Van Mooy B.A.S., Rocap G., Fredricks H.F., Evans C.T. & Devol A.H. (2006). Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 8607-8612.

VanBogelen R.A. & Neidhardt F.C. (1990). Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 5589-5593.

Varkey D., Mazard S., Ostrowski M., Tetu S.G., Haynes P. & Paulsen I.T. (2015). Effects of low temperature on tropical and temperate isolates of marine *Synechococcus*. *ISME Journal*.

Vass I. & Cser K. (2009). Janus-faced charge recombinations in photosystem II photoinhibition. *Trends in plant science*, 14, 200-205.

Vass I., Styring S., Hundal T., Koivuniemi A., Aro E. & Andersson B. (1992). Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 1408-1412.

Vaulot D., Eikrem W., Viprey M. & Moreau H. (2008). The diversity of small eukaryotic phytoplankton (≤3 µm) in marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 795-820.

Vaulot D. & Xiuren N. (1988). Abundance and cellular characteristics of marine *Synechococcus* spp. in the dilution zone of the Changjiang (Yangtze River, China). *Continental Shelf Research*, 8, 1171-1186.

Vincent W. (2000). Cyanobacterial dominance in the polar regions. *Whitton BA, Potts M [eds] The ecology of cyanobacteria Kluwer, Dordrecht*, 321-340.

Vincent W.F. & Quesada A. (2012). Cyanobacteria in high latitude lakes, rivers and seas. In: *Ecology of cyanobacteria II*. Springer, pp. 371-385.

Vishnivetskaya T.A., Petrova M.A., Urbance J., Ponder M., Moyer C.L., Gilichinsky D.A. & Tiedje J.M. (2006). Bacterial community in ancient Siberian permafrost as characterized by culture and culture-independent methods. *Astrobiology*, 6, 400-414.

Von Liebig J.F. (1836). *Annalen der Pharmacie*. Meyerschen Hof-Buchh. und der Winterschen Universitäts-Buchh.

Vrba J.M. & Curtis S.E. (1990). Characterization of a four-member psbA gene family from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Plant molecular biology*, 14, 81-92.

W

Wada H. & Murata A. (1998a). Membrane lipids in cyanobacteria *P-A Siegenthaler*, Lipids Photosynthesis *: Structure, Function and Genetics.*, 65-81.

Wada H. & Murata N. (1989). *Synechocystis* PCC 6803 mutants defective in

desaturation of fatty acids. *Plant and cell physiology*, 30, 971-978.

Wada H. & Murata N. (1990). Temperature-induced changes in the fatty-acid composition of the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Plant Physiology*, 92, 1062-1069.

Wada H. & Murata N. (1998b). Membrane Lipids in Cyanobacteria. In: *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics* (eds. Paul-André S & Norio M). Springer Netherlands, pp. 65-81.

Wada H. & Murata N. (2007). The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis. *Photosynthesis research*, 92, 205-215.

Wada H. & Murata N. (2010). Lipids in thylakoid membranes and photosynthetic cells. In: *Lipids in Photosynthesis*. Springer, pp. 1-9.

Walsh J.J. (1983). Death in the sea: enigmatic phytoplankton losses. *Progress in Oceanography*, 12, 1-86.

Walsh J.J., Rowe G.T., Iverson R.L. & McRoy C.P. (1981). Biological export of shelf carbon is a sink of the global CO2 cycle.

Wang W., Vinocur B., Shoseyov O. & Altman A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*, 9, 244-252.

Waterbury J.B., Watson S.W., Guillard R.R.L. & Brand L.E. (1979). Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. *Nature*, 277, 293-294.

Waterbury J.B., Watson S.W., Valois F.W. & Franks D.G. (1986). Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. *Canadian Bulletin Fisheries Aquatic Sciences*, 214, 71-120.

Weier D., Müller C., Gaspers C. & Frentzen M. (2005). Characterisation of acyltransferases from *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochemical and biophysical research communications*, 334, 1127-1134.

West N.J., Lebaron P., Strutton P.G. & Suzuki M.T. (2011). A novel clade of *Prochlorococcus* found in high nutrient low chlorophyll waters in the South and Equatorial Pacific Ocean. *The ISME journal*, 5, 933-944.

White S.W., Zheng J., Zhang Y.-M. & Rock C.O. (2005). The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 791-831.

Wilbanks S.M. & Glazer A. (1993). Rod structure of a phycoerythrin II-containing phycobilisome. I. Organization and sequence of the gene cluster encoding the major phycobiliprotein rod components in the genome of marine *Synechococcus* sp. WH8020. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 1226-1235.

Willey J. & Waterbury J. (1989). Chemotaxis toward nitrogenous compounds by swimming strains of marine *Synechococcus* spp. *Applied Environmental Microbiology*, 55, 1888-1894.

Wilmotte A. (2004). Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: *The molecular biology of cyanobacteria*. Springer, pp. 1-25.

Wilmotte A., Demonceau C., Goffart A., Hecq J.-H., Demoulin V. & Crossley A. (2002). Molecular and pigment studies of the picophytoplankton in a region of the Southern Ocean (42–54 S, 141–144 E) in March 1998. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 49, 3351-3363.

Wilson A., Ajlani G., Verbavatz J.M., Vass I., Kerfeld C.A. & Kirilovsky D. (2006). A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria. *Plant Cell*, 18, 992-1007.

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

Woitzik D., Weckesser J. & Jürgens U.J. (1988). Isolation and characterization of cell wall components of the unicellular

cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6307. *J Gen Microbiol*, 134, 619-627.

Wood A.M., Phinney D.A. & Yentsch C.S. (1998). Water column transparency and the distribution of spectrally distinct forms of phycoerythrin-containing organisms. *Marine Ecology Progress Series*, 162, 25-31.

Y

Yao P., Nussler A., Liu L., Hao L., Song F., Schirmeier A. & Nussler N. (2007). Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *Journal of hepatology*, 47, 253-261.

Yordanov I, Goltsev V, Stoyanova T & P V. (1986). High temperature damage and acclimation of the photosynthetic apparatus. *Planta*, 170, 471-477.

Z

Zak E., Norling B., Maitra R., Huang F., Andersson B. & Pakrasi H.B. (2001). The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 13443-13448.

Zeidner G., Bielawski J.P., Shmoish M., Scanlan D.J., Sabehi G. & Béjà O. (2005). Potential photosynthesis gene recombination between *Prochlorococcus* and *Synechococcus* via viral intermediates. *Environmental microbiology*, 7, 1505-1513.

Zhang Y.-M. & Rock C.O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 222-233.

Zhao K.-H., Su P., Böhm S., Song B., Zhou M., Bubenzer C. & Scheer H. (2005). Reconstitution of phycobilisome core–membrane linker, L CM, by autocatalytic chromophore binding to ApcE. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1706, 81-87.

Zhaxybayeva O., Doolittle W.F., Papke R.T. & Gogarten J.P. (2009). Intertwined evolutionary histories of marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* marinus. *Genome biology and evolution*, 1, 325-339.

Zheng H. & Wu H. (2010). Gene-centric association analysis for the correlation between the guanine-cytosine content levels and temperature range conditions of prokaryotic species. *BMC Bioinformatics*, 11, S7.

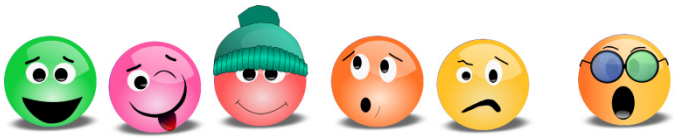
Zilinskas B.A. & Greenwald L.S. (1986). Phycobilisome structure and function. *Photosynthesis research*, 10, 7-35.

Zorz J.K., Allanach J.R., Murphy C.D., Roodvoets M.S., Campbell D.A. & Cockshutt A.M. (2015). The RUBISCO to photosystem II ratio limits the maximum photosynthetic rate in picocyanobacteria. *Life*, 5, 403-417.

Zwirglmaier K., Heywood J.L., Chamberlain K., Woodward E.M., Zubkov M.V. & Scanlan D.J. (2007). Basin-scale distribution patterns of picocyanobacterial lineages in the Atlantic Ocean. *Environmental Microbiology*, 9, 1278-90.

Zwirglmaier K., Jardillier L., Ostrowski M., Mazard S., Garczarek L., Vaulot D., Not F., Massana R., Ulloa O. & Scanlan D.J. (2008). Global phylogeography of marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* reveals a distinct partitioning of lineages among oceanic biomes. *Environmental Microbiology*, 10, 147-61.

« R’marquez faut pas se plaindre, on n’est pas les plus malheureux ! »
Coluche



#Synechococcute

ADAPTATION DES CYANOBACTERIES MARINES DU GENRE *SYNECHOCOCCUS* AU GRADIENT LATITUDINAL DE TEMPERATURE

Les picocyanobactéries marines sont les organismes photosynthétiques les plus abondants de la planète. Parmi celles-ci, les *Synechococcus* marins sont détectés de l'équateur aux cercles polaires, suggérant qu'ils ont évolué des stratégies adaptatives très efficaces à la température. La première partie de ce travail de thèse a visé à étudier la thermophysiologie de différentes lignées de la radiation des *Synechococcus* marins. Les résultats d'expériences de variations thermiques à cours et long terme associées une étude de phyloécologie ont démontré l'existence de clades physiologiquement spécialisées dans des niches thermiques distinctes, *i.e* des thermotypes. Ces travaux ont de plus mis en évidence l'importance de l'optimisation de l'efficacité de l'appareil photosynthétique dans l'acclimatation à la température. Ainsi, la thermostabilité du photosystème II, complexe clé de la régulation de l'énergie, a été comparée chez différentes souches de *Synechococcus* marins. Ces travaux ont révèlé de grandes différences de thermostabilité de l'antenne photosynthétique et de ses constituants, qui sont corrélées à la latitude d'isolement des souches. L'étude de modèles d'homologie de structure de phycobiliprotéines a permis de révéler certaines des adaptations moléculaires de ce complexe à la température. La fonctionnalité des complexes photosynthétiques est directement dépendante de la fluidité des membranes au sein desquelles ils sont insérés, un facteur physique très influencé par la température. Le troisième volet de cette thèse a permis de mieux comprendre les mécanismes de régulation des lipides membranaires chez les *Synechococcus* marins. Les résultats montrent que la composition en acides gras joue un rôle important durant l'acclimatation à différentes températures. De plus, par une approche de génomique comparative, ce travail de thèse montre que les *Synechococcus* marins présentent des équipements différents en enzymes désaturases, qui ont très probablement joué un rôle dans la colonisation de différentes niches thermiques. Les résultats de ce travail de thèse, discutés dans un contexte d'évolution de l'adaptation au gradient latitudinal de température chez les picocyanobactéries marines, soulèvent de nouvelles hypothèses exaltantes pour les travaux futurs.

ADAPTATION OF MARINE CYANOBACTERIA FROM THE GENUS *SYNECHOCOCCUS* TO THE LATITUDINAL GRADIENT OF TEMPERATURE

Marine picocyanobacteria are the most abundant photosynthetic organisms on Earth. Among them, *Synechococcus* displays a wide latitudinal distribution, ranging from the equator to polar circles, suggesting that they have evolved efficient adaptive strategies to cope with the latitudinal temperature gradient. The first part of this PhD work aimed at studying the thermophysiology of different lineages of the marine *Synechococcus* radiation. The combination of thermal acclimation and stress experiments with a phyloecology study allowed unveiling the existence of lineages physiologically specialized in distinct thermal niches, *i.e.* thermotypes., This work furthermore pointed out the importance of the capacities to optimize the photosynthetic apparatus efficiency for successful temperature acclimation. The thermostability of photosystem II, a key complex to the regulation of light energy utilisation, was compared within several marine *Synechococcus* strains. The results revealed that the photosynthetic antenna and its components have distinct thermostabilities, which are related to the strain isolation latitude. Structural homology models of phycobiliproteins thus revealed sites of molecular adaptation of the antenna to temperature. The function of the photosynthetic complexes is dependent on the fluidity of the membranes in which they are embedded, a physical factor regulated by temperature. The results a first lipidomic study suggested that the regulation of the composition in acyl chains plays an important role in temperature acclimation in marine *Synechococcus*. Furthermore, genomic comparative analyses revealed notably that marine *Synechococcus* have distinct sets of desaturase enzymes which have likely played a role in the colonization of different thermal niches. The results of this PhD thesis, which are discussed in the context of the *Synechococcus* adaptive evolution to the latitudinal gradient of temperature, raise new hypotheses for some future exciting work.