



HAL
open science

Vers la reprogrammation métabolique de la cyanobactérie modèle *Synechocystis* pour la production durable de biocarburants : structuration des flux du carbone par CP12 et implications sur l'équilibre bioénergétique, l'hydrogénase et l'intégrité génomique

Théo Veaudor

► **To cite this version:**

Théo Veaudor. Vers la reprogrammation métabolique de la cyanobactérie modèle *Synechocystis* pour la production durable de biocarburants : structuration des flux du carbone par CP12 et implications sur l'équilibre bioénergétique, l'hydrogénase et l'intégrité génomique. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2017. Français. NNT : 2017SACLS257 . tel-01791091v2

HAL Id: tel-01791091

<https://theses.hal.science/tel-01791091v2>

Submitted on 23 Jul 2018

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.

Vers la reprogrammation métabolique de la cyanobactérie modèle *Synechocystis* pour la production durable de biocarburants

Structuration des flux du carbone par CP12 et implications sur l'équilibre bioénergétique, l'hydrogénase et l'intégrité génomique

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°577 - Structure et Dynamique des Systèmes Vivants
(SDSV)

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 11/09/2017, par

Théo Veaudor

Composition du Jury :

Fabrice Confalonieri Professeur des Universités, Université Paris-Saclay (UMR 9198)	Président
Brigitte Meunier-Gontero Directrice de recherche CNRS, Université Aix-Marseille (UMR 7281)	Rapporteuse
Yonghua Li-Beisson Chercheuse CEA, CEA Cadarache (UMR 7265)	Rapporteuse
Annick Méjean Professeure des Universités, Université Paris-Diderot (UMR 8236)	Examinatrice
Corinne Cassier-Chauvat Directrice de recherche CNRS, CEA Saclay (UMR 9198)	Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier Corinne et Franck de m'avoir accueilli dans le laboratoire pendant près de quatre ans. J'y ai beaucoup appris, à la fois au niveau technique et scientifique et je le quitte fort de l'expérience qu'ils ont partagé. Je les remercie également pour la confiance qu'ils m'ont témoignée dans la réalisation de ces travaux et aussi de mes idées.

Cette thèse ne serait pas ce qu'elle est en particulier grâce à Corinne dont la somme de savoirs n'a pas cessé de m'impressionner tout au long de ma thèse. Je la remercie pour tous ses conseils, ses points de vue éclairés et pour avoir bien souvent ramené mon cerveau sur le chemin du bon sens et de la simplicité. Je n'oublierai pas non plus les innombrables discussions qui ont jalonné ces quatre années de résultats plus... surprenants les uns que les autres.

Je souhaite aussi remercier tous nos collaborateurs sans qui ce projet n'aurait pas pu aller aussi loin.

Merci à Pierre Sétif pour sa disponibilité et grâce à qui j'ai découvert la puissance des outils biophysiques pour étudier les organismes photosynthétiques.

Merci à Jean-Christophe Aude qui malgré un agenda de ministre, a toujours été présent pour prendre en charge (et m'expliquer !) les analyses transcriptomiques.

Un grand merci également à Gabriel Thieulin-Pardo et Brigitte Meunier-Gontero qui ont été nos piliers dans l'étude biochimique de CP12. Les surprises ont été nombreuses mais toujours riches d'enseignements. Je leur suis très reconnaissant pour le temps et la bienveillance qu'ils ont témoignés à ce travail.

Je souhaite également remercier Christophe Junot pour nous avoir donné accès à l'Orbitrap et nous avoir épaulés pour la préparation et l'injection des échantillons. Un énorme merci également à Florence Castelli pour tout le temps et la pédagogie qu'elle a investi pour m'aider et m'apprendre à traiter les données de MS.

Thank you also to Cheryl Kerfeld and Raul Gonzalez for sharing their time and experience in TEM imaging of *Synechocystis*.

Enfin, je voudrai remercier très chaleureusement et très sincèrement remercier Hervé Bottin pour les mesures d'activité hydrogénase. En plus de tout le temps qu'il m'a accordé sans réserves, je le remercie pour sa gentillesse et pour la richesse des conversations échangées autour de la boîte à gants. Je lui souhaite de profiter pleinement de sa retraite.

Un grand merci à Sandrine, Marcia et Aurélia qui ont été très présentes pour m'aider à mon arrivée au labo et tout au long de cette thèse. Je les remercie aussi pour tous les bons moments passés dans et en dehors du labo. Merci à Emilio, Antonin et Xavier avec qui j'ai partagé le labo et que j'espère avoir pu aider comme il se doit pendant leurs stages.

Je remercie également tout le bâtiment 142 pour avoir été d'aussi agréable compagnons de science de tout poil ! Je remercie en particulier Agnès, Gwenaëlle, Catherine, Stéphane, Jean-Christophe, Jean-Yves, Régis, Laurent, Amir, Samia, Shakir, Bo et Benoît pour avoir indéfectiblement ponctué mes longues journées de rires autour de café ou de délicieux plateaux repas. Merci aussi à Lyne, Christelle, Rosa et Elodie pour avoir supporté la charge de travail à la laverie.

Une grosse pensée pour Alise, Cyril et Clément qui d'ombres furtives dans les couloirs sont progressivement devenus collègues, partenaires de rires et de misères en tout genre, amis et même colocataires... Vous êtes la petite magie inoubliable de ma thèse.

Je tiens à remercier du fond du cœur mes parents qui m'ont porté jusque-là grâce à leur soutien et leur amour. Ce travail m'a bien souvent gardé loin d'eux mais je tiens à ce qu'ils sachent que cette thèse est le reflet de la ténacité et des valeurs qu'ils m'ont inculquées et qu'à ce titre, ils en sont autant les artisans que moi.

Je souhaiterai aussi remercier tous mes amis à commencer par Tom, Stan, Camille, Nico, Doudou et Jo avec qui j'ai tracé mon chemin, de près ou de loin, depuis plus de 10 ans. Le tableau est trop grand pour être résumé simplement alors je me contenterai de vous dire merci pour ce que vous êtes et pour ce que je suis devenu grâce à vous.

Merci à Alice, Fred, Flo, Amandine et Elisa pour avoir animé le groupe de thérapie des thésards. Merci pour votre légèreté et tous ces moments passés à rire de tout et surtout de rien !

Je ne saurai pas terminer ces remerciements sans mentionner AhOuhPuc. Au-delà du disque et de ce qu'il m'a apporté, j'y ai découvert des gens parfaitement incroyables. Je tiens donc à remercier chaleureusement Guillaume, Martin, Anja, Mathou, Brigitte, Luc, Lili, Popsy, Loïc, Emma, Isa, Bubar, Lauren, Toinou, Puzzy et Mario O'Brien. Vous m'avez fait voyager, transpirer, mourir de rire et pourtant tous les jours, vous me faites encore rêver un peu plus. Merci pour ces leçons de vie que vous êtes.

« Il n'y a pas de formule magique pour réussir sauf peut-être une
acceptation inconditionnelle de la vie et de ce qu'elle apporte. »

Arthur Rubinstein

Sommaire

Remerciements.....	p.1
Sommaire.....	p.5
Index des figures.....	p.12
Index des tableaux.....	p.15
Liste des abréviations.....	p.16
Avant-propos.....	p.18

Introduction

Chapitre I. Histoire des cyanobactéries : du façonnement de la biosphère aux enjeux biotechnologiques modernes.....	p.24
---	------

A. De la soupe primitive à la diversité biologique actuelle.....p.24

1. La chimie prébiotique et les premiers processus biochimiques compartimentalisés.....p.24
2. La photosynthèse et la Grande Oxydation.....p.26
3. Diversité microbienne.....p.30

B. De la soupe primitive à la diversité biologique actuelle.....p.30

1. Les processus microbiologiques, alliés ancestraux des sociétés humaines..p.30
2. Essor des biotechnologies.....p.32

C. Les biotechnologies vertes.....p.34

1. Nouveaux enjeux et intérêts.....p.34
2. Avantages majeurs des cyanobactéries.....p.36
3. Exemples et limitations persistantes.....p.37
 - a. La production de biocarburants.....p.37
 - b. La production de petites molécules plateformes.....p.38
 - c. Vers l'identification et la levée des verrous biologiques.....p.39

Chapitre II. La photosynthèse chez les cyanobactéries.....p.42

A. Les complexes photosynthétiques et mécanismes fonctionnels.....p.42

1. Le phycobilisome : unité de capture des photons.....p.44
2. Le photosystème II : séparation de charge et oxydation de l'eau.....p.44
3. Le cytochrome b_6f : pompe à protons et carrefour des électrons.....p.46
4. Le photosystème I : réduction de la ferrédoxine.....p.46
5. L'ATP synthase : production d'énergie chimique.....p.46

B. Un processus puissant mais versatile.....p.48

1. Le stress oxydant.....p.48
2. Mécanismes de protection.....p.50

C. La cyanobactérie modèle *Synechocystis* PCC6803.....p.54

1. Origine et écologie.....p.54
2. Propriétés génétiques et outils développés.....p.56
3. De l'étude de la photosynthèse aux applications industrielles.....p.56

D. Le métabolisme central.....p.58

Chapitre III. La balance carbone/azote, équilibre vital mais fragile.....p.62

A. La voie anabolique : le cycle de Calvin et sa régulation.....p.62

1. Les enzymes majeures du cycle.....p.63
 - a. La phosphoribulokinase (PRK).....p.63
 - b. La Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygénase (RuBisCO).....p.63
 - c. La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).....p.64
 - d. Régénération du ribulose-5-phosphate (Ru5P).....p.66
2. Régulation générale du cycle de Calvin.....p.68
3. CP12, régulateur majeur de l'activité du cycle.....p.72
 - a. Caractéristiques.....p.72

b.	Un mécanisme de régulation efficace.....	p.74
c.	Diversité phylogénétique et rôle des protéines CP12.....	p.76
d.	Le « switch » CP12 au service de l'ingénierie métabolique.....	p.80
B.	Les voies cataboliques du carbone.....	p.82
1.	Glycolyse, voies d'Entner-Doudoroff et des pentoses phosphates.....	p.82
2.	Le cycle de Krebs et la respiration.....	p.83
3.	Les réservoirs de carbone.....	p.84
C.	Le métabolisme de l'azote.....	p.86
1.	Voies de production de l'ammonium.....	p.86
a.	Réduction assimilatrice du nitrate.....	p.88
b.	Dégradation des acides aminés.....	p.88
c.	Hydrolyse de l'urée.....	p.88
2.	Incorporation du NH_4^+ et cycle de l'urée.....	p.88
a.	Synthèse des précurseurs azotés.....	p.88
b.	Le cycle de l'urée.....	p.90
3.	L'urée et l'uréase.....	p.92
a.	Intérêts pour les biotechnologies.....	p.92
b.	Organisation génomique des gènes codant pour les sous-unités de l'uréase et ses protéines de maturation.....	p.94
c.	Fonction de l'uréase chez les cyanobactéries.....	p.96
D.	La carence d'azote.....	p.98
1.	Effets physiologiques et mécanismes de détection.....	p.98
2.	Effecteurs et réponses à la carence en azote.....	p.98
a.	Cascade de signalisation.....	p.98
b.	Dégradation des réserves et chlorose.....	p.100
c.	Coordination avec le métabolisme du carbone.....	p.101

Chapitre IV. Le dihydrogène, un composé énergétique aux propriétés attrayantes.....	p.103
---	-------

A. Caractéristiques, applications et production biologique d'hydrogène.....	p.103
1. Caractéristiques.....	p.103
2. Applications actuelles et futures.....	p.104
3. Vers un carburant renouvelable.....	p.104
a. Enjeu de la production biologique de H ₂	p.104
b. Les hydrogénases.....	p.106
B. Organisation génomique, rôle et régulation : Revue I.....	p.107
C. Une compréhension partielle du métabolisme de l'hydrogène.....	p.122
1. Ubiquité des hydrogénases.....	p.122
2. Convergence structurale avec NDH-I et réseau des centres Fe-S.....	p.124
3. CP12 et les opérons <i>hox</i>	p.126

Résultats et discussion

I. CP12 n'est pas essentielle mais exerce un contrôle global du métabolisme en photoautotrophie.....	p.130
A. Construction des mutants de délétion et de surexpression du gène <i>cp12</i>	p.130
1. Construction du mutant de délétion $\Delta cp12$	p.130
2. Construction des mutants de surexpression TR- <i>cp12</i> et CE- <i>cp12</i>	p.134
B. Absence d'effets sur la croissance et l'activité du cycle de Calvin... ..	p.138
C. Analyse transcriptomique du mutant $\Delta cp12$	p.140
D. Capacité photosynthétique et perturbation rédox.....	p.142
E. Impact sur le métabolisme du carbone.....	p.148

II.	En mixotrophie, CP12 structure les flux du carbone et est nécessaire pour maintenir l'équilibre carbone/azote.....	p.150
	A. La présence de glucose engendre une insuffisance rédox photo-dépendante.....	p.150
	B. Construction et analyse des mutants ponctuels WTr, $\Delta 4Cys$ et $\Delta Core$	p.152
	C. Réponse transcriptionnelle du mutant $\Delta cp12$ en mixotrophie et implications.....	p.158
	D. Analyse métabolomique.....	p.164
III.	Apparition d'une mutation secondaire perturbant le métabolisme de l'urée dans le contexte génétique $\Delta cp12$	p.170
	A. Le mutant $\Delta cp12$ n'est pas capable d'utiliser l'urée comme source d'azote.....	p.170
	1. La croissance du mutant $\Delta cp12$ en milieu urée mime une carence d'azote..	p.170
	2. Influence de l'urée comme source d'azote sur le métabolisme.....	p.174
	3. Le défaut de croissance du mutant $\Delta cp12$ en urée est dû à une mutation secondaire dans son génome.....	p.180
	B. Compensation métabolique et interaction entre uréase et hydrogénase.....	p.186
	C. Discussion complémentaire.....	p.188
IV.	Surproduction de l'hydrogénase et sélection de mutants adaptés pour la croissance prolongée en dégradant l'urée.....	p.190
	A. Objectifs, résultats et article.....	p.190
	B. Résultats complémentaires et discussion.....	p.226

Conclusion et perspectives

Matériel et Méthodes

I. Matériel.....	p.243
A. <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803.....	p.243
B. <i>Escherichia coli</i>	p.246
C. Plasmides.....	p.246
II. Méthodes.....	p.249
A. Biologie moléculaire.....	p.249
1. Extraction et purification des acides nucléiques.....	p.249
a. Resuspension et dosage des préparations.....	p.249
b. Extraction d'ADN génomique (ADNg) et plasmidique.....	p.249
c. Purification des fragments d'ADN.....	p.250
d. Extraction des ARN totaux.....	p.250
2. Ligation et transformation de <i>E. coli</i> par choc thermique.....	p.251
3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et déclinaisons.....	p.251
a. PCR générique.....	p.251
b. PCR assemblage.....	p.256
c. PCR quantitative.....	p.256
4. Transcriptomique sur puce à ADN.....	p.258
B. Manipulation génétique chez <i>Synechocystis</i>	p.258
1. Inactivation de gène par transformation.....	p.258
2. Transfert de plasmide réplcatif par conjugaison.....	p.260
C. Tests de croissance.....	p.262
D. Mesure des pigments de <i>Synechocystis</i>	p.262
1. Evaluation globale.....	p.262
2. Extraction et dosage spectrophotométrique de la chlorophylle a.....	p.262

E. Dosages des activités enzymatiques.....	p.264
1. Activités PRK, GAPDH et G6PDH.....	p.264
2. Activité uréase.....	p.264
3. Activité hydrogénase.....	p.266
F. Etude <i>in situ</i> des processus cellulaires.....	p.266
1. Production et consommation du pouvoir réducteur.....	p.266
2. Production et consommation d'oxygène.....	p.268
G. Analyse des métabolites de <i>Synechocystis</i>	p.268
1. Dosage enzymatique du glutathion (GSH) intracellulaire total.....	p.268
2. Dosage enzymatique du glycogène.....	p.270
3. Quantification relative de métabolites par spectrométrie de masse.....	p.272
H. Méthodes de microscopie.....	p.273
1. Microscopie à fluorescence.....	p.273
2. Microscopie électronique à transmission.....	p.274
Références.....	p.276

Annexes

Annexe I : Etude comparative des systèmes de réparation et de recombinaison de l'ADN chez les cyanobactéries.....	p.296
Abstract.....	p.310
Résumé.....	p.311

Index des figures

Figure 1 : La chimie prébiotique, les expériences de Miller-Urey, Oro et la réaction formose.....	p.23
Figure 2 : Frise chronologique de l'évolution du vivant et des organismes photosynthétiques.....	p.27
Figure 3 : Historique et avancées majeures des biotechnologies dans les sociétés humaines.....	p.29
Figure 4 : La matière première et les générations de biotechnologies.....	p.33
Figure 5 : Exemples de produits d'intérêt dérivés du métabolisme central des cyanobactéries.....	p.35
Figure 6 : Les complexes photosynthétiques et la chaîne de transport d'électrons.....	p.41
Figure 7 : Le schéma en Z du potentiel redox des électrons photosynthétiques.....	p.41
Figure 8 : La diversité de pigmentation chez les cyanobactéries.....	p.43
Figure 9 : Le stress oxydant chez <i>Synechocystis</i>	p.47
Figure 10 : Microscopie électronique des supercomplexes PSI-IsiA chez <i>Synechococcus</i> PCC 7942.....	p.51
Figure 11 : Représentation du génome de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 composé d'un chromosome circulaire central et de sept plasmides.....	p.55
Figure 12 : Le métabolisme central chez <i>Synechocystis</i>	p.57
Figure 13 : Le cycle de Calvin-Benson-Bassham.....	p.61
Figure 14 : Les sucres du cycle de Calvin et de la phase de régénération du Ru5P.....	p.65
Figure 15 : Les mécanismes de concentration du CO ₂ et leur régulation chez <i>Synechocystis</i>	p.69
Figure 16 : Conservation des résidus dans les protéines CP12 de cyanobactéries.....	p.73
Figure 17 : Mécanisme d'inhibition de PRK et GAPDH par CP12 chez les cyanobactéries.....	p.73
Figure 18 : Structure cristallographique du complexe CP12-GAPDH chez <i>Synechococcus</i> PCC7942.....	p.75
Figure 19 : Le métabolisme du carbone chez <i>Synechocystis</i>	p.81
Figure 20 : Le métabolisme de l'azote chez <i>Synechocystis</i>	p.85
Figure 21 : Le cycle de l'urée de <i>Synechocystis</i>	p.89
Figure 22 : L'organisation génomique des gènes codant pour les sous-unités et chaperones de l'uréase chez <i>Synechocystis</i>	p.93
Figure 23 : Etapes de maturation de l'uréase chez <i>Synechocystis</i>	p.93
Figure 24 : Modèles structuraux de l'uréase mature et du complexe d'activation.....	p.95
Figure 25 : Effets physiologiques de la carence d'azote chez les cyanobactéries.....	p.97

Figure 26 : Mécanisme de détection et de réponse à la carence d'azote chez <i>Synechocystis</i>	p.99
Figure 27 : Distribution des hydrogénases FeFe et NiFe dans les trois domaines du vivant.....	p.105
Figure 28 : Convergence structurale entre le complexe I et l'hydrogénase de <i>Synechocystis</i> et réseau interne des centres Fe-S.....	p.123
Figure 29 : Analyse des gènes <i>cp12</i> présents dans les opérons <i>hox</i>	p.125
Figure 30 : Construction and PCR verification of the $\Delta cp12::Km^r$ DNA cassette for the deletion of the <i>Synechocystis cp12</i> gene.....	p.129-131
Figure 31 : Construction and PCR verification of the pTR- <i>cp12</i> and pCE- <i>cp12</i> vectors for temperature-controlled and constitutive overexpression of the <i>Synechocystis cp12</i> gene.....	p.133
Figure 32 : qPCR analysis of <i>cp12</i> expression in deletion and overexpression mutants.....	p.135
Figure 33 : Growth analysis and GAPDH (NADPH and NADH-consuming), PRK and G6PDH enzymatic activity assays in the <i>cp12</i> deletion and overexpression mutants.	p.137
Figure 34 : Transcriptomic analysis of the $\Delta cp12$ mutant grown in standard conditions.....	p.139
Figure 35 : Growth analyses of WT and $\Delta cp12$ cells under various light and inorganic carbon availabilities and O ₂ -evolving capacity and GSH content assays in standard conditions.	p.141
Figure 36 : DUAL-PAM measurements of reducing power production and consumption after different light exposure durations.....	p.145
Figure 37 : Metabolomic analysis of the main carbon pathways in the WT and $\Delta cp12$ mutant grown in standard conditions.....	p.147
Figure 38 : Mixotrophic growth and GSH analysis of WT and $\Delta cp12$ strains with increasing light availability.....	p.149
Figure 39 : Construction and PCR verification of the <i>cp12::SmSp^r</i> DNA cassettes to generate sequence variants of the <i>Synechocystis cp12</i> gene.....	p.153
Figure 40 : Assays of GAPDH NADPH-consuming and PRK activities and mixotrophic growth analysis of <i>cp12</i> sequence variants under various photosynthetic regimes.	p.155
Figure 41 : List of the 43 annotated transcripts with increased abundance under mixotrophy in the $\Delta cp12$ mutant.	p.157
Figure 42 : List of the 69 annotated transcripts with decreased abundance under mixotrophy in the $\Delta cp12$ mutant.....	p.159
Figure 43 : Transcriptomic response and Nile Red staining of intracellular PHB granules in WT and $\Delta cp12$ strains during mixotrophic growth.	p.161
Figure 44 : Metabolomic analysis of the main carbon pathways in the WT and $\Delta cp12$ mutant grown in mixotrophy with different light intensities.....	p.163

Figure 45 : Metabolomic analysis of amino acids in the WT and $\Delta cp12$ mutant grown in mixotrophy with different light intensities.....	p.165
Figure 46 : Metabolomic analysis of the glutathione pathway in the WT and $\Delta cp12$ mutant grown in mixotrophy with different light intensities.....	p.167
Figure 47 : Analysis of WT and $\Delta cp12$ strains during growth on urea medium.....	p.169
Figure 48 : Investigation of urease activities in WT and $\Delta cp12a$ strains and influence on cell morphology during growth with urea as the sole nitrogen source.	p.171
Figure 49 : Metabolomic analysis of the main carbon pathways in the WT and $\Delta cp12a$ mutant grown with urea as the sole N source.....	p.173
Figure 50 : Metabolomic analysis of amino acids in the WT and $\Delta cp12a$ mutant grown with urea as the sole N source.....	p.175
Figure 51 : Metabolomic analysis of the glutathione pathway in the WT and $\Delta cp12a$ grown with urea as the sole N source.....	p.177
Figure 52 : Growth analysis of the <i>cp12</i> sequence variants in urea medium and genetic study of <i>ureG</i> influence in urease-deficient mutants.	p.179
Figure 53 : Analysis of <i>ureG</i> genomic locus in WT and $\Delta cp12a$ strains.	p.181
Figure 54 : Mixotrophic growth analysis of WT, $\Delta cp12a$ and $\Delta cp12$ -bis strains under different photosynthetic regimes.	p.185
Figure 55 : Hydrogenase activities of WT and $\Delta cp12$ strains in standard conditions and with increasing iron/nickel supply.	p.187
Figure 56 : Analysis of urea and ammonia cross-effects on growth of urease mutants.....	p.225
Figure 57 : Phenotypic analysis of our hydrogenase mutants during urea-sustained growth.....	p.227
Figure 58 : Time-course measurements of hydrogenase activities during growth on urea medium.	p.229
Figure 59 : Cartes des différents vecteurs de clonage et d'expression utilisés.....	p.245
Figure 60 : Principe de transformation et de ségrégation des mutations chez <i>Synechocystis</i>	p.257
Figure 61 : Principe de la conjugaison à trois partenaires chez <i>Synechocystis</i>	p.259
Figure 62 : Spectre d'absorbance typique des cellules de <i>Synechocystis</i>	p.261
Figure 63 : Protocole de quantification de l'activité uréase chez <i>Synechocystis</i>	p.263
Figure 64 : Méthode d'analyse de l'activité hydrogénase de <i>Synechocystis</i>	p.265
Figure 65 : Principe de mesure de la dynamique du pouvoir réducteur par DUAL-PAM chez <i>Synechocystis</i>	p.267
Figure 66 : Principe d'extraction et dosage du glycogène chez <i>Synechocystis</i>	p.269
Figure 67 : Procédure d'analyse du métabolome chez <i>Synechocystis</i>	p.271

Index des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des enzymes impliquées dans la régénération du Ru5P.....	p.68
Tableau 2 : Diversité phylogénétique des protéines CP12 chez les cyanobactéries.....	p.77
Tableau 3 : Composition du BG11 modifié.....	p.243
Tableau 4 : Composition en éléments traces du milieu minéral.....	p.243
Tableau 5 : Préparation et composition des milieux dérivés du milieu minéral.....	p.244
Tableau 6 : Concentrations finales des antibiotiques utilisés selon l'organisme cultivé.....	p.244
Tableau 7 : Liste et caractéristiques des vecteurs utilisés et constructions dérivées.....	p.247
Tableau 8 : Liste des amorces utilisées.....	p.242
Tableau 9 : Configuration et propriétés optiques des filtres passe-bande du Leica DM IRE2.....	p.273

Liste des abréviations

PSII/PSI	Photosystème II/Photosystème I
Fdx	Ferrédoxine
Trx	Thiorédoxine
CP12	12 kDa Chloroplastic Protein
ATP	Adénosine-triphosphate
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
GSH	Glutathion réduit
PRK	Phosphoribulokinase
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygénase
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GS-GOGAT	Glutamine synthase-Glutamate Oxoglutarate Aminotransférase
Hox	Hydrogen Oxidation protein (Hydrogénase)
Hyp	Hydrogenase Pleiotropic protein
H₂	Dihydrogène
Ru5P	Ribulose-5-phosphate
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphate
Ci	Carbone inorganique
BPGA	1,3-Bisphosphoglycérate
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
Pyr	Pyruvate
PHB	Poly- β -hydroxybutyrate
α-KG	α -cétoglutarate
GABA	γ -aminobutyrate
NO₃⁻	Nitrate
NH₄⁺	Ammonium
DTT	Dithiothréitol
Ni	Nickel
Fe	Fer
ROS	Reactive Oxygen Species
CCM	Carbon Concentration Mechanism
CBS	Domaine Cystathionine- β -synthase
Balance C/N	Balance Carbone/Azote
Km	Kanamycine
Sm/Sp	Streptomycine/Spectinomycine
Gm	Gentamycine
DO	Densité Optique

Avant-propos

Le projet de thèse présenté dans ce manuscrit est issu d'un peu plus de trois années de travail réalisé au CEA de Saclay dans le Laboratoire de Biologie et Biotechnologie des Cyanobactéries sous la direction de Corinne Cassier-Chauvat. Il s'inscrit dans l'effort de recherche nécessaire pour améliorer notre compréhension du métabolisme des cyanobactéries. Ces bactéries jouent un rôle prépondérant dans les cycles biogéochimiques de la Terre grâce à leur puissante photosynthèse, leurs propriétés métaboliques (assimilation du CO₂) et leur ubiquité. Elles sont également perçues comme des systèmes biologiques prometteurs pour les biotechnologies et la production durable d'une grande variété de molécules d'intérêt (substances pharmaceutiques, molécules plateformes pour la chimie, biocarburants...). Dans cette optique, il est nécessaire de bien comprendre la voie d'assimilation du CO₂ (cycle de Calvin), sa régulation et son influence sur les autres voies métaboliques. Enfin, l'essor des biotechnologies vertes doit être considéré conjointement avec la recherche de substrats alternatifs et accessibles qui renforceront leur ancrage économique et sociétal.

Ainsi, une partie de mon projet porte sur la régulation du cycle de Calvin de la cyanobactérie modèle *Synechocystis PCC6803*. Elle se focalise sur le rôle de CP12, une protéine possédant des propriétés rédox dont la principale fonction connue chez les eucaryotes photosynthétiques est la régulation de l'activité de deux enzymes du cycle. Son rôle chez les cyanobactéries est peu étudié mais est essentiel pour approfondir notre compréhension du métabolisme des cyanobactéries et le reprogrammer au profit des substances d'intérêt.

Cette protéine est présente chez tous les organismes photosynthétiques et possède des résidus conservés dont des cystéines pouvant former des ponts disulfures la connectant à l'activité photosynthétique et au statut rédox. Pour étudier sa fonction chez les cyanobactéries et en particulier chez *Synechocystis PCC6803*, j'ai construit différents mutants du gène codant pour cette protéine et analysé leur phénotype dans différentes conditions de croissance. Cette caractérisation m'a conduit à approfondir l'étude du métabolisme de l'azote ainsi que le maintien de la balance carbone/azote chez *Synechocystis*. Je me suis intéressé au métabolisme de l'urée dans cette espèce qui peut la dégrader grâce à son uréase, une enzyme à nickel.

L'hydrogénase de *Synechocystis* fonctionne aussi grâce au nickel et présente un biais vers la production de H₂, une molécule très énergétique dont la production par voie biologique est très profitable. Grâce aux mutants surproduisant cette enzyme disponibles au laboratoire, j'ai étudié les relations existant entre ces deux processus reposant sur le nickel.

Le manuscrit se compose d'une introduction en 4 chapitres, des résultats et discussions divisés en 4 sections ainsi qu'une conclusion s'ouvrant sur les axes de recherche futurs.

La première partie d'introduction évoque brièvement les origines de la vie sur la Terre primitive et l'émergence de la photosynthèse et des lignées photosynthétiques. Elle aborde aussi la diversification du vivant ainsi que l'historique et les intérêts de sa domestication par l'être humain. Elle décrit également les enjeux des biotechnologies vertes dites de troisième génération et les avantages des cyanobactéries vis-à-vis de ce nouveau technologique.

Le second chapitre détaille le fonctionnement de la photosynthèse dans les cyanobactéries et les risques associés à ce puissant processus biologique. Les différents atouts de l'espèce modèle *Synechocystis* ainsi que son métabolisme central y sont également décrits.

La troisième partie se rapporte plus spécifiquement au métabolisme du carbone dans cette espèce. Elle concerne premièrement le cycle de Calvin et ses mécanismes de régulation connus mais également ce que l'on sait de la régulation exercée par CP12 dans d'autres organismes photosynthétiques. La suite du chapitre décrit les différentes voies de dégradation des sucres et la respiration ainsi que sa connexion avec le métabolisme de l'azote. Une dernière partie est consacrée à l'uréase et à ses caractéristiques.

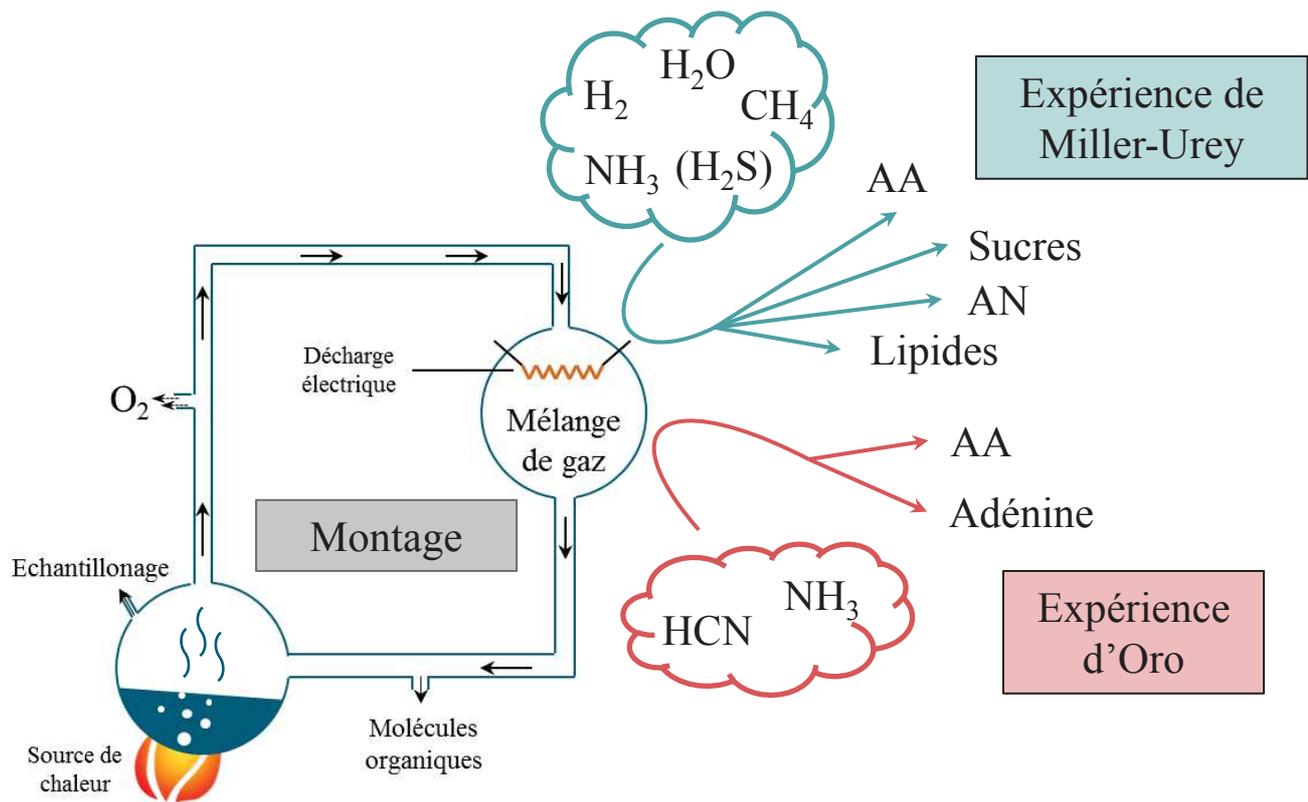
Le dernier chapitre d'introduction est dédié à l'hydrogénase de cette cyanobactérie. Il se compose d'une revue synthétique publiée durant ma thèse complétée par une ouverture sur les questions subsistant quant à son rôle et ses relations phylogénétiques avec différentes fonctions cellulaires centrales.

Les trois premières sections de résultats et de discussion concernent l'étude de CP12 chez *Synechocystis*. Elles ont respectivement traité à son rôle lors d'une croissance en photoautotrophie (conditions standards), en mixotrophie (présence de glucose) et vis-à-vis du métabolisme de l'urée. Le rôle des résidus conservés de CP12 a également été étudié dans ces conditions pour identifier les motifs essentiels à ces fonctions régulatrices. Un manuscrit rassemblant une partie des données obtenues sera prochainement soumis pour publication. Les résultats seront progressivement discutés pour introduire la dernière partie de résultats.

Celle-ci concerne le rôle de l'hydrogénase et l'obtention d'une mutation qui diminue l'activité uréase mais est bénéfique lors d'une croissance prolongée en présence d'urée. Cette partie est présentée sous forme d'un article en révision dont je suis le premier auteur. La discussion est étayée par une seconde revue publiée dont je suis co-auteur comparant les systèmes de réparation de l'ADN chez les cyanobactéries et les implications biotechnologiques de l'instabilité génétique.

Enfin, la dernière section est un résumé synthétique de mon travail et de certaines perspectives nouvelles qu'il offre pour poursuivre l'effort de recherche visant à améliorer notre compréhension et notre utilisation des cyanobactéries en biotechnologies.

Introduction



Réaction de formose

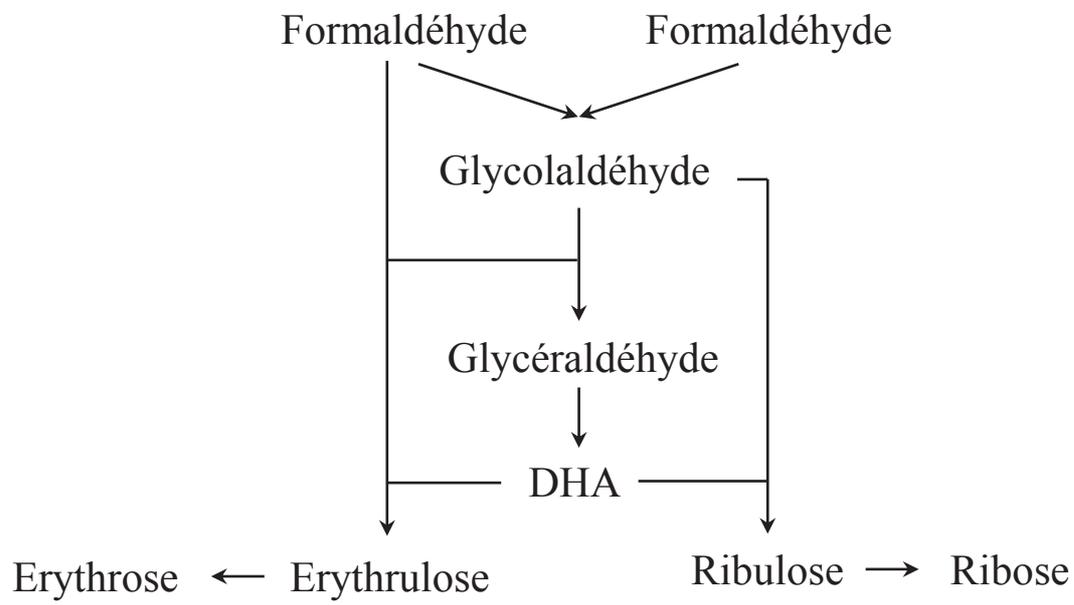


Figure 1 : La chimie prébiotique, les expériences de Miller-Urey, Oro et la réaction formose

Chapitre I

Histoire des cyanobactéries : du façonnement de la biosphère aux enjeux biotechnologiques modernes

A. De la soupe primitive à la diversité biologique actuelle

1. La chimie prébiotique et les premiers processus biochimiques compartimentalisés

L'atmosphère de la Terre primitive, anoxique et réductrice, se composait de gaz aujourd'hui présents en quantités infimes comme le dioxyde de carbone (CO_2), le méthane (CH_4), le dihydrogène (H_2), l'hydrogène sulfuré (H_2S) et l'ammoniac (NH_3). Le volcanisme intense alimentait cette atmosphère et façonnait la surface de la planète, partiellement recouverte d'eau liquide. Le magma affleurant à la surface, gorgé d'éléments tels que les silicates (SiO_2), le fer (Fe), le manganèse (Mn), le magnésium (Mg), le calcium (Ca), a graduellement enrichi les océans primitifs de minéraux. La chaleur en surface fut également le moteur des premiers cycles d'évaporation et de condensation de ces réservoirs d'eau. Ce sont ces mêmes conditions qu'ont reproduit Stanley Miller et Harold Urey dans leur laboratoire en 1953 pour élucider l'origine des molécules organiques dans ce biotope appelé la soupe primitive [1]. Le montage de cette expérience fondatrice est présenté en Figure 1. L'ensemble de cette expérience et de ses dérivés a permis de synthétiser des composés appartenant à chacune des quatre grandes classes de macromolécules organiques (acides aminés et nucléiques, lipides, carbohydrates) dans des conditions supposées proches de la Terre primitive [2-5]. La réaction de formose (contraction de formaldéhyde et aldose) mise au point par Butlerov en 1861 [6] permet également de produire, à partir du formaldéhyde, une importante variété de sucres dont du ribose, un squelette carboné indispensable à l'émergence des premiers catalyseurs organiques : les ribozymes.

L'hypothèse d'une vie initialement basée sur ces catalyseurs ribonucléiques est nommée pour la première fois en 1986 par Walter Gilbert : le « monde à ARN » [7,8]. On dénombre aujourd'hui plusieurs centaines de ribozymes naturels ou artificiels couvrant un vaste spectre d'activités enzymatiques [9]. Certains processus biologiques comme la réplication peuvent être effectués par les ribozymes et sont soumis à la sélection lorsqu'ils

coexistent. La réplication est par ailleurs plus fidèle et plus rapide dans une enveloppe lipidique [10-13] et peut induire sa scission [14]. Autrement dit, la sélection naturelle aurait favorisé l'émergence de protocellules constituées de ribozymes répliatifs encapsulés dans des vésicules lipidiques [15,16]. La séquence d'évolution vers des métabolismes plus élaborés n'est toutefois pas consensuelle. Une hypothèse récurrente dans la littérature est l'émergence d'un organisme litho-autotrophe [17-20] qui aurait assimilé le CO₂ via la voie de l'acétyl-CoA (voie de Wood-Ljungdahl), la seule qui soit partagée entre certaines Bactéries et Archées actuelles [21]. Celle-ci aurait favorisé le développement de métabolismes méthanogène [22] ou acétogène [23] utilisant des donneurs d'électrons inorganiques abondants comme le fer ferreux (Fe²⁺), le H₂ ou le H₂S [20,24,25].

2. La photosynthèse et la Grande Oxydation

La photosynthèse est un processus probablement apparu chez les bactéries après divergence entre les deux domaines procaryotes du vivant décrits par Carl Woese [26], puisqu'aucune archée photosynthétique n'est aujourd'hui décrite [27]. Les phylogénies obtenues à partir de gènes spécifiques aux organismes photosynthétiques (voie de biosynthèse des chlorophylles) se sont avérées plus fiables que les classifications habituellement basées sur des orthologues universels [27]. Plus encore, elles ont désigné les bactéries pourpres comme ancêtre commun des cinq lignées photosynthétiques actuelles. Ces bactéries réalisent la photosynthèse à partir de donneurs d'électrons comme le H₂S (bactéries sulfureuses pourpres) ou le H₂ (bactéries non-sulfureuses pourpres). Elles génèrent alors du soufre moléculaire ou des protons et est dite anoxygénique. Il a été proposé que cette voie ait évolué à partir de complexes photosensibles plus rudimentaires comme ceux de la phototaxie. Ceci aurait permis à ces bactéries de s'affranchir en partie de leur dépendance aux substrats minéraux [28]. Ce type de photosynthèse est reconnu comme ayant précédé la photosynthèse oxygénique [18,29]. Celle-ci est uniquement réalisée par les cyanobactéries qui constituent un taxon monophylétique apparenté aux héliobactéries possédant un appareil photosynthétique unique [27]. Dans ce scénario évolutif, une série de duplications de gènes aurait contribué à l'apparition d'un second photosystème fonctionnant en tandem et plus favorable du point de vue énergétique [30]. Ces nouveaux gènes auraient alors été acquis par les autres lignées photosynthétiques par transfert horizontal [31,32]. Parallèlement, l'évolution de composants auxiliaires dans les « protocyanobactéries » (*i.e* antennes photosynthétiques [30], cluster manganèse [29]) a conduit à une innovation majeure : l'oxydation de la molécule d'eau [33].

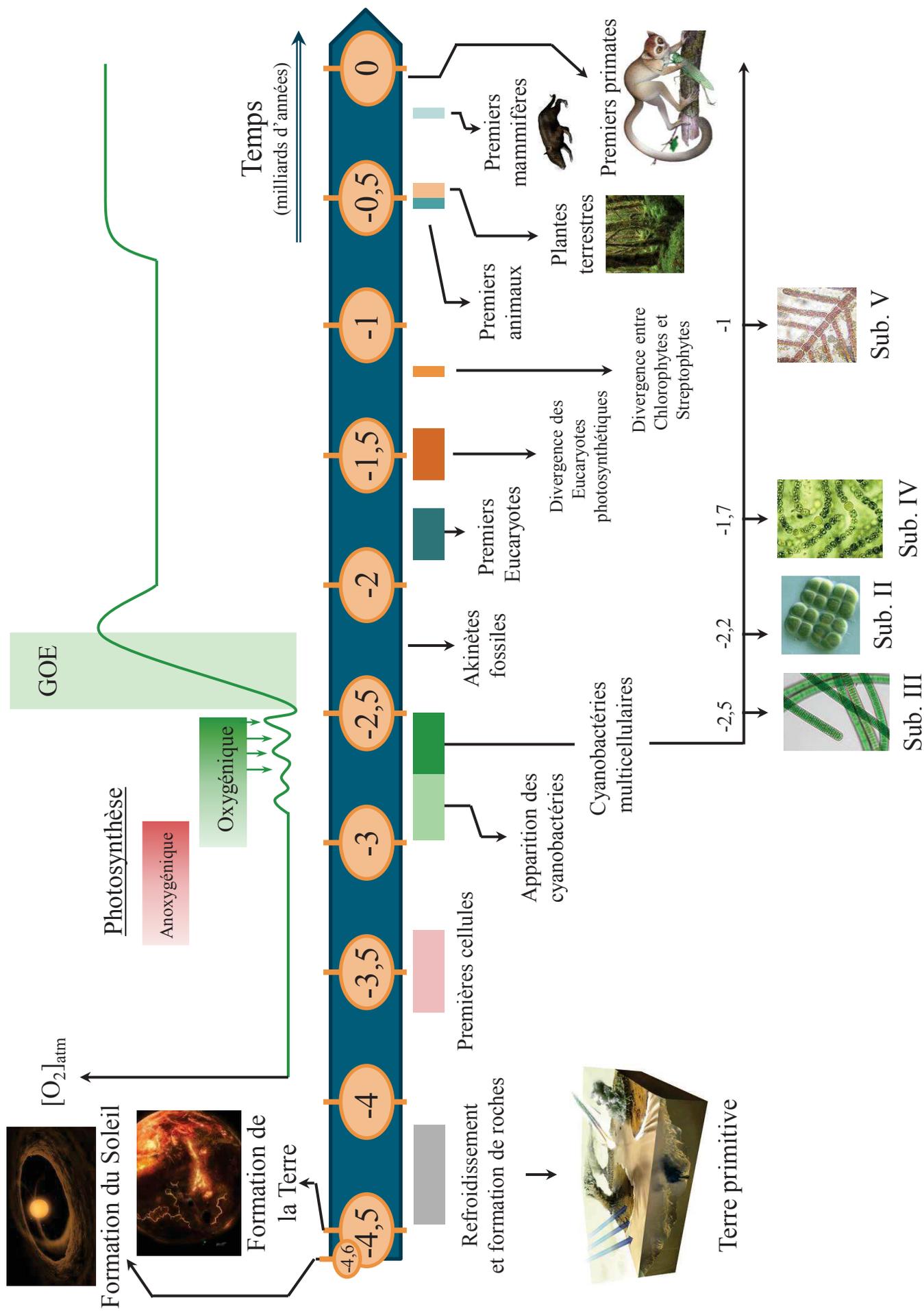


Figure 2 : Frise chronologique de l'évolution du vivant et des organismes photosynthétiques

La datation des premières cyanobactéries n'est pas encore précisément établie mais de nombreuses marques fossiles témoignent de leur expansion sur la surface de la Terre. Grâce à la photosynthèse, elles ont efficacement assimilé le CO₂ atmosphérique dont une importante partie s'est immobilisée sous forme de CaCO₃ [34]. Leur métabolisme a ainsi considérablement influencé le cycle biogéochimique du carbone puisque ces minéraux calcaires se sont accumulés dans des roches dont certaines, les stromatolites, sont parmi les plus anciennes traces de vie connues [35]. La production d'oxygène a aussi fortement impacté la géochimie en engendrant une précipitation massive de certains métaux par exemple sous forme de fer rubané et d'oxydes de Mn [36]. L'ensemble de cet historique fossile offre une bonne résolution temporelle de l'activité cyanobactérienne et concorde avec les analyses phylogénétiques [37] situant l'apparition des cyanobactéries entre -2,5 et -3 milliards d'années (Figure 2). Leur rapide colonisation de la surface terrestre s'est accompagnée d'un fort dégagement d'oxygène jusqu'alors absent, qui a lentement mais irréversiblement transformé les sphères géologique et biologique [36,38]. La géosphère riche en espèces réduites a exercé un effet tampon pendant des millions d'années mais une fois saturée, le dioxygène (O₂) libre s'est rapidement accumulé dans l'air et l'eau. Cette brusque transition vers des biotopes oxydants est appelée Grande Oxydation ou GOE (Great Oxygenation Event). Le O₂ est une molécule indispensable pour beaucoup d'organismes contemporains (eucaryotes et procaryotes). Mais il y a plus de 2,5 milliards d'années, ce fut un poison métabolique puissant, avide d'électrons, qui circonscrit la vie anaérobie aux environnements dépourvus d'oxygène et marqua ainsi la fin de la domination des organismes anaérobies.

La libération de ces niches écologiques a entraîné une forte radiation évolutive. Parmi les grandes innovations biologiques, on retrouve par exemple l'acquisition du compartiment nucléaire (≈ -1,8 milliards d'années) qui marque l'émergence du domaine Eucaryote (Figure 2). Cette diversification s'est également traduite par le développement de métabolismes élaborés reposant sur la spécialisation d'organites intracellulaires grâce aux endosymbioses. Ce scénario évolutif, proposé en 1964 par Lynn Margulis [39] et largement étayé, stipule que ces organites ont une origine procaryotique. On sait aujourd'hui que les chloroplastes, apparus il y a environ 1,5 milliards d'années, sont issus des cyanobactéries [40-42]. Ces dernières ont par ailleurs bénéficié de cette radiation évolutive avec l'apparition de la multicellularité et de la capacité de différenciation cellulaire au sein du phylum [43] qui définissent les 5 sous-sections des cyanobactéries (Figure 2).

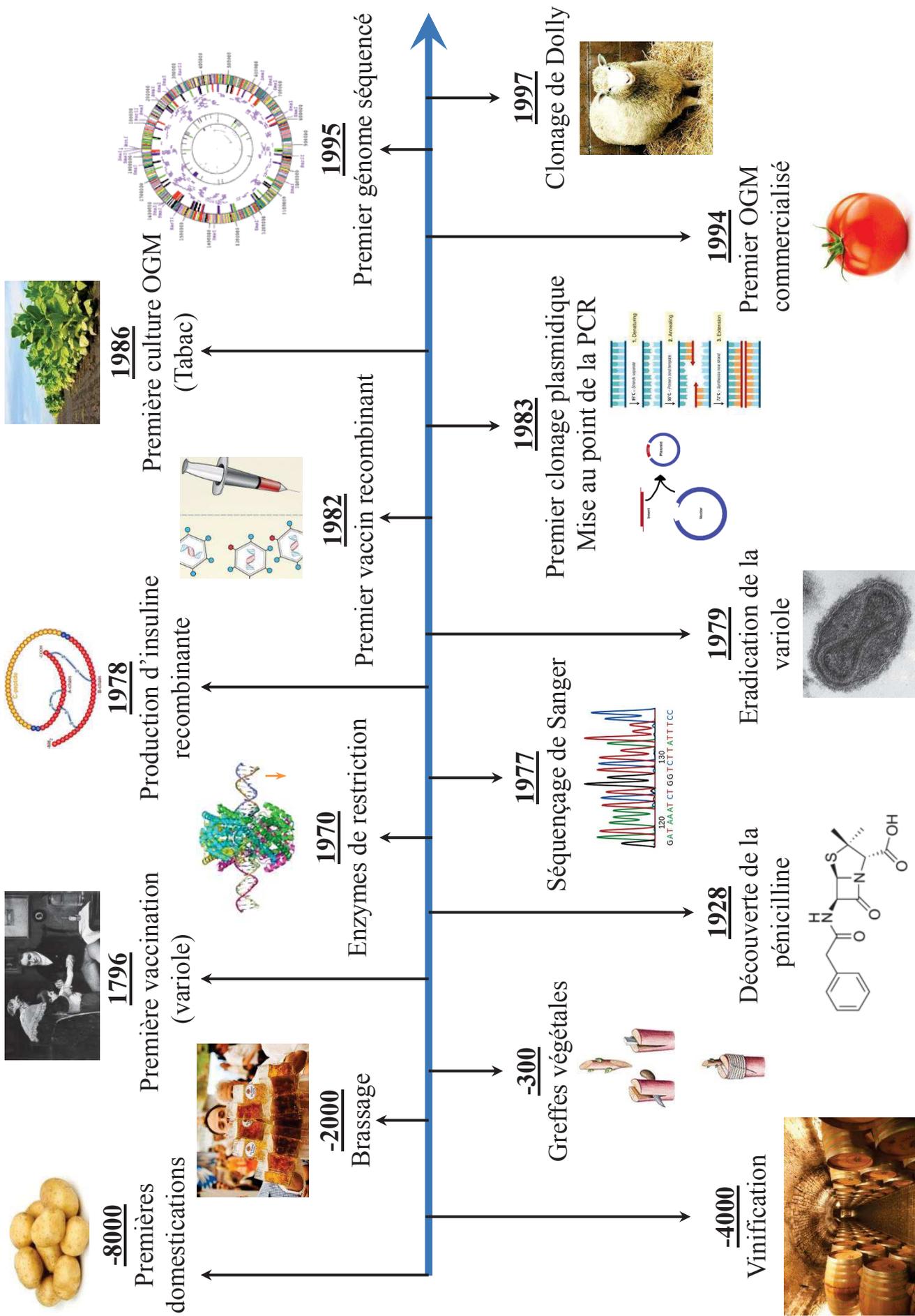


Figure 3 : Historique et avancées majeures des biotechnologies dans les sociétés humaines

3. Diversité microbienne

Aujourd'hui, les Procaryotes pourraient représenter jusqu'à 30% de la biomasse totale sur Terre [44,45] et possèdent une vaste diversité de physiologies distribuées entre Bactéries et Archées. L'ensemble de leurs types trophiques offre un panel d'activités biologiques très large allant de l'oxydation du fer, du soufre ou même du méthane jusqu'à la production de nombreux acides organiques, d'alcools ou encore de métabolites secondaires extrêmement variés. La découverte des organismes extrémophiles a par ailleurs montré que certains biotopes inattendus abritaient de nombreux micro-organismes inconnus.

Cette diversité a longtemps été sous-estimée notamment parce que les milieux et conditions de culture conventionnels sont conçus pour des organismes mésophiles. Des études génomiques ont suggéré que seulement 1% des Procaryotes étaient cultivables en laboratoire [46]. Grâce au développement de la métagénomique et des approches « single-cell » il est désormais possible d'étudier un organisme à partir d'une infime quantité de biomasse [47,48]. De cette manière, plusieurs travaux ont permis de cultiver des organismes nécessitant des nutriments très particuliers [49,50]. L'effort de recherche à fournir pour étendre ces progrès à la totalité des organismes incultivables apparaît toutefois considérable. Les analyses métagénomiques ont néanmoins révélé que cette diversité inexplorée était une mine de gènes et fonctions atypiques. Leur étude est donc vouée à stimuler notre compréhension des génomes mais également d'enrichir le répertoire d'activités d'intérêt biotechnologique.

B. Les sociétés humaines et les biotechnologies

1. Les processus microbiologiques, alliés ancestraux des sociétés humaines

Le terme biotechnologie possède aujourd'hui une définition précise et technique grâce au patrimoine scientifique accumulé au cours des siècles. De tout temps cependant, les sociétés humaines ont tiré profit des activités biologiques à l'aide de procédés ingénieux. Compte tenu des connaissances limitées à ces époques, certains procédés ne sont rien de moins que les prémices de la biotechnologie actuelle. La première trace d'exploitation du vivant par l'être humain est attribuée aux chasseurs-cueilleurs des Andes. Il y a 10000 ans, ces peuples ont appris à éliminer les toxines des pommes de terre et l'ont alors cultivé en masse pour leur alimentation (Figure 3). Les plus anciennes traces utilisations de micro-organismes sont la vinification (-8000 ans) et le brassage de la bière (-6000 ans). Le berceau

de ces produits de fermentation est localisé au nord du Golfe Persique. Le vin était vraisemblablement servi lors des rites funéraires alors que la bière (littéralement « pain liquide » en sumérien) était un breuvage très commun, fait de céréales rendues comestibles par la fermentation alcoolique.

Au fil du temps, l'être humain perfectionne son savoir-faire et ses connaissances du vivant et élargit son champ d'application. Au XVII^{ème} siècle, Antoni Van Leeuwenhoek révèle l'existence des micro-organismes à l'aide de ses microscopes. Il renverse de fait la théorie dominante de la génération spontanée au profit de la théorie des germes et révolutionne la médecine. Un siècle plus tard, Edward Jenner réalise la première vaccination de la variole sur un enfant, étendue ensuite par Louis Pasteur à la rage et l'anthrax (Figure 3). En 1928, Alexander Fleming isole la pénicilline et entraîne pour la première fois, la production d'un composé d'origine biologique au niveau industriel.

2. Essor des biotechnologies

Au cours XX^e siècle, les avancées techniques et scientifiques amplifient sans cesse le potentiel des biotechnologies. Les progrès en biologie moléculaire sont fulgurants (découverte des enzymes de restriction, séquençage de l'ADN, clonage...) et sont rapidement adaptés pour la production de composés recombinants à l'échelle mondiale (vaccins, hormones...). Dans le même temps, des aboutissements historiques ont lieu avec par exemple l'éradication officielle de la variole en 1979 ou encore un allongement significatif de l'espérance de vie (Figure 3). Au-delà du champ biomédical, les biotechnologies se répandent aussi dans le domaine agroalimentaire (OGM) et la synthèse de substances à valeur marchande.

Aujourd'hui, les biotechnologies sont classées en 3 couleurs selon les applications : rouge pour le domaine biomédical, gris pour les technologies environnementales et blanc pour les procédés industriels. Dans leur grande majorité, tous ces procédés impliquent ou sont inspirés de micro-organismes divers. Les organismes utilisés dans ces procédés sont traditionnellement hétérotrophes et sont généralement sélectionnés sur la base de leur temps de génération, leur facilité de manipulation génétique et leurs caractéristiques intrinsèques. Par exemple, les levures sont plus intéressantes que les bactéries pour produire des protéines eucaryotes recombinantes parce qu'elles possèdent les facteurs et conditions de maturation requis. En revanche, la production de métabolites est fréquemment réalisée avec des bactéries qui sont souvent plus performantes dans la synthèse et l'excrétion de composés uniques.

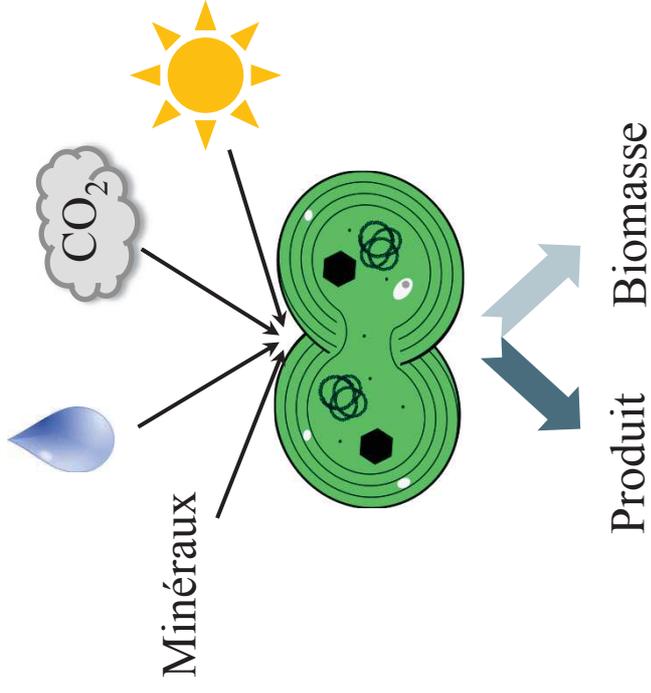
1^{ère} génération



2^{ème} génération



3^{ème} génération



Extraction
mécanique

Hydrolyse
enzymatique

Substrat fermentescible
(sucres, amidon, huiles...)

Produit

Figure 4 : La matière première et les générations de biotechnologies

C. Les biotechnologies vertes

1. Nouveaux enjeux et intérêts

Les biotechnologies se sont étendues au point de devenir aujourd'hui un marché d'une taille considérable. Par conséquent, la culture des souches industrielles (hétérotrophes) nécessite de grandes quantités de nutriments comme les sucres, les substrats azotés, le phosphate mais aussi l'eau. Ces matières premières contribuent significativement au coût de revient de très nombreux procédés. Typiquement, l'approvisionnement en carbone organique est devenu un challenge qui influence l'évolution des biotechnologies.

Initialement, les biotechnologies dites de première génération utilisaient des mélasses riches en sucres, directement issues de l'agriculture (Figure 4). En Europe, il s'agissait principalement d'extraits de betterave sucrière alors que d'autres pays comme le Brésil ont massivement cultivé la canne à sucre ou le maïs pour soutenir la production de bioéthanol. Inévitablement, les biotechnologies sont entrées en compétition avec la production agroalimentaire pour le partage des surfaces et ressources agricoles.

Suite à la prospection de filières alternatives, les biotechnologies de seconde génération ont vu le jour. Celles-ci emploient toujours des extraits contenant beaucoup de sucres mais qui sont produits à partir de déchets (Figure 4). Il s'agit en grande partie de résidus agricoles et forestiers non-fermentescibles comme les tiges, les feuilles, les glumes ou encore le bois. Les sucres complexes (lignine, cellulose...) de ces tissus végétaux sont traités à l'aide d'enzymes ou de micro-organismes cellulolytiques pour les transformer en sucres simples et fournissent des hydrolysats utilisables dans les fermenteurs. Cependant, ces techniques ne réduisent ni la quantité d'eau et de nutriments nécessaires pour parvenir au produit fini, ni les intermédiaires de la chaîne de production. Les coûts de revient sont donc inchangés, sinon plus élevés. De plus, du traitement de la matière première jusqu'au processus de fermentation final, ces procédés dégagent des gaz à effet de serre (CO₂) en quantité.

La plupart des biotechnologies actuelles reposent sur des approches de biologie synthétique, c'est-à-dire sur le clonage de gènes d'un organisme donné dans un autre organisme. Ces approches permettent notamment d'introduire les enzymes d'une voie dans un organisme qui ne la possède pas mais qui est adapté pour convertir un précurseur métabolique en produit d'intérêt. L'exemple le plus connu est le clonage des gènes de levures codant la pyruvate décarboxylase et l'alcool déshydrogénase pour produire de l'éthanol à partir de

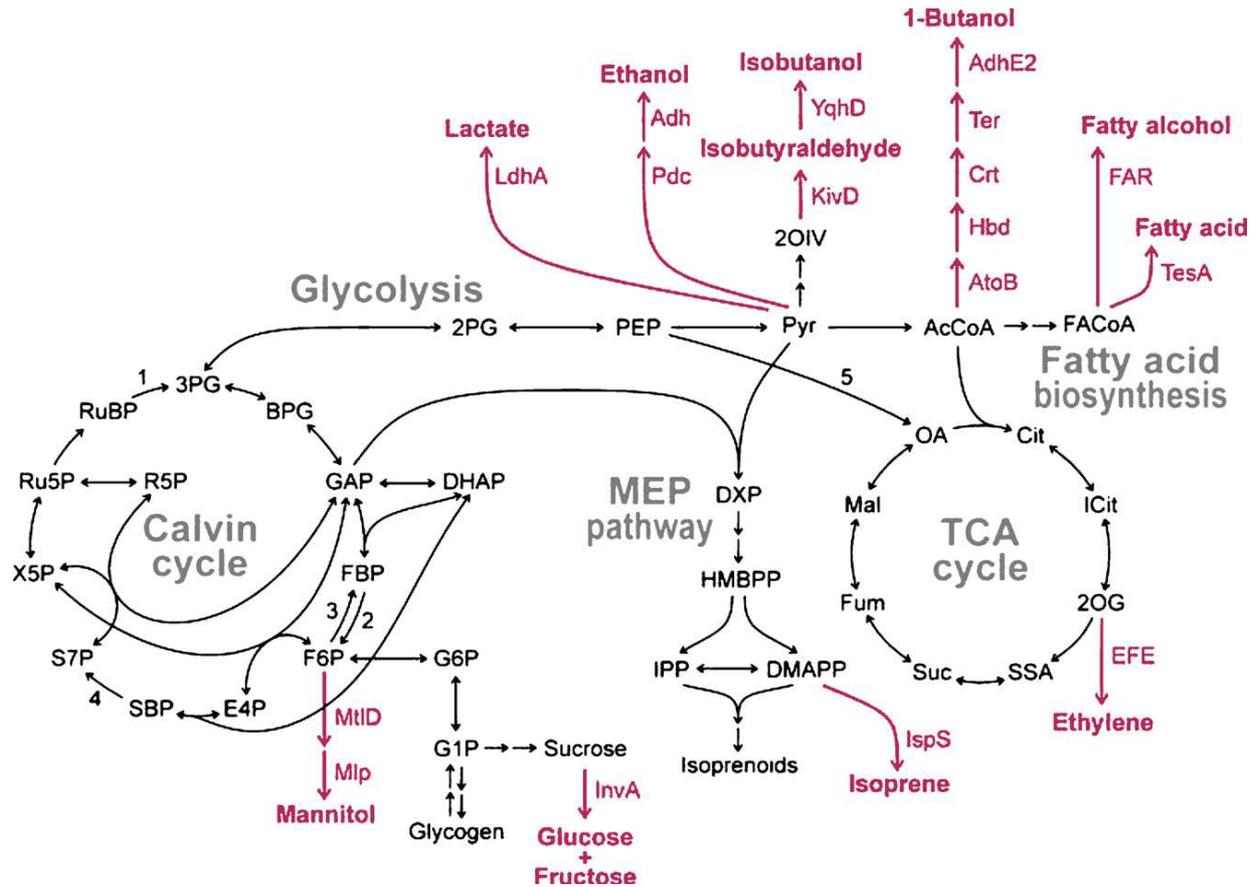


Figure 5 : Exemples de produits d'intérêt dérivés du métabolisme central des cyanobactéries (Extrait de Rosgaard *et al.*, 2012, Journal of Biotechnology [54])

Les voies et métabolites naturels sont indiqués en noir. Les enzymes qui peuvent être introduites dans les cyanobactéries par biologie synthétique pour synthétiser des molécules d'intérêt à partir de la photosynthèse et de l'assimilation du CO₂ sont représentées en rouge.

pyruvate. Les progrès récents de la biologie synthétique offrent même aujourd'hui la possibilité de cloner des systèmes de régulation sophistiqués [51]. L'hôte ne supporte cependant pas toujours la forte production du composé désiré parce qu'elle peut engendrer des déséquilibres métaboliques sévères. De nombreux rapports font état d'une diminution du rendement au cours de la fermentation liée à l'accumulation de mutations compensatoires qui affectent la synthèse du métabolite et en atténue les effets néfastes.

Grâce aux récents progrès technologiques, il est aujourd'hui possible d'étudier les métabolismes et leur régulation de manière précise. Ceci a favorisé l'émergence des biotechnologies dites de troisième génération, basées sur la reprogrammation métabolique. Ces nouvelles approches ne reposent plus uniquement sur des systèmes hétérologues mais aussi sur la redirection des flux métaboliques existants dans un organisme pour forcer la surproduction de certains métabolites (Figure 4). L'avantage majeur de cette approche est d'exploiter une voie qui est par définition intégrée dans un châssis biologique. Il s'agit donc de comprendre un métabolisme et sa régulation pour mieux le déréguler au profit de la substance recherchée.

2. Avantages majeurs des cyanobactéries

Dans cette perspective, les cyanobactéries ont de nombreux atouts. Premièrement, elles utilisent la lumière comme source d'énergie et d'électrons. Ceci leur permet d'assimiler le CO₂ et les minéraux (nitrate, phosphate...) pour produire de la biomasse (Figure 4). Elles pourraient donc être couplées aux procédés rejetant du CO₂ pour constituer un piège alimenté par l'énergie lumineuse, là où les biotechnologies conventionnelles sont des procédés énergivores et polluants. Il est également possible de les cultiver avec des eaux saumâtres et sur des surfaces non-agricoles. De plus, de nombreux génomes cyanobactériens ont été séquencés [52], sont facilement manipulables et peuvent être modifiés par ingénierie génétique [53].

Les cyanobactéries sont donc des systèmes biologiques performants et flexibles nécessitant des nutriments bien moins coûteux que les organismes utilisés dans les biotechnologies actuelles. Un nombre croissant de travaux montrent que les approches d'ingénierie génétique et métabolique aboutissent à des titrations variables mais significatives de divers produits pouvant être divisés en deux groupes : les biocarburants et les petites molécules carbonées utilisées comme molécules plateformes ayant parfois une forte valeur ajoutée (Figure 5 et [54,55]).

3. Exemples et limitations persistantes

a. La production de biocarburants

Les biocarburants regroupent diverses molécules libérant de grandes quantités d'énergie lors de leur combustion. Parmi elles, les cyanobactéries peuvent synthétiser certains composants du biodiesel, des alcools (isobutanol, éthanol...), du dihydrogène (H₂) ou encore des terpénoïdes (pour revue [56]).

Le biodiesel est produit par estérification d'acides gras (di- et triacylglycérol) eux-mêmes dérivés de la DHAP issue de la glycolyse. Les algues et les cyanobactéries peuvent les accumuler mais l'extraction de ces précurseurs lipidiques est souvent limitante dans la production du biodiesel. Néanmoins, un système lytique reposant sur l'expression de lipases à partir de promoteurs phagiques inductibles a été mis au point chez *Synechocystis* et a permis d'augmenter considérablement le rendement en acides gras pour cette espèce [57] qui reste néanmoins inférieur à ceux obtenus avec les algues vertes ou les diatomées.

Les cyanobactéries peuvent également produire différents alcools à partir de pyruvate lorsque les gènes nécessaires à leur synthèse sont introduits dans le génome (Figure 5). Grâce à ces méthodes, des quantités significatives d'éthanol ont été obtenues avec des mutants de *Synechococcus* PCC7002 et *Synechocystis* PCC6803 (pour revue [58]). Plusieurs compagnies comme Algenol ou Joule Unlimited exploitent même des brevets déposés pour certaines souches ayant atteint le seuil de rentabilité économique. Même si la nature de ces souches et le procédé utilisé ne sont publiques, en 2013 Algenol affirmait produire environ 26500 litres d'éthanol par hectare et par an.

L'isobutanol, un alcool plus énergétique que l'éthanol, peut être produit par les cyanobactéries avec un meilleur rendement lorsque l'activité de l'enzyme fixant le CO₂ (RuBisCO) est augmentée chez *Synechococcus* PCC7942 [59].

Le dihydrogène H₂ est une autre molécule très énergétique considérée comme l'une des plus prometteuses dans les nouveaux enjeux énergétiques. Son rôle physiologique et sa production par les hydrogénases dans les micro-organismes (dont les cyanobactéries) seront détaillés dans le chapitre IV.

Enfin, les terpènes et terpénoïdes regroupent un vaste ensemble de carbohydrates (limonène, menthol, squalène...) dérivés de l'isoprène (pour revue [60]). Il s'agit de composés énergétiques souvent volatiles qui présentent fréquemment des propriétés

médicinales (anti-inflammatoires, anti-cancéreux...). Chez les cyanobactéries, l'isoprène est produit à partir de G3P (voie du méthylérythritol phosphate ou MEP) et est le précurseur de la biosynthèse des pigments photosynthétiques. Les concentrations obtenues chez les cyanobactéries pour ces molécules sont généralement comprises entre 0,3 et 1mg par litre de culture. Le facteur limitant leur synthèse n'est pas connu mais son identification pourrait conduire à une amélioration conséquente de ces faibles rendements.

b. La production de petites molécules plateformes

Les cyanobactéries produisent de petites molécules carbonées (acides organiques, trioses, alcènes...) qui servent d'intermédiaires et de précurseurs dans les voies de biosynthèse des macromolécules (Figure 5). Nombre d'entre elles sont aussi utilisées dans l'industrie chimique comme plateforme et servent de squelette pour greffer des fonctions chimiques ou assembler des molécules de complexité croissante. La demande globale pour ces composés est bien inférieure à celle des biocarburants mais leur valeur marchande est plus élevée.

Les cyanobactéries peuvent ainsi accumuler de l'isoprène qui est indispensable à la production industrielle de caoutchouc. Comme évoqué précédemment, les travaux réalisés sur ce composé sont récents et n'ont pas encore permis d'atteindre une production soutenue.

L'éthylène est une hormone végétale volatile et un produit très répandu dans l'industrie chimique où il sert à fabriquer de nombreux plastiques et textiles. Son marché pèse plusieurs centaines de milliards de dollars et sa production mondiale avoisine les 150 millions de tonnes annuelles. Il est majoritairement issu du vaporeformage du pétrole, un procédé dépendant des énergies fossiles et fortement polluant (jusqu'à 3 tonnes de CO₂ dégagé pour 1 tonne d'éthylène produite). Néanmoins, il peut être produit par voie biologique par l'Efe (Ethylene-forming enzyme) à partir d' α -cétoglutarate et d'arginine. Le clonage de cette enzyme chez *Synechocystis* PCC6803 a permis d'atteindre des productions du même ordre de grandeur que chez *E. coli* ou *S. cerevisiae* (pour revue [61]).

Le 3-hydroxybutyrate (3-HB) et sa forme polymérisée (PHB) sont des précurseurs pour la synthèse de plastiques biodégradables. Ils sont produits par différents micro-organismes, dont les cyanobactéries, pour stocker le carbone organique en réponse à des carences nutritives. Chez *Synechocystis* PCC6803, ils peuvent représenter plus de 30% du poids sec des cellules lorsque ces carences sont combinées à l'ingénierie génétique [62].

c. Vers l'identification et la levée des verrous biologiques

L'ensemble de ces études montre que les cyanobactéries sont appropriées pour produire des composés aux applications diverses. Certains procédés ont d'ores et déjà atteint la rentabilité économique et confirment qu'une révolution verte des biotechnologies est possible. Ces succès sont néanmoins des exceptions et l'effort de recherche et de développement doit se poursuivre pour surmonter les obstacles entravant les rendements.

Premièrement, le métabolisme photoautotrophe gagne à être mieux appréhendé notamment parce qu'il est dépendant de la lumière reçue. Les stratégies d'ingénierie reposent généralement sur trois principes complémentaires : l'élimination des voies en compétition sur le substrat de la production, la maximisation du flux métabolique de la voie d'intérêt et l'augmentation de la tolérance au produit final. Il existe un quatrième paradigme pour optimiser les systèmes photoautotrophes : l'amélioration de la capture du CO₂ et de la lumière pour accroître les flux du métabolisme central [56]. La caractérisation des flux métaboliques dans différentes conditions de culture et avec différents génotypes vise à améliorer notre compréhension de ce métabolisme et à favoriser l'identification et le contournement des goulots d'étranglement biologiques.

L'accumulation d'une substance produite en grande quantité dans les cellules ou le milieu peut engendrer un déclin de la productivité des souches. En effet lorsque cette substance est toxique à forte dose (éthanol, terpènes...), des mutations compensatoires diminuant la synthèse du produit d'intérêt sont naturellement sélectionnées dans les cultures. En effet, elles confèrent un avantage aux cellules à la productivité réduite qui vont progressivement envahir la population. Ces problèmes d'instabilité génétique ont notamment été reportés dans les souches de cyanobactéries offrant de bons rendements dans la production d'éthanol, ou d'éthylène [63,64]. L'effort d'optimisation du couplage entre production de biomasse et du produit est récent mais a déjà fourni quelques pistes intéressantes pour améliorer la stabilité des voies d'intérêt (pour revue [58]).

Une autre limitation du développement de ces procédés concerne la conception des milieux de culture. Le portage à grande échelle des biotechnologies de troisième génération est en effet susceptible de décupler la demande en engrais, notamment pour l'azote et le phosphate [65]. Or leur production se fait généralement par des processus ayant un impact très négatif sur l'environnement (solubilisation du phosphate par des traitements acides et

hydrogénation du diazote N_2 en ammoniac à très haute température). Pour être parfaitement durable, la culture des cyanobactéries à grande échelle doit donc reposer sur des matières premières propres voire même sur le recyclage de déchets [66]. Elles sont d'ailleurs très intéressantes pour introduire de nouveaux apports azotés puisque certaines espèces peuvent directement assimiler le N_2 atmosphérique tandis que d'autres comme *Synechocystis* PCC6803 peuvent importer et hydrolyser l'urée dans leur cytoplasme pour satisfaire la demande en azote. Il existe donc des alternatives métaboliques pertinentes aux engrais conventionnels qui là encore, pourraient être associées à des filières de dépollution (eaux usées, effluents agricoles...).

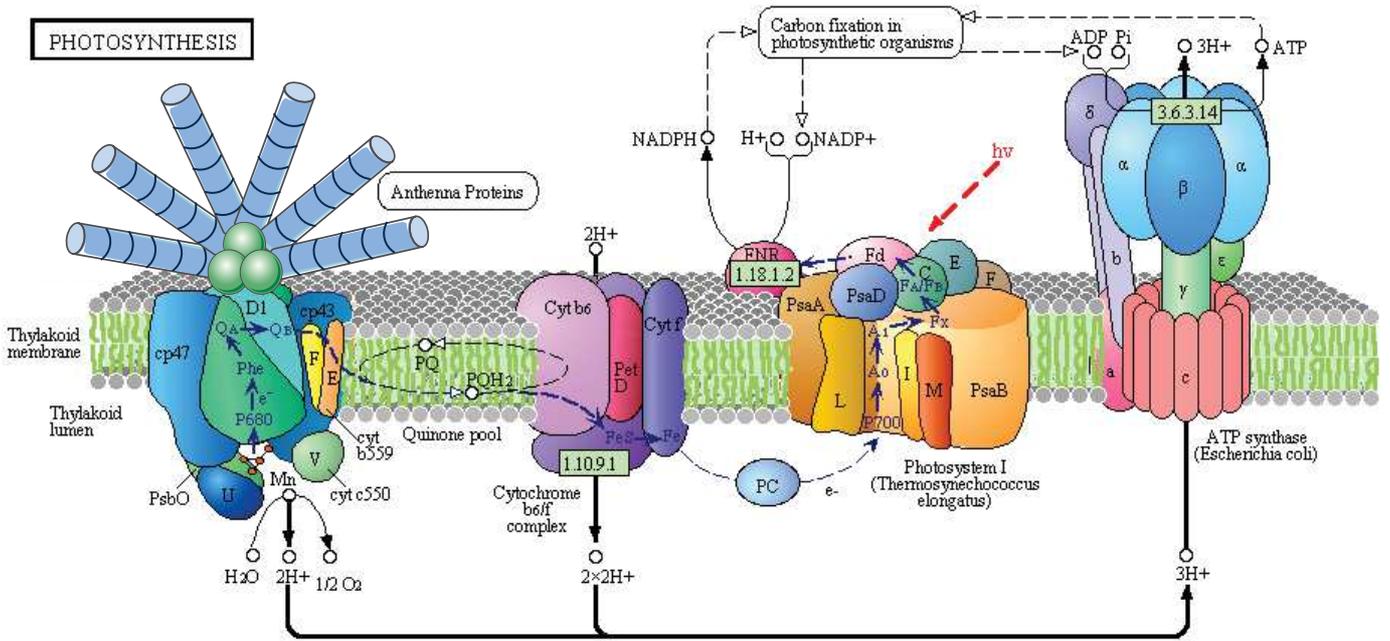


Figure 6: Les complexes photosynthétiques et la chaîne de transport d'électrons (Source : KEGG Pathways)

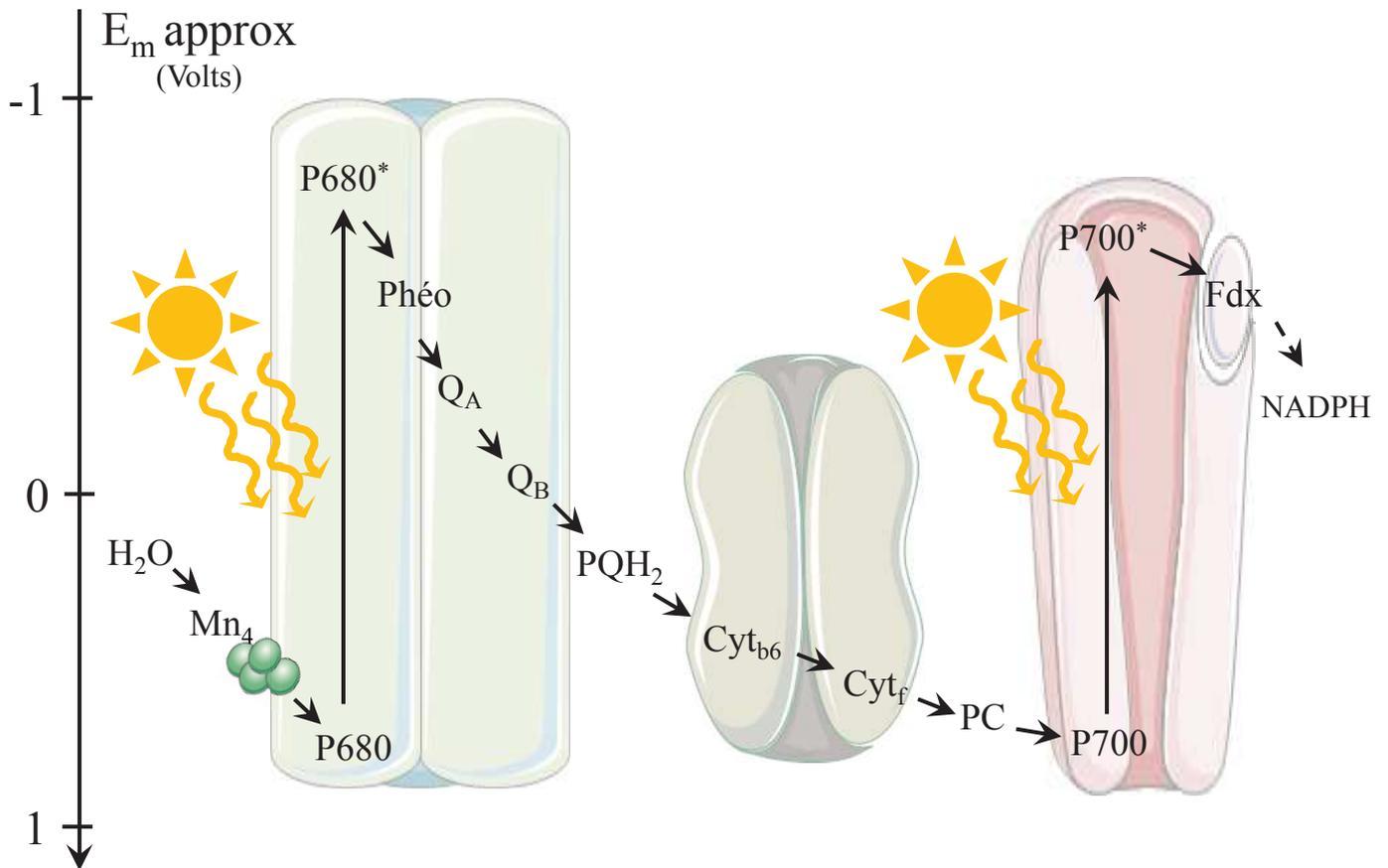


Figure 7 : Le schéma en Z du potentiel redox des électrons photosynthétiques

Mn_4 = Cluster manganèse; Phéo = phéophytine; Q_A/Q_B = Sites de fixation des quinones; PQH_2 = Plastoquinone réduite; Cyt_{b_6} = cytochrome b_6 ; Cyt_f = cytochrome f ; PC = plastocyanine; Fdx = Ferrédoxine

Chapitre II

La photosynthèse chez les cyanobactéries

Les cyanobactéries constituent le seul phylum Procaryote a réalisé la photosynthèse oxygénique. L'ubiquité de son donneur d'électrons, l'eau, permet aux cyanobactéries de coloniser davantage de biotopes que les bactéries effectuant la photosynthèse anoxygénique. Certains genres et espèces, grâce à leurs propriétés intrinsèques, vont jusqu'à coloniser un spectre d'écosystèmes très vaste : eaux douces, saumâtres, salées, milieux anthropisés, sources chaudes, lacs alcalins, déserts, banquise [67-74].

Les cyanobactéries sont considérées comme étant les ancêtres des chloroplastes des Eucaryotes photosynthétiques. Ceci explique la forte conservation structurale et fonctionnelle des complexes photosynthétiques dans ces deux règnes du vivant [75]. Le processus (Figure 6) repose sur le fonctionnement en série de 4 complexes :

- Le photosystème II (photolyse de la molécule d'eau)
- Le cytochrome b_6f (transfert de protons et carrefour des flux d'électrons)
- Le photosystème I (réduction de la ferrédoxine)
- L'ATP synthase (production d'énergie chimique)

Ces complexes sont enchâssés dans la membrane de vésicules lipidiques intracellulaires spécialisées : les thylakoïdes. Chez les algues et les plantes, ces thylakoïdes sont eux-mêmes empilés en grana dans le stroma des chloroplastes (équivalent au cytoplasme des cyanobactéries).

A. Les complexes photosynthétiques et mécanismes fonctionnels

La circulation des électrons dans la chaîne photosynthétique est dictée par leur potentiel rédox. Celui-ci est diminué par excitation photonique au sein de chaque photosystème (Figure 7). La lumière est donc le moteur du flux des électrons issus de la molécule d'eau et réduisant la ferrédoxine.

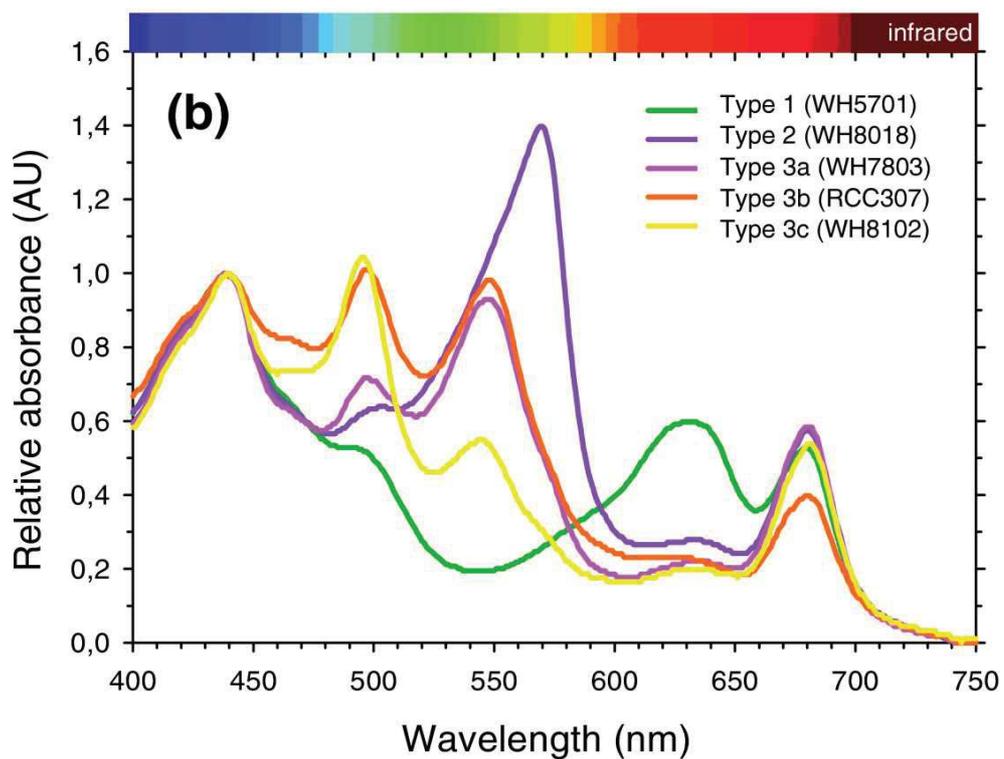
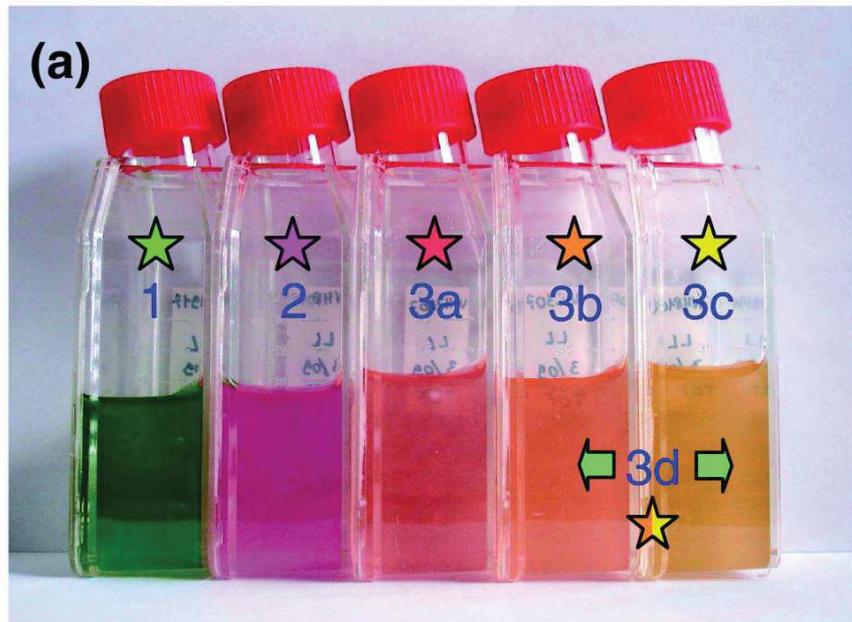


Figure 8 : La diversité de pigmentation chez les cyanobactéries (D'après Six *et al.*, 2007, Genome Biology [77])

- (a) Photographies de cultures de différentes espèces de cyanobactéries marines du genre *Synechococcus*.
 (b) Spectres d'absorbance des cellules présentées en (a)

1. Le phycobilisome : unité de capture des photons

Chez les cyanobactéries, la capture de l'énergie lumineuse est réalisée grâce aux phycobilisomes. Ces complexes supramoléculaires solubles sont faits de cylindres (antennes) agencés autour d'un noyau. Les unités structurales de ces assemblages sont les phycobiliprotéines constituées d'une apoprotéine associée à un pigment. Les antennes sont des empilements de phycobiliprotéines telles que la phycocyanine, la phycoérythrine ou la phycoérythrocyanine. Le noyau est quant à lui composé d'allophycocyanine. Chaque phycobiliprotéine possède ses propres caractéristiques spectroscopiques qui varient selon l'association apoprotéine/pigment.

Les antennes photosynthétiques sont très abondantes dans les cellules et peuvent représenter jusqu'à 50% des protéines solubles [76]. Cependant, chaque espèce de cyanobactérie ne possède pas nécessairement toutes les phycobiliprotéines répertoriées. Par conséquent, elles sont actives à différentes longueurs d'onde qui conditionnent leur distribution et leur dominance dans l'environnement [70]. Ceci explique également pourquoi elles arborent des couleurs variées [77] allant du violet au rouge en passant par le célèbre bleu-vert (Figure 8). Lorsqu'un photon est capturé par ces antennes, il est dirigé jusqu'au photosystème II grâce au transfert d'énergie par résonance.

2. Le photosystème II : séparation de charge et oxydation de l'eau

Le photosystème II (PSII) est une oxydoréductase multimérique qui couple l'oxydation de l'eau et la réduction des quinones. Il se compose d'environ 20 sous-unités protéiques, de pigments (chlorophylle a, caroténoïdes) et d'un cluster manganèse (Mn_4CaO_5) qui oxyde la molécule d'eau. Le centre réactionnel est un dimère formé par les protéines D1 et D2 qui renferme une paire spéciale de chlorophylle a, le P680. Lorsque l'énergie captée par les antennes est transférée au P680, celui-ci passe dans un état excité P680* et cède alors un électron à la phéophytine. Dans sa forme oxydée, le P680⁺ est l'espèce biologique avec le potentiel rédox le plus haut jamais répertorié (1,3 V) et donc la plus oxydante connue. Cette séparation de charge (P680⁺-Phéo⁻) est la clé de voûte du transfert d'électrons puisqu'elle enclenche d'une part, l'oxydation de l'eau pour régénérer le P680 et d'autre part la réduction de la quinone Q_A. Le transfert d'électrons se poursuit alors vers la quinone Q_B avant de réduire la plastoquinone membranaire PQ.

3. Le cytochrome b_6f : pompe à protons et carrefour des électrons

La plastoquinone peut être réduite par d'autres complexes enzymatiques, notamment ceux de la respiration (NADPH oxydoréductase I et II et succinate déshydrogénase). Son oxydation quant à elle, est essentiellement réalisée par le cytochrome b_6f . Ce complexe riche en centres fer-soufre (Fe-S) utilise aussi la ferrédoxine comme donneur d'électrons et canalise donc une grande partie des électrons du métabolisme. C'est la raison pour laquelle son fonctionnement est essentiel pour la croissance en photoautotrophie mais aussi en hétérotrophie.

Après oxydation de son donneur, le cytochrome b_6 réduit le cytochrome f. Cette réduction est couplée au transfert de 2 protons du cytoplasme vers le lumen. L'accepteur terminal du complexe est un transporteur soluble à cuivre, la plastocyanine, qui reçoit ses électrons du cytochrome f sur la face luménale du thylakoïde.

4. Le photosystème I : réduction de la ferrédoxine

La plastocyanine réduite s'associe ensuite au photosystème I. Celui-ci se compose de 11 sous-unités, de pigments divers dont une centaine de molécules de chlorophylle a améliorant la collecte des photons. Il possède également une paire spéciale de chlorophylle, le P700, retenue par le dimère PsaAB. Après excitation, le P700* est la molécule biologique avec le potentiel rédox le plus bas connu et est donc un réducteur très puissant. Il cède alors un électron à la phylloquinone, occasionnant une séparation de charge similaire au PSII. La plastocyanine est alors oxydée pour régénérer le P700 tandis que la phylloquinone réduit l'accepteur terminal d'électrons de la photosynthèse : la ferrédoxine.

5. L'ATP synthase : production d'énergie chimique

Enfin, le gradient de protons produit à la fois par l'oxydation de l'eau et l'import du cytochrome b_6f est utilisé par l'ATP synthase pour phosphoryler l'ADP en ATP sur la face cytoplasmique. Il est communément admis que la synthèse d'une molécule d'ATP requiert la translocation de 3 à 4 ions H^+ .

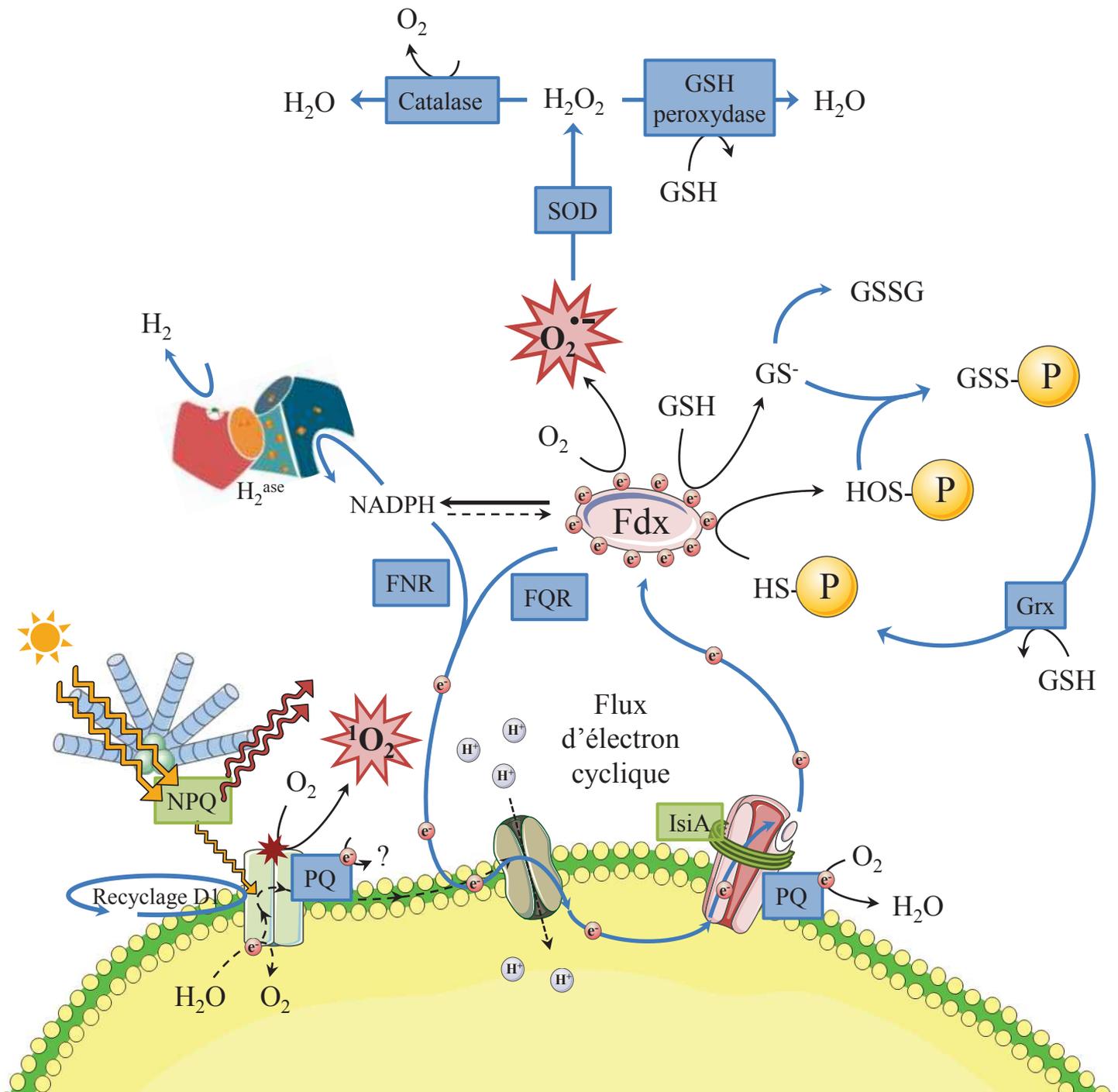


Figure 9 : Le stress oxydant chez *Synechocystis*

Les rectangles verts indiquent les mécanismes de dissipation de l'énergie d'excitation des photosystèmes (NPQ) tandis que les flèches et rectangles bleus représentent les mécanismes de photoprotection et antioxydants.

1O_2 = Oxygène singulet; $O_2^{\cdot-}$ = Superoxyde; NPQ = Quenching non-photochimique; PQ = Quenching photochimique; Fdx = Ferrédoxine; FQR = Ferrédoxine quinone réductase; FNR = Ferrédoxine-NADP⁺ réductase; H_2^{ase} = Hydrogénase; GSH = Glutathion; Grx = Glutarédoxine; SOD = Superoxyde dismutase

B. Un processus puissant mais versatile

1. Le stress oxydant

La photosynthèse est un mécanisme très performant pour fournir des équivalents réduits au métabolisme (ferrédoxine, NADPH...). Cette efficacité peut cependant s'avérer grandement dommageable lorsque la production d'électrons excède leur consommation. Dans le milieu naturel, les cyanobactéries sont fréquemment confrontées à ce type de déséquilibre car elles sont soumises à de fortes fluctuations environnementales. Par exemple, la houle modifie constamment leur position dans la colonne d'eau et donc la qualité et la quantité de lumière qu'elles reçoivent. De la même manière, l'abondance des nutriments varie régulièrement et modifie l'activité des voies d'assimilation nécessitant des électrons.

Lorsque la consommation des électrons est limitante, deux éléments de la chaîne photosynthétique (les transporteurs d'électrons et les centres réactionnels) peuvent jouer un rôle néfaste (Figure 9). En effet, les électrons qui ne sont plus évacués par les enzymes du métabolisme central vont progressivement saturer la chaîne de transport. De la même manière, les centres réactionnels sont bloqués dans leur état excité où les chlorophylles sont très réactives. Dans les deux cas de figures, les électrons ou l'énergie d'excitation sont alors captés par le seul accepteur disponible : le dioxygène (O_2).

Le O_2 est une molécule pouvant recombinaison avec les électrons à faible potentiel redox ($E^\circ < -0,33 \text{ V}$) ou les excédents d'énergie et former des espèces radicalaires, les ROS (Reactive Oxygen Species). Dans la chaîne de transport, la capture d'un électron par le O_2 génère un radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), un oxydant puissant qui endommage les macromolécules biologiques. Au niveau du centre réactionnel du PSII, lorsque le P680 persiste trop longtemps dans son état excité, la paire de chlorophylles se relaxe pour atteindre un état d'excitation intermédiaire : l'état triplet ($^3\text{Chl a}$). Le O_2 peut réagir avec cette forme intermédiaire et en absorber l'excès d'énergie. Il passe alors dans une forme excitée et instable : l'oxygène singulet 1O_2 [78]. Là encore, il s'agit d'une espèce à faible durée de vie qui va principalement oxyder les composants biologiques à proximité immédiate. La protéine D1 est l'un des composants les plus sensibles à ces dégâts oxydatifs qui engendrent une perte progressive des propriétés enzymatiques du PSII (photoinhibition). Dans une moindre mesure, le PSI est également sensible aux fortes pressions d'excitation à cause du P700 car la photoinhibition de son centre réactionnel n'implique pas de réduction du O_2 auquel il est imperméable [79].

2. Mécanismes de protection

Les cyanobactéries font régulièrement face à la production de ces ROS. En tant que pionnières de la photosynthèse oxygénique, elles comptent également parmi les premiers organismes à avoir développé des défenses contre ces espèces. Ces mécanismes sont d'une complémentarité remarquable et interviennent à tous les niveaux de la chaîne photosynthétique (Figure 9).

Au niveau des phycobilisomes, le transfert d'énergie vers le PSII est court-circuité par un mécanisme dit de quenching non-photochimique ou NPQ (Figure 9). Il est essentiellement assuré par l'OCP (Orange Carotenoid Protein), une protéine photoactivable grâce au caroténoïde qu'elle lie. Lorsqu'elle est activée, elle se fixe au phycobilisome et dissipe alors l'énergie lumineuse incidente sous forme de chaleur [80,81]. Il a également été montré que la mobilité des phycobilisomes dans le cytoplasme leur permet de s'associer avec les deux photosystèmes. Lorsque le régime photosynthétique est modifié, ces transitions d'état équilibrent les activités de chaque photosystème et assurent ainsi leur synchronisation [82].

L'activité du PSII est largement tributaire des phycobilisomes et profite donc directement du NPQ. Il possède cependant des mécanismes de photoprotection propres qui améliorent sa résistance à l'oxydation. Son centre réactionnel est notamment entouré de nombreux caroténoïdes qui neutralisent l'oxygène singulet produit par le P680 [83]. De plus la protéine D1, très conservée chez les organismes photosynthétiques, a été sélectionnée pour sa sensibilité oxydative. En effet lorsqu'elle est oxydée, elle est sélectivement dégradée par des protéases photoactivables puis remplacée *de novo* sans nécessiter une déconstruction complète du photosystème [84]. Elle protège donc les autres constituants du complexe au prix d'un turnover élevé. Le PSII possède également un mécanisme de quenching photochimique au niveau du site Q_B. Le dimère de flavoprotéines (Flv2-4) peut s'y fixer pour limiter la réduction des plastoquinones. Il détourne alors les électrons pour réduire un substrat qui pourrait être l'oxygène [85-87].

Le PSI possède également des effecteurs spécifiques pour diminuer la pression d'excitation de son centre réactionnel. A l'instar du PSII et de ses antennes photosynthétiques, les fluctuations d'intensité lumineuse favorise l'association d'un dimère de flavoprotéines (Flv1-3) au PSI [88]. Celui-ci réduit alors le O₂ en H₂O sans produire de ROS [89]. L'exposition à une forte lumière déclenche aussi l'expression de l'opéron *isiAB* (Iron Stress-Induced) codant pour une protéine liant la chlorophylle (IsiA) et la flavodoxine (IsiB), un transporteur d'électron similaire à la ferrédoxine mais utilisant un cofacteur FMN à la place

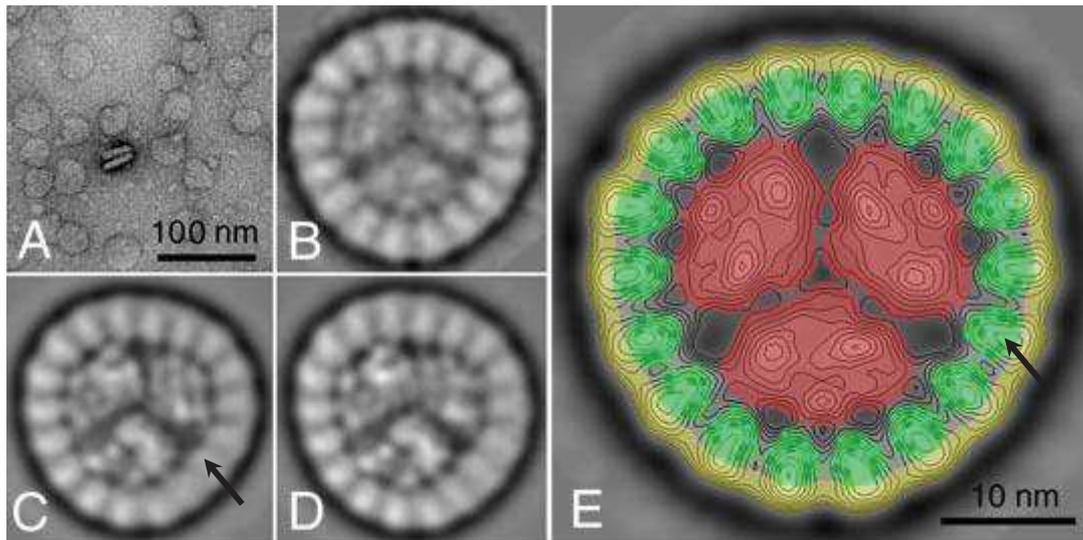


Figure 10 : Microscopie électronique des complexes PSI-IsiA chez *Synechococcus* PCC 7942 (D'après Boekema *et al.*, 2001, Nature [91])

A. Micrographes de complexes isolés;

B-C-D. Projections à une résolution de (A) 22 Å, (B) 14 Å et (C) 15 Å obtenues à partir de 231, 2000 et 2000 images respectivement;

E. Version colorée de (B). Les zones rouges correspondent au PSI trimérique entouré de 18 protéines IsiA (vert). Les points verts et bleus sombres indiquent la position des hélices α transmembranaires et des molécules de chlorophylle respectivement. La zone jaune correspond au détergent environnant.

d'un centre Fe-S [90]. Chaque protéine IsiA, homologue à des sous-unités des centres réactionnels, lie 18 molécules de Chl a et s'oligomérisent pour former de remarquables structures en couronne [91]. Ces anneaux protéiques se complexent alors à des trimères de PSI et en deviennent les antennes principales (Figures 9 et 10). Lorsqu'elles captent des photons, les molécules de chlorophylle liées s'excitent puis se relâchent en produisant de la chaleur [92].

En aval de la chaîne photosynthétique, différentes enzymes réoxydent les transporteurs d'électrons (ferrédoxine, thiorédoxine) et les cofacteurs réduits (NADH et NADPH). Ceci favorise la circulation des électrons ainsi que la relaxation des centres réactionnels excités et limite donc leur recombinaison avec l'oxygène. Le métabolisme central est un contributeur essentiel pour gérer ce pouvoir réducteur. Il sera décrit plus en détails chez *Synechocystis* à la fin de ce chapitre tandis que les grands principes de son fonctionnement et de sa régulation sont abordés dans le chapitre III.

Parfois ces voies métaboliques ne suffisent pas pour évacuer le surplus d'électrons mais il existe d'autres enzymes dédiées à cette fonction. Différentes oxydases membranaires assistent par exemple chaque chaîne de transport d'électrons (respiration et photosynthèse) et peuvent en détourner pour réduire l'oxygène en eau [93].

D'autres enzymes réorientent les électrons vers le pool de plastoquinones et entretiennent un flux cyclique d'électrons (CEF) entre le cytochrome b_6f et le PSI (Figure 9). En plus de contribuer au recyclage des équivalents réduits, cette voie sauvegarde le gradient de protons généré par le cytochrome et donc la synthèse d'ATP. Ce flux cyclique existe de manière constitutive et est essentiel pour la croissance d'*Arabidopsis thaliana* dans les conditions de laboratoire [94]. Il est stimulé par divers stress (oxydatif, osmotique, thermique...) et se décompose en 2 voies : celle utilisant les cofacteurs réduits (NADPH et/ou NADH) et celle utilisant la ferrédoxine. La première est largement dépendante de l'activité FNR (ferrédoxine-NADPH oxydoréductase) réduisant le NADP^+ et est appelée la voie FNR [95]. Elle regroupe des enzymes de la respiration (NDH1, SDH) mais pourrait impliquer un transfert des électrons du NADPH vers les PQ opéré directement par la FNR. La seconde voie utilise la ferrédoxine comme donneur d'électrons et est réalisée par la ferrédoxine-plastoquinone oxydoréductase Pgr5 [96]. L'hydrogénase joue également le rôle de valve à électrons [97] et sa contribution hypothétique au CEF est discutée dans le chapitre IV.

Il arrive cependant que les fluctuations métaboliques soient trop brusques et/ou trop importantes pour être compensées par ces mécanismes et produisent alors des ROS. Le système de détoxification le plus étudié est le relai superoxyde dismutase (SOD)/catalase (Figure 9). La première réduit le radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est ensuite décomposé par la catalase en H_2O et O_2 . Malgré son efficacité, ce système n'empêche pas complètement l'altération des molécules biologiques. Les protéines et leurs thiols (groupements $-SH$ des cystéines) sont particulièrement sensibles à ces oxydations et peuvent facilement perdre leur fonction. Le glutathion (GSH) est un tripeptide Glu-Cys-Gly non-ribosomal assurant l'homéostasie des thiols [98]. Lorsqu'elle est perturbée, le glutathion s'oxyde (Figure 9) et se complexe aux cystéines endommagées pour les protéger d'une suroxydation irréversible [99]. Le GSH réduit est également le cofacteur des glutarédoxines (régénération des thiols glutathionylés) et des GSH peroxydases (détoxification du H_2O_2) et contribue à la tolérance de divers stress métalliques et métaboliques [100,101].

C. La cyanobactérie modèle *Synechocystis* PCC6803

1. Origine et écologie

Synechocystis sp. PCC6803 (abrégée ci-après *Synechocystis*) est une cyanobactérie unicellulaire (entre 1-2 μm de diamètre). Elle a été isolée en 1968 dans un lac d'eau douce en Californie et est disponible dans la collection de l'Institut Pasteur [102]. Son temps de génération en conditions standards du laboratoire (photoautotrophie) est compris entre 10 et 12 heures. C'est une bactérie motile qui, contrairement à d'autres espèces, ne produit pas de toxine. Les cellules de *Synechocystis* sont motiles et peuvent également s'organiser en biofilm via la production d'exopolysaccharides [103]. C'est une cyanobactérie euryhaline pouvant tolérer une salinité équivalente à 2-3 fois celle de l'eau de mer [104,105] ainsi que des pH élevés. Elle est également capable de croître en absence de photosynthèse en utilisant le glucose comme source de carbone et d'énergie mais requiert quelques minutes de lumière bleue tous les jours pour y parvenir. Elle peut aussi produire de l'hydrogène (H_2) grâce à son hydrogénase (voir Chapitre IV) et peut utiliser de nombreuses sources d'azote pour soutenir sa croissance (nitrate, ammonium, urée...). Son uréase, décrite plus précisément dans le chapitre III, lui permet par exemple de produire de l'ammonium à partir d'urée.

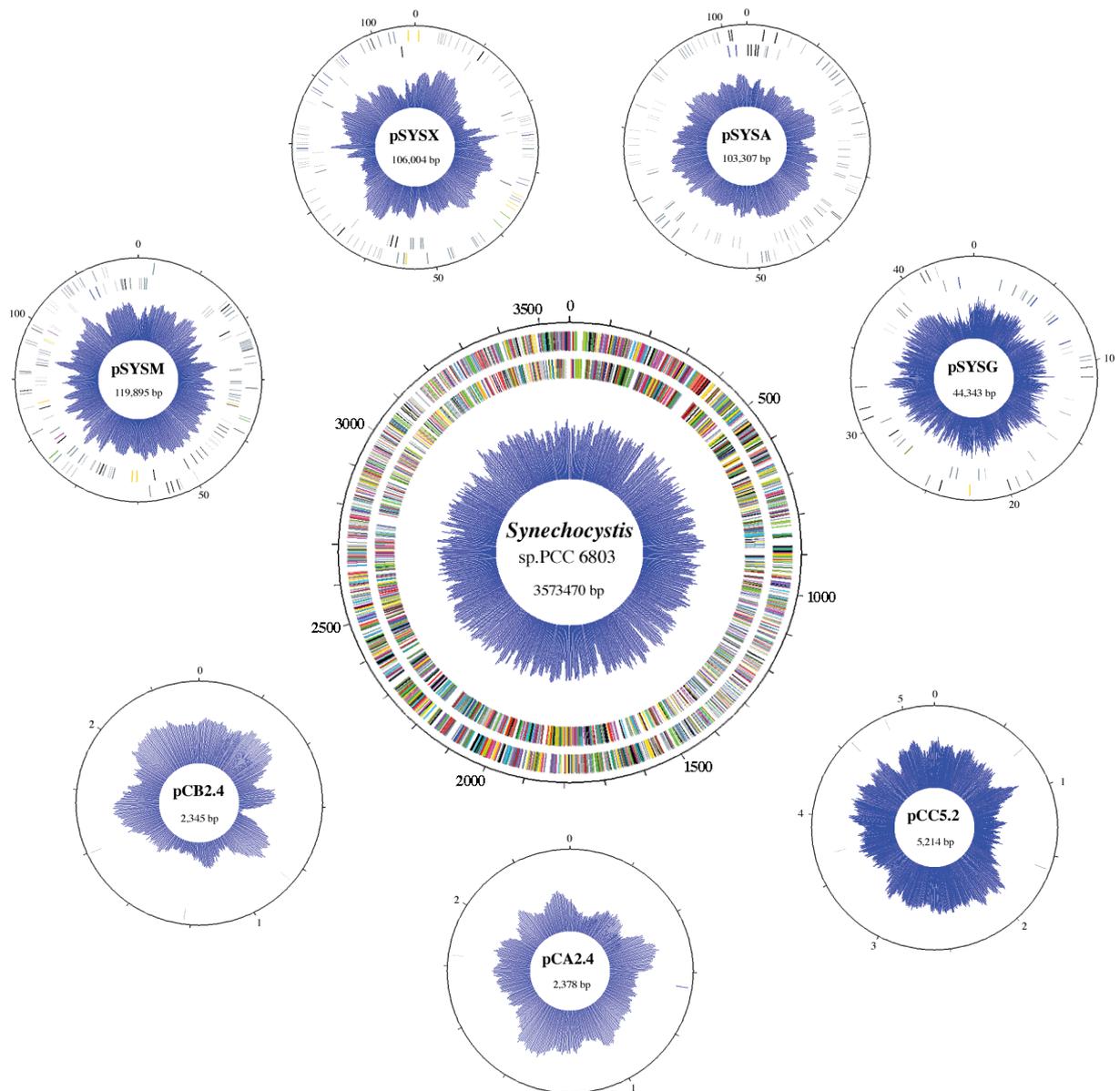


Figure 11 : Représentation du génome de *Synechocystis* sp. PCC 6803 composé d'un chromosome circulaire central et de sept plasmides
 (Source : Cyanobase; <http://genome.annotation.jp/cyanobase/Synechocystis>)

2. Propriétés génétiques et outils développés

Le génome de *Synechocystis* est l'un des premiers séquencés en 1996 [106]. Sa taille est d'environ 4 Mb et comprend un peu moins de 4000 gènes répartis sur un chromosome circulaire (3,57 Mb) et 7 plasmides de 2 à 120 kb (Figure 11). On dénombre approximativement 600 gènes homologues à des gènes de plantes dont 160 codant pour des protéines de fonction inconnue. En phase exponentielle de croissance, le chromosome est présent en 12 copies par cellule mais ce nombre varie selon la phase de croissance [107].

En 1970, Shestakov a montré que *Synechocystis* est naturellement transformable [108]. Cette propriété permet d'introduire des mutations dans le génome (délétion, remplacement de promoteurs, mutations ponctuelles...) de manière efficace par recombinaison homologue [107,109,110]. D'autres outils génétiques, notamment des vecteurs réplicatifs [111,112], ont été développés au laboratoire ou adaptés pour exprimer des gènes de différentes manières chez *Synechocystis* [113]. Ces systèmes d'expression peuvent par exemple reposer sur des promoteurs phagiques forts (surexpression), parfois associés à des systèmes de régulation (expression conditionnelle ou constitutive) ainsi que des sites de clonage générant des fusions de gènes (double-hybride bactérien, étude de localisation...).

3. De l'étude de la photosynthèse aux applications industrielles

Les gènes codant pour des protéines essentielles à la photosynthèse ne peuvent pas être délétés dans les espèces photoautotrophes strictes. Initialement, *Synechocystis* fut utilisée comme modèle d'étude de ce processus grâce à sa faculté de croître en hétérotrophie [114-116]. Rapidement, les outils de manipulation génétique furent mis au point et contribuèrent à l'étude approfondie des photosystèmes. *Synechocystis* devint alors logiquement le modèle d'étude des cyanobactéries unicellulaires.

Plus tard, cette compréhension du métabolisme de *Synechocystis* lui donna un intérêt nouveau vis-à-vis des tendances en biotechnologies. En effet, au-delà d'être aisément manipulable, elle possède un potentiel biotechnologique important.

Synechocystis synthétise naturellement divers métabolites ayant un intérêt pour les sociétés humaines. Elle est par exemple capable d'accumuler des granules intracellulaires de poly- β -hydroxybutyrate (PHB), en particulier lors de carences nutritives. Après extraction, ces PHB peuvent être transformés en plastiques biodégradables. Elle produit également de

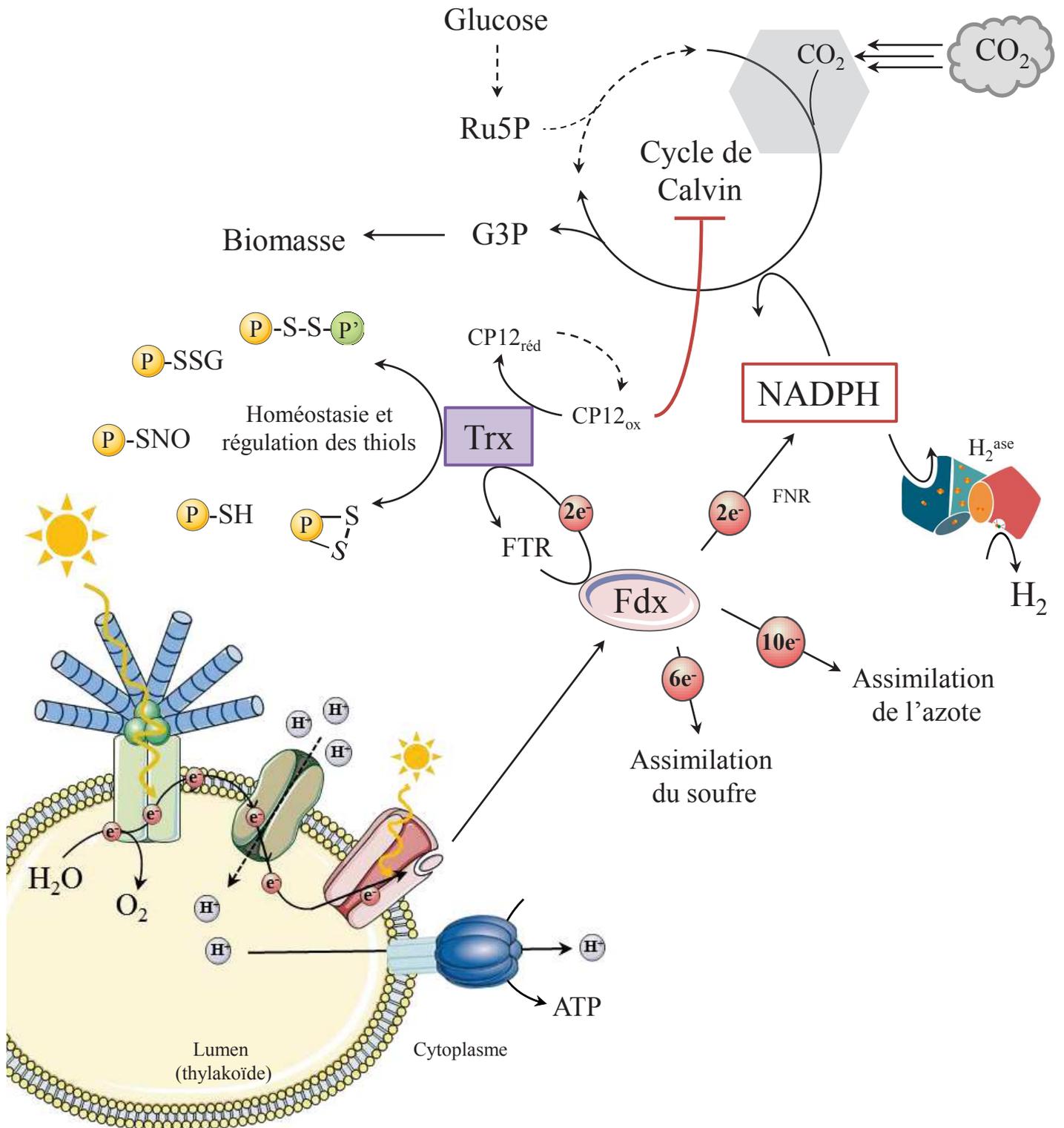


Figure 12 : Le métabolisme central chez *Synechocystis*.

Fdx = Ferrédoxine; Trx = Thiorédoxine; CP12_{réd/ox} = CP12 réduite/oxydée; P-SX = Modification post-traductionnelle des cystéines (-SH = réduit; -S-S- = Pont disulfure intra- et intermoléculaire; -SSG = glutathionylation; -SNO = nitrosylation); FTR = Ferrédoxine-thiorédoxine réductase; FNR = Ferrédoxine-NADP⁺ réductase; H₂^{ase} = Hydrogénase; Ru5P = Ribulose-5-phosphate; G3P = Glycéraldéhyde-3-phosphate

petites molécules ou peptides qui présentant des activités antioxydantes, antivirales voire même anticancéreuses [117-119]. Enfin, elle synthétise de nombreuses molécules très énergétiques envisagées comme alternative aux énergies fossiles.

Parmi elles, on trouve des terpènes (précurseurs des pigments photosynthétiques) mais aussi du H₂, produit et substrat de l'hydrogénase dont le fonctionnement et le rôle sont décrits dans le chapitre IV. Les approches de biologie synthétique permettent également de lui faire produire divers alcools comme l'éthanol, le butanol ou l'isobutanol.

Or la synthèse de tous ses composés intervient dans un métabolisme utilisant seulement de la lumière, du CO₂, de l'eau et des minéraux et produit une biomasse facilement valorisable. Etant donné les limitations auxquelles font face les biotechnologies actuelles (décrites dans le chapitre II), ces propriétés trophiques sont éminemment intéressantes dans le cadre des biotechnologies de 3^{ème} génération. Il serait cependant imprudent de considérer que l'ingénierie de tels métabolismes sera aisée. Nous disposons aujourd'hui de nombreux outils pour éditer les génomes et altérer les flux métaboliques. Mais les cyanobactéries modernes sont le fruit de presque 3 milliards d'années d'évolution et leur métabolisme est de ce fait contrôlé et coordonné par des systèmes de régulation extrêmement complexes. Cette robustesse repose notamment sur l'existence de mécanismes de réparation de l'ADN et de recombinaison qui éliminent efficacement les mutations fragilisant cette architecture métabolique.

D. Le métabolisme central

Chez *Synechocystis*, la ferrédoxine réduite est la source d'électrons de nombreuses enzymes. La ferrédoxine-thiorédoxine réductase (FTR) l'utilise pour réduire les thiorédoxines qui assurent une large partie de la régulation métabolique par les thiols [120]. Un exemple de ce type (régulation du cycle de Calvin) est détaillé dans le chapitre III. Elle fournit également du pouvoir réducteur aux voies d'assimilation de l'azote et du soufre (Figure 12). La réduction du sulfite (SO₃²⁻) en soufre assimilable (S²⁻) est réalisée par la sulfite réductase et requiert 6 électrons. La réduction du nitrate (NO₃⁻) en ammonium (NH₄⁺) fait intervenir la nitrate réductase (NarB) et la nitrite réductase (NirA) qui consomment respectivement 2 et 6 électrons. 2 électrons supplémentaires sont requis par la glutamate synthase pour produire du glutamate à partir d'ammonium.

Une grande partie de la ferrédoxine réduite est également oxydée par la FNR pour produire du NADPH (Figure 12), cofacteur de nombreuses réactions. Il est par exemple utilisé dans la chaîne de biosynthèse des PHB, les mécanismes d'import de CO₂ ou ceux de la détoxification des ROS dont l'hydrogénase. Le principal consommateur de NADPH est le cycle de Calvin, au cours duquel le CO₂ est incorporé dans des squelettes carbonés. C'est grâce à cette voie que les cyanobactéries sont autotrophes. Pour produire une molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P), le cycle consomme 6 molécules de NADPH, soit 12 électrons. L'enzyme correspondante (Gap2) est l'isoforme anabolique de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase glycolytique (Gap1) et sera davantage décrite dans le chapitre suivant.

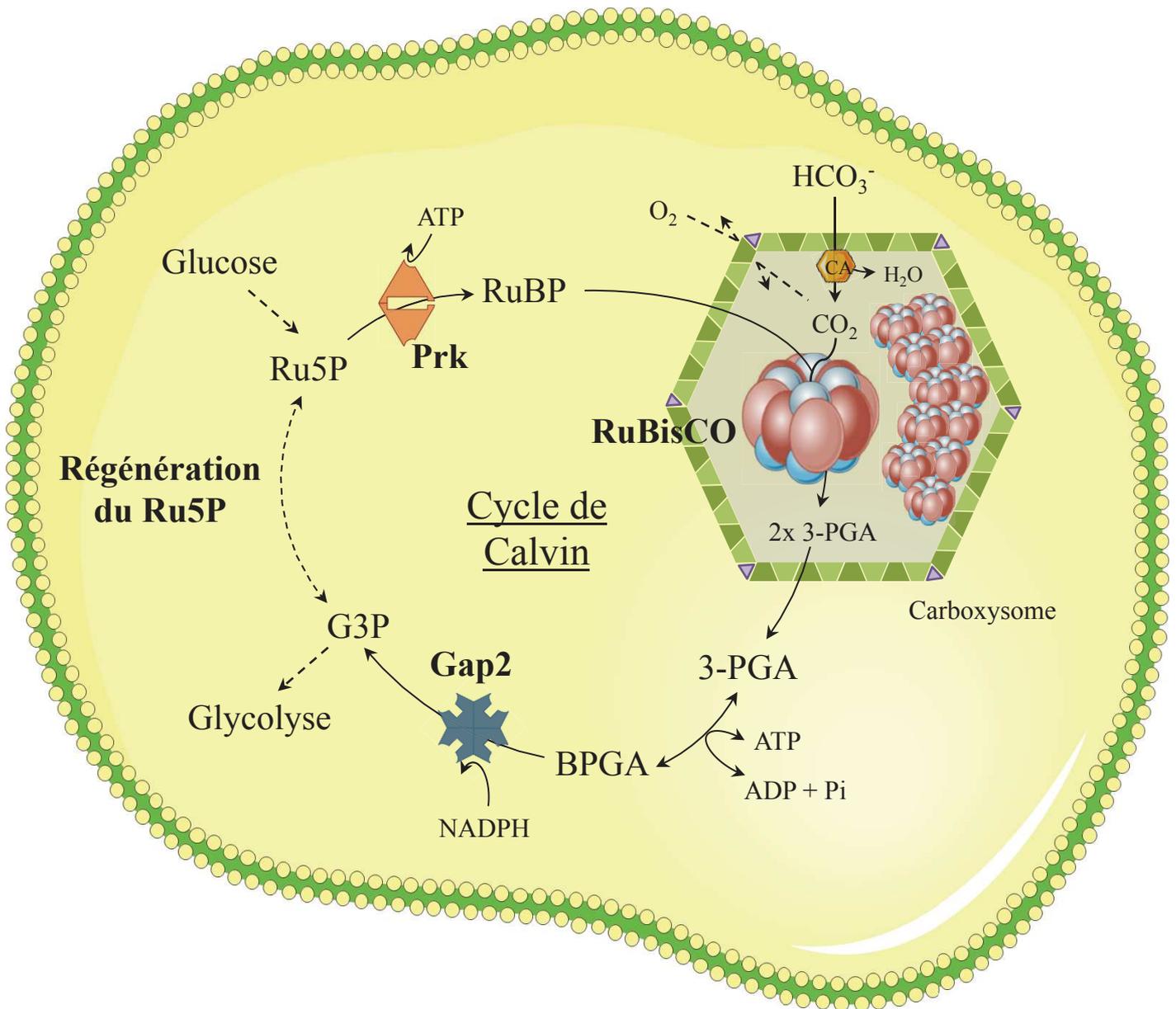


Figure 13 : Le cycle de Calvin-Benson-Bassham.

Les trapèzes vert représentent la coque protéique du carboxysome, imperméable à l'oxygène et au CO_2 , dont les coins (triangles violets) sont comblés par une protéine spécifique. Ce compartiment contient des carbonates anhydrases (hexagone orange) et est très riche en RuBisCO (L_8S_8) dont les grandes et petites sous-unités sont illustrées par des ellipses rouges et sphères bleues respectivement.

Ru5P = Ribulose-5-phosphate; RuBP = Ribulose-1,5-bisphosphate; 3-PGA = 3-phosphoglycérate; BPGA = Biphosphoglycérate; G3P = Glycéraldéhyde-3-phosphate; PRK = Phosphoribulokinase; CA = Carbonate anhydrase; RuBisCO = Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase; Gap2 = Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

Chapitre III

La balance carbone/azote, équilibre vital mais fragile

Comme vu précédemment, les flux métaboliques peuvent être ajustés en réponse à une production accrue ou diminuée d'électrons. Ils sont également coordonnés les uns par rapport aux autres pour satisfaire au mieux la demande métabolique pour chaque élément (carbone, azote, soufre...). Le maintien de l'équilibre entre carbone et azote organiques (balance C/N) est essentiel dans tout organisme vivant et particulièrement chez les organismes photosynthétiques. Il correspond à un état où composés carbonés et azotés sont produits en quantités optimales pour la croissance. Ainsi, lorsque ce ratio est modifié, la croissance peut être sévèrement perturbée. Au cours de ce chapitre, je décrirai dans un premier temps les voies gouvernant les flux de carbone organique chez *Synechocystis* ainsi qu'un exemple de régulation de la voie anabolique (cycle de Calvin). Dans un deuxième temps, je détaillerai le métabolisme de l'azote de cette cyanobactérie ainsi que les mécanismes de réponse au déséquilibre C/N le plus fréquent : la carence d'azote.

A. La voie anabolique : le cycle de Calvin et sa régulation

Le cycle de Calvin-Benson-Bassham (ou cycle de Calvin) est la voie majeure d'assimilation du CO₂ par les organismes autotrophes. Il s'agit du principal pourvoyeur de squelettes carbonés alloués à la production de biomasse et de métabolites secondaires. En tant que tel, le cycle de Calvin est la porte d'entrée du carbone minéral qui aujourd'hui fait des cyanobactéries des candidats prometteurs pour les biotechnologies de troisième génération. Les différentes réactions qui le composent impliquent des sucres très différents (trioses, tétroses, pentoses, hexoses et heptoses) et peuvent être regroupées en quatre étapes majeures (Figure 13) :

- Production de ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) par la PRK
- Carboxylation du RuBP par la RuBisCO et production de 3-phosphoglycérate (3-PGA)
- Conversion du 3-PGA en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) par la GAPDH
- Régénération du ribulose-5-phosphate (Ru5P)

1. Les enzymes majeures du cycle

a. La phosphoribulokinase (PRK)

Les PRK sont retrouvées dans différents organismes (cyanobactéries, bactéries sulfureuses pourpres, archées ou eucaryotes) et sont généralement réparties en deux classes : les PRK des procaryotes et des eucaryotes [121]. Cette classification est néanmoins ambiguë puisque la PRK des cyanobactéries est apparentée à celle des Eucaryotes. Dans ces organismes, elle fonctionne sous forme oligomérique dont la stœchiométrie est variable et n'a jamais été déterminée chez *Synechocystis* [122-124]. Chez cette dernière, la PRK est une protéine de 38 kDa codée par le gène *sll1525*. C'est une enzyme soluble qui serait localisée à proximité des thylakoïdes [125]. Elle consomme de l'ATP pour phosphoryler le Ru5P en RuBP (Figure 13). Son activité est régulée par deux effecteurs allostériques, le NADH (activateur) et l'AMP (inhibiteur), qui sont en compétition pour occuper le site de fixation [126]. Elle possède également 2 cystéines (Cys19 et Cys41) qui correspondent aux cystéines régulatrices (Cys16 et Cys55) de la PRK de l'épinard [127]. Dans cet eucaryote photosynthétique, l'état d'oxydation de ces cystéines est régulé par la thiorédoxine via le système FTR [128]. En conditions oxydantes, elles forment un pont disulfure inhibant l'activité de l'enzyme qui peut être restaurée *in vitro* par ajout d'un composé réduisant les thiols, le dithiothréitol ou DTT [129-131]. Chez les cyanobactéries, cette régulation intrinsèque est absente *in vivo* à cause du fort espacement des cystéines [132,133]. Cette observation provient de modèles structuraux de PRK cyanobactériennes pour lesquelles il n'existe aucune structure publiée et reste à confirmer [134]. Actuellement, le seul mécanisme connu de régulation de l'enzyme chez les cyanobactéries repose sur l'interaction avec la protéine CP12 décrite plus tard dans ce chapitre.

b. La Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygénase (RuBisCO)

La RuBisCO est une enzyme multimérique composée de 8 grandes et 8 petites sous-unités (Figure 13). La grande sous-unité (RbcL, L pour Large) de 52,4 kDa est codée par le gène *slr0009* tandis que la petite (RbcS, S pour Small) de 13 kDa, est codée par le gène *slr0012*. Chez *Synechocystis*, ces gènes sont regroupés au sein de l'opéron *rbc* (ou *cbb*) qui comprend également les gènes codant pour les chaperones et protéines accessoires nécessaires à l'assemblage et au fonctionnement de la RuBisCO (pour revue [135]).

La RuBisCO catalyse la carboxylation du RuBP pour produire deux molécules de 3-PGA. Elle possède deux caractéristiques intrinsèques qui limitent l'assimilation du CO₂. Premièrement, sa constante catalytique est l'une des plus faible connue ($k_{cat} \approx 3 \text{ s}^{-1}$). Cet inconvénient est compensé par la production d'une grande quantité de RuBisCO pour en augmenter l'efficacité dans les plantes et les chloroplastes. On considère que c'est l'enzyme la plus abondante sur Terre [136]. Deuxièmement, la faible spécificité de la RuBisCO ne permet pas de discrimination entre CO₂ et O₂ lors de la catalyse. Lorsque le O₂ est utilisé comme substrat (activité oxygénase) la réaction produit une molécule de 3-PGA et une molécule de 2-phosphoglycolate (2-PG). Le 2-PG est un composé toxique qui inhibe certaines enzymes du métabolisme du carbone comme la triose phosphate-isomérase ou la phosphofructokinase [137,138]. Aux concentrations normales de l'air, le rapport entre les activités carboxylase/oxygénase est d'environ 4/1.

Pour limiter la production de 2-PG, les cyanobactéries ont développé un système sophistiqué d'encapsulation de la RuBisCO au sein de carboxysomes (pour revue [139,140]). Ces compartiments protéiques sont partiellement imperméables à la fois au O₂ et au CO₂. L'enveloppe comporte cependant des transporteurs et des anhydrases carboniques qui respectivement, importent du HCO₃⁻ et le déshydratent en CO₂ qui s'y trouve alors piégé et concentré (Figure 13). L'intérieur du compartiment est quant à lui extrêmement riche en RuBisCO, au point que les enzymes y sont immobilisées dans un état paracristallin [141]. Le carboxysome est donc un nano-environnement riche en RuBisCO et en CO₂ qui favorise l'activité carboxylase de l'enzyme. Il arrive malgré tout que du 2-PG soit produit et celui-ci est éliminé par les processus de photorespiration (cytoplasmiques) qui diffèrent sensiblement entre cyanobactéries et plantes (pour revue [142]). Chez *Synechocystis*, la photorespiration est essentielle à la viabilité cellulaire en photoautotrophie [143].

c. La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH)

La GAPDH du cycle de Calvin (Gap2) est une isoforme de la GAPDH glycolytique (Gap1, encodée par le gène slr0884) chez *Synechocystis* [144]. Elle est codée par le gène sll1342 dont le promoteur est régulé par l'activité photosynthétique [145]. Gap2 est une enzyme homotétramérique (1 monomère = 36,5 kDa) dont la stœchiométrie est conservée entre cyanobactéries et eucaryotes photosynthétiques. Chez les plantes terrestres cependant, il existe en plus une isoforme chloroplastique (GapB) possédant une extension C-terminale [146]. Cette extension est issue d'une fusion des gènes codant pour GapA (l'homologue de

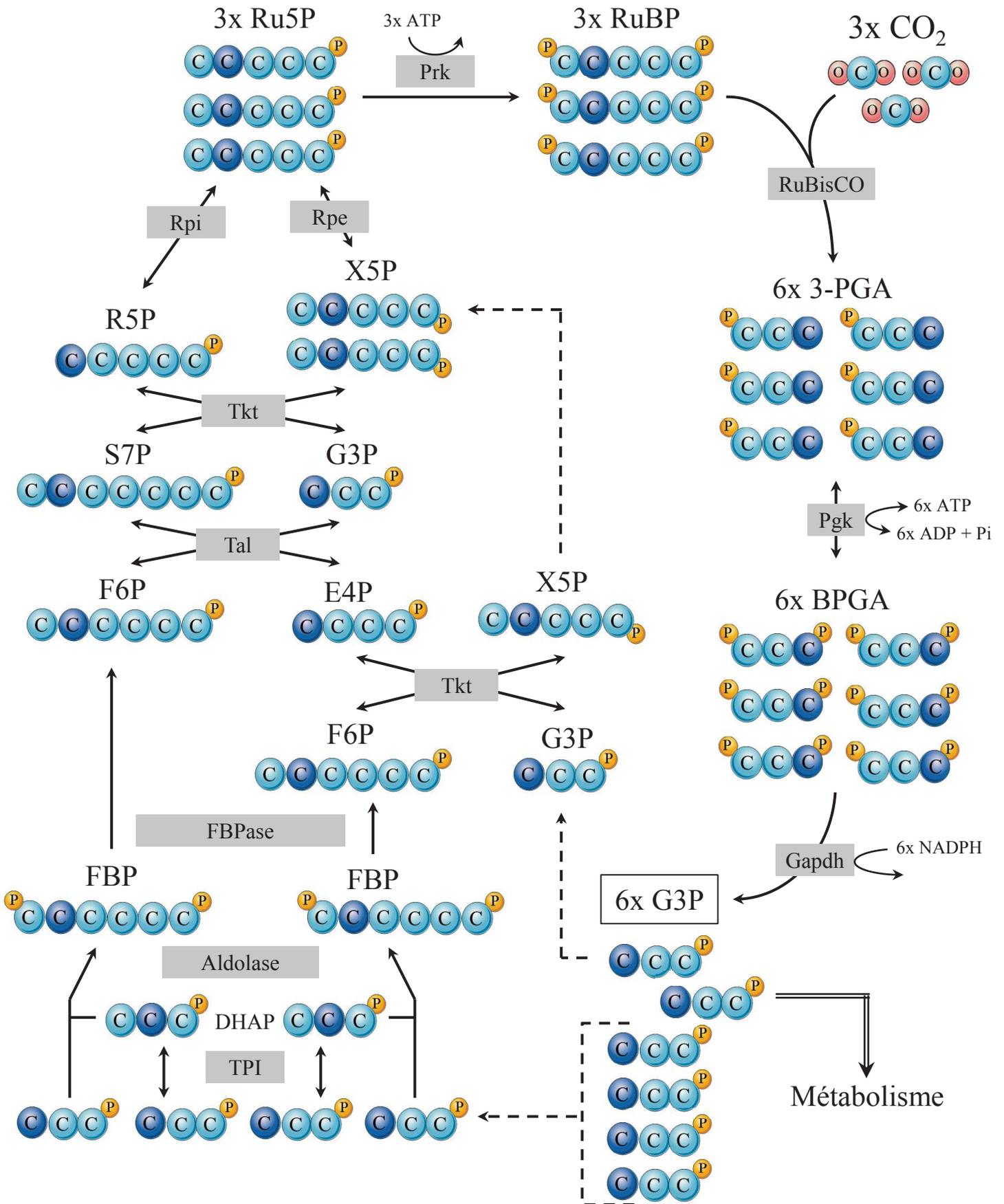


Figure 14 : Les sucres du cycle de Calvin et de la phase de régénération du Ru5P

Les sphères bleues foncées indiquent la position de la double liaison C=O dans chaque sucre. Les sphères jaunes illustrent la position du groupement phosphate. Les différentes enzymes sont nommées dans les rectangles gris.

Gap2) et CP12 (un régulateur de l'enzyme qui sera décrit en détails dans ce chapitre). Il permet à GapB de s'autoréguler en fonction de l'état redox du chloroplaste. La GAPDH des cyanobactéries est soluble mais serait, comme PRK, proche des thylakoïdes *in vivo* [125].

Lorsqu'elle est purifiée, Gap2 est une enzyme bidirectionnelle qui convertit le BPGA en G3P (et inversement) en utilisant soit du NADP(H) soit du NAD(H) [144]. Elle est cependant favorisée dans le sens anabolique *in vivo* (Figure 13) par association à un petit inhibiteur de faible poids moléculaire [147].

d. Régénération du ribulose-5-phosphate (Ru5P)

Après carboxylation du RuBP et production de G3P par Gap2, le substrat du cycle (Ru5P) doit être régénéré. Cette étape implique des réarrangements de sucres les uns avec les autres via des enzymes fonctionnant en série. Lorsque 3 molécules de RuBP sont carboxylées par la RuBisCO, le cycle produit 6 molécules de G3P dont une correspond au gain net de carbone organique (Figure 14). Les 5 restantes sont utilisées pour régénérer le Ru5P.

Tout d'abord, 2 d'entre elles sont isomérisées par la triose-phosphate isomérase (Tpi) en dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Ces 2 molécules de DHAP ainsi que 2 autres G3P sont ensuite consommés par la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (aldolase) pour produire 2 molécules de fructose-1,6-bisphosphate (FBP). Ces 2 hexoses sont ensuite déphosphorylés par la fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) pour produire du fructose-6-phosphate (F6P). Un F6P et le dernier G3P subissent alors une transcétolisation opérée par la transcétolase (Tkt) et produisent de l'érythrose-4-phosphate (E4P) et du xylulose-5-phosphate (X5P). L'E4P et le F6P restant sont alors utilisés par la transaldolase (Tal) pour produire du sédoheptulose-7-phosphate (S7P) et du G3P. La transcétolase Tkt prend à nouveau ces substrats en charge pour synthétiser du ribose-5-phosphate (R5P) et une seconde molécule de X5P. Enfin, ces pentoses sont respectivement isomérisés en Ru5P par la R5P isomérase (Rpi) et la Ru5P épimérase (Rpe). Ainsi, cette étape complexe permet de boucler le cycle de Calvin en évitant la perte de carbone incorporé par la RuBisCO (régénération de 3 pentoses à partir de 5 trioses). Les caractéristiques des enzymes de cette étape sont présentées dans le tableau 1.

Figure 14 (suite) : Les sucres du cycle de Calvin et de la phase de régénération du Ru5P

Ru5P = Ribulose-5-phosphate; RuBP = Ribulose-1,5-bisphosphate; 3-PGA = 3-phosphoglycérate; BPGA = Bisphosphoglycérate; G3P = Glycéraldéhyde-3-phosphate; DHAP = Dihydroxyacétone phosphate; FBP = Fructose-1,6-bisphosphate; F6P = Fructose-6-phosphate; X5P = Xylulose-5-phosphate; E4P = Erythrose-4-phosphate; S7P = Sedoheptulose-7-phosphate; R5P = Ribose-5-phosphate; P_{gk} = Phosphoglycérate kinase; TPI = Triose phosphate isomérase; FBPase = Fructose-1,6-bisphosphatase; Tkt = Transcétolase; Tal = Transaldolase; Rpi = Ribose-5-phosphate isomérase; Rpe = Ribulose-5-phosphate épimérase

Tableau 1 : Caractéristiques des enzymes impliquées dans la régénération du Ru5P.

Enzyme	Gène	PM (kDa)	Etat oligomérique	Substrat(s)	Produit(s)	Références
Tpi	slr0783	26,2	ND	G3P/DHAP	DHAP/G3P	[148]
Aldolase (classe I)*	slr0943	33	Dimérique	DHAP + G3P	FBP	[149]
Aldolase (classe II)*	slI0018	39	Octamérique	DHAP + G3P	FBP	[149]
FBPase (classe I)*	slr2094	38,3	Tétramérique	FBP/SBP	F6P/S7P	[150-152]
FBPase (classe II)*	slr0952	29	ND	FBP/SBP	F6P/S7P	[150]
Tal	slr1793	43,1	ND	E4P + F6P	S7P + G3P	[153,154]
Tkt	slI1070	71,7	ND	F6P + G3P S7P + G3P	E4P + X5P R5P + X5P	[155]
Rpi	slr0194	24,8	Dimérique	R5P	Ru5P	[155,156]
Rpe	slI0807	25	Hexamérique	X5P	Ru5P	[157]

* Chez les cyanobactéries, l'aldolase et la FBPase ont un spectre de substrat plus large que leurs homologues des organismes hétérotrophes. Ainsi, l'aldolase de *Synechocystis* peut combiner la DHAP avec du E4P pour produire du sédoheptulose-1,7-bisphosphate (SBP) qui peut être déphosphorylé par la FBP/SBPase pour produire du S7P (voir Figure 19).

2. Régulation générale du cycle de Calvin

Le cycle de Calvin occupe une place primordiale dans le métabolisme central et en est probablement la voie la plus active chez *Synechocystis*. Son fonctionnement repose sur un approvisionnement adéquat de ses substrats (CO₂, pouvoir réducteur et ATP) et est donc fortement dépendant de l'activité photosynthétique et de l'import de CO₂ dans la cellule puis dans le carboxysome. Réciproquement, lorsque le métabolisme est perturbé, son activité est rapidement ajustée soit pour empêcher l'épuisement des substrats énergétiques soit au contraire pour favoriser leur recyclage. Typiquement, lorsque les cellules subissent un stress oxydant, il devient un acteur déterminant pour évacuer les électrons de la chaîne de transport photosynthétique.

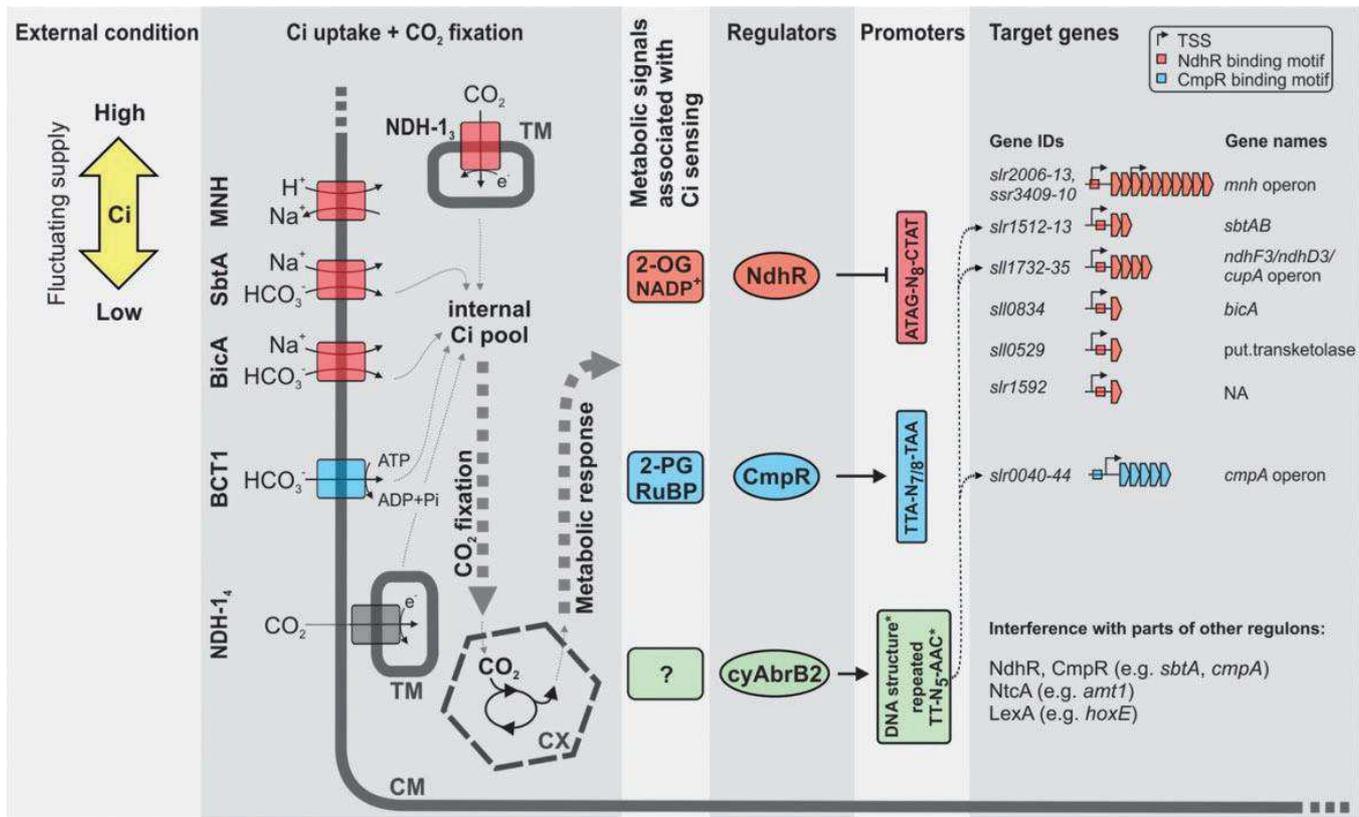


Figure 15 : Les mécanismes de concentration du CO_2 et leur régulation chez *Synechocystis*.
(Extrait de Orf *et al.*, 2016, Plant Cell Physiol [165])

Le carbone inorganique (Ci) est importé dans le cytoplasme par différents transporteurs et est incorporé aux squelettes carbonés dans le carboxysome. Lorsque son abondance diminue, différents métabolites comme l'oxoglutarate (2-OG), le phosphoglycolate (2-PG, photorespiration) et le ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) s'accumulent. Ils se fixent à des facteurs de transcriptions comme NdhR ou CmpR et active l'expression de gènes impliqués notamment dans l'import du Ci .

Par conséquent, la régulation du cycle de Calvin ne peut pas être simplement circonscrite aux enzymes qui le composent et aux gènes qui les codent. Elle s'apparente davantage à un réseau complexe qui couvre plusieurs processus métaboliques interdépendants. Ainsi, la photosynthèse et les mécanismes de concentration du carbone (CCM) conditionnent l'activité du cycle qui, en retour, contribue à leur bon fonctionnement. Ces régulations peuvent être transcriptionnelles, post-traductionnelles ou allostériques et assurent une coordination optimale du métabolisme photoautotrophe.

Au niveau de la photosynthèse, lorsque la fixation du CO₂ est altérée (mutagenèse, limitation en CO₂...), la chaîne de transport des électrons est rapidement saturée. Les mécanismes de photoprotection et de détoxification des ROS décrits dans le chapitre II sont alors activés. Ils protègent les photosystèmes et les protéines de l'oxydation et permettent ainsi de restaurer rapidement les flux métaboliques lorsque le stress prend fin.

Les composants du CCM sont également régulés par différents éléments (Figure 15). Chez *Synechocystis*, on dénombre 3 régulateurs transcriptionnels dont l'activité est contrôlée par allostérie (CmpR, NdhR et RbcR). Leurs effecteurs sont des signaux métaboliques qui traduisent en temps réel l'activité du cycle de Calvin (pour revue [158]). Brièvement, CmpR est un activateur transcriptionnel de l'opéron *cmpABCD* codant pour un transporteur actif de bicarbonate HCO₃⁻ [159]. Son activité est stimulée par le 2-PG et le RuBP, susceptibles de s'accumuler lorsque le CO₂ se raréfie [160]. NdhR est quant à lui un répresseur transcriptionnel de gènes dispersés sur le chromosome de *Synechocystis* codant notamment pour des symporteurs Na⁺/HCO₃⁻ et un transporteur de CO₂ à haute affinité [161,162]. Il possède deux co-répresseurs, le NADP⁺ (produit par le cycle de Calvin) et l' α -cétoglutarate (α -KG) qui est temporairement épuisé lorsque la teneur en CO₂ diminue [163]. Enfin, RbcR est un activateur transcriptionnel de l'opéron *rbc* encodant entre autres les sous-unités de la RuBisCO et est encore peu étudié car essentiel à la croissance en photoautotrophie [161]. Chez certaines algues rouges, son activité est stimulée par le RuBP, le 3-PGA et peut être également par le NADPH [164]. Il existe d'autres régulateurs impliqués dans le CCM comme AbrB2 [165] ou encore LexA, un régulateur essentiel à la viabilité cellulaire en photoautotrophie mais dont la fonction est indépendante du métabolisme de l'ADN [166]. De manière générale, la croissance des mutants de délétion du CCM est altérée en présence de fortes intensités lumineuses ou lorsque le CO₂ est peu abondant [161,167].

3. CP12, régulateur majeur de l'activité du cycle

Le cycle de Calvin est davantage régulé aux niveaux métabolique et post-traductionnel que transcriptionnel [168]. La régulation métabolique du cycle a déjà été évoquée à travers l'action des différents effecteurs allostériques qui contrôlent par exemple les activités PRK et RuBisCO. Les enzymes du cycle disposent néanmoins d'un niveau de régulation supplémentaire basé sur les cystéines. Lorsque l'état redox intracellulaire varie, les thiols oxydés deviennent les cibles de modifications post-traductionnelles [169]. Elles peuvent typiquement être glutathionylées [99] ou former des ponts disulfure intra- et intermoléculaires. La réactivité des thiols offre un mode de régulation dynamique et réversible qui connecte en permanence les enzymes au métabolisme. Chez les organismes réalisant la photosynthèse oxygénique, cette coordination est notamment assurée par une petite protéine à 4 cystéines (CP12) qui peut piéger et inhiber plusieurs enzymes (PRK et Gap2) en les agrégeant au sein d'un large complexe supramoléculaire.

a. Caractéristiques

Chez les plantes, l'existence de complexes supramoléculaires comprenant à la fois la GAPDH et la PRK a été reportée en 1991 [130,170]. Plus tard, un troisième partenaire indispensable à la formation du complexe a été identifié chez le pois [171] et correspond à une protéine chloroplastique nommée CP12 (12 kDa Chloroplastic Protein). Rapidement, il apparaît que le gène *cp12* possède de nombreux homologues dans d'autres organismes photosynthétiques et notamment les cyanobactéries [172].

De récentes analyses phylogénétiques ont montré que ce gène était présent dans la quasi-totalité des cyanobactéries [173] à l'exception de UCYN-A, un endosymbiote cyanobactérien [174]. Certaines espèces possèdent même jusqu'à 5 copies du gène dans leur génome ce qui est aussi fréquemment le cas chez les plantes terrestres [175].

CP12 est une petite protéine dont la longueur est généralement comprise entre 70 et 80 acides aminés pour un poids moléculaire d'environ 8,3 kDa. Elle présente un profil de migration électrophorétique anormal (poids apparent de 12 ou 17 kDa sur gel SDS-PAGE si la protéine est oxydée ou réduite respectivement). Ceci s'explique par la présence de nombreux résidus chargés qui interagissent avec le maillage des gels de polyacryamide et ralentissent la migration. Ce biais est caractéristique des protéines intrinsèquement désordonnées ou IDP [176]. *In vivo*, cette hydrophilie empêche effectivement CP12 d'acquies des structures secondaires (point isoélectrique = 4,13 ; charge nette = -12,7).

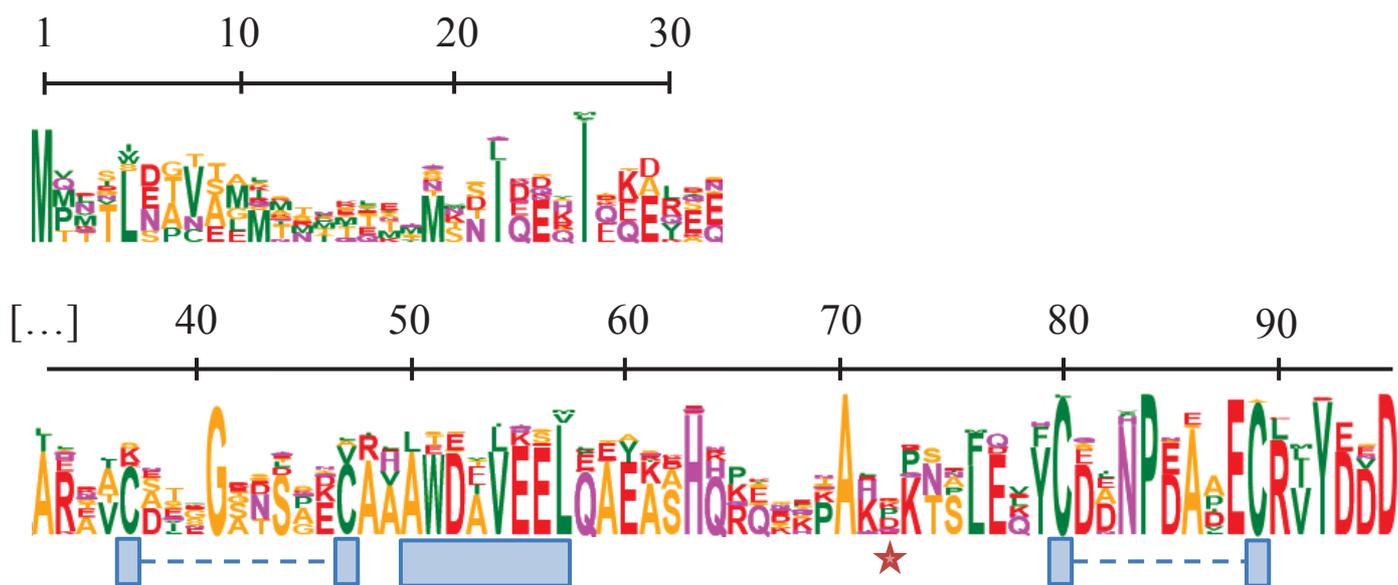


Figure 16 : Conservation des résidus dans les protéines CP12 de cyanobactéries.

La représentation en logo de séquence a été obtenue à partir de 155 séquences de protéines CP12 issues du portail JGI. La taille des lettres est proportionnelle à la fréquence de chaque acide aminé à la position correspondante. La nature des résidus est indiquée par les couleurs jaune (petits acides aminés non-polaires), vert (hydrophobes), magenta (polaires) et rouges (chargés positivement et négativement). Les résidus impliqués dans le mécanisme de régulation sont mis en évidence par les rectangles bleus. Les ponts disulfures formés par les paires de cystéines sont indiqués par les pointillés bleus. L'étoile rouge correspond au résidu T52 phosphorylable chez *Synechocystis* [316].

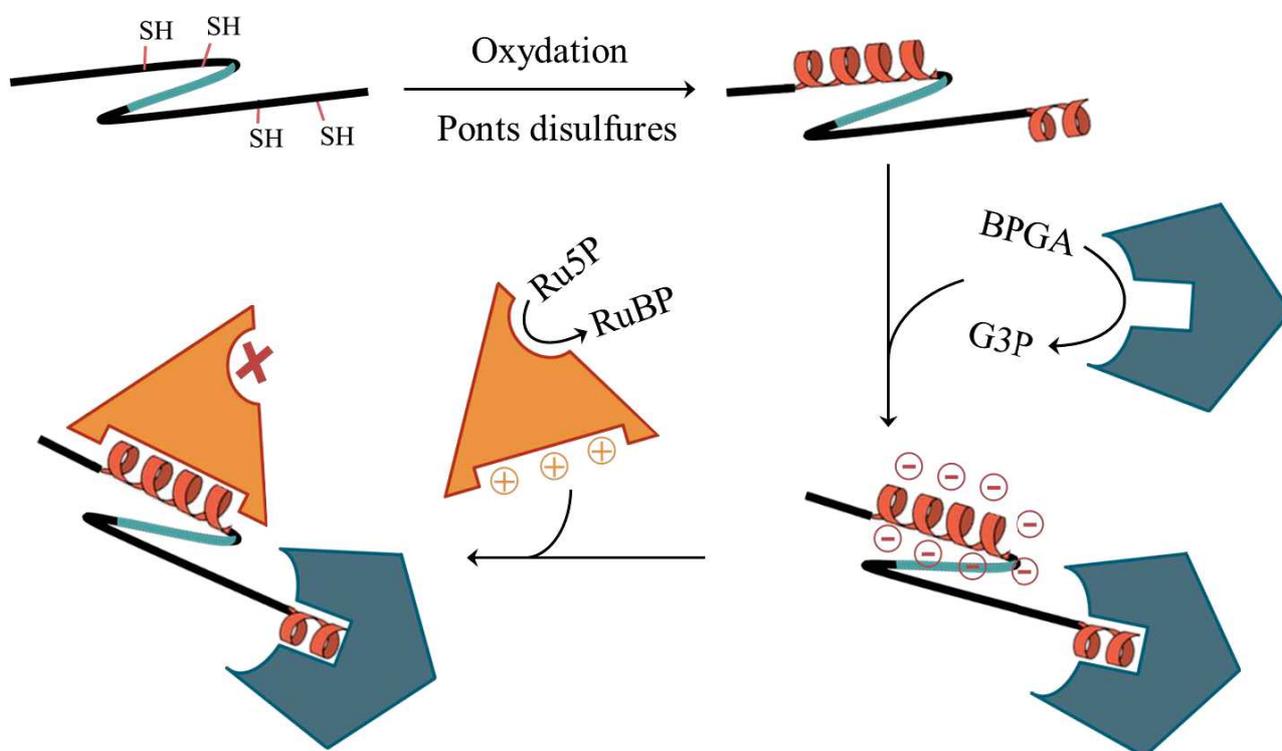


Figure 17 : Mécanisme d'inhibition de PRK et GAPDH par CP12 chez les cyanobactéries.

Lorsque les thiols (-SH) s'oxydent, ils forment des ponts disulfures puis des hélices α (spiraes rouges). L'hélice C-terminale s'insère dans le site actif de la GAPDH (bleue) et génère un environnement riche en charges négatives. La PRK (orange) est alors recrutée par interaction électrostatique avant de s'associer à l'hélice N-terminale.

Le désordre est une propriété commune dans les protéomes et peut concerner seulement une partie de la protéine (par exemple un domaine) ou comme dans le cas de CP12, l'intégralité du polypeptide [178]. Ces régions peuvent être la cible de modifications post-traductionnelles favorisant l'acquisition d'une structure régulatrice de manière temporaire. L'exemple le plus connu est la modification des histones (pour revue [179]). Grâce à leur flexibilité, elles peuvent aussi favoriser aussi l'interaction avec de multiples partenaires à l'aide d'un nombre réduit de résidus. Cette propriété dite de « moonlighting » repose précisément sur leur faculté d'adopter de nombreuses conformations [180]. Cependant, l'absence de structure secondaire stable est un compromis qui rend généralement ces protéines plus susceptibles à la protéolyse.

Chez les cyanobactéries, le désordre intrinsèque de CP12 est à la base de son mécanisme de régulation qui implique des résidus très conservés : 2 paires de cystéines (une dans la région N-terminale, l'autre à l'extrémité C-terminale) ainsi qu'une succession très conservée de 7 résidus (AWDXVEEL) au centre de la séquence primaire [173] (Figure 16). Il a également été montré qu'elle pouvait être phosphorylée au niveau de la thréonine 52 chez *Synechocystis* mais son rôle ainsi que la kinase correspondante n'ont pas été déterminés [316].

b. Un mécanisme de régulation efficace

Ce mode de régulation a été extensivement caractérisé dans l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, et est vraisemblablement similaire chez les cyanobactéries [181-183]. CP12 est un partenaire du relai FTR qui, lorsqu'il est alimenté par la photosynthèse, assure la réduction de ses thiols. Sous sa forme réduite (CP12_{réd}), la protéine est déstructurée, flexible et inactive (Figure 17). En revanche lorsque le flux d'électrons se tarit (*i.e* la nuit), les 4 cystéines s'oxydent faute de réduction par les thiorédoxines. Chaque paire forme alors un pont disulfure qui rapproche les résidus séparant ses cystéines et qui se structurent rapidement en hélices α [184]. Cette protéine oxydée, plus rigide et partiellement structurée (CP12_{ox}) correspond à la forme active de CP12 sur les enzymes du cycle de Calvin (Figure 17).

Dans un premier temps, l'hélice α C-terminale se fixe dans le site actif de la GAPDH et bloque rapidement son activité [185,186]. Cette association améliore aussi la résistance de l'enzyme à l'oxydation [187]. Ce recrutement induit des changements de conformation au niveau de GAPDH qui expose alors des charges négatives à sa surface (Figure 17 et [188]). La PRK, qui possède des charges positives, est recrutée dans un second temps sur le

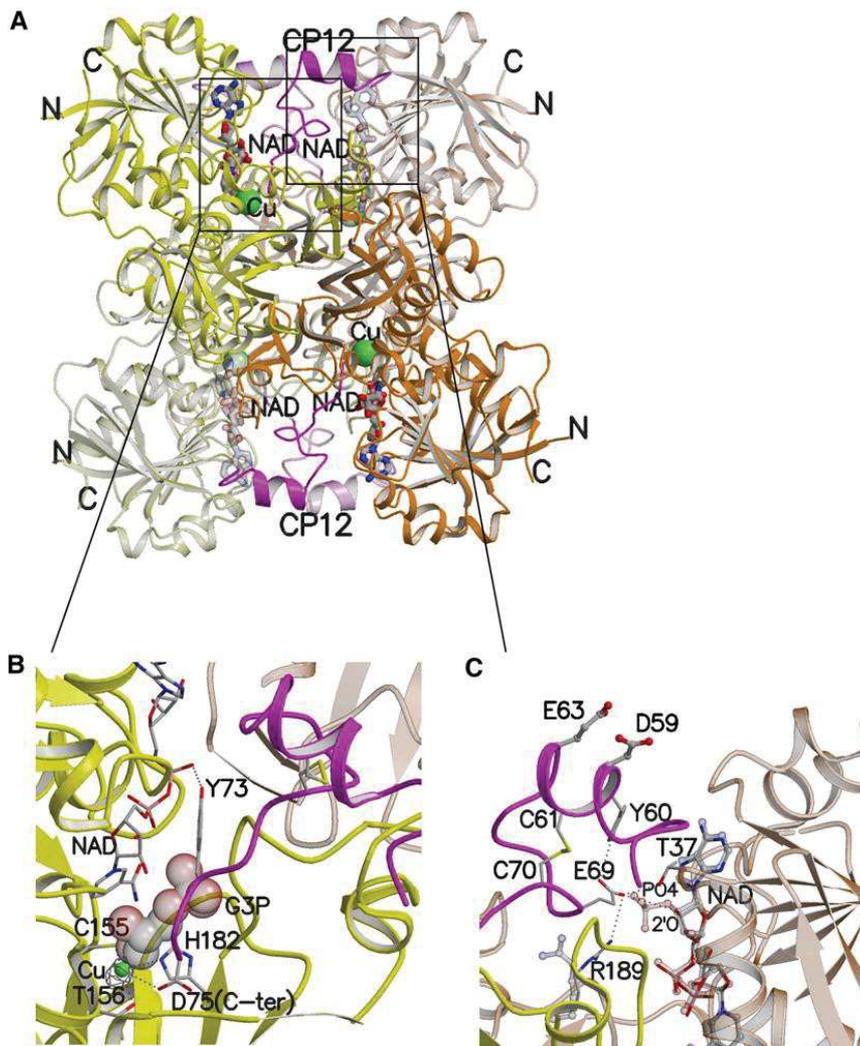


Figure 18 : Structure cristallographique du complexe CP12-GAPDH chez *Synechococcus* PCC7942.
(Extrait de Matsumura *et al.*, 2011, Structure [188])

- A. Structure du tétramère GAPDH (jaune, orange et gris) complexé avec 4 protéines CP12 (violet).
- B. Zoom sur la zone d'interaction entre CP12 et le site actif de la GAPDH en présence de NAD et de G3P
- C. Zoom sur la paire de cystéines C-terminale (C61-C70) et de l'hélice α formée grâce au pont disulfure

complexe. L'hélice α N-terminale de CP12 se fixe alors sur l'enzyme au niveau d'un site encore indéterminé et renforce l'interaction. A l'instar de la GAPDH, l'activité PRK diminue fortement lorsque l'enzyme est recrutée sur le complexe [171,188]. A ce jour, le complexe comprenant les 3 partenaires n'a pas pu être cristallisé faute d'une quantité suffisante de protéines purifiées. La seule structure cristallographique publiée (Figure 18) a néanmoins précisé les déterminants de l'interaction GAPDH-CP12 [187]. Le consensus central de CP12, riche en charges négatives, pourrait favoriser l'ancrage de PRK sur le complexe car l'absence des cystéines N-terminales n'empêche pas l'association de l'enzyme [189].

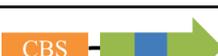
La formation du complexe est réversible et permet de restaurer l'activité des enzymes. Les thiorédoxines, en réduisant les ponts disulfures de CP12, sont les activateurs les plus efficaces de PRK et GAPDH lorsqu'elles sont agrégées dans le complexe [130,190,191]. La libération des enzymes est également favorisée par le NADP(H) qui se lie à CP12 et dont le groupement phosphate pourrait perturber les interactions électrostatiques régissant la formation du complexe [172,189]. L'ATP et le BPGA contribuent aussi à la réactivation de ces enzymes [130,185,191,192].

CP12 est donc un « switch » rédox qui module rapidement et réversiblement l'activité du cycle de Calvin grâce à sa connexion à l'activité photosynthétique [193].

c. Diversité phylogénétique et rôle des protéines CP12

Quasiment toutes les cyanobactéries possèdent un gène *cp12*. A l'exception des cyanobactéries picoplanctoniques, lorsque le gène est présent en une seule copie, il code pour la forme dite canonique de la protéine, c'est-à-dire portant les 4 cystéines et la séquence consensus centrale. Dans certaines espèces en revanche, un ou plusieurs paralogues du gène peuvent être présents et codent pour des protéines plus ou moins divergentes de la forme canonique [173]. Ces variants CP12 peuvent par exemple présenter des substitutions au niveau des cystéines ou du consensus mais peuvent aussi être fusionnés en tant que domaine à d'autres protéines (fusion de gènes). On retrouve notamment de nombreuses protéines CP12 possédant, à leur extrémité N-terminale, un domaine cystathionine- β -synthase (CBS). Une classification en huit groupes a été proposée à partir des 274 séquences protéiques CP12 disponibles [173]. Elle se base sur la présence ou l'absence des cystéines, du consensus central et du domaine CBS et est récapitulée dans le tableau 2 [173].

Tableau 2 : Diversité phylogénétique des protéines CP12 chez les cyanobactéries

Nomenclature	Domaine CBS	Cystéines N _{ter}	Consensus central	Cystéines C _{ter}	Représentation	Proportion
CP12	-	+	+	+		120/274 (43,8 %)
CP12-ΔNter	-	-	+	+		13/274 (4,7 %)
CP12-ΔNter-ΔCore	-	-	-	+		39/274 (14,2 %)
CP12-ΔCter	-	+	+	-		2/274 (0,7 %)
CP12-Δ4Cys	-	-	+	-		8/274 (2,9 %)
CBS-CP12	+	+	+	+		14/274 (5,1 %)
CBS-CP12-ΔCter	+	+	+	-		55/274 (20,1 %)
CBS-CP12-Δ4Cys	+	-	+	-		23/274 (8,4 %)

Les domaines CBS sont des modules protéiques d'environ 100 acides aminés répandus dans tous les domaines du vivant [194]. Ils peuvent lier différents métabolites, notamment l'ATP et l'AMP, qui favorisent leur dimérisation [195]. Ces dimères ont des fonctions régulatrices dont le mécanisme est encore peu étudié (pour revue [196]). Chez *A. thaliana*, il a néanmoins été montré qu'une protéine chloroplastique composée de deux domaines CBS en tandem était activée lors d'un stress oxydant. Cette activation correspond à une association des CBS de la protéine qui stimule alors l'activité des thiorédoxines du chloroplaste et réduit la production de H₂O₂ [197]. L'effet est amplifié en présence d'AMP.

Aucune protéine fusion CBS-CP12 cyanobactérienne n'a encore été étudiée. L'étude de la distribution des gènes codant ces variants soulève pourtant plusieurs questions. D'une part, il apparaît que ces fusions représentent plus de 30% des gènes *cp12* cyanobactériens et surviennent systématiquement au niveau N-terminal. D'autre part, une large majorité des protéines CP12 ainsi fusionnées ne possèdent pas la paire de cystéines C-terminale responsable de l'inhibition de Gap2 (78/92, soit environ 85%, Tableau 2). Il est donc possible que les modules CBS participent à la régulation de la PRK. Cette hypothèse est étayée par le fait que l'association de PRK au complexe est faible et que cette enzyme est inhibée de manière allostérique par l'AMP [126]. La présence d'un domaine CBS pourrait par exemple

permettre, via l'AMP, de renforcer la régulation CP12 et de la synchroniser avec les signaux métaboliques inhibant PRK. En se dimérisant, CP12 pourrait d'une certaine manière augmenter son potentiel électrostatique (charges négatives) et donc son affinité pour PRK, au point de s'affranchir de la contribution de Gap2 dans cette interaction.

De plus, un nombre significatif des gènes codants pour ces protéines fusion sont retrouvés dans les opérons *hox* codant pour l'hydrogénase (voir Figure 29). Sur 21 gènes, 17 sont situés entre les séquences codantes des sous-unités du module hydrogénase (HoxYH) et encodent majoritairement des protéines de la forme CBS-CP12- Δ Cter. Leur fonction au sein de ces opérons n'est pas connue [198] mais cette organisation génomique suggère que la production de H₂ et le métabolisme du CO₂ sont liés, à moins que CP12 ne possède une autre fonction inconnue. Compte tenu de son rôle prouvé, CP12 pourrait favoriser une coordination rédox et/ou énergétique entre ces deux processus qui sera discutée dans le chapitre IV.

Les variants ne possédant pas de domaine CBS (Tableau 2) sont peu caractérisés. Une étude d'un de ces variants concerne une CP12- Δ Nter (absence des cystéines N-terminales) chez la cyanobactérie unicellulaire *Synechococcus* PCC7942 [189]. Le mutant de cette protéine présente un retard de croissance lors d'alternances jour/nuit et une consommation de O₂ réduite à l'obscurité, attribués à une perturbation du catabolisme du carbone en absence de lumière. Il a également été montré que cette protéine et son équivalent sans cystéines (CP12- Δ 4Cys) étaient capables de se lier *in vitro* à la PRK contenue dans des extraits cellulaires bruts. Ce résultat est néanmoins ambigu puisque *Synechococcus* PCC7942 possède deux copies de gène *cp12*, la seconde codant pour la forme canonique. Or les extraits utilisés pour ces expériences de reconstitution de complexe proviennent de simples mutants du variant.

Une autre étude a montré que de nombreux cyanophages (bactériophages de cyanobactéries) possèdent un gène *cp12* dans leur génome [154]. Sur les 24 génomes étudiés, 18 présentent un gène homologue qui code pour un variant CP12- Δ Nter- Δ Core (absence des cystéines Nter et du consensus central). Lors de la phase d'infection précoce des cyanobactéries par ces phages, le ratio NADP(H)/NAD(H) chute. Il favorise l'inhibition de Gap2 par ces variants CP12 et permet d'économiser du NADPH. Simultanément, d'autres gènes viraux (transaldolase et enzymes de la voie des pentoses phosphates) assurent la redirection des flux de carbone vers le R5P, précurseur des nucléotides. Le pouvoir réducteur est alors dirigé vers la voie de synthèse des dNTP nécessaires à la réplication du phage. Grâce à cette batterie de gènes, les cyanophages sont donc capables de détourner les flux métaboliques à leur avantage en mimant un environnement intracellulaire « nocturne ».

Brièvement, quelques études indiquent également que CP12 pourrait avoir d'autres rôles chez les plantes terrestres. *A. thaliana* possède par exemple trois gènes *cp12* encodant tous des formes canoniques (CP12-1, CP12-2 et CP12-3) qui semblent pouvoir former le complexe PRK/CP12/GAPDH *in vitro* [193]. Elles diffèrent essentiellement par leur profil d'expression en fonction des tissus ou de facteurs abiotiques (température, cycles jour/nuit...). Elles pourraient notamment avoir une fonction indépendante du cycle de Calvin dans les tissus non-photosynthétiques comme les racines [200]. Chez *Nicotiana tabacum*, la déplétion de la protéine CP12 (unique et canonique) par ARN interférence résulte en un sévère défaut de croissance. Celui-ci est lié à une distribution inadéquate du carbone mais n'est en revanche pas associé à une variation des activités PRK et GAPDH. Ceci est soutenu par le fait que CP12 possède parfois d'autres partenaires qu'elle doit réguler différemment. Chez *C. reinhardtii* notamment, elle peut recruter l'aldolase sur le complexe PRK/CP12/GAPDH et augmenter sa constante catalytique spécifiquement vis-à-vis du FBP [201].

d. Le « switch » CP12 au service de l'ingénierie métabolique

Les travaux publiés montrent que CP12 est un régulateur efficace qui a été conservé au cours de l'évolution pour coordonner le métabolisme central chez les cyanobactéries, les algues et les plantes terrestres. Chez les cyanobactéries, les duplications et fusions de gènes ont aussi permis l'émergence de paralogues fonctionnels, vraisemblablement spécialisés dans la régulation d'une seule des deux enzymes. Dans le cas des cyanophages, ces protéines participent à la dérégulation des flux métaboliques pour favoriser la production de virions.

La modulation de l'activité Gap2 pourrait favoriser l'économie de pouvoir réducteur, qui est un facteur limitant fréquent dans la production de certains métabolites d'intérêt [202]. Aussi, la régulation de PRK et d'autres enzymes par les CP12 canoniques ou divergentes réorganise les flux du carbone. Il s'agit donc d'un candidat prometteur pour altérer la distribution du carbone et du pouvoir réducteur au profit de précurseurs et produits d'intérêt.

Plus largement, l'étude de ce régulateur n'a jamais été entreprise chez *Synechocystis*. Pourtant elle est susceptible d'améliorer notre compréhension de son métabolisme carboné et énergétique et d'encourager, en retour, les efforts d'ingénierie métabolique de cet organisme modèle pour les biotechnologies de troisième génération.

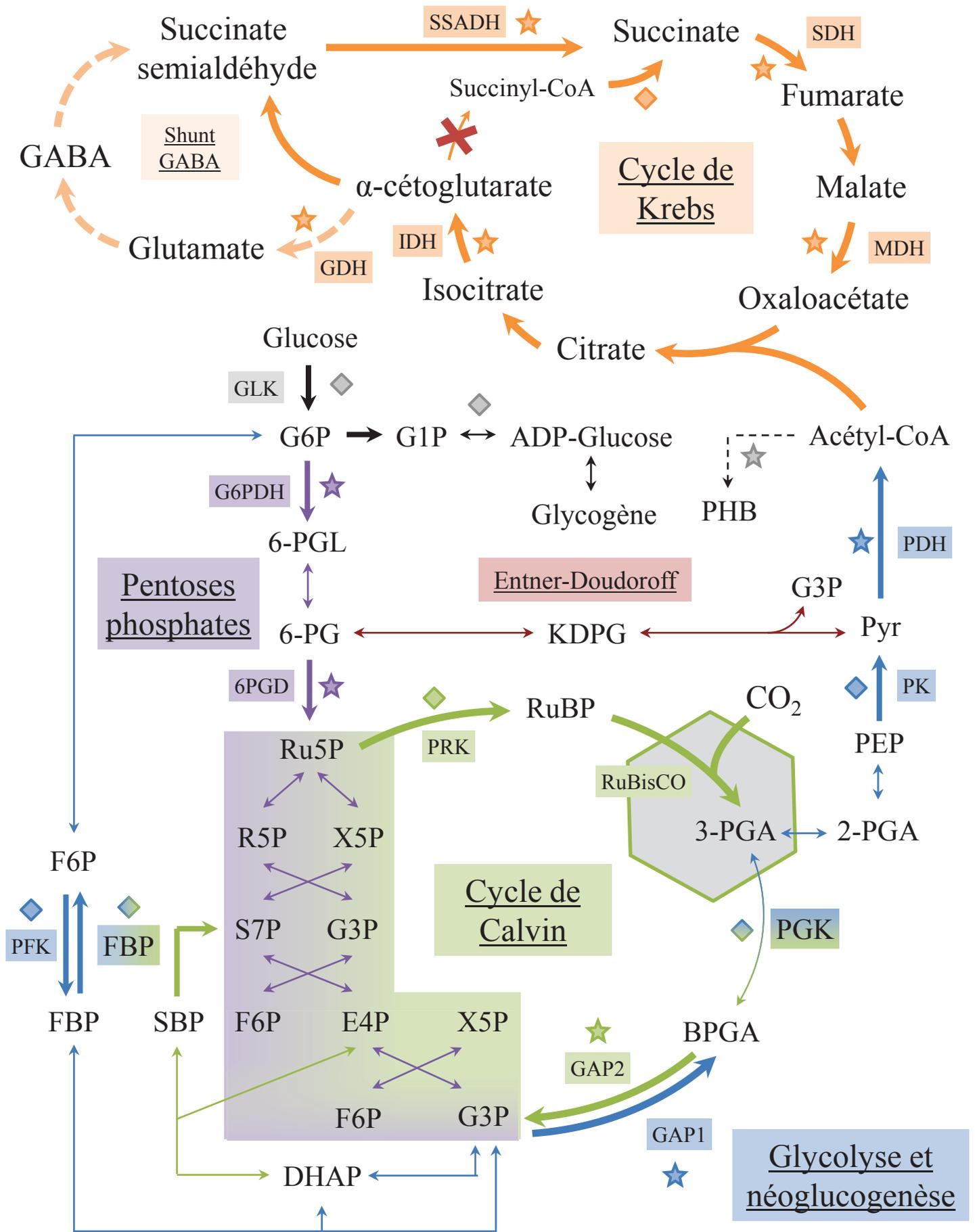


Figure 19 : Le métabolisme du carbone chez *Synechocystis*.

B. Les voies cataboliques du carbone

Chez *Synechocystis*, le cycle Calvin est imbriqué dans deux voies cataboliques du carbone : la glycolyse et la voie des pentoses phosphates (Figure 19). Les deux réactions croisées avec la glycolyse sont celles de la conversion du 3-PGA (produit de la RuBisCO) en G3P, faisant intervenir Gap2. La régénération de Ru5P à partir de G3P correspond quant à elle, aux réactions inverses de la voie des pentoses phosphates (Figure 19). Le G3P produit lors de la fixation du CO₂ par le cycle de Calvin peut aussi être dirigé vers le cycle de Krebs.

En photoautotrophie, une partie du carbone est également stockée sous forme de polymères de carbohydrates agglomérés en granules intracellulaires insolubles. Les cyanobactéries peuvent ainsi accumuler du PHB (poly-β-hydroxybutyrate) à partir d'acétyl-CoA. Elles peuvent également produire du glycogène à partir de G3P lorsque celui-ci emprunte la voie de la néoglucogénèse.

1. Glycolyse, voies d'Entner-Doudoroff et des pentoses phosphates

Chez *Synechocystis*, le glucose peut être importé du milieu extracellulaire ou provenir de la dégradation du glycogène. Il est converti en glucose-6-phosphate (G6P) par la glucokinase (Glk). Sa dégradation en pyruvate (Pyr) est similaire à celle des organismes hétérotrophes (enzymes homologues). Cependant, la glycolyse n'est pas la voie privilégiée pour dégrader le G6P [203]. Celui-ci est préférentiellement oxydé en 6-phosphogluconolactone (6-PGL) par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), la première enzyme de la voie des pentoses phosphates (Figure 19), lui-même hydrolysé en 6-phosphogluconate (6-PG).

Figure 19 : Le métabolisme du carbone chez *Synechocystis*.

Le métabolisme du carbone comprend la glycolyse/néoglucogénèse (bleu), les voies d'Entner-Doudoroff (rouge) et des pentoses phosphates (violet), le cycle de Calvin (vert) et le cycle de Krebs (orange). Les losanges et les étoiles indiquent les réactions enzymatiques utilisant respectivement l'ATP ou les cofacteurs réduits (NADPH et NADH) comme cofacteurs.

G6P = Glucose-6-phosphate; G1P = Glucose-1-phosphate; 6-PGL = 6-phosphogluconolactone; 6-PG = 6-phosphogluconate; Ru5P = Ribulose-5-phosphate; RuBP = Ribulose-1,5-bisphosphate; 3-PGA = 3-phosphoglycérate; DHAP = Dihydroxyacétone phosphate; FBP = Fructose-1,6-bisphosphate; F6P = Fructose-6-phosphate; X5P = Xylulose-5-phosphate; E4P = Erythrose-4-phosphate; S7P = Sedoheptulose-7-phosphate; SBP = Sedoheptulose-1,7-bisphosphate; R5P = Ribose-5-phosphate; 2-PGA = 2-phosphoglycérate; PEP = Phosphoénolpyruvate; Pyr = Pyruvate; GABA = γ-aminobutyrate; GLK = Glucokinase; G6PDH = Glucose-6-phosphate déshydrogénase; 6PGD = 6-phosphogluconate déshydrogénase; PFK = Phosphofructokinase; FBP = Fructose-1,6-bisphosphatase; PGK = Phosphoglycérate kinase; PK = Pyruvate kinase; PDH = Pyruvate déshydrogénase; IDH = Isocitrate déshydrogénase; GDH = Glutamate déshydrogénase; SSADH = Succinate semialdéhyde déshydrogénase; SDH = Succinate déshydrogénase; MDH = Malate déshydrogénase

Ce dernier est oxydé et décarboxylé par la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGD) pour produire du Ru5P. Elle permet donc de satisfaire la demande en substrat de la PRK à partir d'hexoses. Cette série de réactions produit également 2 molécules de NADPH et est désignée comme phase oxydative de la voie. Le Ru5P peut ensuite être pris en charge par les mêmes enzymes qui régénèrent ce précurseur du cycle de Calvin pour produire du G3P puisque celles-ci sont bidirectionnelles (Figure 19). Il s'agit de la phase non-oxydative des pentoses phosphate dont l'orientation (production de Ru5P ou de G3P) est principalement dictée par les équilibres chimiques entre substrats et produits des enzymes. Elle est donc conditionnée par l'activité de chaque voie du métabolisme carboné et par leur coordination.

Il existe une voie alternative, celle d'Entner-Doudoroff, pour convertir le 6-PG en trioses. Elle comprend deux réactions longtemps considérées exclusives aux procaryotes hétérotrophes. Pourtant, cette activité a récemment été décelée chez les cyanobactéries, les diatomées et les plantes [203,204]. La première étape est une déshydratation (6-PG déshydratase) qui produit du 2-céto-3-déoxy-6-phosphogluconate (KDPG). Une rétro-aldolisation réalisée par la KDPG aldolase le clive ensuite en G3P et pyruvate (Figure 19). Le rendement en ATP de cette voie est plus faible mais elle requiert moins d'enzymes et permet d'alimenter le métabolisme en précurseurs carbonés indépendamment du cycle de Calvin.

L'injection du G3P dans le tronçon triose de la glycolyse est sous contrôle de Gap1, l'isoforme glycolytique de Gap2 [147]. Le G3P est progressivement dégradé en pyruvate par les différentes enzymes connues. Le pyruvate est ensuite pris en charge par le complexe pyruvate déshydrogénase (PDH) pour produire de l'acétyl-CoA qui peut être utilisé dans le cycle de Krebs (Figure 19).

2. Le cycle de Krebs et la respiration

Chez les cyanobactéries, le cycle de Krebs a longtemps été considéré comme incomplet car elles ne possèdent pas l' α -cétoglutarate déshydrogénase (conversion de l' α -KG en succinyl-CoA). Elles présentent en réalité un shunt métabolique opéré par deux enzymes : l' α -KG décarboxylase et la succinate semialdéhyde déshydrogénase (Figure 19). A partir d' α -KG, elles synthétisent successivement du succinate semialdéhyde puis du succinate [205]. Certaines espèces, minoritaires, peuvent également recourir au shunt glyoxylate (absent chez *Synechocystis*) qui convertit directement l'isocitrate en succinate et glyoxylate via l'isocitrate lyase [206]. Très récemment, l'existence d'une troisième voie, présente chez *Synechocystis*, a été démontrée. Celle-ci produit du glutamate à partir d' α -KG (glutamate déshydrogénase) qui

est décarboxylé en γ -aminobutyrate (GABA) par la glutamate décarboxylase [207]. Le GABA est ensuite converti en succinate semialdéhyde par la GABA aminotransférase (Figure 19). Ce shunt GABA permettrait de connecter le métabolisme de l'azote, via le glutamate, au cycle de Krebs et à la charge énergétique qu'il génère à travers la respiration.

La respiration chez les cyanobactéries est un processus constitutif qui permet de satisfaire la demande en ATP pour la croissance et les autres fonctions cellulaires. Son fonctionnement général est très similaire à celui des organismes non-photosynthétiques mais présente certaines particularités (pour revue [208]). Par exemple, le complexe NADPH oxydoréductase I (NDH-1) est localisé uniquement au niveau du thylakoïde et réduit les plastoquinones. Il communique donc avec la chaîne de transport des électrons de la photosynthèse. Par ailleurs, comme pour tous les organismes réalisant la photosynthèse oxygénique, le module diaphorase (oxydation du NADPH ou du NADH) de ce complexe n'est toujours pas identifié. Les cyanobactéries possèdent un second complexe NDH (NDH-2) ainsi que le complexe II (succinate déshydrogénase) également capables de réduire le pool de PQ. Tous deux sont à la fois localisés au niveau du thylakoïde et de la membrane cytoplasmique interne. Lors de la respiration, les PQ sont oxydées par la bd quinol oxidase qui réduit l'oxygène en eau. Comme vu précédemment, elles peuvent aussi être oxydées par le cytochrome b_6f . Les complexes respiratoires, de par leur localisation et leurs cofacteurs, sont donc intimement liés à la photosynthèse et aux mécanismes de photoprotection, notamment le flux d'électrons cyclique évoqué dans le chapitre précédent.

3. Les réservoirs de carbone

Durant la croissance en photoautotrophie, *Synechocystis* stocke continuellement une partie du carbone organique sous forme de glycogène ou de PHB [209]. Le précurseur du glycogène est le glucose-1-phosphate (G1P) qui est ADP-ribosylé puis polymérisé respectivement par l'ADP-glucose pyrophosphorylase et les glycogène-synthases (Figure 19). L'activité de ces enzymes est régulée par la thiorédoxine via l'état rédox de leurs cystéines [210]. Par ailleurs, le PHB est synthétisé en 3 étapes à partir de deux molécules d'acétyl-CoA ([211,212] et Figure 19). Elles sont tout d'abord condensées en acétoacétyl-CoA par la β -cétotliolase (PhaA) qui est ensuite réduite en hydroxybutyryl-CoA par l'acétoacétyl-CoA réductase (PhaB). Enfin, sa polymérisation est assurée par la PHB synthase (PhaEC). La formation des granules chez *Synechocystis* dépend de régulateurs spécifiques et de l'approvisionnement en NADPH [213,214].

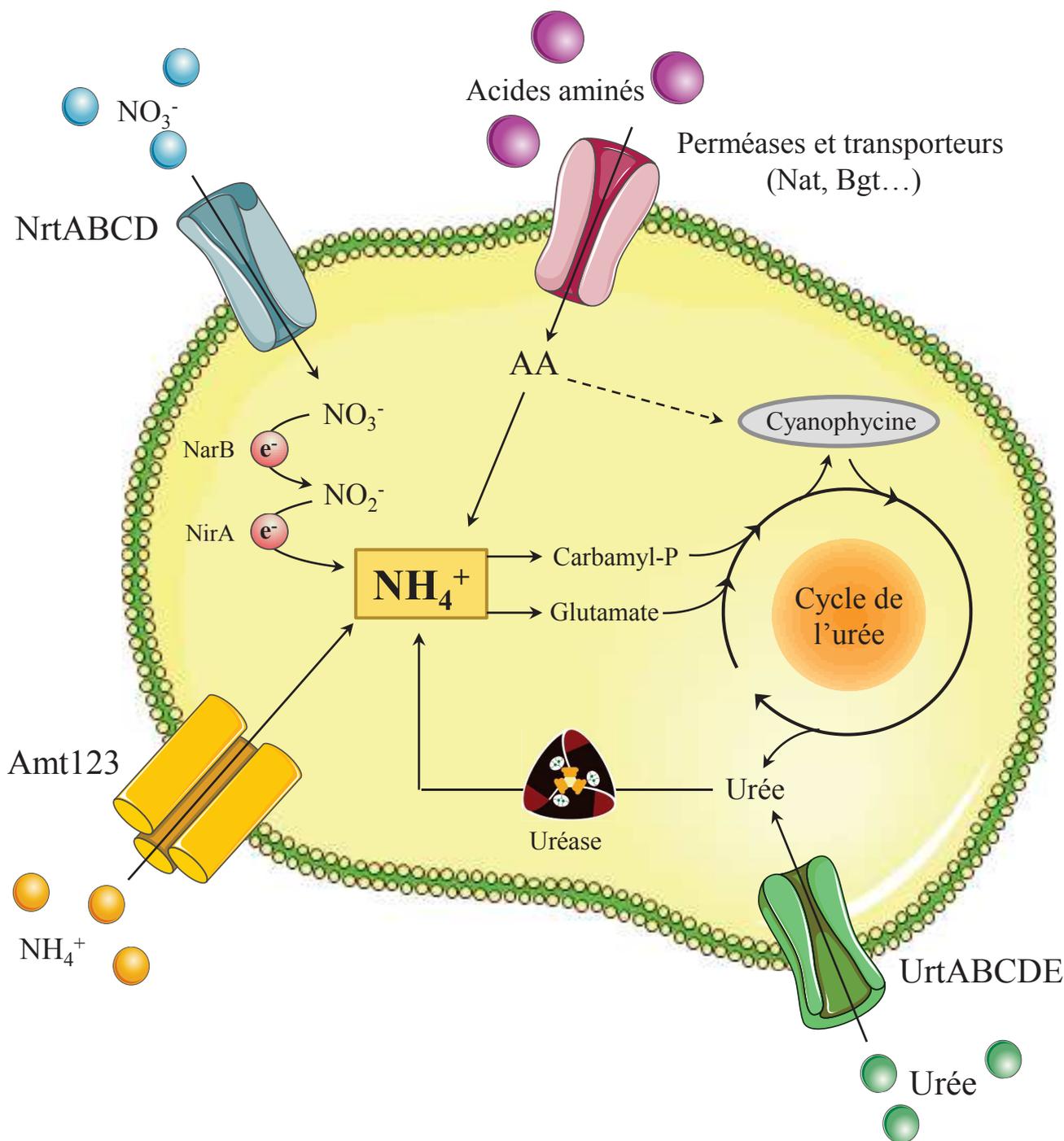


Figure 20 : Le métabolisme de l'azote chez *Synechocystis*.

Le nitrate (NO_3^-), l'ammonium (NH_4^+), l'urée et certains acides aminés (AA) sont importés dans la cellule par leurs transporteurs respectifs (NrtABCD, Amt123, UrtABCDE, Nat et Bgt). Le NO_3^- est converti en NH_4^+ par la nitrate réductase (NarB) et la nitrite réductase (NirA). Le carbamyl-phosphate (carbamyl-P) et le glutamate sont produits à partir de NH_4^+ et entrent dans le cycle de l'urée où ils peuvent être utilisés pour le stockage d'azote sous forme de cyanophycine. L'urée est le déchet azoté du cycle et est hydrolysée par l'uréease en ammonium.

La relation existante entre ces deux polymères de stockage n'est cependant pas entièrement comprise. Par exemple, un mutant incapable de synthétiser du glycogène ne possède pas davantage de PHB mais excrète préférentiellement son excès de carbone organique sous forme de pyruvate et d' α -KG [215]. Réciproquement, un mutant de biosynthèse des PHB n'accumule pas davantage de glycogène [216].

Ces polymères peuvent tous deux alimenter le métabolisme en précurseurs carbonés et en énergie pour assurer la maintenance des composants biologiques lorsque les conditions sont défavorables. Ils contribuent ainsi à préserver l'intégrité des cellules qui pourront reprendre leur croissance lorsque l'environnement le permet.

Leur synthèse est stimulée lorsque certains nutriments comme le phosphore ou l'azote se raréfient (pour revue [217]). De manière générale, elles agissent comme des « valves » à carbone lorsque celui est excédentaire. Ce déséquilibre survient notamment lors des carences d'azote qui limitent l'exportation des précurseurs carbonés vers le métabolisme de l'azote (ajout des groupements amine). Ces jonctions correspondent à des métabolites-clés comme l' α -KG (précurseur du glutamate) dont l'accumulation traduit un déséquilibre C/N.

C. Le métabolisme de l'azote

Contrairement à l'eau, la lumière et le CO_2 qui sont des substrats quasiment inépuisables, les sources d'azote sont souvent disponibles de manière limitée et temporaire dans l'environnement. *Synechocystis* est une cyanobactérie qui ne fixe pas le diazote atmosphérique pour s'affranchir de cette sporadicité comme le font certaines espèces diazotrophiques. Elle peut néanmoins importer et métaboliser différents composés azotés pour synthétiser de l'ammonium (NH_4^+).

1. Voies de production de l'ammonium

Le NH_4^+ est la forme réduite de l'azote que les cyanobactéries incorporent dans des molécules carbonées telles que l' α -KG décrit précédemment. Pour le produire, *Synechocystis* peut réduire le nitrate (utilisé comme engrais et pour les cultures de laboratoire) ou capturer et dégrader les acides aminés du milieu extérieur ainsi que ceux présents dans la cellule (Figure 20). Enfin, elle peut importer et, grâce à son uréase, hydrolyser l'urée qui est aussi un de ses propres déchets métaboliques produit par le cycle de l'urée.

a. Réduction assimilatrice du nitrate

Le nitrate (NO_3^-) est la forme oxydée de l'azote minéral utilisable par la plupart des cyanobactéries (pour revue [218]). Chez *Synechocystis*, le NO_3^- est importé par le complexe NrtABCD, un transporteur membranaire de type ABC à haute affinité (Figure 20). Il est tout d'abord réduit en nitrite (NO_2^-) par la nitrate réductase NarB à l'aide de deux électrons délivrés par la ferrédoxine. Le nitrite est ensuite réduit par NirA (nitrite réductase) en NH_4^+ . Cette activité consomme six électrons provenant de la ferrédoxine et qui sont transférés grâce au centre 4Fe-4S de NirA.

b. Dégradation des acides aminés

Synechocystis est également capable de capter la plupart des acides aminés présents dans le milieu extracellulaire grâce à trois transporteurs et perméases ayant une large spécificité [219]. L'arginine, la glutamine et l'asparagine peuvent soutenir la croissance lorsqu'ils constituent la seule source d'azote disponible [220]. Par exemple, l'arginine est majoritairement dégradée par l'arginase et l'arginine décarboxylase [221,222]. Ces voies produisent notamment de l'urée, un déchet azoté qui peut être recyclé en NH_4^+ .

c. Hydrolyse de l'urée

Chez de nombreuses espèces procaryotes et eucaryotes, l'urée ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) est un sous-produit du métabolisme. *Synechocystis* est capable de la prélever dans le milieu grâce au complexe UrtABCDE, un transporteur spécifique de type ABC [223]. Son uréase lui permet ensuite de dissocier l'urée en ammonium et en CO_2 [220]. L'uréase est une métalloenzyme multimérique de la forme Ure(ABC)₃ dont le site actif contient deux atomes de nickel (Ni). L'assemblage de ce site actif fait intervenir plusieurs chaperones (UreDEFG) et sera plus amplement décrit dans la suite de ce chapitre.

2. Incorporation du NH_4^+ et cycle de l'urée

a. Synthèse des précurseurs azotés

L'azote organique est produit par différentes enzymes qui incorporent l'ammonium dans certains métabolites. Ces réactions sont fortement dépendantes de l' α -KG et constituent la passerelle entre le métabolisme de l'azote et celui du carbone (pour revue [224]). Elles contribuent donc activement au maintien d'une balance C/N adéquate. Chez les

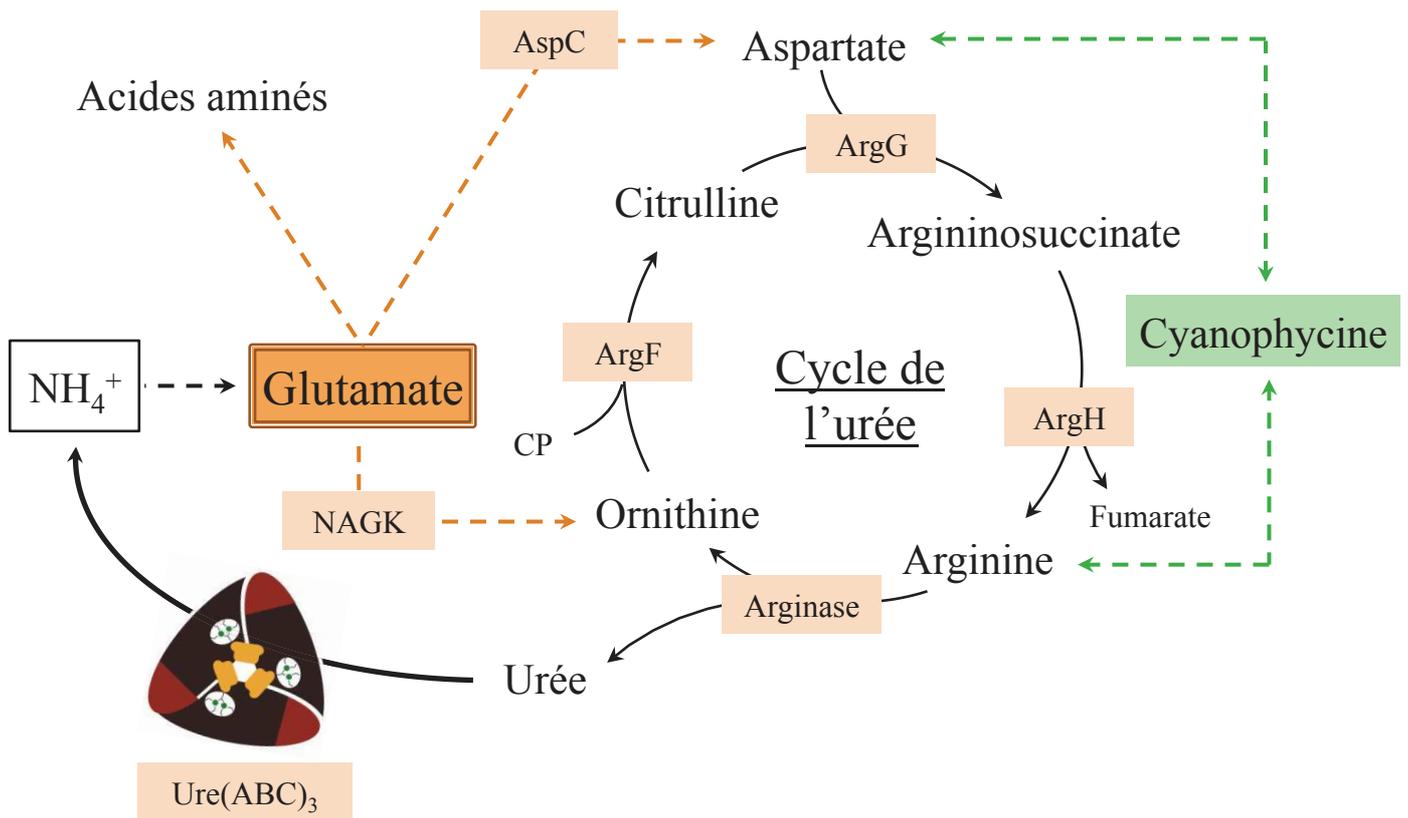
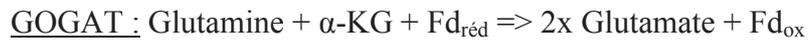


Figure 21 : Le cycle de l'urée de *Synechocystis*.

Le nom des enzymes figure dans les rectangles oranges. La voie de biosynthèse de la cyanophycine est représentée en vert. NAGK = N-acétylglutamate kinase; CP = Carbamyl-phosphate; AspC = aspartate aminotransférase; ArgF = Ornithine carbamyltransférase; ArgG = Argininosuccinate synthase; ArgH = Argininosuccinate lyase; Ure(ABC)₃ = Uréase.

cyanobactéries, la principale voie d'assimilation du NH_4^+ est la production de glutamate à partir de glutamine, d' α -KG et d'ammonium (Figure 20). Elle implique deux réactions catalysées successivement par la glutamine synthase (GS) et la glutamine-oxoglutarate aminotransférase (GOGAT) comme suit :



Le glutamate peut aussi être directement synthétisé à partir de NH_4^+ et d' α -KG par la glutamate déshydrogénase (enzyme du shunt GABA) qui utilise le NADPH comme cofacteur [225]. La production de précurseurs azotés par cette voie est faible en comparaison du relié GS-GOGAT mais elle favoriserait la survie lorsque les différents nutriments sont limitants pour la croissance [226]. Enfin, *Synechocystis* possède un gène codant potentiellement pour une carbamate kinase qui n'est actuellement pas caractérisée au niveau expérimental et qui pourrait synthétiser du carbamyl-phosphate (CP) à partir de CO_2 , d'ammonium et d'ATP. Elle possède aussi deux gènes homologues à ceux codant pour les deux sous-unités de la carbamyl-phosphate synthase. Chez *A. cylindrica*, cette enzyme catalyse une réaction similaire mais utilise la glutamine comme substrat azoté [227]. Le CP et certains dérivés du glutamate (ornithine et aspartate) sont entre autres métabolisés au cours du cycle de l'urée, une voie permettant la distribution et le recyclage de l'azote organique (Figure 20).

b. Le cycle de l'urée

Le cycle de l'urée comprend 4 métabolites dont l'abondance dépend de l'assimilation du NH_4^+ (Figure 21). L'ornithine est un dérivé non-protéinogène du glutamate dont la synthèse est régulée par l'équilibre C/N au niveau de la NAGK (N-acétylglutamate kinase). Au cours du cycle, l'ornithine est condensée avec le CP (ornithine carbamyltransférase, ArgF) pour produire de la citrulline, un autre acide aminé non-protéinogène. A son tour, celle-ci est combinée à l'aspartate par l'argininosuccinate synthase (ArgG) qui requiert de l'ATP. L'aspartate est aussi synthétisé à partir de glutamate et d'oxaloacétate (aspartate aminotransférase, AspC). L'argininosuccinate est ensuite converti en arginine et en fumarate (argininosuccinate lyase, ArgH). Enfin, l'arginine est dégradée par l'arginase en ornithine et en urée mais le gène codant pour cette enzyme n'est pas encore identifié [222]. Des études ont montré que chez *Synechocystis*, l'arginine pouvait être catabolisée par décarboxylation ou par oxydation dans des voies produisant également de l'urée [221].

L'arginine et l'aspartate sont deux acides aminés primordiaux dans le métabolisme des cyanobactéries. En effet, lorsque l'azote est présent en quantité suffisante, elles accumulent progressivement des granules insolubles de cyanophycine [228]. Il s'agit de polymères branchés composés d'arginine et d'aspartate en quantité équimolaire [229]. A l'instar du glycogène vis-à-vis du carbone organique, ces réserves peuvent être mobilisées lors des carences pour approvisionner le métabolisme en azote organique (Figure 21). La cyanophycine synthase contrôle sa synthèse tandis que la cyanophycinase la dégrade [230,231]. Lorsque de cette dégradation, les monomères d'aspartate et d'arginine alimentent le cycle de l'urée. Celui-ci va alors produire de l'urée qui, grâce à l'uréase, permet de redistribuer l'azote aux voies de biosynthèse des autres acides aminés.

3. L'urée et l'uréase

a. Intérêt pour les biotechnologies

L'urée est un déchet azoté excrété par de nombreux organismes et est donc naturellement présent dans l'environnement, y compris dans les océans où sa concentration est de l'ordre du micromolaire [232]. Dans les sociétés humaines, on la retrouve notamment en grande quantité dans les eaux usées des stations d'épuration. Elle peut également être produite par voie chimique à partir de CO_2 et de NH_4^+ . Depuis plusieurs décennies, elle est utilisée dans différents secteurs tels que la cosmétique, l'automobile et surtout l'industrie pétrochimique. En effet, à partir des années 1960, l'essor de l'agriculture intensive a considérablement augmenté la demande en engrais azotés. L'urée, plus riche en azote, a alors graduellement supplanté les composés à base de nitrate et d'ammonium. Elle représente aujourd'hui environ 70% des apports agricoles [233].

Cependant lorsque l'urée est abondante dans l'environnement, elle peut avoir des conséquences néfastes. En effet, la croissance de nombreux microorganismes est limitée par l'insuffisance des sources d'azote. Ceci est particulièrement le cas du phytoplancton (cyanobactéries, algues et diatomées unicellulaires) dans les écosystèmes côtiers et aquatiques. Or le drainage par les eaux de pluie favorise l'accumulation des effluents agricoles et urbains dans ces habitats. Le phytoplancton peut alors proliférer et devient rapidement dominant au sein de ces milieux dits eutrophisés. Ces efflorescences (ou « blooms ») comprennent des espèces connues pour produire diverses toxines qui rendent ces

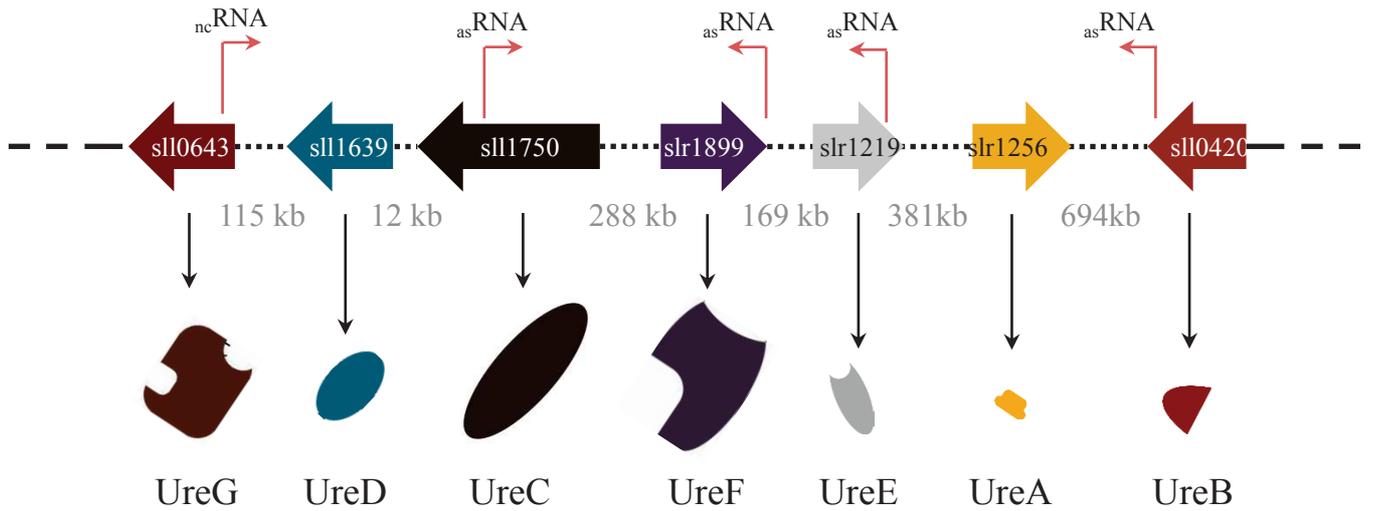


Figure 22 : L'organisation génomique des gènes codant pour les sous-unités et chaperones de l'uréase chez *Synechocystis*.

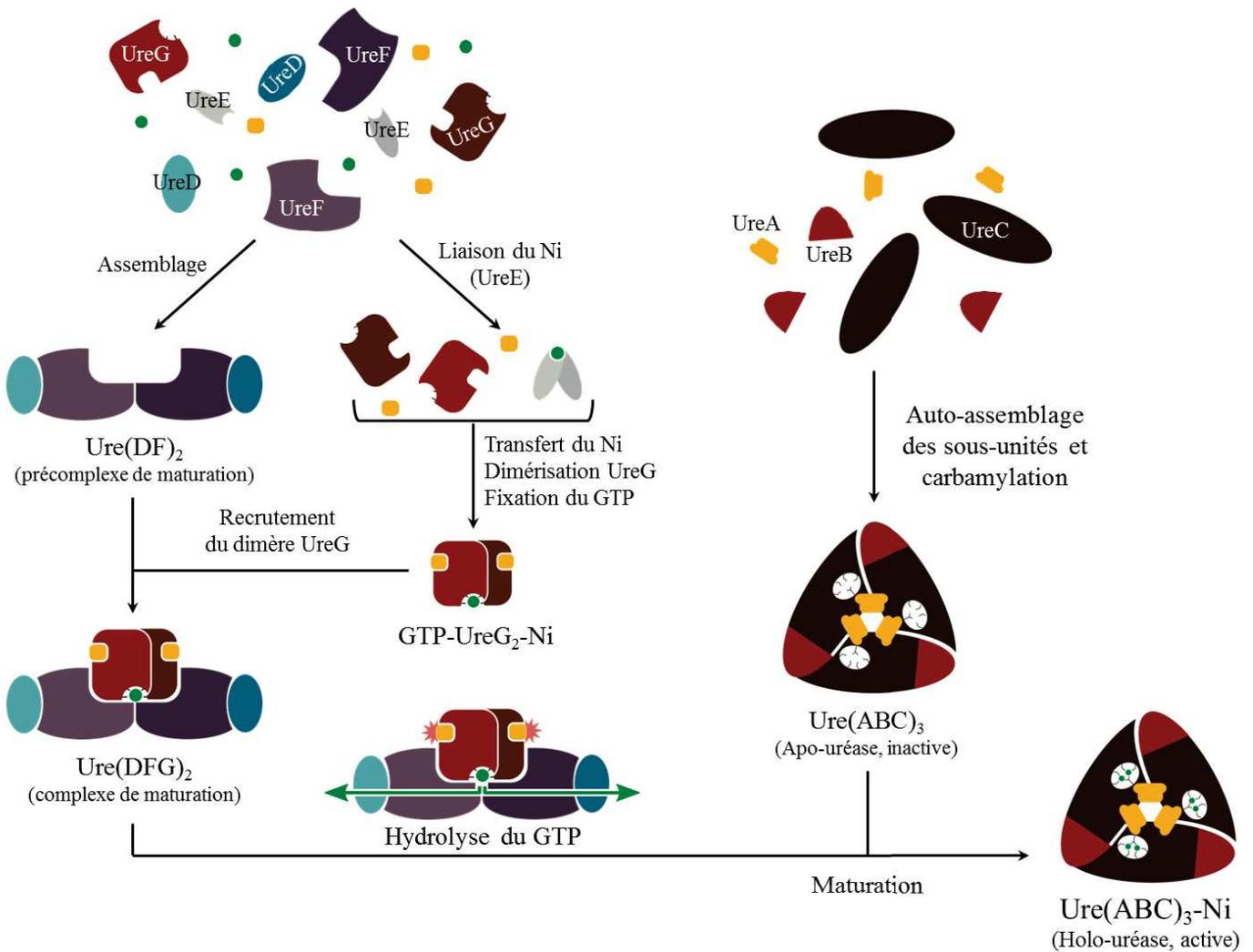


Figure 23 : Etapes de maturation de l'uréase chez *Synechocystis*.

Le nickel est représenté par des sphères vertes tandis que le GTP est illustré par les carrés jaunes.

eaux dangereuses pour la faune (pour revue [234]). En 1961, des milliers d'oiseaux ont été victimes d'un empoisonnement de ce type en Californie dont Hitchcock se serait inspiré pour son film *Les Oiseaux*. Les cas d'intoxications humaines par ces blooms sont aussi nombreux et ont un impact direct sur la santé publique, le tourisme et l'économie locale [235].

Le traitement des eaux usées permet d'éviter de tels rejets et leurs conséquences environnementales mais il nécessite des infrastructures spécifiques et coûteuses. Pourtant, cette urée pourrait constituer une filière d'approvisionnement considérable pour satisfaire les besoins en azote des biotechnologies de troisième génération (voir Chapitre I). Ceci permettrait de valoriser ce déchet pour produire de la biomasse et/ou des produits d'intérêt à moindre coût. Le critère déterminant de l'organisme choisi est alors sa capacité d'utiliser l'urée comme source d'azote. Chez *Synechocystis*, la conversion de l'urée en ammonium est réalisée par l'uréase.

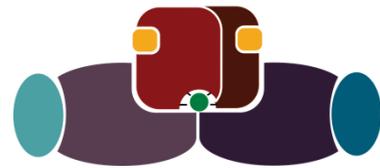
b. Organisation génomique des gènes codant pour les sous-unités de l'uréase et ses protéines de maturation

L'uréase est une enzyme à nickel composée de trois sous-unités (UreABC, Figure 22) qui s'organisent en trimères, eux-même assemblés par trois pour former l'apoenzyme $Ure(ABC)_3$. La maturation de l'enzyme nécessite l'action de quatre chaperones (UreDEFG, Figure 23) qui activent la sous-unité catalytique UreC en y insérant deux atomes de nickel (Ni). Les sous-unités UreA et UreB ne semblent pas jouer de rôle direct dans la catalyse mais pourraient faciliter le transfert du nickel et protégeraient UreC de la protéolyse [236]. Par ailleurs, l'activation de UreC implique une carbamylation (probablement non-enzymatique) au niveau de la lysine du site actif (K219).

L'uréase est trouvée chez les plantes (pour revue [237]) et dans de nombreuses cyanobactéries. Sur les 126 génomes cyanobactériens utilisés pour l'analyse phylogénétique de CP12, 109 contiennent un gène homologue à la sous-unité catalytique *ureC*. Chez *Synechocystis*, les gènes *ureABCDEFG* sont répartis sur l'ensemble du chromosome (Figure 22) mais chez plusieurs espèces de cyanobactéries, ils sont groupés dans le génome et sont probablement transcrits en opéron. Plusieurs ARN non-codants et antisens ont été identifiés à proximité des gènes *ureG*, *ureC*, *ureF*, *ureE* et *ureB* de *Synechocystis* cependant, il existe peu de données décrivant la régulation de leur transcription [238].



Ure(ABC)₃-Ni
(Holo-uréase, active)



Ure(DFG)₂
(complexe de maturation)

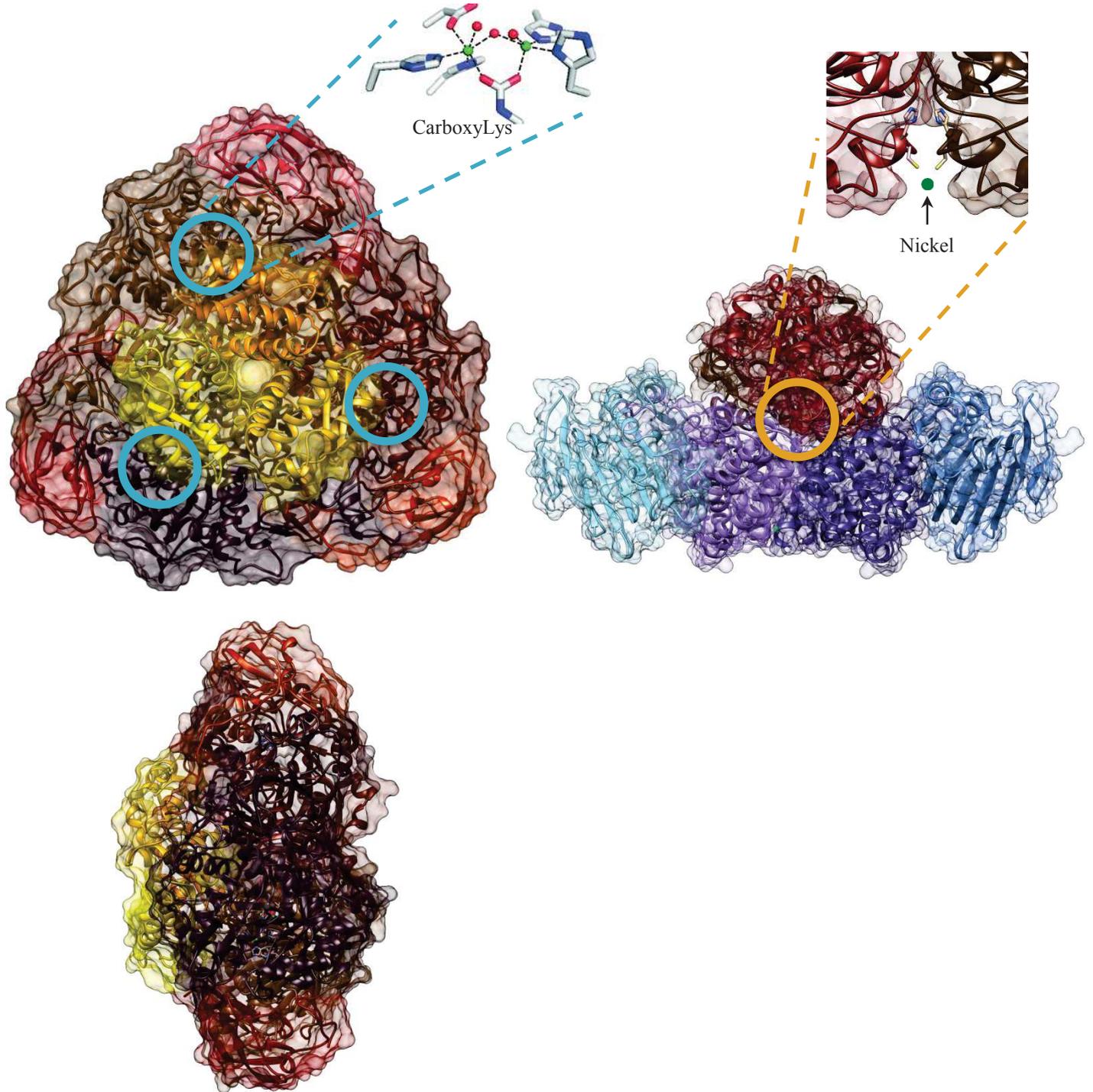


Figure 24 : Modèles structuraux de l'uréase mature et du complexe d'activation

Les étapes de maturation de l'uréase ont essentiellement été étudiées chez des protéobactéries pathogènes comme *Helicobacter pylori* et *Klebsiella aerogenes* (pour revue [239]). La conservation de la structure des protéines Ure suggère néanmoins que le processus de maturation est similaire chez les cyanobactéries (Figure 23). Le Ni est tout d'abord lié par un dimère de UreE qui le charge sur la GTPase UreG [240]. Celle-ci se dimérise et fixe deux molécules de GTP avant de s'associer aux protéines UreD et UreF. Un complexe de maturation Ure(DFG)₂ est ainsi formé et recruté au niveau de l'uréase via UreD [241]. Enfin, l'hydrolyse du GTP déclenche le transfert du Ni qui est orienté vers le site actif grâce à un tunnel hydrophile interne formé par UreD et UreF [242]. Un deuxième cycle est requis pour l'insertion du second atome de Ni puisque chaque dimère UreG en fixe un seul. Au niveau du site catalytique, les métaux sont coordonnés par plusieurs histidines ainsi que par la lysine modifiée. Le modèle structural de l'enzyme mature de *Synechocystis* que j'ai construit au cours de mes travaux est présenté en Figure 24.

c. Fonction de l'uréase chez les cyanobactéries

Chez *H. pylori*, l'uréase est un facteur de virulence périsplasmique qui neutralise l'acidité gastrique (production d'ammoniac à partir de l'urée extracellulaire) et permet la colonisation de l'estomac induisant fréquemment le développement d'ulcères. Dans les cyanobactéries, l'urée est produite par le métabolisme mais peut aussi être importée dans le cytoplasme par un système de transport pour y être hydrolysée [220]. Cette activité ne requiert ni pouvoir réducteur, ni énergie et produit une molécule d'ammoniac (NH₃) et une molécule de carbamate (NH₂COOH). Le carbamate se dissocie spontanément en CO₂ et ammoniac. A pH physiologique, l'ammoniac est essentiellement présent sous sa forme protonée NH₄⁺ (pKa = 9,25).

Dans l'environnement, l'azote est généralement limitant pour la croissance des cyanobactéries. Lorsque le cycle de l'urée fonctionne, l'uréase recycle les deux atomes d'azote contenus dans l'urée et évite donc leur perte. Inversement, de nombreuses espèces utilisent l'urée pour évacuer les excédents d'azote. La présence d'un système de transport (UrtABCDE) permet donc aux cyanobactéries de récupérer puis de métaboliser ce déchet sans dépense énergétique. Cette flexibilité peut malgré tout s'avérer insuffisante pour maintenir l'équilibre C/N lorsque l'ensemble des sources d'azote internes et externes sont épuisées.

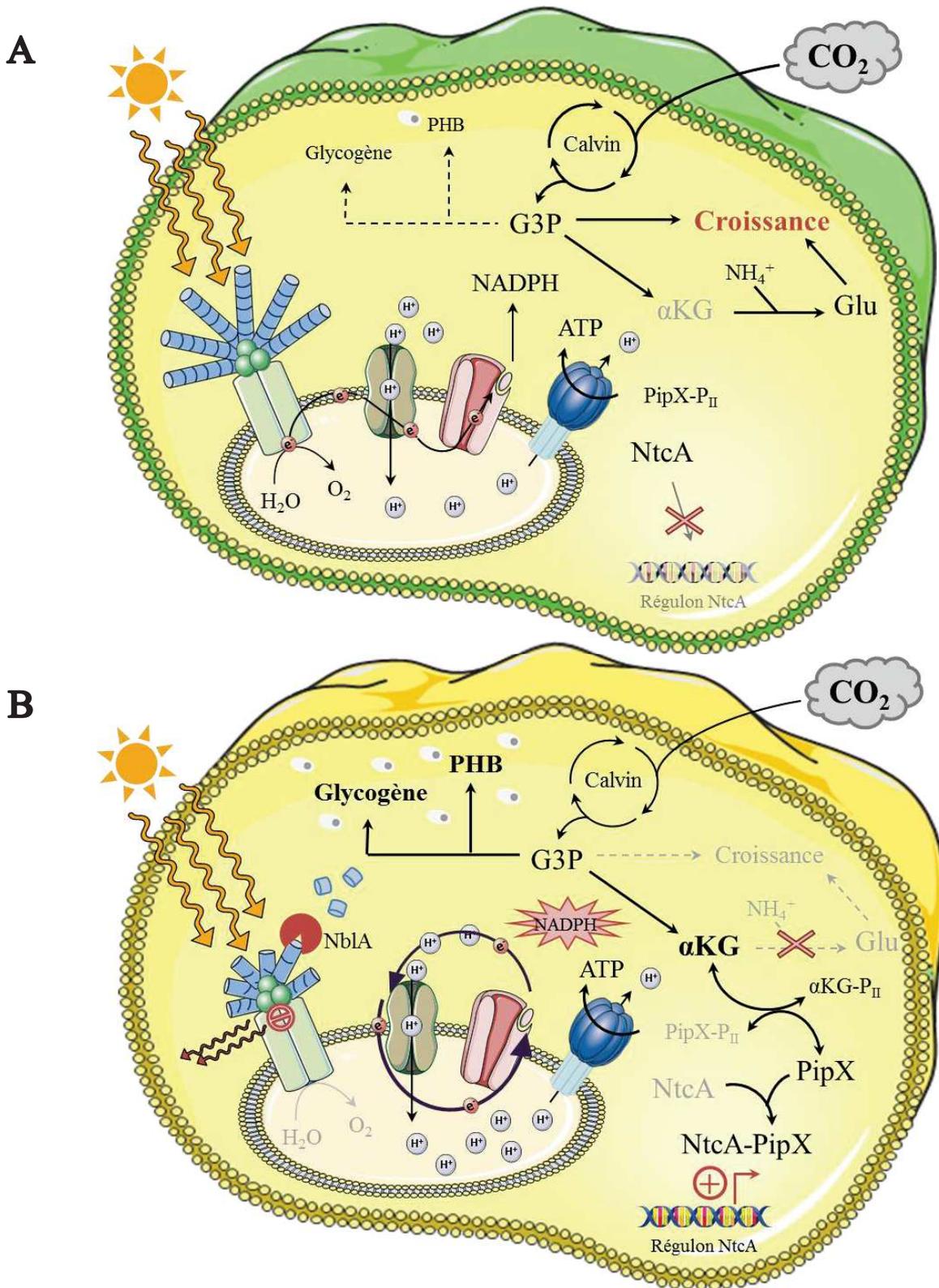


Figure 25 : Effets physiologiques de la carence d'azote chez les cyanobactéries.

PipX = P_{II}-Interacting Protein; NblA = Non-bleaching protein A; NtcA = Nitrogen control transcription factor.

- En présence d'azote assimilable, la réduction des transporteurs d'électrons assure la production de NADPH et d'ATP alimentant le cycle de Calvin et la synthèse des précurseurs carbonés et azotés qui sont consommés pour soutenir la croissance.
- Lorsque l'azote est absent, l' α -KG s'accumule et enclenche la signalisation de P_{II}. L'inhibition du cycle de Calvin résulte en une accumulation d'électrons dans la chaîne de transport qui est limitée par la dégradation des phycobilisomes (jaunissement). Le flux cyclique des électrons maintient la production d'ATP tandis que le carbone est dirigé vers la production de réserves.

D. La carence d'azote

1. Effets physiologiques et mécanisme de détection

En photoautotrophie, l'absence d'azote engendre deux déséquilibres majeurs : une saturation de la chaîne de transport des électrons photosynthétiques et une surcharge de carbone organique dans le métabolisme (Figure 25).

Le déséquilibre rédox provient de l'arrêt des activités enzymatiques impliquées dans la production et l'assimilation de l'ammonium. La production nette d'une molécule de glutamate à partir de nitrate requiert en effet 10 électrons. Cette accumulation de pouvoir réducteur déclenche les mécanismes de photoprotection décrits dans le chapitre II. Dans ces conditions, le flux cyclique d'électrons permet de maintenir le gradient de protons et la production d'ATP (Figure 25). Le cycle de Calvin, malgré son rôle dans la réoxydation des cofacteurs réduits, est inhibé dans ces conditions pour éviter d'accentuer le déséquilibre C/N [243].

En effet, l'absence d'azote engendre également une accumulation de squelettes carbonés qui ne sont plus consommés par les enzymes du métabolisme de l'azote. Cet excès de carbone est notamment redirigé vers la production de glycogène et de PHB [216], qui dans ces conditions peuvent représenter jusqu'à 10% du poids sec des cellules [244]. Une partie du carbone est également injectée dans le cycle de Krebs dont les intermédiaires s'accumulent de manière significative [213,245]. L' α -KG est le métabolite clé de l'assimilation du NH_4^+ et son accumulation est symptomatique des déséquilibres C/N (Figure 25). Chez les cyanobactéries, ce senseur métabolique est au centre d'un réseau d'interactions protéiques impliquant des régulateurs agissant en cascade.

2. Effecteurs et réponses à la carence en azote

a. Cascade de signalisation

Le métabolisme de l'azote est sous contrôle de P_{II} , un régulateur homotrimérique qui peut se lier à l' α -KG (pour revue [246]). Chez les cyanobactéries, lorsque l'azote est abondant, les trimères P_{II} sont associés à deux protéines : la NAGK et le coactivateur transcriptionnel PipX [247]. Ils préservent l'activité de la NAGK (chaîne de biosynthèse de l'ornithine à partir de glutamate) en masquant le site de fixation de son inhibiteur, l'arginine. D'autre part, ils empêchent l'association de PipX avec NtcA, un facteur de transcription contrôlant l'expression d'un vaste régulon [248].

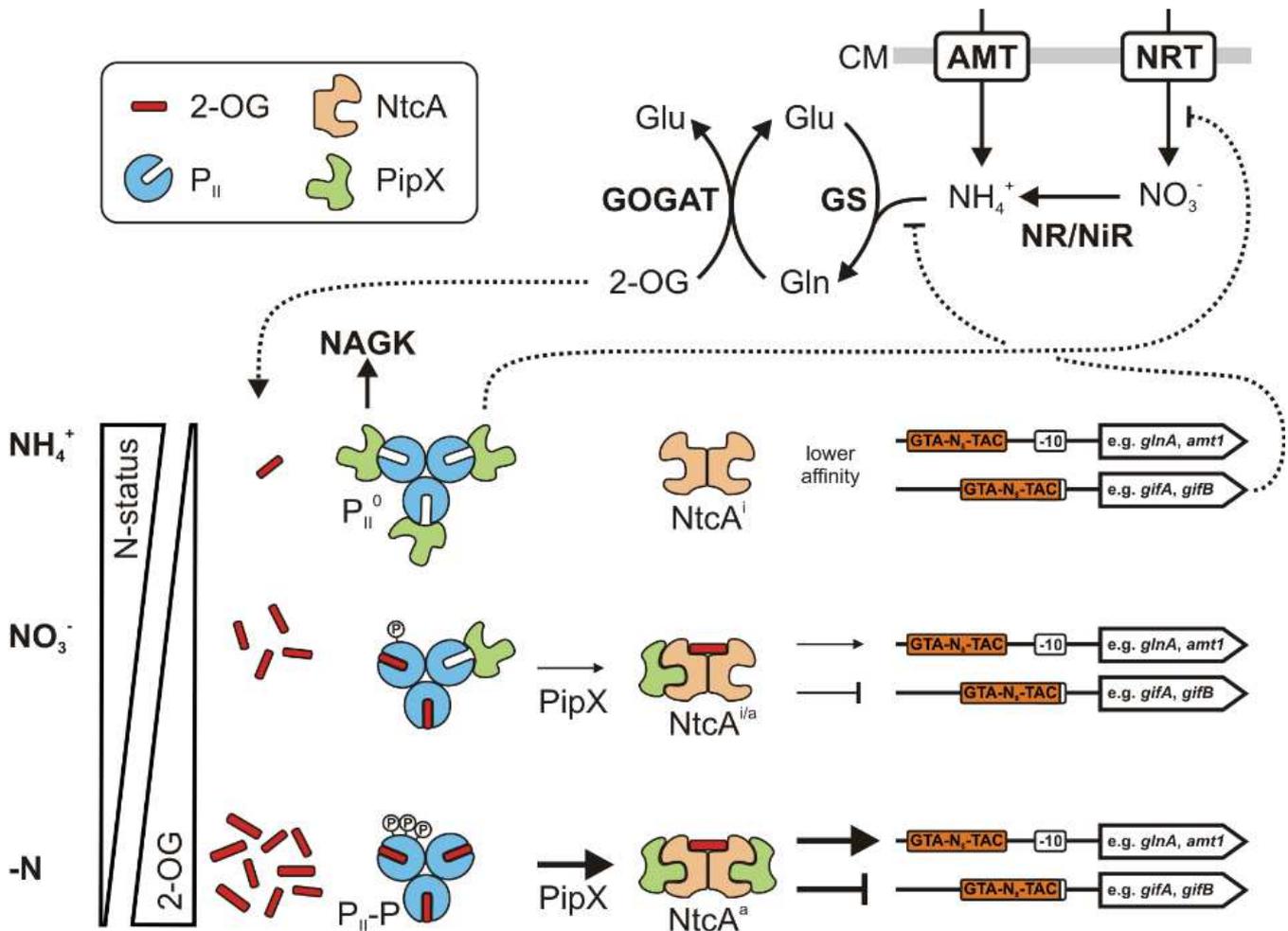


Figure 26 : Mécanisme de détection et de réponse à la carence d'azote chez *Synechocystis*.
(Extrait de Klähn *et al.*, 2015, PNAS [251])

Lorsque l'azote est abondant, il favorise la consommation de l' α -cétoglutarate (2-OG ou 2-oxoglutarate) et la formation du complexe P_{II}-PipX. En absence de son coactivateur transcriptionnel PipX, l'affinité de NtcA pour ses sites de fixation à l'ADN (GTA-N₈-TAC, rectangles oranges) est faible.

Lorsque l'azote devient limitant, l'accumulation d' α -cétoglutarate engendre sa complexation aux trimères PII qui sont ensuite phosphorylés. Cette modification induit la libération des protéines PipX qui à leur tour, sont recrutées par NtcA. La fixation de ce complexe au niveau des promoteurs peut activer ou diminuer la répression des gènes cibles impliqués dans la réponse à la carence d'azote (glutamine synthase, transporteurs...)

PipX = P_{II}-Interacting Protein; NR/NiR = Nitrate/nitrite réductase; GS = Glutamine synthase; GOGAT = Glutamine-oxoglutarate aminotransférase; NAGK = N-acetylglutamate kinase; Glu = Glutamate; Gln = Glutamine; GifAB = Glutamine Synthase Inactivating Factor A and B.

Lorsque l' α -KG s'accumule, il se complexe à P_{II}, induit sa phosphorylation et la libération de ses partenaires (Figures 25 et 26). Par conséquence, l'arginine peut exercer son inhibition sur la NAGK et empêche un approvisionnement supplémentaire d'ornithine dans le cycle de l'urée. Simultanément, PipX se fixe sur NtcA et induit le recrutement du complexe sur les promoteurs de nombreux gènes via un motif de fixation palindromique 5'-GTA-N₈-TAC-3' [249]. Il joue majoritairement le rôle d'activateur transcriptionnel (stabilisation de l'ARN polymérase) mais réprime aussi l'activité de certains promoteurs [250]. Chez *Synechocystis*, il induit l'expression des gènes codant pour la GS (*glnA*), P_{II} (*glnB*), le transport d'ammonium (*amt1*) et d'urée (*urtA*) tandis qu'il réprime *gifA* et *gifB* codant pour des peptides inhibiteurs de la GS (Figure 26 et [251]). Son site de fixation est également présent en amont de nombreux autres gènes [252]. Parmi eux, l'opéron *nrt-narB*, *nirA*, l'ensemble des gènes *ure* et *urt* mais aussi l'opéron *rbc*, des gènes codants pour certains composants du CCM ou encore *isiA*. Bien que l'effet transcriptionnel de NtcA n'ait pas été quantifié sur ces cibles potentielles, la distribution de ces sites de fixation suggère que NtcA orchestre une reprogrammation globale du métabolisme pour parer au manque d'azote.

b. Dégradation des réserves et chlorose

Pour redistribuer les flux métaboliques, les cyanobactéries doivent synthétiser de nouvelles protéines à partir d'acides aminés dont la production est abolie par la carence d'azote. Elles contournent ce paradoxe en mobilisant deux réserves internes : les antennes photosynthétiques et la cyanophycine.

La dégradation de la cyanophycine alimente directement le cycle de l'urée qui grâce à l'uréase, fournit du NH₄⁺ (Figure 21). L'inhibition de la NAGK par l'arginine permet alors de dédier ce nutriment à la synthèse de glutamate, précurseur de la plupart des acides aminés.

Lors de la carence d'azote, le flux d'électron linéaire de l'eau vers la ferrédoxine ralentit à cause des mécanismes de photoprotection. L'excitation du PSII par les antennes photosynthétiques devient alors superflue, voire délétère. Dans ces conditions, l'expression de deux protéases spécifiques (NblA1 et NblA2) est induite et permet leur dégradation [76]. Etant donné que ces complexes représentent jusqu'à 50% des protéines solubles, leur protéolyse joue à la fois un rôle de protection du PSII (diminution de l'excitation) et de recyclage de leurs acides aminés. Ces protéases sont responsables du changement de pigmentation (chlorose) observé chez *Synechocystis* et les autres cyanobactéries lors des carences d'azote [253].

c. Coordination avec le métabolisme du carbone

La redistribution de l'azote endogène s'accompagne d'un remodelage des voies du carbone pour en gérer l'excédent, notamment via le glycogène et les PHB. Le glycogène est un composé de stockage essentiel lors des carences d'azote alors que le rôle des PHB est encore questionné [216]. Chez *Synechocystis*, un mutant incapable de produire des PHB n'est pas plus sensible à la carence d'azote qu'une souche sauvage alors que cette viabilité diminue si la production de glycogène est abolie [216]. Un modèle récent propose que les granules de PHB sont associés au nucléoïde pour être équitablement distribués entre cellules filles. [216,254]. Lorsque de l'azote est à nouveau disponible, cette répartition éviterait aux cellules d'être confrontées à un manque d'énergie ou de carbone dans l'intervalle de temps nécessaire pour rétablir un métabolisme photoautotrophe. Il a été montré que le glycogène joue ce rôle de moteur pour la respiration dont le rendement énergétique favorise une reprise rapide de la croissance [255]. Leur biosynthèse est stimulée au niveau transcriptionnel par NrrA [245].

L'expression de NrrA est elle-même sous-contrôle de NtcA et est donc dépendante de l'équilibre C/N [256]. NrrA stimule également l'expression de gènes codant pour des enzymes cataboliques comme la Pfk ou encore Gap1 [257]. Enfin, NtcA peut se fixer sur le promoteur d'un gène codant pour un facteur σ^{70} (SigE) et stimuler sa transcription [258]. SigE est également un activateur transcriptionnel du catabolisme des sucres et présente un recouvrement de ses cibles avec NrrA (régulation de Pfk et Gap1). Il stimule cependant l'expression d'autres gènes codant par exemple pour la G6PDH et la pyruvate kinase [259].

L'ensemble de ces régulations coordonne l'évacuation du carbone organique excédentaire sous forme de réserves ou sa dégradation par le cycle de Krebs [213]. Les cellules peuvent alors réduire leur activité métabolique tout en assurant une maintenance minimale de leurs composants biologiques. Dans cet état proche de la dormance, elles peuvent préserver leur intégrité pendant plusieurs semaines [255].

Chapitre IV

Le dihydrogène, un composé énergétique aux propriétés attrayantes

Depuis les premiers signes de ralentissement de l'industrie pétrolière et les catastrophes liées au nucléaire civil, un nombre croissant de travaux se sont voués à la recherche et au développement de sources d'énergie alternatives. L'enjeu majeur de ces énergies nouvelles est d'assurer la transition énergétique amorcée dans de nombreux pays tout en soutenant leur développement économique et social. Par ailleurs, ces nouveaux mix énergétiques se doivent d'être durables et de favoriser l'indépendance énergétique des populations. Plusieurs procédés ont fait l'objet d'évaluations et de projections théoriques à plus ou moins long terme ayant validé leur faisabilité. Certains d'entre eux comme le photovoltaïque, la géothermie ou l'éolien sont d'ores et déjà en plein essor même s'il subsiste des limitations techniques et climatiques à leur expansion. L'autre grande filière se base sur les méthodes de production par voie biologique et inclut la biomasse, le biogaz ou encore les biocarburants. Le développement de ces derniers est étroitement lié aux progrès des biotechnologies de troisième génération pour les raisons évoquées dans le chapitre I. Parmi les biocarburants prometteurs on retrouve notamment l'éthanol, les terpénoïdes ou encore le dihydrogène.

A. Caractéristiques, applications et production biologique d'hydrogène

1. Caractéristiques

Le dihydrogène (abrégé hydrogène ou H_2) est la plus petite molécule connue et pourtant la liaison covalente entre ses deux atomes est très énergétique. Il s'agit d'un gaz très inflammable nécessitant un conditionnement spécifique mais dont la combustion ne produit que de l'eau et libère beaucoup d'énergie ($286 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). A titre de comparaison, un baril de pétrole brut (159 litres) contient autant d'énergie que 47,3 kg de H_2 [260].

Au regard de la crise énergétique mondiale, l'hydrogène est perçu comme un nouveau et puissant vecteur d'énergie, c'est-à-dire comme molécule « navette » permettant de stocker l'énergie sous forme chimique (liaison covalente H-H) directement là où elle est produite. Ce conditionnement de l'énergie facilite son transport et évite les pertes liées à son acheminement.

2. Applications actuelles et futures

Aujourd'hui, le H₂ est essentiellement utilisé dans l'industrie chimique (production de NH₄⁺) et pétrochimique (raffinage pétrolier). Son utilisation la plus connue comme carburant concerne l'aéronautique où il s'agit du combustible de propulsion des navettes spatiales.

Son entrée dans la sphère domestique et civile a trait aux moyens de transports. Différents constructeurs automobiles développent depuis plusieurs années des prototypes de voitures à hydrogène dont les premiers modèles ont été mis sur le marché en 2015. Ils sont équipés de moteurs électriques alimentés par une pile à hydrogène. D'autres technologies reposent sur l'alimentation directe en H₂ d'un moteur à explosion classique. A plus long terme, le développement des technologies de l'hydrogène pourrait étendre son champ d'application à d'autres moyens de transports (naval, aérien...). Cependant pour être réellement durables, ces technologies appellent une révision profonde des modes de production de l'hydrogène, qui sont actuellement polluants et tributaires des énergies fossiles.

3. Vers un carburant renouvelable

a. Enjeu de la production biologique de H₂

La production annuelle mondiale de dihydrogène s'élève à environ 50 millions de tonnes. Les principales méthodes de production comprennent la gazéification de la biomasse ou du charbon et le reformage des combustibles fossiles comme le pétrole et le gaz naturel. Ces procédés rejettent cependant beaucoup de CO₂ et dépendent de ressources épuisables. L'électrolyse de l'eau est une autre méthode permettant d'obtenir du H₂ plus pur mais nécessite un apport conséquent d'énergie.

La synthèse de H₂ par voie biologique est particulièrement appropriée puisqu'elle répond à ces critères de durabilité [261]. Elle comprend aujourd'hui plusieurs modes de production basés sur l'utilisation de micro-organismes chimiohétérotrophes et, plus désirables encore, photoautotrophes (pour revue [262]).

La fermentation obscure repose sur la digestion de composés organiques par des consortia bactériens hétérotrophes (*Clostridium*, *Bacillus*...) qui vont progressivement convertir les polymères complexes en acides, CO₂ et H₂. Ces techniques de seconde génération sont néanmoins limitées par la disponibilité et la récalcitrance des matières premières à la fermentation.

Hydrogénases FeFe

Hydrogénases NiFe

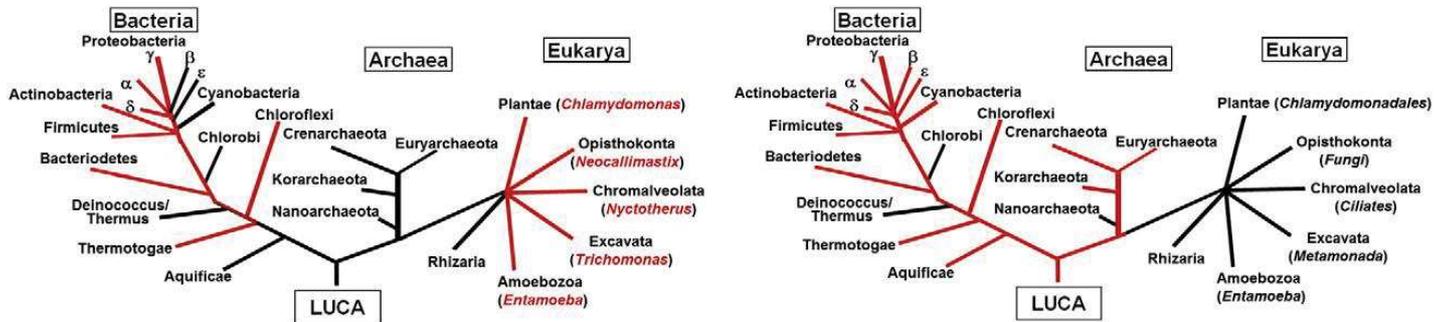


Figure 27 : Distribution des hydrogénases FeFe et NiFe dans les trois domaines du vivant (Extrait de Peters *et al.*, 2015, BBA [264])

Les phyla dans lesquels au moins un homologue de chaque type d'hydrogénase est retrouvé sont indiqués en rouge.

La photo-fermentation implique quant à elle des bactéries photosynthétiques anoxygénogènes utilisant différents donneurs d'électrons (H_2S , molécules organiques...) pour générer de l'ATP et du pouvoir réducteur. Ceux-ci sont en partie utilisés pour assimiler le N_2 atmosphérique grâce à la nitrogénase dont l'un des sous-produits est le H_2 . Le rendement est cependant limité par la forte demande en ATP de la nitrogénase.

Enfin, l'hydrogène peut être produit par photolyse de l'eau dans les organismes photosynthétiques comme les algues et les cyanobactéries (pour revue [263]). Le processus repose sur l'oxydation de l'eau par le PSII qui produit des électrons et de l'ATP. Une partie du pouvoir réducteur peut être consommé par l'hydrogénase pour réduire deux protons en H_2 . Les cyanobactéries sont des organismes prometteurs pour développer une filière renouvelable d'hydrogène puisque sa synthèse est proportionnelle à la biomasse produite et donc à l'assimilation du CO_2 . Il existe néanmoins des verrous biologiques à la production de H_2 qui sont inhérents au métabolisme de l'hydrogène et aux hydrogénases [202].

b. Les hydrogénases

Les hydrogénases sont des métalloenzymes que l'on retrouve dans les trois domaines du vivant mais uniquement dans les micro-organismes (Figure 27 et pour revue [264]). Elles comprennent un nombre variable de sous-unités organisées en deux assemblages fonctionnels : un module diaphorase réalisant l'oxydoréduction du cofacteur (ferrédoxine ou NAD(P)H) et un module hydrogénase où le H_2 est produit ou consommé. Ces enzymes sont majoritairement bidirectionnelles mais certaines présentent un biais favorable à la consommation d'hydrogène (« uptake » hydrogénase) et d'autres, comme celle de *Synechocystis*, à sa production [265].

Elles possèdent des centres Fe-S permettant l'acheminement des électrons jusqu'à la sous-unité catalytique. Cette dernière porte, au niveau de son site actif, un centre métallique pouvant contenir un seul ou deux atomes de fer (Fe et FeFe) ou un alliage nickel-fer (NiFe). La synthèse et l'insertion de ce cluster métallique font intervenir des chaperones spécifiques (les protéines Hyp) ainsi qu'une protéase assurant le contrôle qualité de l'assemblage. En effet, celle-ci active la sous-unité catalytique en clivant son extrémité C-terminale uniquement lorsque le ligand métallique est correctement inséré.

La composition de ces ligands complexes définit trois grands groupes d'hydrogénases et est responsable de leur sensibilité à l'oxygène. En effet, le O₂ supprime l'activité enzymatique lorsqu'il se fixe aux métaux du site actif. Dans le cas des hydrogénases à fer, que l'on retrouve chez les eucaryotes et certaines bactéries, cette liaison le détruit irréversiblement. En revanche, pour les hydrogénases NiFe, exclusivement procaryotiques, cette inhibition est réversible grâce au nickel.

Chez les cyanobactéries, le rôle de l'hydrogénase NiFe est encore peu compris mais semble étroitement lié au métabolisme central et aux perturbations redox [97,265-267]. Chez *Synechocystis*, l'hydrogénase est encodée par l'opéron *hox* et possède 5 sous-unités (HoxEFUYH) dont la maturation implique 6 chaperones (HypABCDEF) ainsi qu'une protéase dédiée, HoxW.

B. Organisation génomique, rôle et régulation : Revue I

Chez *Synechocystis*, les gènes codant les sous-unités de l'hydrogénase sont regroupées au sein de l'opéron *hox* qui comprend aussi trois autres gènes codant des protéines de fonctions inconnues (*sll1222*, *ssl2420* et *sll1225*). L'expression de cet opéron est sous-contrôle de différents régulateurs transcriptionnels (LexA, AbrB1 et AbrB2) mais aussi probablement au niveau post-transcriptionnel via des ARN antisens et non-codants [238]. Les gènes codant pour les différentes chaperones nécessaires à l'assemblage du centre NiFe de l'enzyme (HypABCDEF) et à la maturation de la sous-unité catalytique par clivage protéolytique (HoxW) sont quant à eux répartis sur l'ensemble du chromosome).

Les travaux précédents menés au laboratoire ont permis de générer des mutants surexprimant simultanément et de manière constitutive l'opéron *hox* ainsi que les six gènes *hyp*. Ces souches présentent une forte activité hydrogénase lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu enrichi en fer et en nickel [267]. Elles présentent également une tolérance accrue aux stress oxydant et métabolique. Néanmoins, l'hydrogénase de *Synechocystis* est une enzyme complexe qui semble aussi régulée au niveau post-translationnel par glutathionylation [99]. Ces nouveaux éléments suggèrent que notre compréhension du métabolisme de l'hydrogène chez les cyanobactéries est encore partielle.

Les différents points évoqués ci-dessus sont détaillés dans la revue suivante dont je suis deuxième auteur.

Review

Advances in the Function and Regulation of Hydrogenase in the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803

Corinne Cassier-Chauvat, Théo Veaudor and Franck Chauvat *

UMR8221, CEA, CNRS, University of Paris XI, Institute of Biology and Technology Saclay, Laboratory of Biology and Biotechnology of Cyanobacteria, CEA-Saclay, Gif sur Yvette 91 191, France; E-Mails: corinne.cassier-chauvat@cea.fr (C.C.-C.); theo.veaudor@cea.fr (T.V.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: franck.chauvat@cea.fr; Tel.: +33-1-69-08-35-74.

External Editor: Patrick Hallenbeck

Received: 11 September 2014; in revised form: 15 October 2014 / Accepted: 21 October 2014 / Published: 31 October 2014

Abstract: In order to use cyanobacteria for the biological production of hydrogen, it is important to thoroughly study the function and the regulation of the hydrogen-production machine in order to better understand its role in the global cell metabolism and identify bottlenecks limiting H₂ production. Most of the recent advances in our understanding of the bidirectional [Ni-Fe] hydrogenase (Hox) came from investigations performed in the widely-used model cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 where Hox is the sole enzyme capable of combining electrons with protons to produce H₂ under specific conditions. Recent findings suggested that the Hox enzyme can receive electrons from not only NAD(P)H as usually shown, but also, or even preferentially, from ferredoxin. Furthermore, plasmid-encoded functions and glutathionylation (the formation of a mixed-disulfide between the cysteines residues of a protein and the cysteine residue of glutathione) are proposed as possible new players in the function and regulation of hydrogen production.

Keywords: hydrogen; bioproduction; cyanobacteria; oxidative stress; regulation; cysteine oxidation; sugar stress; electron transport; ferredoxin

1. Introduction

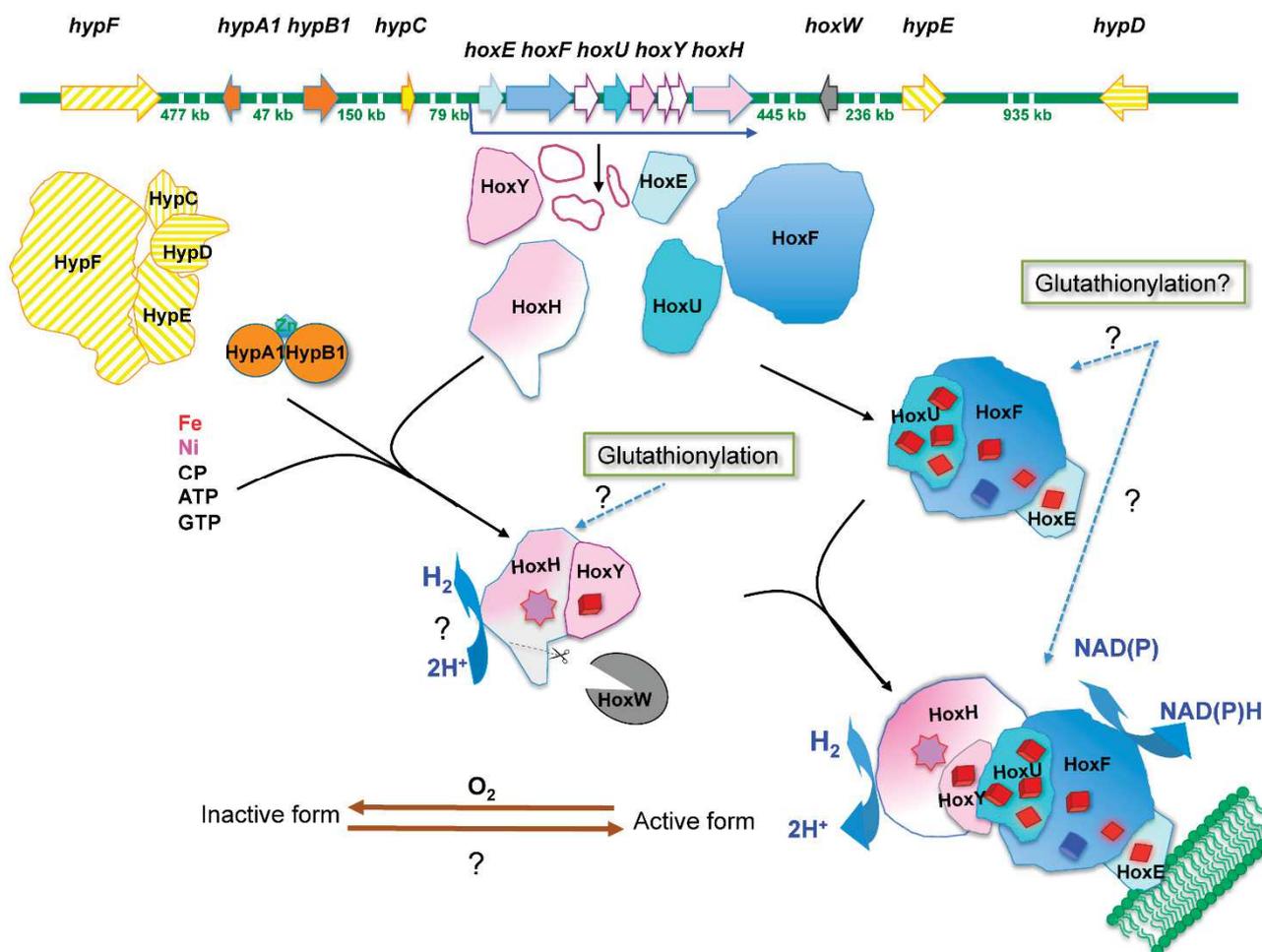
Energy is crucial to modern industry. In 2012, 570 ExaJoules (1 EJ = 10^{18} Joules) of energy was consumed worldwide, of which approximately 80% was generated from burning fossil fuels thereby liberating into the atmosphere about 6 gigatons (6×10^9 tons) of the green-house-generating gas CO₂. Even hydrogen (H₂), which has a higher energy content than oil (142 MJ/kg for H₂ vs. 44.2 MJ/kg for oil) and burns cleanly, producing only water as its by-product, is not yet a clean biofuel because it is mostly produced from burning oil [1]. Hence, the pollution problem and the fossil fuel shortfall anticipated to occur during the 21st century make it important to develop new energy sources that are plentiful, renewable and environmentally friendly. Sunlight is naturally attractive as it is the most readily available and inexpensive source of energy on Earth. For instance, the annual solar flux received by Earth—approximately 5 YottaJoules (1 YJ = 10^{24} Joules)—is in huge excess of the 570 ExaJoules used by our society. Consequently, there is a growing interest in processes that could couple the solar energy-powered capture of CO₂ to the production of energies through the use of photosynthetic organisms, such as microalgae [2,3]. Indeed, production by microalgae of renewable biofuels from nature's most plentiful resources, solar light, water, mineral salts and CO₂, is of great interest in recycling CO₂ and saving arable soils, fertilizers, pesticides and fresh waters for crop production. Cyanobacteria (formerly termed blue-green algae) have the potential for that. First, cyanobacteria are the most abundant photosynthetic organisms of our planet. They colonize most ecological niches, fresh and salt waters, terrestrial and extreme environments (pH, temperature) that counter-select most competing organisms, a primary concern of mass cultivation [4]. Second, cyanobacteria convert captured solar energy into biomass at high efficiencies (3%–9%) [2,5] to produce a large part of the atmospheric oxygen and organic assimilates for the food chain [6]. On a global scale, cyanobacteria fix an estimated 25 Giga tons of carbon from CO₂ per year into energy dense biomass [7]. To perform this huge CO₂ fixation, cyanobacteria use 0.2%–0.3% of the solar energy, 178,000 terawatts (1 TW = 10^{12} watts), reaching the Earth surface [8]. Thus, the amount of energy passing through cyanobacteria exceeds by more than 25 times the energy demand of our society; roughly 1000-fold the total nuclear energy produced on Earth. Third, as cyanobacteria tolerate high CO₂ content in gas streams and they can grow in a variety of locations, they can be used as “low-cost” microbial cell factories for the capture and storage of industrial CO₂ gas near the sites of industrial productions, thereby reducing transportation costs. Fourth, many cyanobacteria as the unicellular model strain *Synechocystis* PCC6803 have a small sequenced genome amenable to genetic manipulations including with versatile plasmid vectors [9–11]. A powerful genetics is welcome as natural (wild-type) cyanobacteria are not suitable biofuel producers because some of the required metabolic pathways are partially lacking or need optimization [3,5].

In cyanobacteria, two enzymes can produce hydrogen, the [Ni-Fe] bidirectional hydrogenase (Hox for hydrogenase oxidation) and the nitrogenase. Both enzymes are sensitive to oxygen and do not occur in all strains, but for H₂ production the [Ni-Fe] hydrogenase, which does not use ATP [12], is energetically favored over the nitrogenase enzyme that consumes 16 ATP per molecules of H₂ produced [13].

The bidirectional Hox enzyme has been mostly studied in the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 (hereafter *Synechocystis*), where it is the sole enzyme capable of combining electrons

with protons to produce H₂ under specific conditions [12,14]. The Hox enzyme comprise five protein-subunits, HoxEFUYH, and a [Ni-Fe] and several [Fe-S] redox clusters (Figure 1).

Figure 1. Schematic representation of hydrogen production machine in *Synechocystis* adapted from [12,15]. The genes are represented by arrows, which point in the direction of their transcription, and are colored similarly to their protein products. The green numbers indicate the spacing distance (in kilobases) between the scattered genes. The *hoxEFUHY* operon is weakly transcribed [16] as the polycistronic mRNA (bent blue arrow), which encodes (i) the hydrogenase sub-complex (made by the HoxY protein and the HoxW-matured HoxH subunit); (ii) the HoxEFU diaphorase sub-complex; and (iii) the three proteins of unknown function (white forms). The electron transfer FMN cofactor, Fe-Ni center, and [4Fe-4S] and [2Fe-2S] clusters of the Hox proteins, are represented by the blue squares, the pink star, dark-red squares and light-red diamonds, respectively. The zinc-bound to HypA1 and HypB1 proteins is shown as the blue form. CP designates carbamoyl phosphate. The brown lines stand for the reversible inactivation of Hox activity mediated by oxygen. The photosynthetic membrane is represented in green.



The HoxEFU subunits make up the diaphorase sub-complex that transfers to the [Ni-Fe] hydrogenase sub-complex HoxHY the NAD(P)H-transported electrons produced by photosynthesis and/or sugar catabolism [17]. Recently, based on an *in vitro* analysis, it was also proposed that the Hox enzyme can be reduced by ferredoxin or flavodoxin [18], similarly to the [Fe-Fe] hydrogenase of eukaryotic algae [19]. During HoxHY assembly, the HoxH subunit is processed by the HoxW protease [14], and subsequently the [Ni-Fe] HoxEFUYH complex is assembled by the six subunits HypABCDEF complex [12,14]. The Hox enzyme is dispensable to the photoautotrophic growth in standard laboratory conditions [20]; it has a bias towards H₂ production [21] and it is reversibly inactivated by oxygen [17]. Hence, investigating the photobiological production of H₂ by cyanobacteria has both an evident biotechnological interest, and a basic research interest, in addressing the paradox of the antagonistic production of hydrogen and oxygen (O₂ inhibits H₂ production).

2. Expression and Regulation of the Genes Involved in Hydrogen Production

In order to use cyanobacteria for the biological production of hydrogen, it is important to thoroughly study the regulation of the hydrogen-production machine in order to better understand its role in the global cell metabolism (Figure 2) and identify bottlenecks limiting H₂ production.

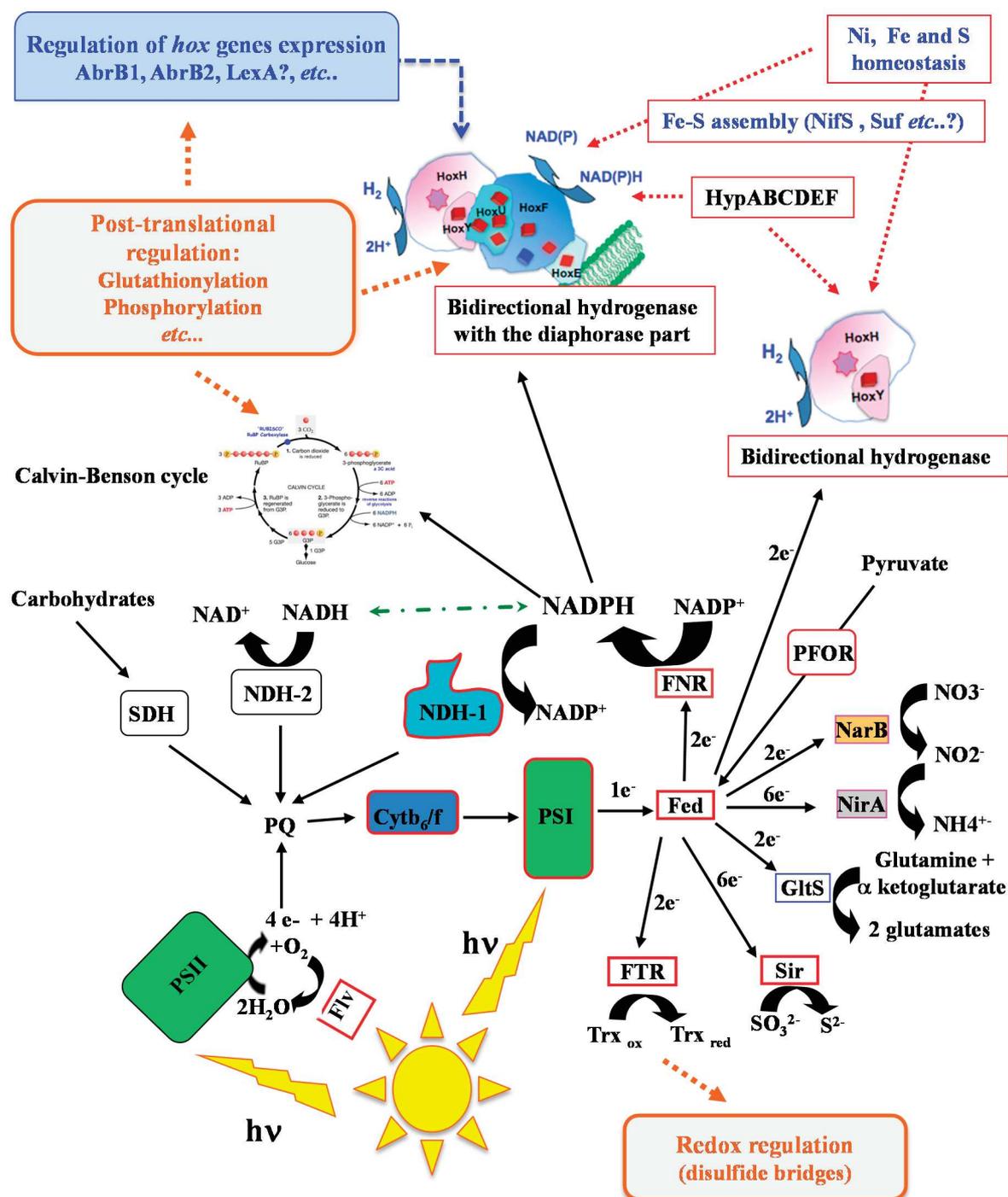
In contrast to the *hypABCDEF* genes that are scattered in the *Synechocystis* chromosome (Figure 1), the *hoxEFUYH* genes are clustered in an octacistronic operon, which comprises the *hoxE*, *hoxF*, *sll1222*, *hoxU*, *hoxY*, *ssl2420*, *sll1225* and *hoxH* genes in that order, and also encode three proteins of unknown function: Sll1222, Ssl2420 and Sll1225 [14,20]. This operon is weakly expressed as a polycistronic transcript, which initiates 168 bp upstream of the start codon of the *hoxE* gene [22,23]. The promoter of the *hoxEFUYH* operon is not very active [16] though it harbors the two sequences resembling canonical *E. coli*-like promoter boxes, -35 (TTGctc) and -10 (TAacAa) located at correct distances from each other (18 bp) and from the transcription start site (7 bp). As such canonical promoters were long ago shown to be strongly active in *Synechocystis* [24], this indicated that it is negatively regulated (see below).

The *hoxEFUYH* operon is regulated by various environmental conditions, such as hydrogen, light, nitrate, nickel, oxygen and sulfur availabilities [25], in agreement with the finding that H₂ production can be increased in media with optimized concentrations of these elements [26]. The transcript levels of all *hox* genes are increased (five to sixfold) under microaerobic conditions [27,28], with an additional induction (10–12-fold) of *hoxEF* in darkness [27].

The upregulation of *hox* genes elicited by nitrogen starvation is consistent with the increased H₂ production triggered by inhibition of nitrate assimilation, suggesting that hydrogenase serves as an alternative sink for photosynthetic electrons no longer used for nitrate reduction [29].

The *hox* genes are also regulated by inhibitors of the photosynthetic electron transport chain in a way suggesting that the redox state of the plastoquinone pool does not play a prominent role in *hox* regulation [27] and H₂ production [26]. Furthermore, the expression of the *hoxEFUYH* operon is controlled by three transcription factors (Figure 2); two positively acting regulators, LexA (Sll1626) [22,23] and AbrB1 (Sll0359) [30], and one repressor AbrB2 (Sll0822) [16].

Figure 2. Schematic representation of the redox (electron transfer) metabolism of *Synechocystis* growing in photoautotrophic conditions. The electron transfers and transcriptional regulations are represented by solid black arrows and dotted blue arrows, respectively. The redox dependent- and metal requiring-processes are indicated by orange and red dotted arrows, respectively. PSII, photosystem II; PSI, photosystem I, Cytb₆/f, cytochrome b6/f; Fed, ferredoxin; Flv, flavodiiron protein; FNR, ferredoxin NADP reductase; FTR, ferredoxin thioredoxin reductase; GltS, ferredoxin dependent glutamate synthase; NarB, Nitrate reductase; NirA, Nitrite reductase; NDH1, NADPH oxidoreductase complex 1; NDH2, NADPH oxidoreductase type 2; PQ, plastoquinone pool; SDH, succinate dehydrogenase; Sir, sulfite reductase; Trx = Thioredoxin.



2.1. LexA a Positively Acting Player in Hydrogen Production

By using streptavidin-coated magnetic beads in DNA affinity assays two groups identified the LexA protein as capable of binding to two regions of the *hox* promoter region, *i.e.*, at 198–338 bp [23] or 592–690 bp [22] upstream of the *hoxE* start codon. Prior to these studies, the LexA regulator was found not to regulate typical DNA repair genes, unlike what occurs in *E. coli*, but instead to control genes involved in carbon metabolism [31] and the redox-responsive gene *crhR* encoding an RNA helicase involved in translational regulation [32]. Furthermore, proteomic analyses identified LexA as protein associated to plasma membrane and thylakoids [25].

The occurrence of two LexA binding sites in the *hox* promoter suggest that the LexA-mediated regulation involves DNA bending [14], a well-known phenomenon in transcriptional regulation. Furthermore, the depletion of the LexA protein decreased the hydrogenase activity, suggesting that LexA plays a positive role in hydrogen production [25]. To test the influence of LexA on the transcription of the *hox* operon, we cloned the *hox* promoter in front of the promoter-less *cat* reporter gene of the promoter-probe plasmid vector pSB2A, which replicates stably in *Synechocystis* at one copy per chromosome copy [9]. Then, we introduced the corresponding recombinant plasmid pSB2A-*hox* promoter in the WT (wild-type) strain and Δ *lexA* mutants where we measured the expression of the *cat* (chloramphenicol acetyl transferase) gene driven by the *hox* promoter. Similar CAT activities were obtained in the WT and Δ *lexA* strains growing in standard photoautotrophic conditions, indicating that the activity of the *hox* promoter is not affected by the absence of LexA (data not shown). This finding challenges the notion that LexA is a direct transcription regulator of the *hox* operon.

2.2. The AbrB1 Protein Positively Regulates the Transcription of the *hoxEFUHY* Operon

By using DNA affinity assays, another transcription factor positively acting on *hox* expression was isolated on the basis of its specific interaction with the *hox* promoter region. This regulator, AbrB1, resembles the AbrB regulator of *B. subtilis*, which regulates about 100 genes involved in various processes (sporulation, biofilm formation, antibiotic production, development of competence for DNA uptake), though the cyanobacterial AbrB1 protein has its putative DNA-binding domain in its C-terminal region, instead of in the usual N-terminal region as occurs in non-cyanobacterial AbrB proteins [30,33]. The *Synechocystis* AbrB1 protein was found to be indispensable to cell life in both the wild-type strain [30] and the glucose tolerant mutant [33]. Interestingly, AbrB1 was found to interact with a high degree of confidence with itself, suggesting that AbrB1 acts as an oligomer [25]. The *abrB1* gene is expressed from an atypical promoter harboring an extended –10 element (5'-tgtTATAtT-3') [30], which might compensate the absence of a genuine –35 box (5'-TTGACA-3'; located at the correct 17 ± 1 bp distance from the –10 element) similarly to what found for the *secA* gene [34].

2.3. The AbrB2 Repressor of the *hoxEFUYH* Operon Plays a Prominent Role in the Regulation and the Tolerance to Oxidative and Metal Stresses

Because it resembles to AbrB1, the AbrB2 has also been studied in *Synechocystis*, and appeared to be dispensable to the growth of both the glucose-tolerant mutant [33] and the wild-type strain [16].

In the glucose-tolerant mutant, AbrB2 appeared to regulate numerous genes involved in nitrogen and carbon assimilation, and to interact with AbrB1 [33,35,36]. In the wild-type strain AbrB2 was shown to repress its own gene and the *hox* operon [16]. The others genes directly involved in hydrogen production: *hoxW*, *hyp*, *lexA* and *abrB1* were not regulated by AbrB2, even though it appeared to regulate a large number of genes (about 330 genes, mostly negatively), as shown by transcriptome analysis with pan-genomic microarrays [37]. The highest number of the AbrB2-responsive genes code for hypothetical proteins or unknown proteins (about 200 genes), emphasizing that we still have a limited knowledge of *Synechocystis*, though it is one of the more intensively studied cyanobacterium. Many these unknown genes belong to the endogenous plasmids, suggesting that they play a role in hydrogen production.

The AbrB2 master regulator was also found to regulate several transport genes, including *cysAPUW* (SO_4^{2-}), *fecBCD* (Fe^{2+}), in agreement with the Hox enzyme using a Ni-Fe and several Fe-S redox clusters to produce hydrogen [37]. In this *abrB2*-deleted mutant, the increased expression of the anti-oxidant genes *cydAB* (cytochrome bd-quinol oxidase that can reduce O_2) and *norB* (nitric oxide reductase) are consistent with the increased production of hydrogen [16], which is regarded as an anti-oxidant process that evacuates electrons occurring in excess to prevent them to reduce molecular oxygen and produce toxic reactive oxygen species [12,15,17,18]. Consistently, the absence of the AbrB2 repressor led to an increased tolerance of *Synechocystis* to both metal and oxidative stresses triggered by nickel and the thiol oxidizing agent diamide [38].

The *abrB2* promoter region was also analyzed, using transcriptional fusion to the promoter-less *cat* reporter gene of the plasmid pSB2A that replicates stably in *Synechocystis* at one copy per chromosome copy [9]. The *abrB2* gene was found to expressed from an atypical promoter, which harbors an extended -10 element (5'-TGTATAAT-3'), likely compensating the absence of a genuine -35 box (5'-TTGACA-3'; located at about 17 ± 1 bp from the -10 element), similarly to the genes *secA* [34], *gap2* [39] and *abrB1* [30]. In addition, a consensus DNA motif, TT-(N₅)-AAC, was also proposed for AbrB2 binding [16].

3. Function and Over-Production of the Hydrogen Production Machine

To attempt increasing hydrogenase activity in *Synechocystis*, Germer and co-workers used the light-inducible promoter of the photosynthetic gene *psbAII* to increase the expression of the endogenous *hoxEFUYH* operon and the heterologous *Nos**hypABCDEF* operon from *Nostoc* PCC7120 [40]. The gain in activity was modest (3.2-fold; *i.e.*, from $2.9 \text{ nmol H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \cdot \text{chlorophyll}^{-1}$ in wild-type cells up to $9.4 \text{ nmol H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \cdot \text{chlorophyll}^{-1}$ in mutant cells) for three main possible reasons. First, the light-inducible *psbAII* promoter used to increase the expression of the *hoxEFUYH* and the *Nos**hypABCDEF* genes is more active under high light that increases the photosynthetic production of O_2 , which inhibits hydrogenase activity. Second, the *Nostoc* HypABCDEF proteins might be not fully active on the *Synechocystis* PCC6803 HoxEFUYH proteins. Third, it is also possible that the *Nostoc* HypABCDEF proteins might somehow interfere with the function of the endogenous *Synechocystis* HypABCDEF proteins.

To increase the expression of the *hoxEFUYH* operon and the *hypABCDEF* genes, we have used the strong λp_R promoter [10,24]. Practically, we replaced the weak [16] natural promoter of the *hoxEFUYH*

operon by the λp_R promoter, and we cloned the *hypABCDEF* genes under the control of the same λp_R promoter, in a plasmid that replicates at the same 10–20 copies per cell as the chromosome [10]. The mutant grew as fit as the WT strain. It strongly over-expressed the *hoxEFUYH* operon and the *hypABCDEF* genes (about 100-fold), and exhibited a 20-fold higher levels of active hydrogenase than the WT strain. These findings show that an increased production of active hydrogenase is not detrimental to cell life, and other factors than *hoxEFUYH* and *hypABCDEF* transcription limit hydrogen production (see below).

4. Role of the Hydrogen Production Machine

Though, the complex hydrogenase enzyme is neither ubiquitous in all cyanobacteria nor essential to the standard photoautotrophic growth of model strains [12], the analysis of gene deletion and overexpression mutants showed that the presence of the Hox enzyme offers some growth advantages in certain environmental situations.

The hoxEFUYH Operon Operates in the Protection against Redox Stresses Triggered by Hydrogen Peroxide or the Reduced Carbon Metabolites Glucose and Glycerol

All aerobic organisms invariably produce reactive oxygen species, such as H₂O₂, through the accidental autoxidation of redox enzymes [41], which occurs when their reduced cofactors reduce oxygen. This phenomenon is important in cyanobacteria, because their active photosynthesis massively produces oxygen and electrons [42]. As the cyanobacterial hydrogenase enzyme complex has been proposed to act as an electron valve releasing some of the supernumerary electrons [12,17], we have compared the H₂O₂ tolerance of the WT strain to that of mutants which either lack the *hoxEFUYH* operon, or overexpress it, alone or in combination with the *hypABCDEF* genes [15]. The data showed that the *hoxEFUYH* operon and the *hypABCDEF* genes contribute to the protection against H₂O₂, positively (*hoxEFUYH* operon) or negatively (*hypABCDEF*). Future experiments will be required to test whether the higher H₂O₂ tolerance directed by the overexpression of the *hoxEFUYH* operon is due to the increased abundance of (i) the HoxHY hydrogenase enzyme *per se*; (ii) the HoxEFU diaphorase enzyme; and/or (iii) the Sll1222, Ssl2420 and Sll1225 proteins of as yet unknown function.

In addition, we have tested the influence on hydrogenase deletion or overproduction mutants of the reduced-carbon metabolites glucose and glycerol, a cheap surplus of industries [43] that stimulate hydrogen production in the cyanobacteria *Arthrospira (Spirulina) maxima* [44] and *Cyanothece* ATCC 51142 [45]. Both glucose and glycerol might be toxic to *Synechocystis* growing under an otherwise normal light fluence, probably because these reduced metabolites somehow decrease the electrons-consuming CO₂-assimilation, thereby allowing spared electrons to recombine with O₂ and generate ROS [46]. The level of tolerance to these stresses increased in parallel with the abundance of the Hox proteins [15], in agreement with the higher tolerance to a mixture of both glucose and arginine of the WT strain as compared to a *hoxH*-deletion mutant [18]. Collectively, these data are consistent with the proposal that hydrogenase operates as an electron valve preventing supernumerary electrons generated by photosynthesis and/or sugar catabolism to recombine with O₂ to generate toxic reactive oxygen species [12].

5. Glutathionylation a Probable New Player in Hydrogen Production

As mentioned above, cyanobacteria are continuously challenged with toxic reactive oxygen species generated by photosynthesis and respiration, which can oxidize the thiol group (SH) of two cysteinyl residues to form disulfide bonds (-S-S-) between proteins, or between a protein and a molecule of the, crucial [47], anti-oxidant tripeptide glutathione (glutathione-protein mixed disulfide, also termed glutathionylation) [41,42]. Collectively, the data suggesting that the *hox* operon repressor AbrB2 exists under two uncharacterized posttranslational modification forms [35,48], and the findings that AbrB2 and the *hox* operon play a role in the tolerance to oxidative stresses [15,38], prompted us to test whether these proteins might be glutathionylated. We found that the single, widely conserved cysteine of AbrB2 is the target of glutathionylation, which affects the oligomerization of AbrB2; its binding on the *hox* operon-promoter DNA; its repression of a wealth of other genes; and its stability at the non-standard temperature of 39 °C [38]. The role of AbrB2 can be viewed as follows. In cells growing in absence of stress, AbrB2 down-regulates hydrogen production and other stress defenses. By contrast, in cells facing oxidative stresses triggered by light excess or metal availabilities, AbrB2 is oxidized and its single cysteine is glutathionylated. Thus, AbrB2 is no longer able to repress hydrogen production thereby allowing evacuation of excess electrons, among other anti-oxidant processes. After recovery from oxidative stress, AbrB2 activity is restored (likely through deglutathionylation catalyzed by glutaredoxins [49]) and starts repressing hydrogen production and other anti-oxidant process, to save photosynthetic electrons. Similarly, we found that the cysteine of the other *hoxEFUYH* regulator, AbrB1, which interacts with AbrB2 and also regulates the *hoxEFUYH* operon [30,33,36], can be glutathionylated *in vitro* like AbrB2. Thus, it will be interesting in the future to analyze the influence of the glutathionylation of AbrB1 and AbrB2 on their interaction and their regulation of hydrogen production. To our knowledge, AbrB2 and AbrB1 are the first cyanobacterial regulators reported to undergo glutathionylation (in other prokaryotes, only the OxyR regulator is known to be controlled by glutathionylation [50]), emphasizing on the evolutionary conservation of this process, well described in eukaryotes [51].

Stimulated by the findings that both AbrB1 and AbrB2, and the mercuric reductase enzyme [49], can be glutathionylated, we performed a large-scale proteomic analysis of glutathionylation [52]. Amongst the glutathionylatable proteins, we found HoxH and HoxF. Interestingly, the glutathionylated Cys (C289) of HoxF is located close to the putative binding site for NAD(P). These findings will certainly stimulate the analysis of the crosstalk between hydrogen production and the oxidative stress-responsive glutathionylation-and-deglutathionylation process.

6. Conclusions

Though significant progress has been made recently in our understanding of the function and regulation of the complex hydrogen Ni-Fe hydrogenase of the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803, important questions remain.

Recent *in vitro* data suggested that the Hox enzyme can receive electrons from not only NAD(P)H as usually shown, but also, or even preferentially, from ferredoxin. This proposal will certainly stimulate

the investigation of the selectivity/redundancy of the nine ferredoxins of *Synechocystis*, which are conserved in cyanobacteria.

Using gene deletion and over-expression, it has been shown recently that the *hoxEFUYH* operon operates in the defense against redox stresses triggered by H₂O₂ or reduced carbon or nitrogen metabolites. These findings strengthen the proposal that hydrogenase operates as an electron valve to prevent the supernumerary electrons to recombine with O₂ to generate toxic reactive oxygen species. Hence, the hydrogenase complex can be viewed as an important enzyme in cyanobacteria like *Synechocystis*, which can grow in biofilm, a thick network of auto-aggregated cells where they are inevitably exposed to H₂O₂ and reduced metabolites released by their neighbors (living or dying and lysing). This view is strengthened by the absence of hydrogenase enzyme in most planktonic cyanobacteria living in open oceans. It will be interesting in the future to investigate the influence of the *Synechocystis* hydrogenase enzyme in the growth and response to environmental stresses of cells incubated not only in agitated liquid cultures but also in static conditions or on solid media to favor the formation of biofilm.

The recently achieved simultaneous overproduction of the HoxEFUYH and HypABCDEF proteins within the same cells led to a 20-fold increase in active hydrogenase. These sophisticated mutants with a higher hydrogenase content and a healthy growth will be very useful cell factories for the purification of large hydrogenase quantities for structural analyses, the data of which should enable the design of a meaningful mutational strategy to increase the low natural O₂ tolerance of the hydrogenase enzyme to increase hydrogen production.

All hydrogenase-overproducing mutants displayed higher levels of expression of the *hoxEFUYH* and *hypABCDEF* genes than that of active hydrogenase, indicating that limiting post-transcriptional factors should be dealt with. Thus, it will be important to pay particular attention to glutathionylation (the formation of a mixed-disulfide between the cysteines residues of a protein and the cysteine residue of glutathione) because it was recently reported that the AbrB1 and AbrB2 hydrogen regulator and the HoxH (diaphorase) and HoxF (hydrogenase) protein-subunits can be glutathionylated. These findings will certainly stimulate the analysis of the redox crosstalk between hydrogen production and the oxidative stress-responsive glutathionylation-and-deglutathionylation process.

Acknowledgments

This work was supported in part by the French scientific Program “ANR-09-BIOE-002-01 (EngineeringH2cyano)”. Théo Veaudor is recipient of a fellowship (IRTELIS) from the CEA (France).

Author Contributions

Thorough analysis of the literature: Corinne Cassier-Chauvat, Franck Chauvat and Théo Veaudor. Writing of the paper: Corinne Cassier-Chauvat, Franck Chauvat and Théo Veaudor.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Armaroli, N.; Balzani, V. The hydrogen issue. *ChemSusChem* **2011**, *4*, 21–36.
2. Zhou, J.; Li, Y. Engineering cyanobacteria for fuels and chemicals production. *Protein Cell* **2010**, *1*, 207–210.
3. Rosgaard, L.; de Porcellinis, A.J.; Jacobsen, J.H.; Frigaard, N.U.; Sakuragi, Y. Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants. *J. Biotechnol.* **2012**, *162*, 134–147.
4. Dismukes, G.C.; Carrieri, D.; Bennette, N.; Ananyev, G.M.; Posewitz, M.C. Aquatic phototrophs: Efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 235–240.
5. Ducat, D.C.; Way, J.C.; Silver, P.A. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 95–103.
6. Zehr, J.P. Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. *Trends Microbiol.* **2011**, *19*, 162–173.
7. Jansson, C.; Northen, T. Calcifying cyanobacteria—The potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 365–371.
8. Kruse, O.; Rupprecht, J.; Mussgnug, J.H.; Dismukes, G.C.; Hankamer, B. Photosynthesis: A blueprint for solar energy capture and biohydrogen production technologies. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 957–970.
9. Marraccini, P.; Bulteau, S.; Cassier-Chauvat, C.; Mermét-Bouvier, P.; Chauvat, F. A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Mol. Biol.* **1993**, *23*, 905–909.
10. Mermét-Bouvier, P.; Chauvat, F. A conditional expression vector for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942 and PCC6301. *Curr. Microbiol.* **1994**, *28*, 145–148.
11. Huang, H.H.; Camsund, D.; Lindblad, P.; Heidorn, T. Design and characterization of molecular tools for a Synthetic Biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 2577–2593.
12. Carrieri, D.; Wawrousek, K.; Eckert, C.; Yu, J.; Maness, P.C. The role of the bidirectional hydrogenase in cyanobacteria. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 8368–8377.
13. Bothe, H.; Schmitz, O.; Yates, M.G.; Newton, W.E. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 529–551.
14. Tamagnini, P.; Leitao, E.; Oliveira, P.; Ferreira, D.; Pinto, F.; Harris, D.J.; Heidorn, T.; Lindblad, P. Cyanobacterial hydrogenases: Diversity, regulation and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **2007**, *31*, 692–720.
15. Ortega-Ramos, M.; Jittawuttipoka, T.; Saenkham, P.; Czarnecka-Kwasiborski, A.; Bottin, H.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Engineering *Synechocystis* PCC6803 for hydrogen production: influence on the tolerance to oxidative and sugar stresses. *PLoS One* **2014**, *9*, e89372.
16. Dutheil, J.; Saenkham, P.; Sakr, S.; Leplat, C.; Ortega-Ramos, M.; Bottin, H.; Cournac, L.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. The AbrB2 autorepressor, expressed from an atypical promoter, represses the hydrogenase operon to regulate hydrogen production in *Synechocystis* strain PCC6803. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 5423–5433.

17. Cournac, L.; Guedeney, G.; Peltier, G.; Vignais, P.M. Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 1737–1746.
18. Gutekunst, K.; Chen, X.; Schreiber, K.; Kaspar, U.; Makam, S.; Appel, J. The bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is reduced by flavodoxin and ferredoxin and is essential under mixotrophic, nitrate-limiting conditions. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 1930–1937.
19. Ghirardi, M.L.; Dubini, A.; Yu, J.; Maness, P.C. Photobiological hydrogen-producing systems. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 52–61.
20. Eckert, C.; Boehm, M.; Carrieri, D.; Yu, J.; Dubini, A.; Nixon, P.J.; Maness, P.C. Genetic Analysis of the Hox Hydrogenase in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 Reveals Subunit Roles in Association, Assembly, Maturation, and Function. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 43502–43515.
21. McIntosh, C.L.; Germer, F.; Schulz, R.; Appel, J.; Jones, A.K. The [NiFe]-hydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 works bidirectionally with a bias to H₂ production. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11308–11319.
22. Gutekunst, K.; Phunpruch, S.; Schwarz, C.; Schuchardt, S.; Schulz-Friedrich, R.; Appel, J. LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a transcription activator. *Mol. Microbiol.* **2005**, *58*, 810–823.
23. Oliveira, P.; Lindblad, P. LexA, a transcription regulator binding in the promoter region of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *251*, 59–66.
24. Ferino, F.; Chauvat, F. A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Gene* **1989**, *84*, 257–266.
25. Oliveira, P.; Lindblad, P. Transcriptional regulation of the cyanobacterial bidirectional Hox-hydrogenase. *Dalton Trans.* **2009**, *45*, 9990–9996.
26. Burrows, E.H.; Chaplen, F.W.; Ely, R.L. Effects of selected electron transport chain inhibitors on 24-h hydrogen production by *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 3062–3070.
27. Kiss, E.; Kos, P.B.; Vass, I. Transcriptional regulation of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *J. Biotechnol.* **2009**, *142*, 31–37.
28. Summerfield, T.C.; Toepel, J.; Sherman, L.A. Low-oxygen induction of normally cryptic *psbA* genes in cyanobacteria. *Biochemistry* **2008**, *47*, 12939–12941.
29. Krasikov, V.; Aguirre von Wobeser, E.; Dekker, H.L.; Huisman, J.; Matthijs, H.C. Time-series resolution of gradual nitrogen starvation and its impact on photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Physiol. Plant* **2012**, *145*, 426–439.
30. Oliveira, P.; Lindblad, P. An AbrB-Like protein regulates the expression of the bidirectional hydrogenase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 1011–1019.
31. Domain, F.; Houot, L.; Chauvat, F.; Cassier-Chauvat, C. Function and regulation of the cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation. *Mol. Microbiol.* **2004**, *53*, 65–80.

32. Patterson-Fortin, L.M.; Colvin, K.R.; Owtrim, G.W. A LexA-related protein regulates redox-sensitive expression of the cyanobacterial RNA helicase, crhR. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 3446–3454.
33. Ishii, A.; Hihara, Y. An AbrB-like transcriptional regulator, Sll0822, is essential for the activation of nitrogen-regulated genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* **2008**, *148*, 660–670.
34. Mazouni, K.; Bulteau, S.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Promoter element spacing controls basal expression and light inducibility of the cyanobacterial *secA* gene. *Mol. Microbiol.* **1998**, *30*, 1113–1122.
35. Lieman-Hurwitz, J.; Haimovich, M.; Shalev-Malul, G.; Ishii, A.; Hihara, Y.; Gaathon, A.; Lebendiker, M.; Kaplan, A. A cyanobacterial AbrB-like protein affects the apparent photosynthetic affinity for CO₂ by modulating low-CO₂-induced gene expression. *Environ. Microbiol.* **2009**, *11*, 927–936.
36. Yamauchi, Y.; Kaniya, Y.; Kaneko, Y.; Hihara, Y. Physiological roles of the cyAbrB transcriptional regulator pair Sll0822 and Sll0359 in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 3702–3709.
37. Leplat, C.; Champeimont, R.; Saenkham, P.; Cassier-Chauvat, C.; Aude, J.-C.; Chauvat, F. Genome-wide transcriptome analysis of hydrogen production in the cyanobacterium *Synechocystis*: Towards the identification of new players. *Int. J. Hydrog. Energ.* **2013**, *38*, 1866–1872.
38. Sakr, S.; Dutheil, J.; Saenkham, P.; Bottin, H.; Leplat, C.; Ortega-Ramos, M.; Aude, J.; Chapuis, V.; Guedeney, G.; Decottignies, P.; *et al.* The activity of the *Synechocystis* PCC6803 AbrB2 regulator of hydrogen production can be post-translationally controlled through glutathionylation. *Int. J. Hydrog. Energ.* **2013**, *38*, 13547–13555.
39. Figge, R.M.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F.; Cerff, R. The carbon metabolism-controlled *Synechocystis gap2* gene harbours a conserved enhancer element and a Gram-positive-like –16 promoter box retained in some chloroplast genes. *Mol. Microbiol.* **2000**, *36*, 44–54.
40. Germer, F.; Zebger, I.; Saggi, M.; Lenzian, F.; Schulz, R.; Appel, J. Overexpression, isolation, and spectroscopic characterization of the bidirectional [NiFe] hydrogenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 36462–36472.
41. Imlay, J.A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 443–454.
42. Narainsamy, K.; Marteyn, B.; Sakr, S.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Genomics of the pleiotropic glutathione system in cyanobacteria. In *Advances in Botanical Research*; Chauvat, F., Cassier-Chauvat, C., Eds.; Academic Press, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; Volume 65, pp. 157–188.
43. Da Silva, G.P.; Mack, M.; Contiero, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 30–39.
44. Carrieri, D.; Ananyev, G.; Costas, A.M.G.; Bryant, D.A.; Dismukes, G.C. Renewable hydrogen production by cyanobacteria: Nickel requirements for optimal hydrogenase activity. *Int. J. Hydrog. Energ.* **2008**, *33*, 2014–2022.
45. Bandyopadhyay, A.; Stockel, J.; Min, H.; Sherman, L.A.; Pakrasi, H.B. High rates of photobiological H₂ production by a cyanobacterium under aerobic conditions. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, doi:10.1038/ncomms1139.

46. Narainsamy, K.; Cassier-Chauvat, C.; Junot, C.; Chauvat, F. High performance analysis of the cyanobacterial metabolism via liquid chromatography coupled to a LTQ-Orbitrap mass spectrometer: Evidence that glucose reprograms the whole carbon metabolism and triggers oxidative stress. *Metabolomics* **2013**, *9*, 21–32.
47. Cameron, J.C.; Pakrasi, H.B. Essential role of glutathione in acclimation to environmental and redox perturbations in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* **2010**, *154*, 1672–1685.
48. Sazuka, T.; Yamaguchi, M.; Ohara, O. Cyano2Dbase updated: Linkage of 234 protein spots to corresponding genes through *N*-terminal microsequencing. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 2160–2171.
49. Marteyn, B.; Sakr, S.; Farci, S.; Bedhomme, M.; Chardonnet, S.; Decottignies, P.; Lemaire, S.D.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. The *Synechocystis* PCC6803 MerA-like enzyme operates in the reduction of both mercury and uranium, under the control of the glutaredoxin 1 enzyme. *J. Bacteriol.* **2013**, *195*, doi:10.1128/JB.00272-13.
50. Masip, L.; Veeravalli, K.; Georgiou, G. The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxid. Redox Signal.* **2006**, *8*, 753–762.
51. Zaffagnini, M.; Bedhomme, M.; Marchand, C.H.; Morisse, S.; Trost, P.; Lemaire, S.D. Redox regulation in photosynthetic organisms: Focus on glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, *16*, 567–586.
52. Chardonnet, S.; Sakr, S.; Cassier-Chauvat, C.; Le Maréchal, P.; Chauvat, F.; Lemaire, S.; Decottignies, P. First proteomic study of S-glutathionylation in cyanobacteria. *J. Proteome Res.* **2014**, doi:10.1021/pr500625a.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

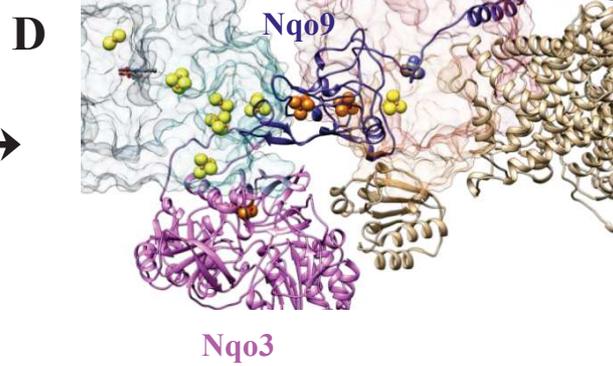
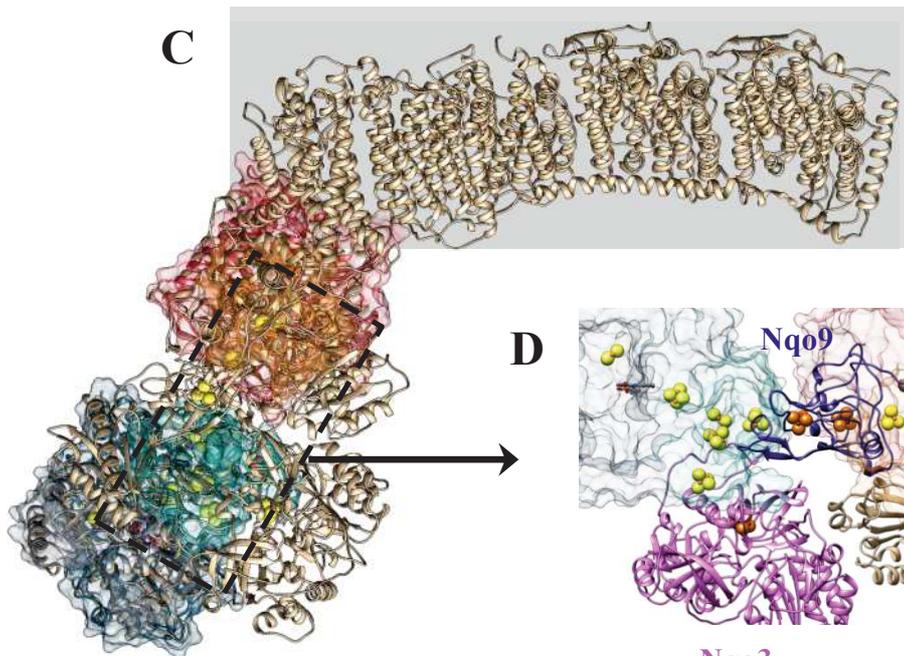
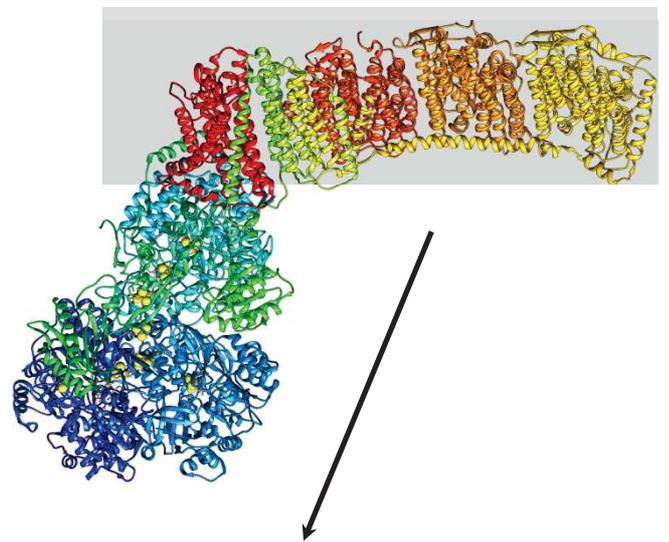
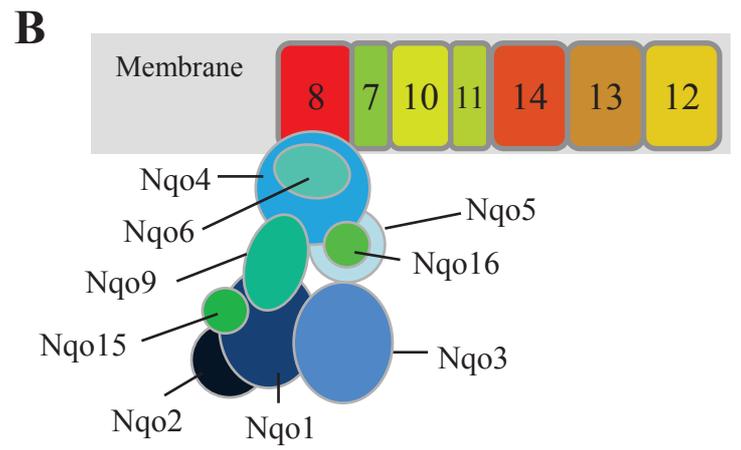
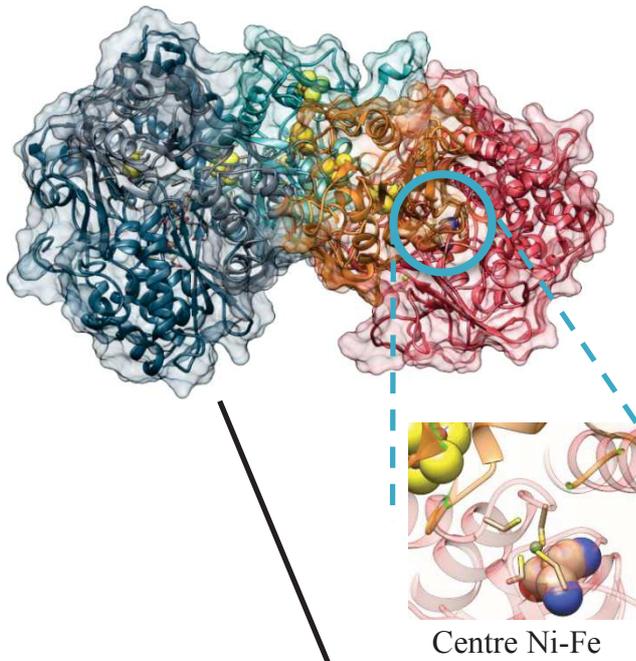
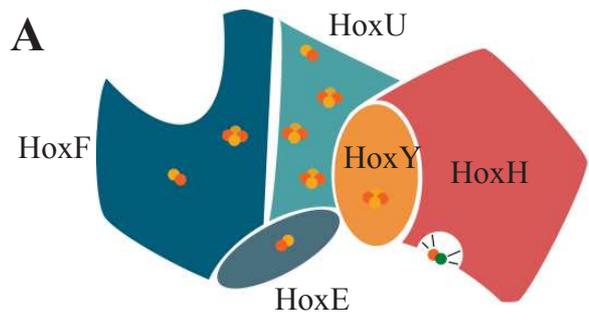
C. Une compréhension partielle du métabolisme de l'hydrogène

Il est aujourd'hui clair que les hydrogénases sont liées aux perturbations rédox du métabolisme des cyanobactéries. Plusieurs faits indiquent cependant que le métabolisme de l'hydrogène pourrait être plus complexe et associé à des processus généraux, partagés entre des taxons très divers.

1. Ubiquité des hydrogénases

Les hydrogénases sont des enzymes retrouvées dans de nombreux micro-organismes incluant des bactéries, des archées et des eucaryotes (pour revue [268]). Dans certaines espèces, plusieurs isoformes de l'enzyme ont même été identifiées, comme par exemple chez *E. coli* dont le génome encode 3 hydrogénases distinctes. Ces organismes présentent des métabolismes extrêmement variés (méthanogénèse, fermentation, photosynthèse...) et possèdent des caractéristiques physiologiques très différentes (aérobies, anaérobies, acidophiles, thermophiles, pathogènes...). Certains protozoaires comme *Trichomonas* sont dépourvus de mitochondries mais disposent d'organites apparentés, les hydrogénosomes. Ces compartiments sont spécialisés dans la fermentation du pyruvate initiée par la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase qui fournit de l'acétyl-CoA pour la production d'ATP [269]. La réoxydation de la ferrédoxine, indispensable pour maintenir l'activité de cette voie, est assurée par une hydrogénase à fer. Enfin chez certaines espèces pathogènes comme *Helicobacter pylori* ou *Salmonella enterica*, l'hydrogénase est un facteur de virulence associé à la respiration qui est nécessaire pour la production d'énergie et la colonisation des tissus [270].

La vaste distribution des hydrogénases dans le vivant suggère qu'il s'agit d'enzymes apparues tôt dans l'évolution. Initialement, elles auraient permis d'utiliser l'hydrogène présent dans l'atmosphère primitive comme donneur d'électrons. Au cours de l'évolution et des bouleversements environnementaux, elles se sont diversifiées jusqu'à parfois atteindre un fort degré de spécialisation. Malgré leurs variations de séquence primaire et de composition des sous-unités, les hydrogénases présentent une convergence structurale remarquable. Cette conservation se traduit au niveau fonctionnel où elles apparaissent habituellement liées aux chaînes de transport d'électrons et à la balance énergétique.



2. Convergence structurale avec NDH-I et réseau des centres Fe-S

Le complexe I de la respiration (NADH-quinone oxydoréductase) est un contributeur majeur de la phosphorylation oxydative. Il couple la réduction des quinones membranaires à la translocation des protons qui alimentent l'ATP synthase. Chez la bactérie *Thermus thermophilus*, il est composé de 16 sous-unités (Nqo1-16) formant une ancre membranaire et une tête cytoplasmique (Figure 28). L'activité diaphorase est portée par le module soluble qui comprend plusieurs centres Fe-S. Cependant, les protéines homologues à cette tête n'ont pas encore été identifiées chez les cyanobactéries.

Pourtant, leurs hydrogénases présentent une forte convergence structurale avec ce complexe (Figure 28). Les sous-unités HoxEFU du module diaphorase de *Synechocystis* se superposent ainsi avec Nqo2, Nqo1 et la région N-terminale de Nqo3, respectivement. Le module hydrogénase HoxYH quant à lui présente une correspondance avec Nqo6 et Nqo4.

Paradoxalement, cet agencement induit une séparation physique entre les deux modules dont l'interaction est maintenue indirectement par d'autres protéines (Nqo5, Nqo9 et Nqo15). Nqo15 ne possède pas d'homologue chez *Synechocystis*, contrairement à Nqo5 et Nqo9 qui présentent une identité significative avec NdhJ et NdhI respectivement. De plus, la protéine Nqo9 possède deux centres Fe-S reliant ceux de l'hydrogénase qui apparaissent découplés au sein du complexe I (Figure 28). L'extrémité C-terminale de Nqo3, absente de HoxU, comporte également un centre Fe-S mais il n'en existe aucun homologue chez *Synechocystis*. Ce réseau interne de centres Fe-S et l'étonnante convergence structurale avec le complexe I suggère qu'il existe une relation évolutive entre l'hydrogénase et les chaînes de transport d'électrons qui régissent le gradient de protons et la production d'ATP.

Figure 28 : Convergence structurale entre le complexe I et l'hydrogénase de *Synechocystis* et réseau interne des centres Fe-S

- Représentation schématique (haut) et modélisation structurale (bas) de l'hydrogénase NiFe HoxEFUYH de *Synechocystis*.
- Représentation schématique (haut) et structure cristallographique (bas) du complexe I (Nqo1-16) de *Thermus thermophilus*.
- Superposition de (A) et (B)
- Zoom sur le réseau de centres Fe-S du module soluble. Les centres additionnels portés par Nqo3 et Nqo9 sont colorés en orange foncé.

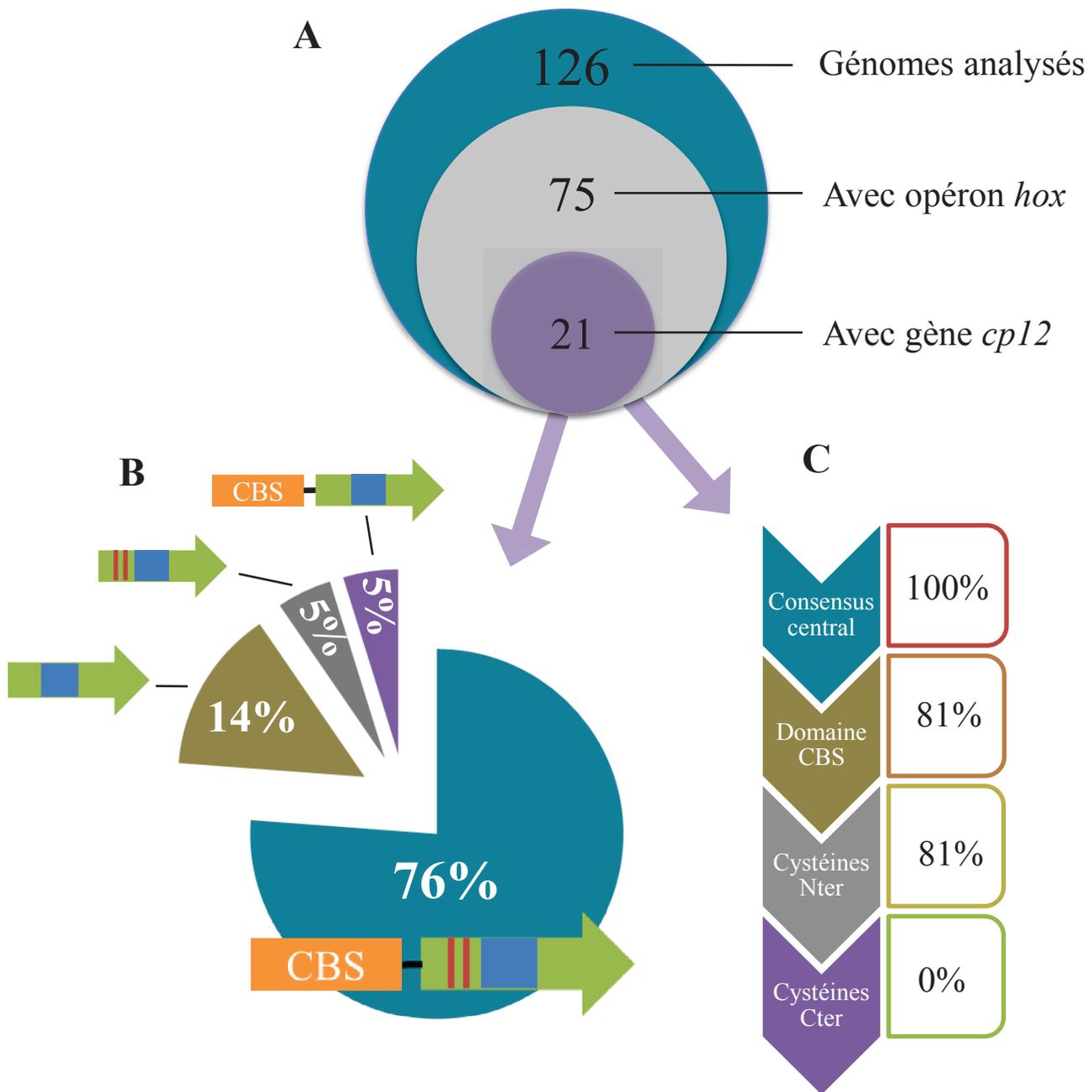


Figure 29 : Analyse des gènes *cp12* présents dans les opérons *hox*

- A. Fréquence des gènes *cp12* au sein des opérons *hox* de 126 espèces de cyanobactéries
- B. Distribution des différentes formes de CP12 présentes dans les opérons *hox*
- C. Fréquence des motifs régulateurs de CP12 dans les protéines homologues présentes dans les opérons *hox*

3. CP12 et les opérons *hox*

Cette considération d'un rôle plus large de l'hydrogénase offre également une nouvelle perspective pour expliquer la présence de gènes *cp12* au sein des opérons *hox* chez les cyanobactéries. L'analyse phylogénétique des 126 génomes de cyanobactéries séquencés indique que 75 espèces possèdent un opéron *hox* (Figure 29). Parmi eux, 21 comprennent un gène *cp12*. Bien qu'aucun de ces 21 gènes ne code pour une CP12 canonique (absence de la paire de cystéines C-terminale), l'ensemble des protéines portent la séquence consensus centrale (Figure 29). On retrouve également une large majorité (81%) de fusions CBS-CP12 ainsi que de protéines portant la paire de cystéines N-terminale. Cette surreprésentation des motifs régulateurs N-terminaux suggère que l'inhibition de PRK intervient dans le même contexte physiologique que la production de H₂. Or la régulation de PRK est essentielle pour coordonner les flux de carbone organique entre catabolisme et anabolisme. A l'obscurité, son inhibition par CP12 prévient une consommation excessive d'ATP et favorise le catabolisme des sucres qui relaye la photosynthèse pour assurer la production d'énergie.

L'implication supposée de l'hydrogénase dans le maintien du gradient de protons devient alors plus plausible encore. En effet, la coexpression des gènes *cp12* contribuerait à la production et la sauvegarde du pool énergétique au niveau des voies du carbone tandis que l'hydrogénase entretiendrait, en aval du cycle de Krebs, le flux d'électrons dans les membranes. Cette fonction hypothétique est en accord avec son rôle antioxydant connu mais coïncide également avec la production d'ATP. En effet le stress oxydant, au-delà de sa toxicité liée aux ROS, est un déséquilibre redox qui induit le blocage des chaînes de transport d'électrons. Ce ralentissement altère l'activité des pompes à protons et donc la synthèse d'ATP. En d'autres termes, il s'agit d'un dérèglement du ratio ATP/NAD(P)H dont l'hydrogénase serait la valve. Le recyclage du pouvoir réducteur qu'elle opère participerait à la relaxation des chaînes de transport tout en entretenant la force proton-motrice, le gradient physicochimique universel, possiblement au niveau du complexe I.

Résultats et discussion

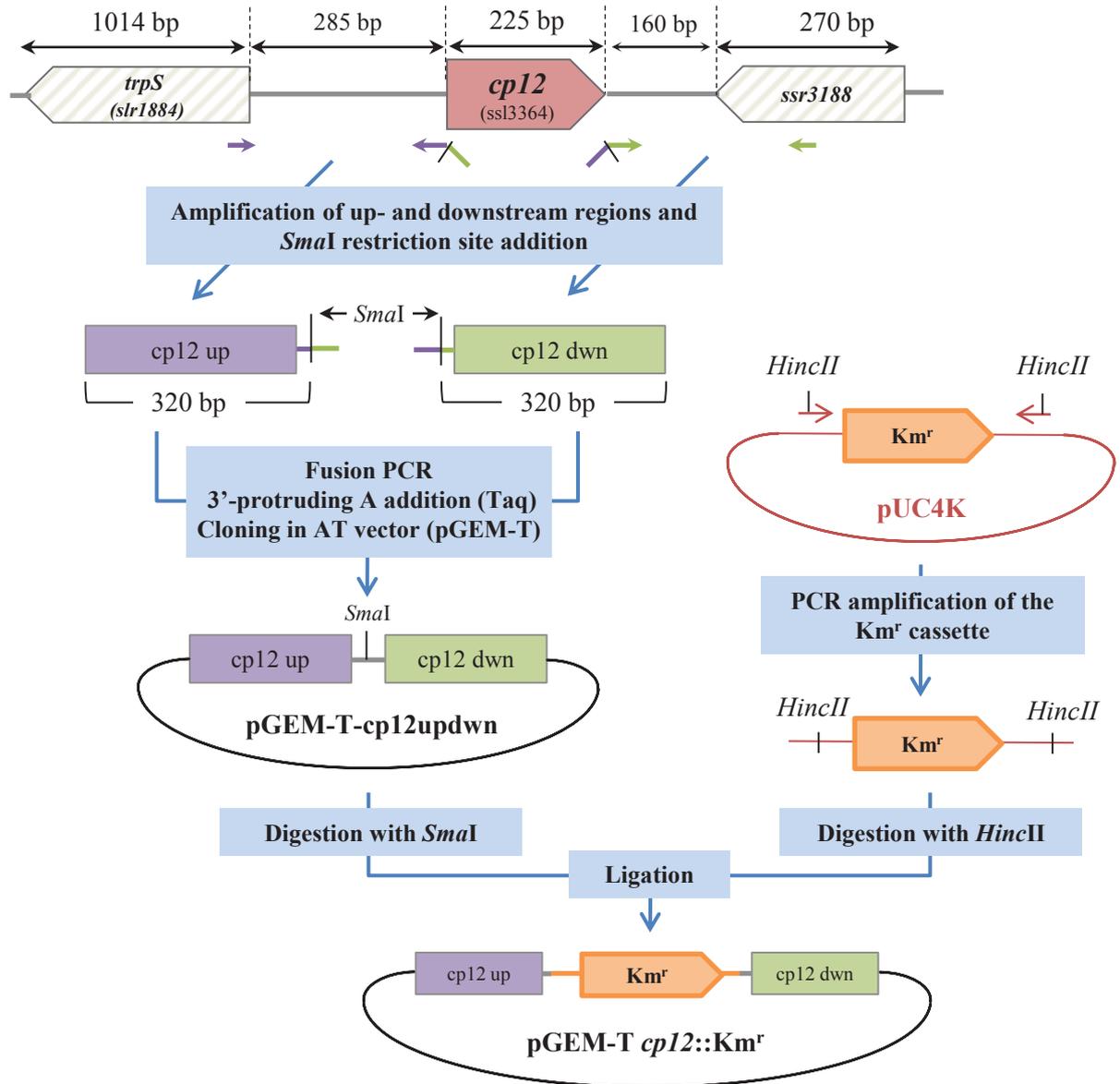
A

Figure 30: Construction and PCR verification of the $\Delta cp12::Km^r$ DNA cassette for the deletion of the *Synechocystis cp12* gene (*ssl3364*, red box)

- A. Adjacent genes (*ssr3188* and *slr1884*) are represented by hatched white boxes pointing their transcription direction (see Cyanobase; <http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>). *cp12* up and *cp12* down DNA sequences were designed to replace the whole *cp12* ORF by the *Km*^r gene through homologous recombination and are displayed as purple and green boxes respectively.

Partie I

CP12 n'est pas essentielle mais exerce un contrôle global du métabolisme en photoautotrophie

Afin de développer des châssis cyanobactériens performants pour la production soutenable et durable de molécules d'intérêt (alcools, terpènes, H₂...) il est nécessaire de mieux comprendre le métabolisme du carbone et sa régulation. Dans les organismes photosynthétiques, la production de carbone organique est assurée par le cycle de Calvin. Chez les plantes et les algues unicellulaires, son activité est régulée par CP12 dont le rôle *in vivo* n'a jamais été étudié chez *Synechocystis* (voir Chapitre III, partie A.3). Chez *Synechococcus* PCC7942, il a été montré qu'il s'agit d'un régulateur majeur des flux du carbone. Pour étudier le rôle de la protéine CP12 chez *Synechocystis*, j'ai construit des mutants de délétion et de surexpression du gène *cp12* ainsi que certaines formes mutantes et analysé leurs phénotypes à l'aide de diverses approches.

A. Construction des mutants de délétion et de surexpression du gène *cp12*

1. Construction du mutant de délétion $\Delta cp12$

Le génome de *Synechocystis* possède une seule copie du gène *cp12* (ssl3364). Afin de le déléter, j'ai construit le plasmide pGEM-T *cp12::Km^r* portant une cassette de délétion (Figure 30-A). Cette cassette permet de remplacer par recombinaison homologue le gène *cp12* par un gène de résistance à la kanamycine (Km^r). Elle a été introduite dans la souche sauvage (WT) de *Synechocystis* par transformation (voir Matériel et Méthodes). Les transformants résistants à la kanamycine (Km^r) ont ensuite été cultivés avec des doses croissantes d'antibiotique (50-300 µg/mL) pour favoriser le remplacement des copies de chromosome sauvage (environ 12 copies par cellule).

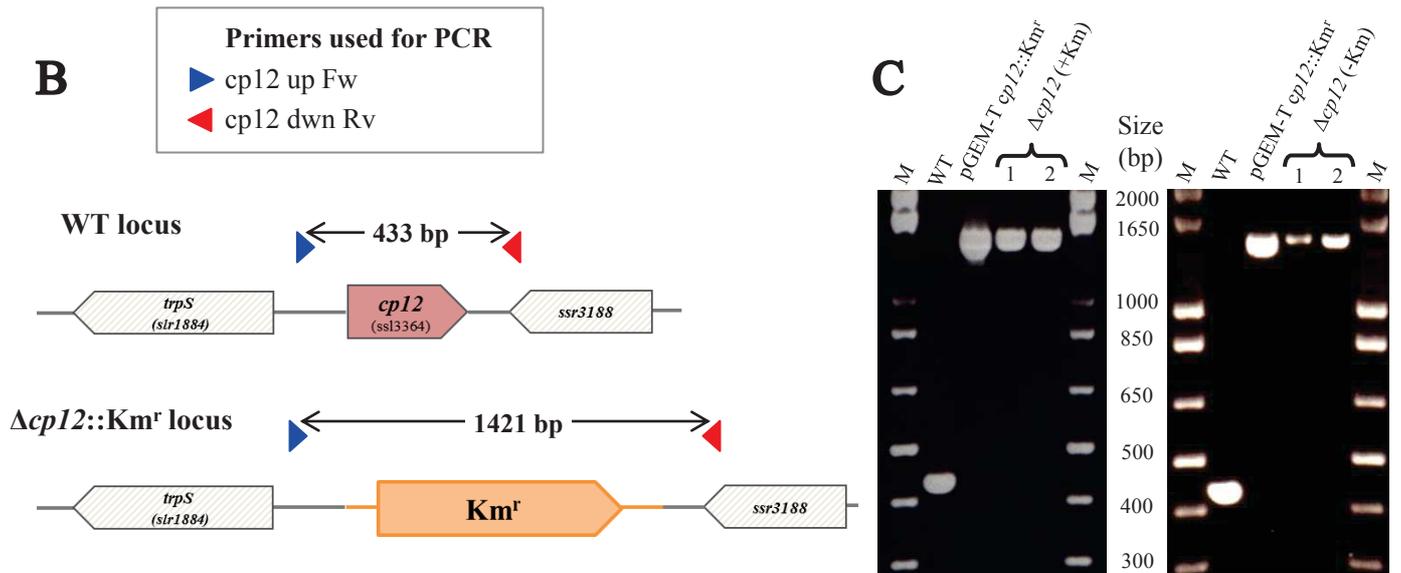


Figure 30 (continued): Construction and PCR verification of the $\Delta cp12::Km^r$ DNA cassette for the deletion of the *Synechocystis cp12* gene (ssl3364, red box)

- B. Schematic representation of the *cp12* gene locus in *Synechocystis* WT and $\Delta cp12$ strains. After transformation, the Km^r cassette (1207 bp) replaces the whole *cp12* ORF. Forward and reverse primers used to monitor segregation of the mutated chromosome during selection on kanamycin (Km) are shown as blue and red triangles respectively. Resulting PCR products are represented as double arrows with their corresponding size in the middle.
- C. UV-light image of the agarose gel showing the 0.43 kb and 1.42 kb PCR products resulting from amplification of either WT or $\Delta cp12$ chromosomal copies. Size marker (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); lanes H₂O and WT correspond to the negative controls (no matrix and size product control respectively). The plasmid used for transformation of WT cells was also used as a positive control for PCR product size (lane pGEM-T *cp12::Km^r*). Two independent clones (named 1 and 2 respectively) obtained after transformation and grown in MM in presence of kanamycin (+ Km) were analyzed. To verify complete segregation these two clones were also grown without selective pressure (- Km) during 3 generations.

La ségrégation a été suivie par PCR à l'aide d'amorces s'hybridant dans les régions flanquant le gène *cp12* (Figure 30-B et C) à partir de colonies Km^r cultivées en présence d'antibiotique (vérification du remplacement du gène *cp12* par la cassette Km^r) ou sans antibiotique pendant 5 générations pour confirmer l'absence de copies sauvages qui peuvent ré-envahir la population sans pression de sélection (Figure 30-C).

Dans les deux clones analysés, le gène *cp12* a bien été remplacé par la cassette Km^r sur toutes les copies de chromosome (pas d'apparition de bande à 433 pb correspondant au locus sauvage en absence de pression de sélection). Ce mutant de délétion sera noté $\Delta cp12$ par la suite. L'analyse qPCR montre également qu'il n'y a plus d'ARNm détectable dans les clones $\Delta cp12$ et confirme que le gène a bien été délété (voir Figure 32-B).

Ces résultats indiquent que le gène *cp12* n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire dans les conditions standards de croissance du laboratoire (photoautotrophie).

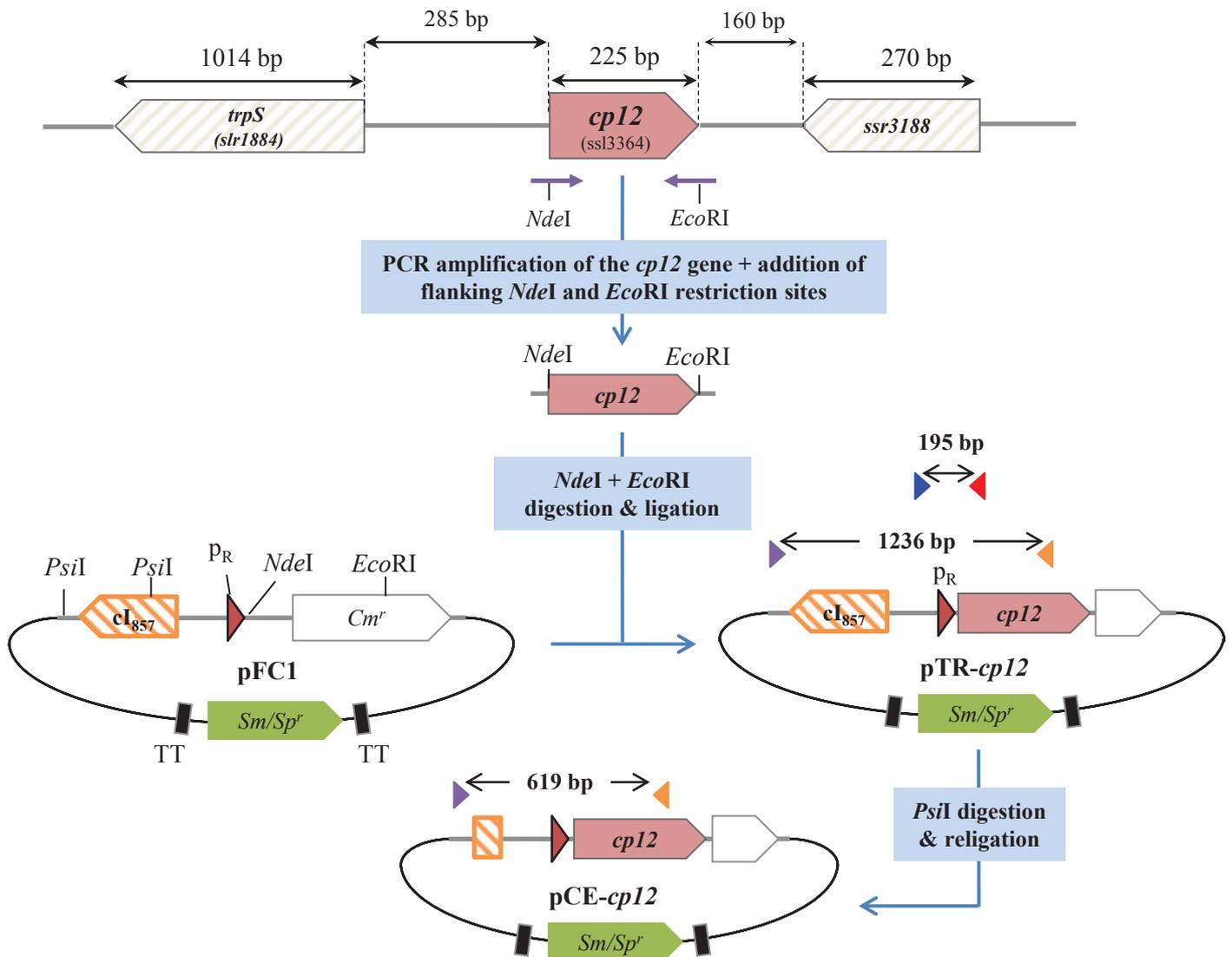


Figure 31: Construction and PCR verification of the pTR-*cp12* and pCE-*cp12* vectors for temperature-controlled and constitutive overexpression of the *Synechocystis cp12* gene.

Adjacent genes (*ssr3188* and *slr1884*) are represented by hatched white boxes pointing their transcription direction (see Cyanobase; <http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>). Amplification of the *cp12* gene and incorporation of flanking restriction sites were achieved using *cp12 NdeI* Fw and *cp12 EcoRI* Rv primers (Supplementary Table X). Following digestion with *NdeI* and *EcoRI*, the *cp12* insert was cloned into the pFC1 vector to yield the temperature-regulated pTR-*cp12*. *PsiI* digestion of this vector removed a large part of the ORF encoding the thermosensitive repressor *cI₈₅₇* thereby generating the constitutive overexpression vector pCE-*cp12*. Proper cloning was verified by PCR and sequencing using either pFC1 p_R-AI Fw and 5' *cp12* Rv primers or *cI₈₅₇* Fw and *cp12* qPCR Rv primers (represented as blue, red, purple and orange triangles respectively). After conjugation, presence of the vectors in *Sm/Sp^r* clones was verified by PCR using the same primers. Resulting PCR products are represented as double arrows with their corresponding size.

2. Construction des mutants de surexpression TR-*cp12* et CE-*cp12*

Afin de surexprimer le gène *cp12* de *Synechocystis*, j'ai utilisé le pFC1 (Tableau 7), un vecteur développé au laboratoire permettant l'expression thermorégulée (TR) de gènes d'intérêt [112]. Le pFC1 est un dérivé du plasmide RSF1010 à large spectre d'hôtes pouvant être introduit chez *Synechocystis* par conjugaison où il se réplique de manière autonome à raison d'une copie par copie de chromosome. Il contient deux gènes de résistance (chloramphénicol ou Cm^r et streptomycine/spectinomycine ou Sm/Sp^r) ainsi qu'un promoteur fort (P_R) issu du bactériophage λ. Ce promoteur comprend un site opérateur sur lequel se fixe le répresseur cI. Le pFC1 porte l'allèle *cI*₈₅₇ qui code pour un répresseur thermosensible. Celui-ci est fonctionnel à 30°C mais se dénature progressivement quand la température augmente. Sa fonction régulatrice est complètement perdue à 39°C. Ainsi, l'activité du promoteur est nulle à 30°C et maximale à 39°C. Le gène *cI*₈₅₇ peut être tronqué par une double digestion *Psi*I suivie d'une religation pour générer un système d'expression fort et constitutif (CE).

Les gènes d'intérêt sont clonés sous contrôle du P_R aux sites de restriction *Nde*I (5'-CA/TATG-3') et *Eco*RI (5'-G/AATTC-3'). Le site *Nde*I est situé immédiatement en aval du promoteur et permet un clonage en phase du codon d'initiation du gène à transcrire (voir Matériel et Méthodes et Figure 31). De plus, ce clonage tronque le marqueur de sélection Cm^r ce qui permet de vérifier rapidement que le clonage a fonctionné (transformants Cm^s).

De cette manière, le gène *cp12* de *Synechocystis* a donc été cloné dans le pFC1 pour obtenir le vecteur d'expression conditionnelle pTR-*cp12* (Figure 31). Ce vecteur a ensuite été digéré par *Psi*I pour produire le pCE-*cp12*.

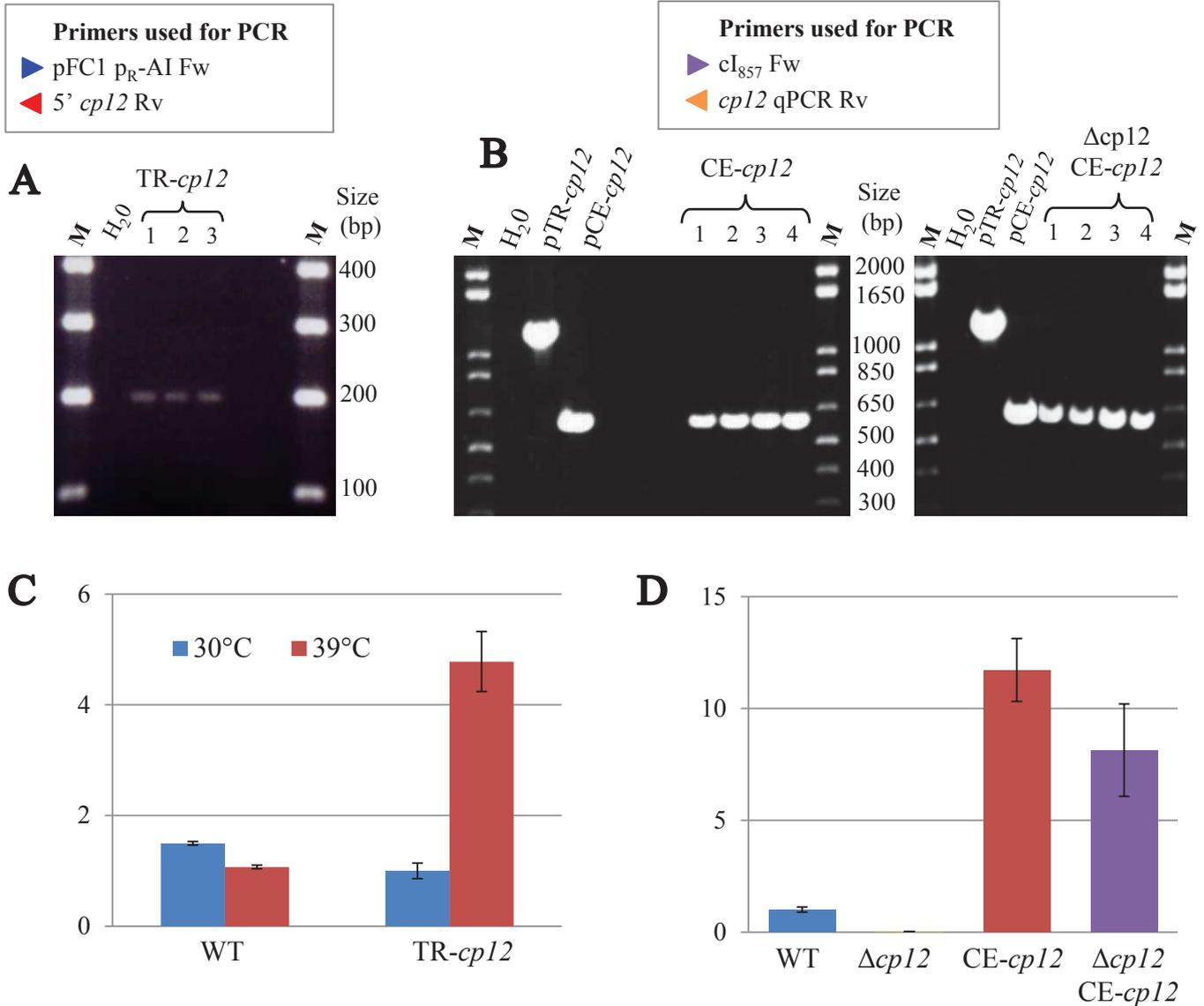


Figure 32: PCR verification of the TR-*cp12* and CE-*cp12* mutants and qPCR analysis of *cp12* expression in deletion and overexpression mutants

- A. UV-light image of the agarose gel showing the 0.2 kb PCR product resulting from amplification of the p_R-*cp12* construct in Sm/Sp^r cells. Size marker (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); lanes H₂O correspond to the negative controls (no matrix). Three independent Sp/Sm^r clones obtained after conjugation were analyzed.
- B. UV-light image of the agarose gels showing the PCR products resulting from amplification the p_R-*cp12* region containing either the native (0.62 kb) or *PsiI*-truncated cI₈₅₇ gene (1.24 kb). Size marker (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); lanes H₂O and pTR-*cp12* correspond to the negative controls (no matrix and size product control respectively). Presence of the pCE-*cp12* vector introduced by conjugation in WT and Δ*cp12* strains was tested using the pCE-*cp12* vector as a positive control for PCR product size (lane pCE-*cp12*). For each mutant construction, four independent Sm/Sp^r clones obtained after conjugation were analyzed.
- C. qPCR analysis of *cp12* expression in WT and TR-*cp12* strains grown at 30 or 39°C in MM for 48 hrs. Expression levels are displayed relative to the TR-*cp12* strain grown at 30°C (set to 1). Error bars represent the mean SD of all samples (N = 2).
- D. qPCR analysis of *cp12* expression in WT, Δ*cp12*, CE-*cp12* and Δ*cp12* CE-*cp12* strains in standard conditions (48 hrs). Expression levels are displayed relative to the WT control (set to 1). Error bars represent the mean SD of all samples (N = 2).

Ces plasmides ont été introduits par conjugaison dans la souche sauvage de *Synechocystis* (voir Matériel et méthodes) pour obtenir les mutants TR-*cp12* et CE-*cp12* respectivement. Le pCE-*cp12* a également été introduit dans la souche $\Delta cp12$ pour générer un mutant de pseudo-complémentation $\Delta cp12$ CE-*cp12*. La présence des vecteurs dans les conjuguants Sm^r/Sp^r a été vérifiée par PCR (Figure 32-A et B).

La quantification des transcrits du gène *cp12* par qPCR indique que le mutant TR-*cp12* produit environ 5 fois plus d'ARNm *cp12* lorsqu'il est cultivé à 39°C pendant 48 heures par rapport à 30°C (Figure 32-C). Les mutants de surexpression constitutive CE-*cp12* et $\Delta cp12$ CE-*cp12* possèdent quant à eux environ 12 et 8 fois plus de transcrits du gène par rapport à la WT, respectivement. Ces résultats montrent que la surexpression du gène *cp12* n'est pas létale chez *Synechocystis* dans les conditions standards du laboratoire (Figure 32-D).

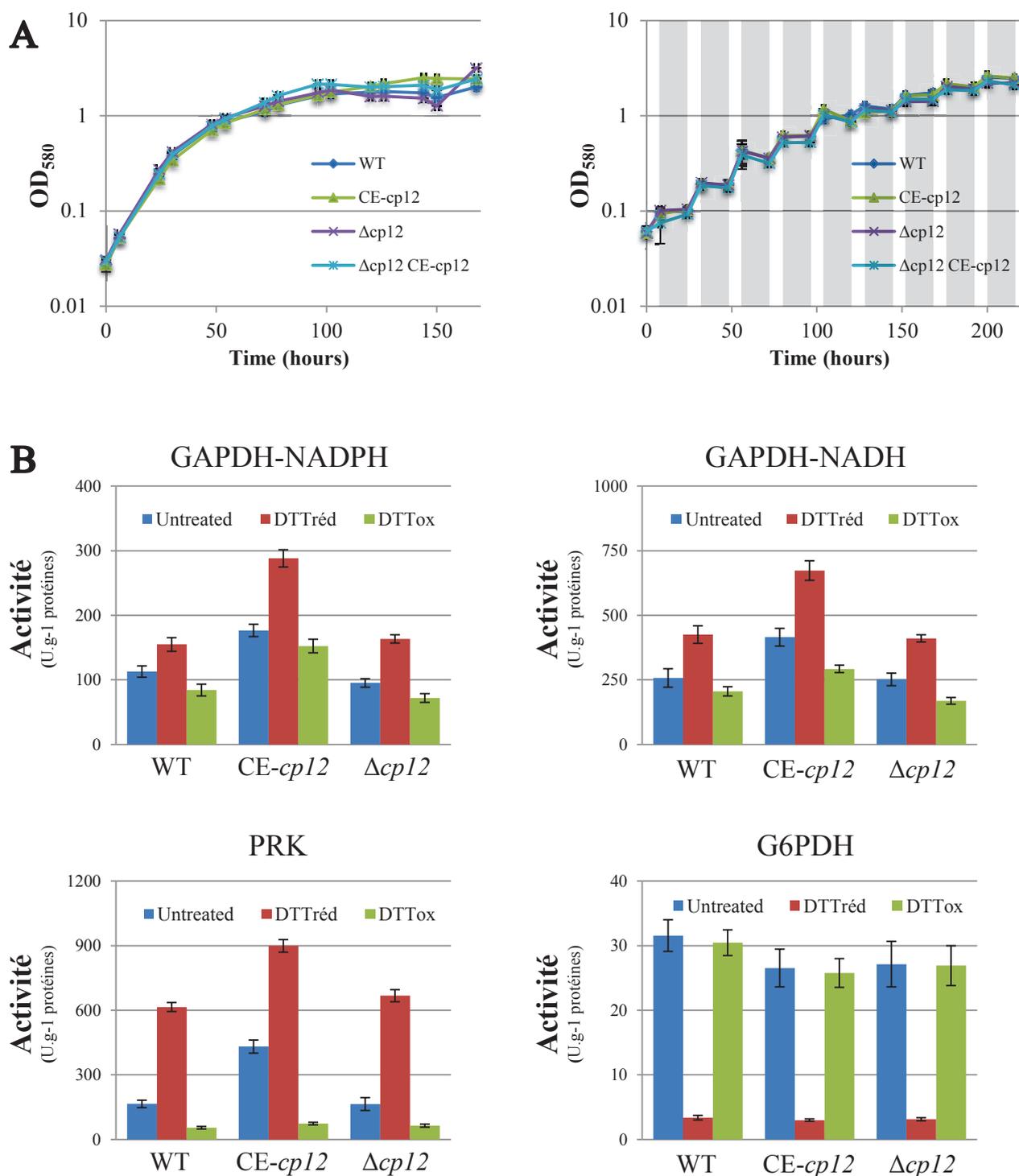


Figure 33: Growth analysis and GAPDH (NADPH and NADH-consuming), PRK and G6PDH enzymatic activity assays in the *cp12* deletion and overexpression mutants.

- A. Growth curves of the WT, CE-*cp12*, Δ*cp12* and Δ*cp12* CE-*cp12* strains cultivated in standard conditions (MM*, 30°C) under either continuous light (left) or light (8 hrs)/dark (16 hrs) cycles. Dark exposures are displayed as grey bars. Error bars represent the mean SD for all samples (N ≥ 2).
- B. Histograms showing GAPDH NADPH-dependent, GAPDH NADH-dependent, PRK and G6PDH activities in WT, CE-*cp12*, Δ*cp12* strains grown in standard conditions. Enzymatic assays were carried out on crude extracts after either no treatment, reduced DTT (DTTred) or oxidized DTT (DTTox) treatment as described in material and methods. Error bars represent the mean SE for all samples (N ≥ 6)

B. Absence d'effets sur la croissance et l'activité du cycle de Calvin

En accord avec l'étude menée chez *Synechococcus* PCC7942 [190], le mutant $\Delta cp12$ de *Synechocystis* PCC6803 (2 clones étudiés) présentent une croissance identique à la WT dans les conditions standards, *i.e* à 30°C en milieu MM*, 2500 lux (Figure 33-A). Les spectres d'absorption sur cellules entières montrent également une composition en pigments similaire entre les souches (résultats non-montrés). La délétion réalisée chez *Synechococcus* PCC7942 concernait seulement le gène *cp12* non-canonique alors que cette espèce en possède deux homologues, le second codant pour la protéine canonique. Néanmoins dans ces travaux, le mutant de délétion présente un retard de croissance par rapport à la WT lorsqu'il est soumis à des cycles jour/nuit (12h/12h) dans ces mêmes conditions [190]. Ils montrent que cet effet corrèle avec une diminution de la concentration intracellulaire en F6P et à une accumulation de RuBP (produit de la PRK) en absence de lumière. Ceci suggère qu'à l'obscurité, le carbone organique est anormalement consommé par le cycle de Calvin dans le mutant $\Delta cp12$ et concorde avec une perte de régulation de cette voie. Cependant, ce phénotype ne se produit pas chez le mutant $\Delta cp12$ de *Synechocystis* même lors de cycles moins favorables à la croissance (8h/16h, Figure 33-A). Les analyses métabolomiques (présentées plus tard dans cette section) n'ont pas permis de détecter le F6P et le RuBP et n'offrent donc pas de comparaison directe avec les résultats obtenus chez *Synechococcus* PCC7942.

En collaboration avec Gabriel Thieulin-Pardo et l'équipe de Brigitte Meunier-Gontero (Enzymologie de Complexes Supramoléculaires, BIP, CNRS), les activités enzymatiques du cycle de Calvin habituellement régulées par CP12 (GAPDH NADPH et NADH-dépendantes et PRK) ainsi que celle de la G6PDH, la première enzyme de la voie des pentoses phosphates régulée par les thiorédoxines, ont été mesurées (Figure 33-B).

Ces mesures montrent tout d'abord que ces quatre activités sont modulées par l'état rédox du tampon (présence de DTT réduit ou oxydé). En effet, les activités natives (A_{nat}) GAPDH et PRK augmentent en présence d'agent réducteur (activité maximale A_{max}) et diminuent en conditions oxydantes (activité minimale A_{min}). Toutefois, les facteurs de variation entre ces différentes activités est propre à chaque enzyme. De manière générale, l'activité PRK répond plus efficacement à ces traitements ($A_{nat} = 30\%$ et $A_{min} = 10\%$ de A_{max} respectivement) que la GAPDH (66% et 50%). Inversement, l'activité maximale de la G6PDH est obtenue en conditions natives et oxydantes et est environ 10 fois supérieure à A_{min} (traitement réducteur).

Gene ID	Name	Function	FC (log ₂)
slr1512	sbtA	sodium-dependent bicarbonate transporter	2.12
slr1513	sbtB	periplasmic protein, function unknown	2.11
slr1928	pilA5	type 4 pilin-like protein	2.06
sll0218		hypothetical protein	1.95
slr0041	cmpB	bicarbonate transport system permease protein	1.78
slr0040	cmpA	bicarbonate transport system substrate-binding protein	1.77
slr0042	porB	probable porin; major outer membrane protein	1.71
sll0217	flv4	flavoprotein	1.70
sll1471	cpcG	phycobilisome rod-core linker polypeptide	1.62
slr0043	cmpC	bicarbonate transport system ATP-binding protein	1.60
slr2052		hypothetical protein	1.59
slr0044	cmpD	bicarbonate transport system ATP-binding protein	1.57
slr0226		unknown protein	1.56
slr1634		hypothetical protein	1.56
slr1929	pilA6	type 4 pilin-like protein	1.52
sll1733	ndhD3	NADH dehydrogenase subunit 4 (involved in low CO ₂ -inducible, high affinity CO ₂ uptake)	1.50
sll0224		amino-acid ABC transporter binding protein	1.48
sll0219	flv2	flavoprotein	1.47
slr1218	ycf39	hypothetical protein YCF39	1.43
sll1732	ndhF3	NADH dehydrogenase subunit 5 (involved in low CO ₂ -inducible, high affinity CO ₂ uptake)	1.38
sll1677		similar to spore maturation protein B	1.30
sll1734	cupA	protein involved in low CO ₂ -inducible, high affinity CO ₂ uptake	1.30
slr0476		unknown protein	1.26
ssl3093	cpcD	phycobilisome small rod linker polypeptide	1.21
slr0895	prqR	transcriptional regulator	1.15*
sll1961		hypothetical protein	1.10
ncRNA029			1.09*
ssr2554		hypothetical protein	1.07
slr0967	rfrP	hypothetical protein	1.04
sll1735		hypothetical protein	1.03
sll1580	cpcC	phycobilisome rod linker polypeptide	1.03*
sll0253		hypothetical protein	1.03
ssl0453	nblA	phycobilisome degradation protein	0.98
sll1712		DNA binding protein HU	0.97
sll1678		similar to spore maturation protein A	0.97
ssr1528		hypothetical protein	0.94
slr0896		multi-drug efflux transporter	0.93*
slr0616	mvrA	unknown protein	0.93
sll0947	lrtA	light repressed protein A homolog	0.92
slr0749	chlL	light-independent protochlorophyllide reductase iron protein subunit ChlL	0.87*
sll0830	fus	elongation factor EF-G	0.87
sll1472		unknown protein	0.85
ssl3364	cp12	CP12 polypeptide	-3.80
sll0645		unknown protein	-3.00
slr0423	rlpA	hypothetical protein	-2.22
slr2018		unknown protein	-1.91
sll0643	ureG	urease accessory protein G	-1.87
ssl2814		unknown protein	-1.81*
ssl2542	hliA	high light-inducible polypeptide HliA, CAB/ELIP/HLIP superfamily	-1.77
sll1009	frpC	unknown protein	-1.77
slr2016	pilA10	type 4 pilin-like protein, essential for motility	-1.72
slr0686		hypothetical protein	-1.70
ssr0706		unknown protein	-1.64
sll1454	narB	ferredoxin-nitrate reductase	-1.63*
sll1483		periplasmic protein, similar to transforming growth factor induced protein	-1.60
sll8006		type I restriction-modification system, S subunit	-1.50
slr2017	pilA11	type 4 pilin-like protein, essential for motility	-1.48
ssr2595	hliB	high light-inducible polypeptide HliB, CAB/ELIP/HLIP superfamily	-1.45*
sll1453	nrtD	nitrate/nitrite transport system ATP-binding protein	-1.34*
sll7087		unknown protein	-1.30
slr1544		unknown protein	-1.28
ssr2153		unknown protein	-1.21
sll1452	nrtC	nitrate/nitrite transport system ATP-binding protein	-1.20*
sll1863		unknown protein	-1.19
sll1514	hspA	16.6 kDa small heat shock protein, molecular chaperone	-1.17
ssl8003		unknown protein	-1.14
sll0471		hypothetical protein	-1.10
ssl1633	hliC	high light-inducible polypeptide HliC, CAB/ELIP/HLIP superfamily	-1.08*
sll1239		unknown protein	-1.03
sll1450	nrtA	nitrate/nitrite transport system substrate-binding protein	-1.01*
sll1451	nrtB	nitrate/nitrite transport system permease protein	-1.00*
slr1675	hypA1	putative hydrogenase expression/formation protein	-1.00
sll7086		unknown protein	-0.99
slr1788		unknown protein	-0.98
sll1862		unknown protein	-0.97
sll7085		unknown protein	-0.96
sll0646	cya2	guanylyl cyclase	-0.96
sll8004		hypothetical protein	-0.95
sll8002		hypothetical protein	-0.95
sll8007		unknown protein	-0.94
ssl8008		hypothetical protein	-0.92
sll7069		hypothetical protein	-0.87
sll0846		hypothetical protein	-0.87
slr8030		hypothetical protein	-0.85
sll0383	cbiM	cobalamin biosynthesis protein M	-0.85

Figure 34: Transcriptomic analysis of the $\Delta cp12$ mutant grown in standard conditions

List of the 83 transcripts with enhanced (left) or decreased (right) abundance in the $\Delta cp12$ mutant. Fold-change values (FC) are displayed as log₂ ratios ($p < 0,01$, $N = 2$). Genes with FC values slightly below the threshold (set to 1 and -1, respectively) are listed below the thick red and green lines. Asterix indicate genes with p -values $< 0,05$.

De manière contre-intuitive, les activités GAPDH et PRK sont environ deux fois plus élevées dans la souche surexprimant *cp12* indépendamment du traitement appliqué. Ceci suggère non seulement que la régulation par CP12 n'est pas plus efficace lorsque la protéine est abondante mais qu'elle favorise même une accumulation de ces enzymes (hausse des activités maximales). Ceci peut s'expliquer par le fait que dans certains organismes comme *C. reinhardtii*, CP12 améliore la tolérance de ces enzymes à l'oxydation et préserve leur activité au sein du complexe supramoléculaire PRK/CP12/GAPDH [186].

En revanche, l'effet inverse n'est pas observé dans la souche $\Delta cp12$. Ce mutant ne présente pas non plus de variation significative de ces activités par rapport à la WT, quel que soit le traitement. Ce résultat est inattendu mais est concordant avec l'absence de phénotype lors d'alternances jour/nuit. Il est possible que le protocole utilisé (inspiré de ceux mis au point chez *C. reinhardtii*) ne soit pas complètement transposable aux cyanobactéries (réactivité des cystéines...) ou que chez *Synechocystis*, la régulation médiée par CP12 implique d'autres mécanismes (allostérie, état oligomérique des enzymes...). Par exemple, CP12 pourrait modifier l'affinité de Gap1 et/ou Gap2 pour leurs substrats et orienter la glycolyse vers la production de G3P (anabolisme) ou de pyruvate (catabolisme). Il est également possible que ces enzymes soient régulées par d'autres modifications de leurs thiols « masquant » les effets de CP12 *in vitro*. A titre d'exemple, la glutathionylation est un mode de régulation fréquent chez *Synechocystis* [99].

C. Analyse transcriptomique du mutant $\Delta cp12$

Afin de savoir si CP12 influence le métabolisme en photoautotrophie chez *Synechocystis*, j'ai étudié le transcriptome du mutant $\Delta cp12$ cultivé en lumière continue à celui de la WT (Figure 34). Bien que les croissances du mutant $\Delta cp12$ et de la WT soient similaires dans ces conditions, on observe que 85 transcrits ont une abondance différente entre ces souches.

Parmi les transcrits dont l'abondance augmente dans le mutant de délétion par rapport à la WT, on retrouve notamment la majorité des gènes du régulon NdhR (*sbtAB*, *cupA*, *ndhD3F3*, *sll1735*, voir Chapitre III, partie A.2) ainsi que de l'opéron *cmp* (*cmpABCD* et *porB*), tous deux impliqués dans l'import du CO₂ et du HCO₃⁻. Les ARN de gènes codant pour des protéines associées au fonctionnement du PSII sont également plus abondants. On trouve par exemple les transcrits *cpcCDG* et *nbla2* impliqués respectivement dans l'assemblage et la dégradation des phycobilisomes ou encore dans une moindre mesure chlL,

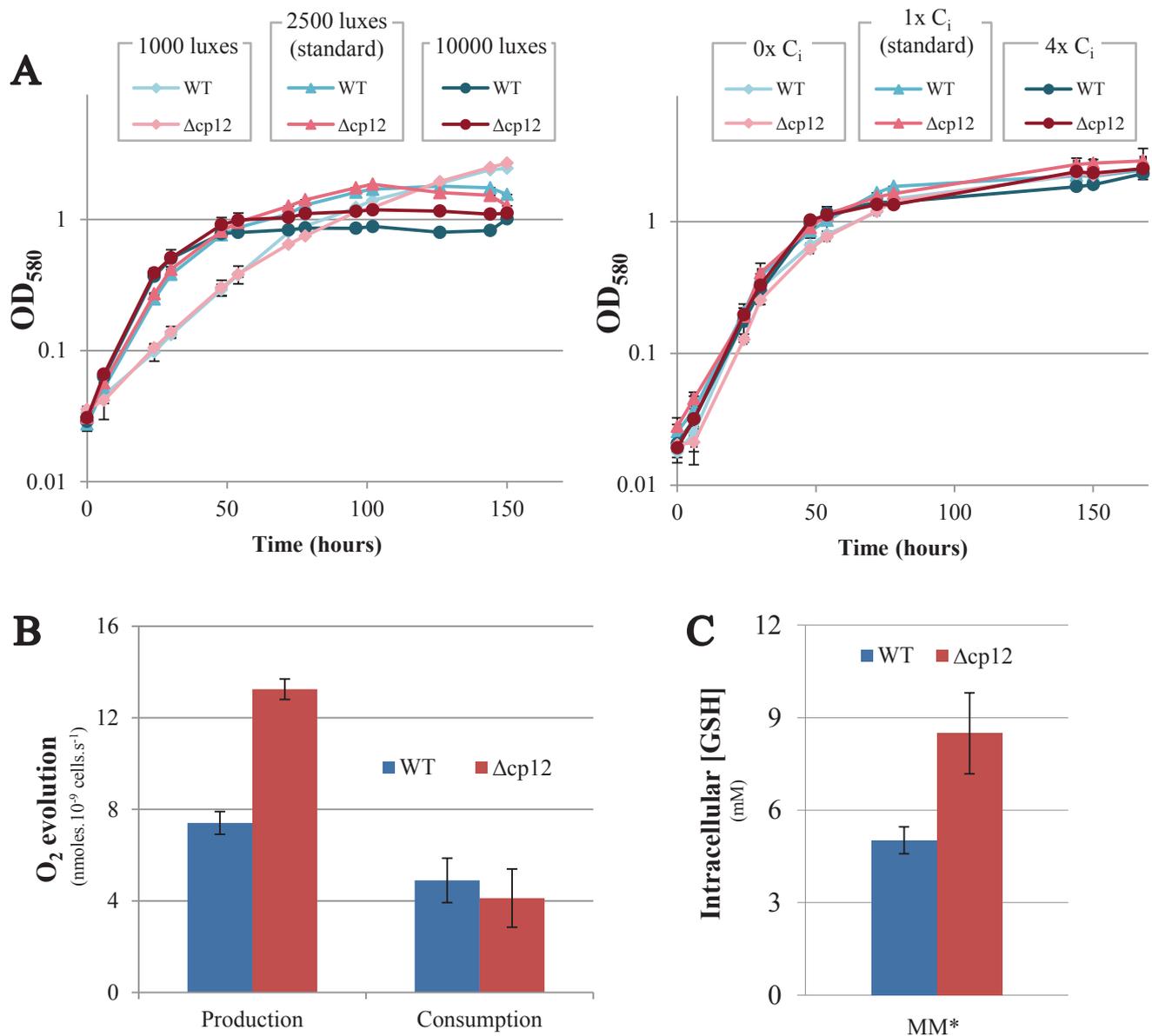


Figure 35: Growth analyses of WT and $\Delta cp12$ cells under various light and inorganic carbon availabilities and O₂-evolving capacity and GSH content assays in standard conditions.

- A. Growth curves of the WT and $\Delta cp12$ strains cultivated under various light (right) and inorganic carbon (right) availabilities. Error bars represent the mean SD for all samples ($N \geq 2$).
- B. Histograms showing O₂-evolving capacities of WT and $\Delta cp12$ strains grown in standard conditions. Production was obtained under saturating light in the electrode chamber whereas consumption was obtained by incubation in the dark. Error bars represent the mean SD for all samples ($N = 3$).
- C. Histograms showing intracellular GSH content in WT and $\Delta cp12$ strains grown in standard conditions. Error bars represent the mean SD for all samples ($N = 3$).

une enzyme de la voie de biosynthèse de la chlorophylle [271,272]. Des gènes associés au stress oxydant sont aussi plus fortement exprimés dans cette souche. On trouve par exemple les transcrits de l'opéron *flv4-sll0218-flv2* (évacuation des électrons au niveau du PSII), du gène *mvrA* et de son régulateur *prqR* (tolérance au méthylviologène) ainsi que *lrtA*, une protéine qui favorise la survie post-stress en s'associant aux ribosomes et qui est recyclée par le produit du gène *fus*, le facteur d'élongation EF-G [273,274].

Réciproquement, certains gènes voient l'abondance de leurs transcrits diminuée dans la souche $\Delta cp12$. On note notamment une diminution des ARN *ureG* (GTPase insérant le nickel dans l'uréase), *hypA1* (chaperone à nickel de l'hydrogénase) et *hliABC* (mécanisme de photoprotection). Bien que la probabilité d'erreur statistique soit sensiblement plus élevée ($p < 0,05$), on observe également une diminution concertée des séquences codantes portées par le transcrite polycistronique *narB-nrtABCD* impliqué dans l'import et la réduction du nitrate.

Ainsi, la réponse transcriptionnelle en absence de *cp12* dans les conditions standards est remarquablement vaste et implique des processus centraux comme la capture des photons (phycobilisomes), l'import de carbone inorganique et la gestion du stress oxydant.

D. Capacité photosynthétique et perturbation rédox

Suite à ces résultats de transcriptome, j'ai étudié l'influence de l'intensité lumineuse et de la teneur en carbone inorganique (Ci) sur le mutant $\Delta cp12$ (Figure 35-A). Lorsque l'intensité lumineuse est faible (1000 lux), la croissance des souches WT et $\Delta cp12$ est similaire mais plus lente par rapport aux conditions standards (2500 lux). Réciproquement lorsque l'intensité lumineuse est forte (10000 lux), la croissance des souches WT et $\Delta cp12$ est sensiblement plus rapide en phase exponentielle qu'avec un éclairage de 2500 lux. De plus, les cultures atteignent une DO maximale plus faible en phase stationnaire par rapport aux conditions standards. Ces résultats montrent que le mutant $\Delta cp12$ répond de manière comparable à la WT aux variations de l'intensité lumineuse.

Le carbone inorganique (Ci) du milieu provient à la fois du CO₂ atmosphérique dissout (constant) et de la supplémentation en Na₂CO₃. Les effets liés à l'absence (0x) ou à l'excès (4x) d'ajout de Na₂CO₃ dans le milieu de culture sont globalement plus modérés que ceux induits par les changements d'intensité lumineuse puisqu'on observe seulement une courte phase de latence lorsque celui-ci est absent (Figure 35-A). De plus, la croissance des souches ne présente aucune différence majeure dans les conditions testées.

Ainsi, malgré une réponse transcriptionnelle suggérant que le mutant $\Delta cp12$ souffre d'un déficit en Ci et/ou d'un défaut de capture ou de gestion de la lumière, il n'est pas plus sensible que la WT à l'excès ou à la limitation de ces nutriments.

Pour déterminer si les différences observées dans les transcriptomes WT et $\Delta cp12$ se répercutent sur leur capacité photosynthétique, j'ai mesuré le dégagement de O_2 (proportionnel à l'activité du PSII) à l'aide d'une électrode de Clark (Figure 35-B). Les résultats montrent que le mutant a une production nette de O_2 presque deux fois supérieure à celle de la WT alors que la consommation de O_2 à l'obscurité (principalement liée à la respiration) est identique entre les deux souches. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats bien qu'il soit impossible de les valider à ce stade.

L'augmentation de la production nette de O_2 peut être liée à un transfert d'énergie plus efficace entre les phycobilisomes et le PSII (capacité photosynthétique) dont le rendement quantique pourra être mesuré par fluorimétrie [275]. L'induction transcriptionnelle des systèmes d'import du CO_2/HCO_3^- pourrait également induire une diminution de l'activité oxygénase de la RuBisCO et donc une augmentation de la production nette de O_2 .

Chez les cyanobactéries, le O_2 peut être réduit en H_2O par des flavodiiron protéines (les hétérodimères Flv1-Flv3 et Flv2-Flv4, voir Chapitre II, partie B.2) dont l'activité est dépendante de la lumière et du NADPH [276]. Une diminution de leur activité pourrait donc engendrer une hausse de la production nette de O_2 . Cependant de manière intrigante, dans la souche $\Delta cp12$, les transcrits des gènes Flv2-4 sont plus abondants que dans la WT. L'activation de ces flavoprotéines indique que la forte production de O_2 pourrait induire un stress oxydant. L'induction de ce mécanisme antioxydant corrèle par ailleurs avec une augmentation d'environ 70% de la concentration intracellulaire en GSH dans les conditions standards de culture (Figure 35-C). Le mutant $\Delta cp12$ semble donc subir un stress oxydant plus important que la WT qui n'affecte pas sa viabilité car il est dissipé par la mise en place de mécanismes antioxydants. Néanmoins, la cause de cette hausse de la production de O_2 dans le mutant reste à déterminer.

Pour déterminer s'il y a une incidence sur la production/consommation de NADPH, j'ai étudié *in vivo* la dynamique du pouvoir réducteur (NADPH et NADH) dans cette souche $\Delta cp12$ cultivée en photoautotrophie en collaboration avec Pierre Sétif (Equipe de Mécanismes Régulateurs des Organismes Photosynthétiques, CEA Saclay).

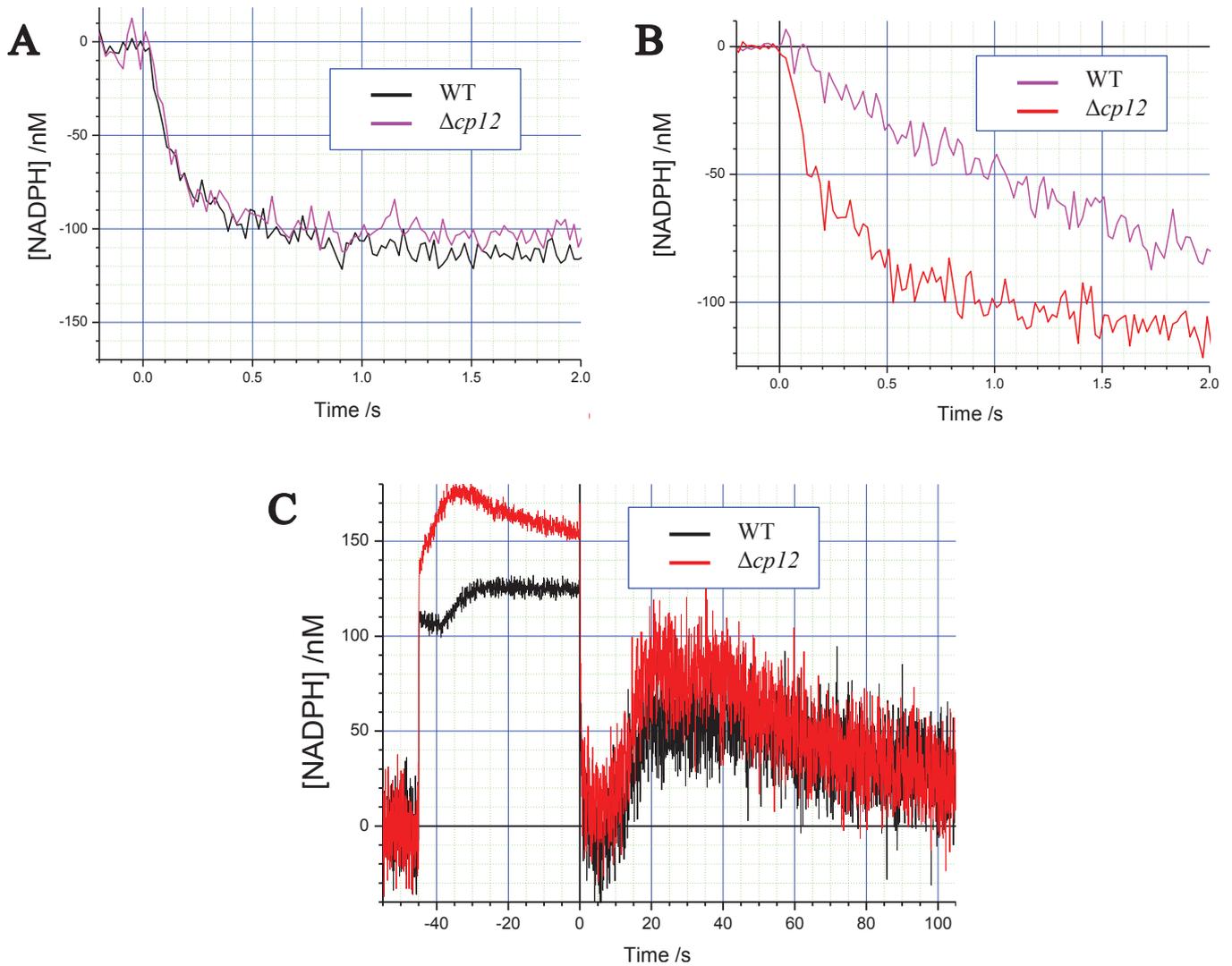


Figure 36: DUAL-PAM measurements of reducing power production and consumption after different light exposure durations

- Curves showing the fluorescence decrease in darkness after 16 s (long) light exposures in WT and $\Delta cp12$ strains grown in standard conditions. Curves represent the average of 60 and 40 technical replicates obtained from 2 biological replicates, respectively. Baseline corresponded to maximal fluorescence obtained before darkness and was set to 0.
- Curves showing the fluorescence decrease in darkness after 0,5 s (short) light exposures in WT and $\Delta cp12$ strains grown in standard conditions. Curves represent the average of 60 and 40 technical replicates obtained from 2 biological replicates, respectively. Baseline corresponded to maximal fluorescence obtained before darkness and was set to 0.
- Curves showing fluorescence dynamics with a larger time-scale following a 45 seconds illumination in WT and $\Delta cp12$ strains grown in standard conditions. Curves represent the average of 3 technical replicates. Note that during darkness, signal noise higher because of the low (actinic) measure frequency (see Material and Methods).

Le principe de cette méthode repose sur la fluorescence émise exclusivement lorsque ces cofacteurs sont réduits (voir Matériel et Méthodes). Leur réduction par la chaîne photosynthétique est très rapide (≈ 100 ms) tandis qu'à l'obscurité, leur oxydation est lente (≈ 2 s). Elle engendre une diminution de la fluorescence qui est enregistrée et analysée pour étudier l'état rédox du métabolisme [277]. En effet, la vitesse de décroissance du signal est fonction de l'activation des voies métaboliques, elle-même proportionnelle à la durée d'éclairement des cellules (activation par les thiorédoxines, déglutathionylation...). Typiquement, une longue illumination induit une baisse rapide de la fluorescence à l'obscurité car l'activation des voies est complète.

De cette manière il apparaît que suite à un éclaircissement long (16 s), la perte de fluorescence est semblable entre WT et $\Delta cp12$ à l'obscurité (Figure 36-A). Autrement dit, lorsque les voies anaboliques sont complètement activées, la vitesse d'oxydation du NAD(P)H est comparable entre ces deux souches. En revanche lorsque l'éclaircissement est bref (0,5 s), la baisse de fluorescence est plus rapide dans le mutant $\Delta cp12$ que dans la WT (Figure 36-B). De plus, cette décroissance de la fluorescence dans le mutant est identique à celle obtenue après une longue illumination. Ces résultats indiquent que les voies ne sont plus régulées par l'activité photosynthétique dans le mutant $\Delta cp12$ et qu'elles sont constitutivement activées. Ceci suggère qu'en photoautotrophie chez *Synechocystis*, CP12 coordonne la photosynthèse et l'anabolisme et pourrait notamment réguler le cycle de Calvin qui est le principal consommateur d'électrons.

Ceci est paradoxal puisque je n'ai pas mis en évidence de différence entre ces souches vis-à-vis des activités enzymatiques PRK et GAPDH. Cela est néanmoins compatible avec l'existence d'un mécanisme de régulation distinct ne pouvant être révélé avec ce protocole.

Par ailleurs, sur des échelles de temps plus longues ($\approx 2-3$ min), l'amplitude du signal de fluorescence entre les phases d'illumination et d'obscurité est plus grande dans le mutant et peut avoir deux significations (Figure 36-C). Premièrement, elle peut correspondre à un état rédox plus voire totalement « oxydé » à l'obscurité dans le mutant. Or il ne présente pas de retard de croissance lors d'incubations prolongées sans lumière (voir Figure 33-A). Cela peut aussi résulter d'une plus grande quantité intracellulaire de cofacteurs. Bien que nous ne puissions infirmer rigoureusement la première hypothèse, cette seconde explication est cohérente avec les observations transcriptomiques et oxymétriques relatives au PSII.

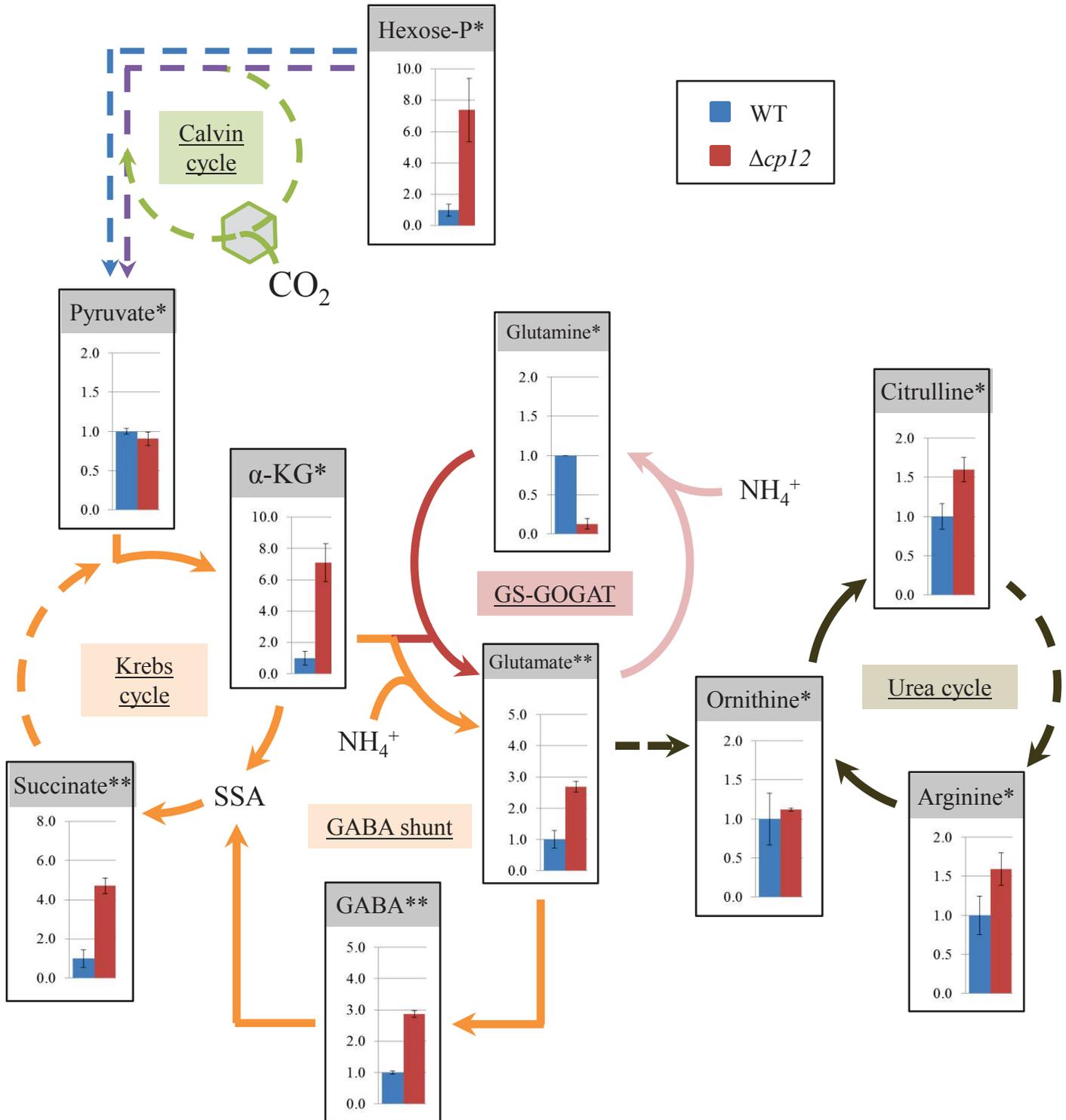


Figure 37: Metabolomic analysis of the main pathways of carbon metabolism in the WT and $\Delta cp12$ mutant grown in standard conditions

Cells were cultivated for 24 hrs in standard conditions (MM*, 2500 luxes). Quantities are displayed relative to the WT strain in standard conditions (set to 1) and were calculated after normalization of peaks areas to the cell number. Error bars represent the mean SD for all samples (N = 2). All metabolites presented passed either one (*) or both (**) statistical analyses between ANOVA and the Kruskal-Wallis test with $p < 0.05$.

Hexose-P = Hexoses phosphate (pool of glucose-1-phosphate, fructose-1/6-phosphate, mannose-1/6-phosphate and galactose-1-phosphate); α -KG = α -ketoglutarate; GABA = γ -aminobutyrate; SSA = Succinate semialdehyde

E. Impact de la déplétion de CP12 sur le métabolisme du carbone

D'après les résultats ci-dessus, le mutant $\Delta cp12$ possède une plus grande capacité à stocker et à évacuer le pouvoir réducteur. Cependant, en absence de CP12, cette efficacité du métabolisme et notamment l'assimilation du CO_2 ne se répercute pas sur la production de biomasse.

En collaboration avec Florence Castelli (Laboratoire d'Etudes du Métabolisme des Médicaments, CEA), j'ai réalisé une analyse métabolomique des souches WT et $\Delta cp12$ dans ces conditions qui confirme néanmoins que la distribution du carbone dans le mutant est partiellement altérée (Figure 37). En effet, on observe une forte augmentation de la quantité d'un mélange d'hexoses phosphates dans le mutant (x7) mais pas de changement notable dans le contenu en pyruvate, produit final de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates. Il y a en revanche une accumulation remarquable des intermédiaires du cycle de Krebs (x7 et x5 pour l' α -KG et le succinate respectivement) ainsi que des métabolites du shunt GABA (x3 environ pour le glutamate et le GABA). Bien qu'il n'ait pas été possible de quantifier les intermédiaires du cycle de Calvin avec cette méthode d'extraction et de chromatographie (voir Matériel et Méthodes, partie G.3), les résultats montrent une accumulation de plusieurs carbohydrates et suggèrent que les flux métaboliques sont modifiés dans le mutant $\Delta cp12$.

De plus, l'augmentation de la quantité de glutamate dans le mutant n'engendre pas de hausse significative des intermédiaires du cycle de l'urée. En revanche la glutamine, qui est étroitement liée au glutamate par les activités GS-GOGAT, est beaucoup moins abondante dans cette souche (diminution de 87% par rapport à la WT).

En conclusion, le surplus des différents métabolites mentionnés pourrait constituer une réserve de carbone capable de soutenir la respiration à l'obscurité et expliquer pourquoi le mutant $\Delta cp12$ est capable de croître après une exposition prolongée sans lumière où il consomme son pouvoir réducteur de manière excessive. Parmi ces molécules, l' α -KG est un métabolite clé dont l'excès déclenche des cascades de régulation au niveau transcriptionnel et post-traductionnel pour stimuler l'assimilation de l'azote. Pourtant la quantité de la plupart des intermédiaires observables du métabolisme azoté est peu affectée par son accumulation. Néanmoins, la baisse drastique du contenu en glutamine suggère qu'il existe un déséquilibre métabolique d'origine inconnue qui pourrait impacter la balance C/N.

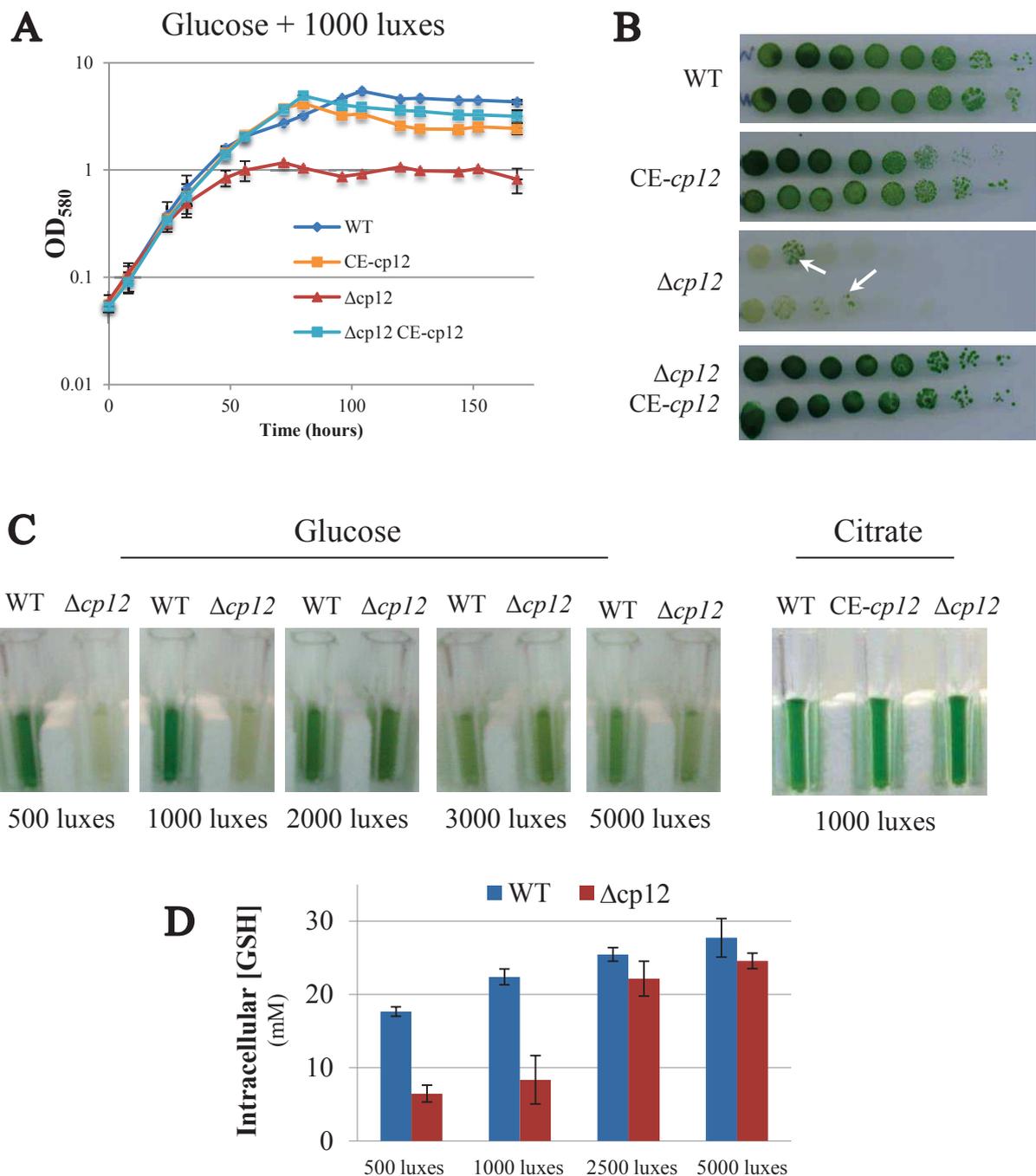


Figure 38: Mixotrophic growth and GSH content of the WT and $\Delta cp12$ strains with increasing light availability

- Mixotrophy was obtained by addition of 55 mM glucose to the standard MM* medium. Error bars represent the mean SD for all samples (N = 2).
- Spot tests pictures obtained after 7 days of mixotrophy growth (1000 luxes) with two independent clones of each strain indicated. White arrows point toward probable $\Delta cp12$ suppressors.
- Pictures of WT and $\Delta cp12$ strains during mixotrophic growth with glucose and increasing light intensities (4 days) or 0.5mM citrate under low light (1000 luxes, 7 days).
- GSH quantification in WT and $\Delta cp12$ strains after 48 hrs of mixotrophic growth with increasing light increasing. Error bars represent the mean SD for all samples (N = 3).

Partie II

En mixotrophie, CP12 structure les flux du carbone et est nécessaire pour maintenir l'équilibre carbone/azote

Les mutants ont été soumis à des conditions favorisant les déséquilibres carbone/azote, notamment en mixotrophie. Chez *Synechocystis*, ces conditions sont obtenues lorsque deux sources de carbone sont présentes : le CO₂ (converti en matière organique par la photosynthèse et le cycle de Calvin) et le glucose (source exogène de carbone organique). Dans ces conditions, les cellules disposent aussi de deux sources d'ATP et de pouvoir réducteur (photosynthèse et catabolisme des sucres) qui doivent être finement régulées les unes par rapport aux autres pour éviter la production de stress oxydant.

A. La présence de glucose engendre une insuffisance rédox photo-dépendante

Dans la continuité des résultats de notre approche de métabolomique, j'ai étudié l'influence du glucose comme source de carbone sur la croissance des différents mutants (délétion et surexpression de *cp12*) en présence de lumière (mixotrophie). Ces cultures ont d'abord été réalisées avec une lumière faible (1000 lux) car il a été montré au laboratoire qu'en présence d'une forte lumière, l'addition de glucose génère du stress oxydant [100]. Dans ces conditions, les souches exprimant le gène *cp12* (WT, CE-*cp12* et Δ *cp12* CE-*cp12*) présentent toutes une croissance rapide et atteignent des densités cellulaires élevées en phase stationnaire ($DO_{580} \approx 4$ soit $2 \cdot 10^8$ cellules/mL). Par contre le mutant Δ *cp12* présente un arrêt précoce de la croissance et sa concentration cellulaire n'excède pas $5 \cdot 10^7$ cellules/mL (Figure 38-A). L'interruption de la croissance est associée à une dépigmentation de la culture qu'on observe également avec une intensité lumineuse plus faible (500 lux, Figure 38-C). Un phénomène similaire est observé sur boîte de Pétri pour lequel on observe, après 7 jours de culture, l'apparition de petites colonies vertes au sein des spots jaunis (Figure 38-B) qui pourraient être dus à la croissance tardive de suppresseurs fonctionnels.

Cependant si l'intensité lumineuse augmente (2000-5000 lux), la croissance du mutant Δ *cp12* est progressivement restaurée (Figure 38-C). Lorsque le glucose est remplacé par du citrate, un autre substrat carboné que *Synechocystis* peut métaboliser grâce au cycle de Krebs, le mutant Δ *cp12* croît de manière similaire à la souche sauvage.

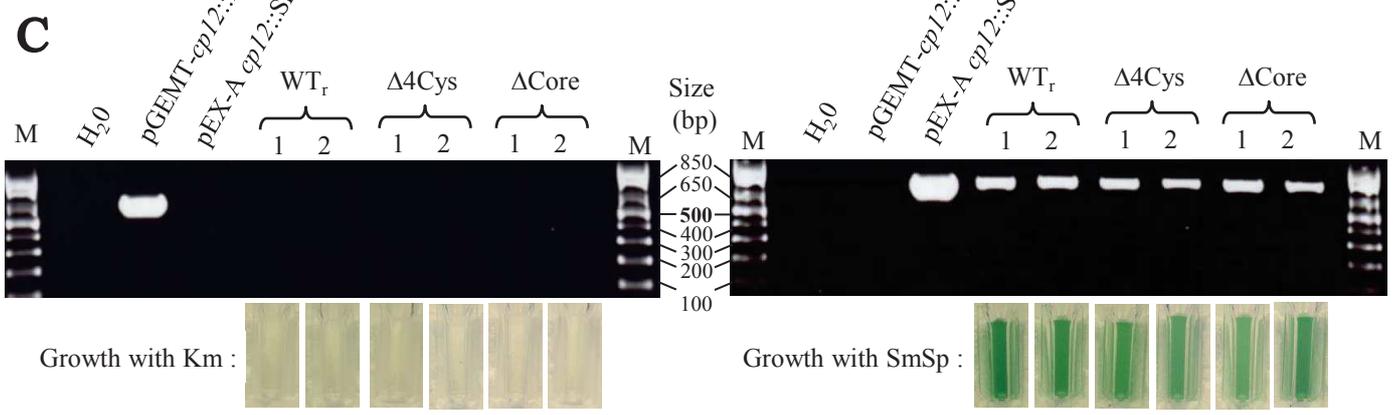
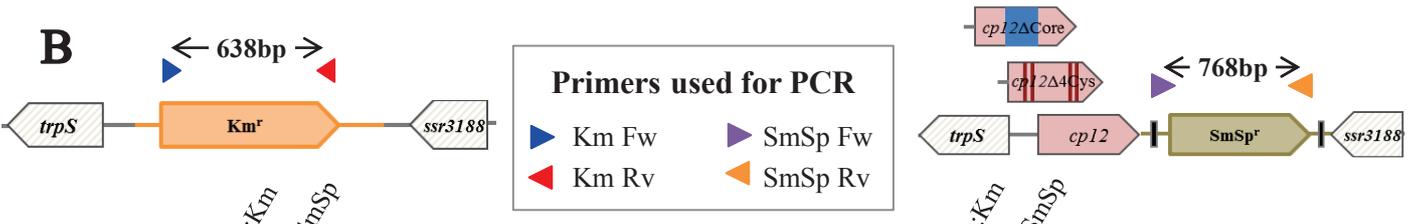
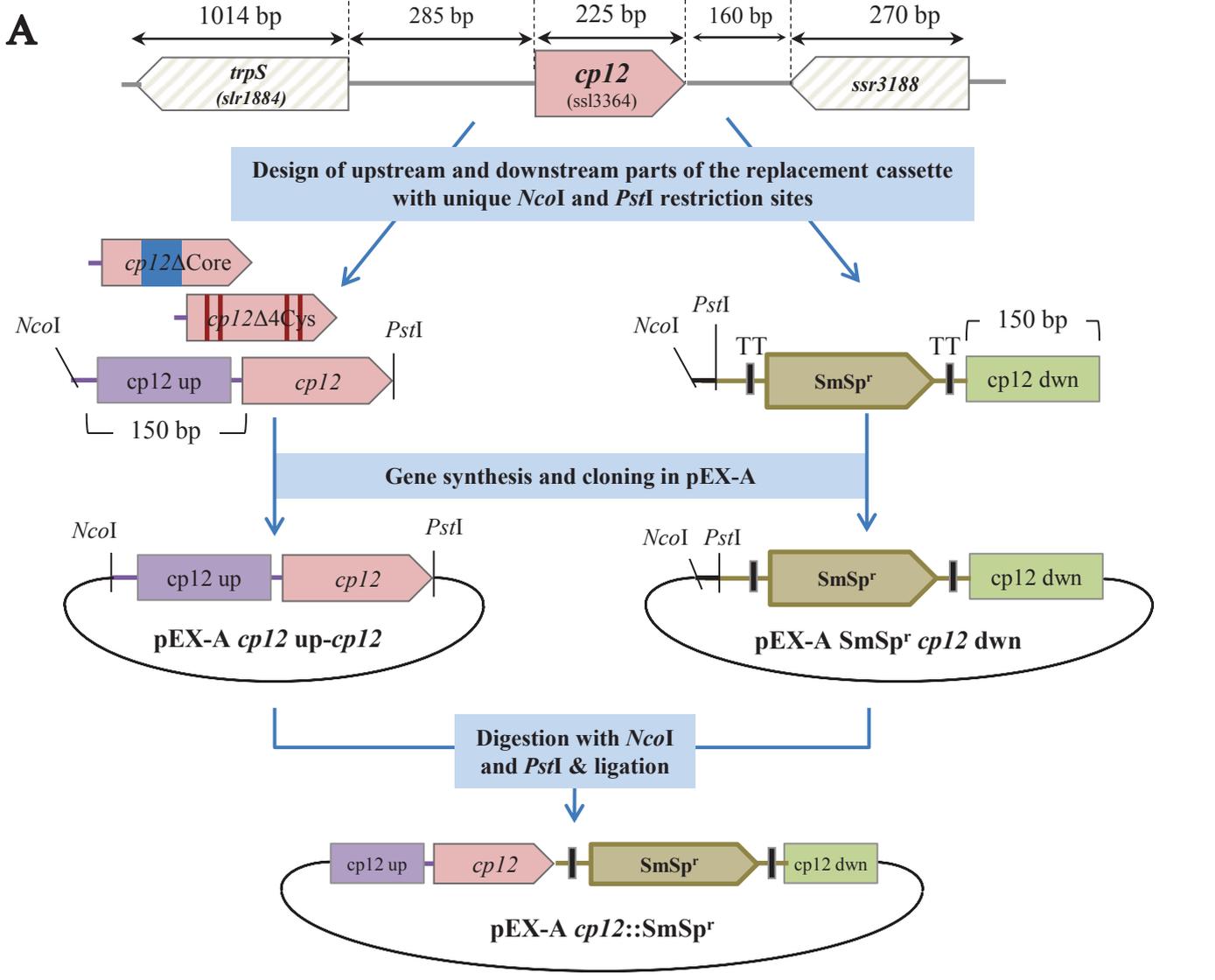
Ces résultats suggèrent que lorsque l'intensité lumineuse est faible (≤ 1000 lux), le mutant souffre d'une insuffisance de pouvoir réducteur induite par le métabolisme du glucose et qui limite la croissance. Ce déficit est compensé en favorisant la photosynthèse (de 2000 à 5000 lux). Ce phénotype est spécifiquement lié à l'absence de CP12 puisque le mutant de complémentation ($\Delta cp12$ CE- $cp12$) a un phénotype identique à la WT et métabolise donc le glucose de manière adéquate.

Il a été montré que l'ajout de glucose stimule la synthèse de glutathion (GSH) dans la souche sauvage. Le contenu en GSH de ces différentes souches a donc été comparé à diverses intensités lumineuses (Figure 38-D). On observe que lorsque l'intensité lumineuse est faible (500 et 1000 lux), la concentration intracellulaire de GSH est inférieure (x2,5) en absence de CP12. Par contre, elle atteint un niveau comparable à la WT lorsque la croissance du mutant $\Delta cp12$ est restaurée (2500 et 5000 lux).

Le cycle de Calvin est une voie anabolique qui s'oppose au catabolisme des sucres en amont du cycle de Krebs, à la fois au niveau de la régénération du substrat de PRK et de la conversion du 3-PGA en G3P (voir Figure 19). En mixotrophie, son activité est diminuée pour favoriser la dégradation des sucres mais n'est pas abolie car elle permet de recycler l'ATP et le pouvoir réducteur. Mes observations sont en accord avec une perte de cette régulation dans le mutant $\Delta cp12$ qui engendrerait un gaspillage des substrats énergétiques plutôt qu'un recyclage modéré. L'apparition de potentiels suppresseurs du mutant $\Delta cp12$ dans ces conditions suggère également que ce défaut peut être compensé par l'acquisition de mutations secondaires. Pour comprendre quelle forme (oxydée ou réduite) et quels motifs conservés de CP12 sont impliqués dans cette fonction, j'ai construit des mutants ponctuels du gène $cp12$.

B. Construction et analyse des mutants ponctuels WTr, $\Delta 4Cys$ et $\Delta Core$

Afin d'étudier plus précisément le rôle des différents résidus conservés de la protéine CP12 chez *Synechocystis*, des mutants ponctuels ont été construits à partir du mutant $\Delta cp12$. Ces mutants comprennent une souche sauvage reconstituée (WTr), une autre produisant une protéine dépourvue de cystéines ($\Delta 4Cys$) ainsi qu'une dernière exprimant une protéine mutée dans la séquence consensus centrale ($\Delta Core$).



La stratégie de mutagenèse mise au point pour introduire les allèles mutants *cp12* repose sur l'introduction d'une cassette portant le gène *cp12* muté qui va remplacer le gène Km^r de la souche $\Delta cp12$ (Figure 39-A). Cette cassette comprend les plateformes d'homologie amont et aval (150 pb chacune) qui flanquent le gène *cp12* sauvage ou muté suivi du gène de résistance à la streptomycine et spectinomycine (Sm/Sp^r). Les gènes *cp12* conçus dans ce travail sont issus de la séquence sauvage et codent pour des protéines CP12 ne portant soit aucune mutation (WTr, allèle sauvage reconstitué) soit des substitutions de plusieurs résidus en alanine par introduction du codon GCC, le plus fréquent chez *Synechocystis*. Ainsi, le gène *cp12* $\Delta 4Cys$ porte quatre substitutions permettant d'étudier l'implication des cystéines dans les fonctions de CP12. Le gène *cp12* $\Delta Core$ porte quant à lui trois substitutions des résidus chargés du consensus central (AWDAVEEL vers AWAAVAAL) et permet d'étudier l'influence de ce motif conservé qui n'a jamais été caractérisé chez les cyanobactéries.

Chaque cassette est assemblée à partir de 2 fragments synthétiques grâce aux sites de restriction *NcoI* et *PstI* (Figure 39-A). Après introduction par transformation dans le mutant $\Delta cp12$, le remplacement des chromosomes Km^r dépourvus de *cp12* par les chromosomes Sm/Sp^r portant les allèles *cp12* d'intérêt a été suivi par PCR à l'aide d'amorces spécifiques à chaque marqueur de sélection (Figure 39-B). Suite à des cultures en présence de Sm/Sp et en absence de Km , la disparition du gène Km^r est complète dans les mutants qui sont donc nommés WTr, $\Delta 4Cys$ et $\Delta Core$ (Figure 39-C). Cette ségrégation est également confirmée par l'absence de croissance après 7 jours de culture en présence de Km (Figure 39-C).

Figure 39 : Construction and PCR verification of the *cp12::SmSp^r* DNA cassettes to generate sequence variants of the *Synechocystis cp12* gene

- A. Adjacent genes (*ssr3188* and *slr1884*) are represented by hatched white boxes pointing their transcription direction (see Cyanobase). *cp12* up and *cp12* down DNA sequences were designed to replace the whole Km^r ORF of the $\Delta cp12$ mutant by the *cp12* sequence variants and $SmSp^r$ gene flanked by transcriptional terminators (TT) through homologous recombination and are displayed as purple and green boxes respectively. Sequence variants include the wild-type *cp12* gene (reconstruction of the WT locus) as well as one encoding a cysteine-less protein (*cp12* $\Delta 4Cys$, Cys-to-Ala substitutions) and one encoding a less charged protein (*cp12* $\Delta Core$, Asp/Glu-to-Ala substitutions in the core AWDAVEEL consensus sequence).
- B. Schematic representation of the *cp12* gene locus in *Synechocystis* $\Delta cp12$ and sequence variant (WTr, $\Delta 4Cys$ and $\Delta Core$) strains. After transformation, cassettes replace the whole Km^r ORF. Forward and reverse primers used to monitor extinction of the Km^r gene and acquisition of the $SmSp^r$ marker during $SmSp$ selection are shown as blue and red as well as orange and purple triangles respectively. Resulting PCR products are represented as double arrows with their corresponding size in the middle.
- C. UV-light image of the agarose gels showing the 0.64 kb (left) and 0.77 kb (right) PCR products resulting from amplification of either Km^r or $SmSp^r$ genes. Size marker (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); lanes H_2O , pGEMT *cp12::Km* and pEX-A *cp12::SmSp* correspond to the negative and positive controls (no matrix and size product control respectively). For each strain, two independent clones (named 1 and 2 respectively) obtained after transformation and grown in MM in presence of streptomycin/spectinomycin were analyzed. Pictures were taken after 7 days of growth with the specified antibiotic.

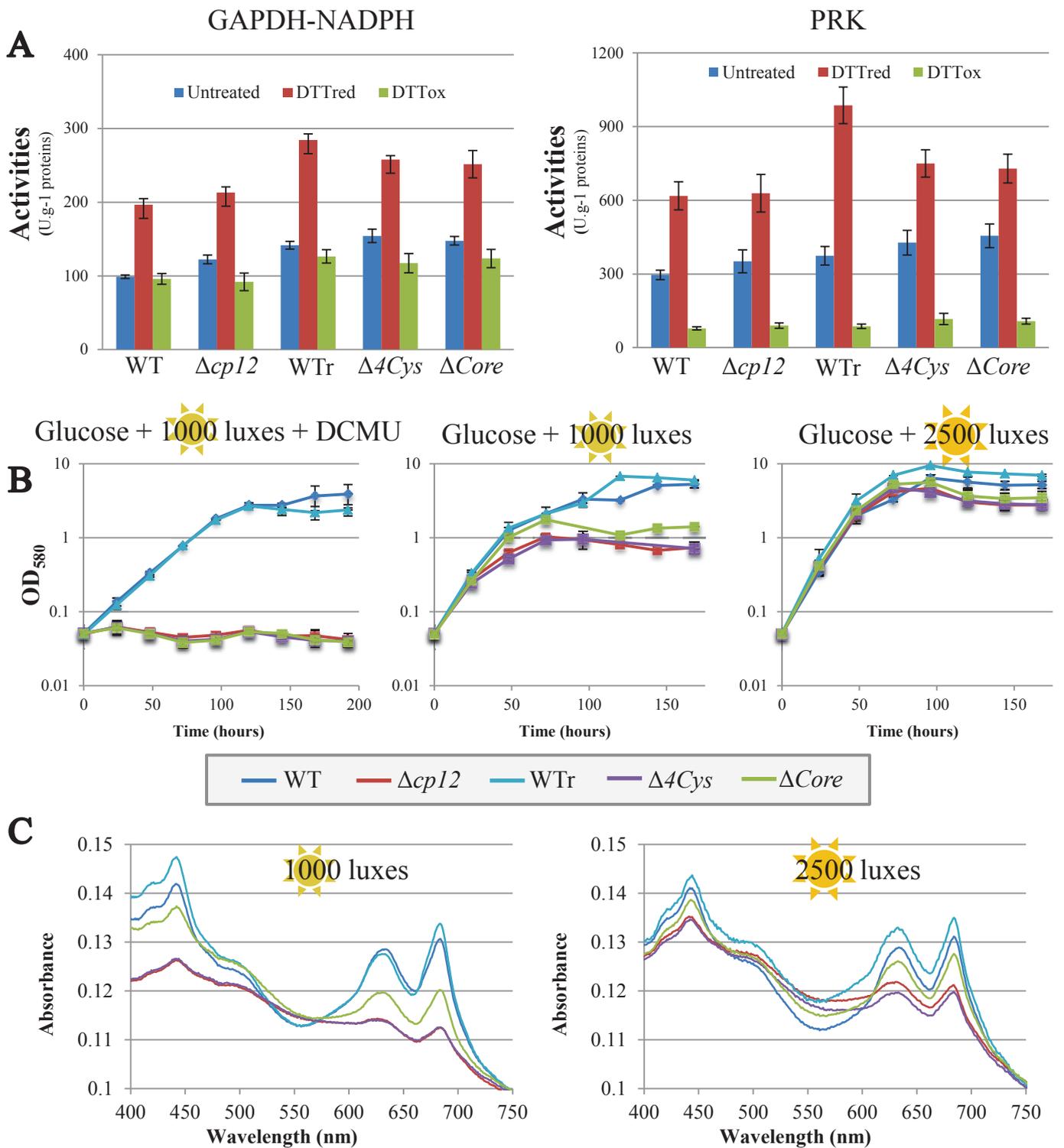


Figure 40: Assays of GAPDH NADPH-consuming and PRK activities and mixotrophic growth analysis of *cp12* sequence variants under various photosynthetic regimes.

- GAPDH NADPH-dependent and PRK activities in WT, $\Delta cp12$, WTr, $\Delta 4Cys$ and $\Delta Core$ strains grown in standard conditions. Assays were carried out as described in material and methods. Error bars represent the mean SE for all samples ($N \geq 6$)
- Mixotrophy was obtained by addition of 55 mM glucose to the standard MM* medium. PSII inhibitor DCMU was supplied at 10 μ M. Error bars represent the mean SD for all samples ($N = 2-4$).
- Spectra analysis of cells grown during 48 hrs in mixotrophy under 1000 luxes (left) and 2500 luxes (right) light intensity. Each spectrum is the average of 2 replicates.

Nos collaborateurs ont répété le dosage des activités GAPDH (NADPH-dépendante), et PRK sur ces nouveaux mutants (Figure 40-A). De manière similaire aux précédentes observations, ces différentes activités sont régulées par les agents rédox (DTT réduit et oxydé). Ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence de différence majeure liée à l'absence de CP12 ou à l'expression d'une version mutée de la protéine.

Ces mutants ont ensuite été cultivés dans les mêmes conditions de mixotrophie que précédemment ainsi qu'en présence de DCMU, un inhibiteur du PSII abolissant la réduction de la ferrédoxine par la photosynthèse (Figure 40-B). Les résultats obtenus montrent que lorsque le PSII est inhibé, les WT et WTr sont capables de croître uniquement aux dépens du glucose avec un temps de génération d'environ 24 heures. En revanche, la croissance des mutants $\Delta cp12$, $\Delta 4Cys$ et $\Delta Core$ est complètement abolie. Lorsque le mutant $\Delta 4Cys$ est cultivé uniquement en présence de glucose (1000 lux), il récupère partiellement la capacité de croître mais présente un défaut de croissance et une dépigmentation identique à celui observé pour le mutant $\Delta cp12$. Ceci suggère que les cystéines sont essentielles à la fonction régulatrice de CP12 et donc probablement à sa structuration en réponse à l'état redox (ponts disulfure).

Dans ces conditions (glucose; 1000 lux), la croissance du mutant $\Delta Core$ est en partie restaurée mais de manière plus importante que les mutants $\Delta cp12$ et $\Delta 4Cys$. Les cultures conservent également leur coloration vert-bleu contrairement à ces deux souches. L'analyse des spectres d'absorbance (Figure 40-C) confirme que ce mutant présente un contenu en pigments intermédiaire entre WT et $\Delta cp12$.

Lorsque l'intensité lumineuse augmente (2500 lux), la croissance des différents mutants ponctuels restaurée. On observe seulement une légère diminution des densités cellulaires maximales en phase stationnaire des mutants $\Delta cp12$, $\Delta 4Cys$ et $\Delta Core$. Les différences de spectres d'absorbance sont également réduites mais les souches les plus riches en pigments restent la WT et la WTr puis le mutant $\Delta Core$ et enfin les souches $\Delta cp12$ et $\Delta 4Cys$.

Ce caractère graduel du phénotype entre les deux types de mutations introduites indique que les cystéines sont essentielles à la régulation exercée par CP12 mais que le consensus porte une fonction « support » qui en renforce les effets. Ceci est en accord avec le modèle proposé faisant intervenir l'attraction électrostatique de PRK (charges positives) et la formation du supracomplexe par l'exposition de charges négatives [188].

Gene ID	Name	Function	FC (log ₂)
ssl2501		unknown protein	2.18
sll1358	mncA	putative oxalate decarboxylase, periplasmic protein	1.67
slr1963	ocp	water-soluble carotenoid protein	1.52
slr0423	rlpA	hypothetical protein	1.50
slr0884	gap1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 1 (NAD+)	1.47
slr1667		hypothetical protein (target gene of sycrp1)	1.44
ssl0020	petF	ferredoxin I, essential for growth	1.42
ssl0707	glnB	nitrogen regulatory protein P-II	1.34
slr1928	pilA5	type 4 pilin-like protein	1.32
sll0329	gnd	6-phosphogluconate dehydrogenase	1.28
slr1214	rre15	two-component response regulator PatA subfamily	1.21
slr0915	I-Ssp6803I	putative endonuclease [encoded in trnFM-intron: 2791054 - 2791708]	1.20
slr1993	phaA	PHA-specific beta-ketothiolase	1.20
ssl1480	rbp2	putative RNA-binding protein	1.15
slr1994	phaB	PHA-specific acetoacetyl-CoA reductase	1.10
sll0680	pstS	phosphate-binding periplasmic protein precursor (PBP)	1.10
slr1929	pilA6	type 4 pilin-like protein	1.09
slr0628	rps14	30S ribosomal protein S14	1.07
sll1694	pilA1	pilin polypeptide PilA1	1.05
sll1221	hoxF	diaphorase subunit of the bidirectional hydrogenase	1.04
ssl0452	nblA1	phycobilisome degradation protein NblA	1.01
slr0853	rimI	ribosomal-protein-alanine acetyltransferase	1.01
sll0681	pstC	phosphate transport system permease protein PstC homolog	1.00
sll1898	ctaA	hypothetical protein	1.00

Gene ID	Name	Function	FC (log ₂)
slr1367	glgP	glycogen phosphorylase	0.99
slr1498	hypD	putative hydrogenase expression/formation protein HypD	0.99
sll0699	ISY100i	putative transposase [ISY100i: 123475 - 124420]	0.99*
sll1222		hypothetical protein	0.96
sll2009	prp2	processing protease	0.91
slr0012	rbcS	ribulose biphosphate carboxylase small subunit	0.90
sll1030	ccmL	carbon dioxide concentrating mechanism protein CcmL, putative carboxysome assembly protein	0.90
slr1830	phaC	poly(3-hydroxyalkanoate) synthase	0.89
sll2008	prp1	processing protease	0.89
sll0200	ISY100s	putative transposase [ISY100s: 2524547 - 2525492]	0.88*
sll0650	ISY100j	putative transposase [ISY100j: 421739 - 422684]	0.88*
sll0684	pstB	phosphate transport ATP-binding protein PstB homolog	0.87
sll1292	rre11	two-component response regulator CheY subfamily	0.87
slr0474	rcp1	two-component response regulator CheY subfamily, regulator for phytochrome 1 (Cph1)	0.87
sll1255	ISY203c	putative transposase [ISY203c: 1728942 - 1730115]	0.86*
sll1626	lexA	LexA repressor	0.86
slr0550	dapA	dihydrodipicolinate synthase	0.86
ssl1175	ISY100v1	putative transposase [ISY100v: 3095975 - 3096319, join 3097194 - 3097362, join 3098314 - 3098743]	0.86*
sll1223	hoxU	diaphorase subunit of the bidirectional hydrogenase	0.85*

Figure 41: List of the 43 annotated transcripts with increased abundance under mixotrophy in the $\Delta cp12$ mutant.

WT and $\Delta cp12$ cells were cultivated 24 hrs in mixotrophy (glucose 55 mM, 1000 luxes). Fold-change values (FC) are displayed as log₂ ratios ($p < 0,01$, $N = 2$). Asterix indicate genes with p-values $< 0,05$. Genes with FC values above 1 are displayed in the left table while those slightly below the threshold are listed in the right table. Asterix indicate genes with p-values $< 0,05$.

C. Réponse transcriptionnelle du mutant $\Delta cp12$ en mixotrophie et implications

L'analyse du transcriptome du mutant $\Delta cp12$ cultivé à 1000 lux en présence de 55 mM de glucose (1000 lux) révèle que 74 transcrits sont plus abondants (dont 43 gènes annotés, Figure 41) tandis que 119 sont plus faiblement représentés (dont 69 annotés, Figure 42) par rapport à la souche sauvage. Ces variations aident à préciser l'origine du défaut de croissance observé pour le mutant $\Delta cp12$ en mixotrophie.

Parmi les gènes dont l'expression augmente ($\log_2 \geq 0.85$), plusieurs sont liés au catabolisme et au stockage du carbone organique comme *gap1* (GAPDH glycolytique), *gnd* (6PGD, voie des pentoses phosphates, Figure 19), *glgP* (glycogène phosphorylase), *phaABC* et *ssl2501* (biosynthèse des PHB, [214]). L'abondance du transcrit de la petite sous-unité de la RuBisCO (*rbcS*) augmente également alors que celle du transcrit *rbcL* (grande sous-unité) est constante malgré leur organisation en opéron.

D'autres interviennent dans le métabolisme de l'azote et sa régulation comme *glnB* (protéine P_{II}), *prp1-2* (protéases dégradant les inhibiteurs de la GS) ou *dapA* (synthèse de la lysine). De plus, plusieurs transcrits de l'opéron *hox* (*hoxFU-sll1222*), de son activateur transcriptionnel (*lexA*) et d'une chaperone de l'hydrogénase (*hypD*) sont plus abondants dans le mutant $\Delta cp12$. Le transcrit *petF* codant pour la ferrédoxine I, essentielle à la croissance en photoautotrophie et en mixotrophie [110], est également enrichi. Enfin, on note une accumulation des ARNm *ocp* (Orange Carotenoid Protein) impliquée dans la photoprotection [81]. On note également que de nombreux transcrits de transposases et de gènes de fonctions inconnues portés par les plasmides sont plus abondants par rapport à la WT.

Parmi les transcrits dont l'abondance diminue, on retrouve certains codant pour des enzymes du métabolisme du carbone comme *fda* (aldolase), *cpxE* (régénération du Ru5P) et *gpmB* (phosphoglycérate mutase). Des transcrits de gènes impliqués dans le métabolisme de l'azote sont également moins représentés comme *ureG* (chaperone à nickel de l'uréase, dont l'abondance était déjà diminuée dans ce mutant en conditions standards) ou encore *gifB* (inhibiteur de la GS). De plus, différents transporteurs d'électrons de la chaîne photosynthétique comme *petJ* (cytochrome *c*₅₅₃, un homologue de la plastocyanine mais dépourvu de cuivre), *petA* (cyt f) ou *petB* (cyt b₆) sont plus faiblement exprimés. Une large majorité de ces gènes réprimés est liée à la synthèse de phycocyanine (*cpcC₁C₂G₁G₂T*), d'allophycocyanine (*apcABCEF*), de chlorophylle (*hemABEFLN₁*, *por*, *ho1* et *chlA_{II}LN*) et à l'assemblage des photosystèmes I (*rubA*) et II (*psbBCDMONVZ* et *psb29*).

Gene ID	Name	Function	FC (log ₂)
ssl3364	cp12	CP12 polypeptide	-5.64
sll0643	ureG	urease accessory protein G	-2.72
sll1471	cpcG	phycobilisome rod-core linker polypeptide	-2.22
sll1515	gifB	glutamine synthetase inactivating factor IF17	-2.10
slr0875	mscL	large-conductance mechanosensitive channel	-1.70
slr0536	hemE	uroporphyrinogen decarboxylase	-1.65
slr1808	hemA	transfer RNA-Gln reductase	-1.60
sll1185	hemF	coproporphyrinogen III oxidase, aerobic (oxygen-dependent)	-1.58
slr0506	por	light-dependent NADPH- protochlorophyllide oxidoreductase	-1.57
sll1009	frpC	unknown protein	-1.57
slr1649	cpcT	hypothetical protein	-1.51
ncRNA063			-1.43
sll1796	petJ	cytochrome c553	-1.41
slr1761	ytfC	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, periplasmic protein	-1.35
slr0906	psbB	photosystem II core light harvesting protein	-1.35
slr0335	apcE	phycobilisome core-membrane linker polypeptide	-1.30
sll0427	psbO	photosystem II manganese-stabilizing polypeptide	-1.30
sll0834	bicA	low affinity sulfate transporter	-1.29
sll1491		periplasmic WD-repeat protein	-1.25
slr0749	chlL	light-independent protochlorophyllide reductase iron protein subunit ChlL	-1.25
slr1322		putative modulator of DNA gyrase; TldD	-1.23
sll1579	cpcC	phycobilisome rod linker polypeptide	-1.23
slr1350	desA	acyl-lipid desaturase (delta 12)	-1.20
slr1459	apcF	phycobilisome core component	-1.20
sll0262	desD	acyl-lipid desaturase (delta 6)	-1.15
slr0750	chIN	light-independent protochlorophyllide reductase subunit ChIN	-1.13
sll0258	psbV	cytochrome c550	-1.12
sll1317	petA	apocytocrome f, component of cytochrome b6/f complex	-1.10
sll0222	phoA	putative purple acid phosphatase	-1.10
ssr3383	apcC	phycobilisome small core linker polypeptide	-1.08
sll1184	ho1	heme oxygenase	-1.03
sll0849	psbD	photosystem II reaction center D2 protein	-1.03
sll1414	psb29	hypothetical protein	-1.02
slr2017	pilA11	type 4 pilin-like protein, essential for motility	-1.02
slr1604	ftsH	cell division protein FtsH	-1.00
slr0342	petB	cytochrome b6	-1.00
sll0851	psbC	photosystem II CP43 protein	-1.00

Gene ID	Name	Function	FC (log ₂)
sll1282	ribH	riboflavin synthase beta subunit	-0.99
sll1621	aphC	AhpC/TSA family protein	-0.97
slr1471	synyidC	hypothetical protein	-0.97
sll1635	dgt	Thy1 protein homolog	-0.96
sll1874	chlAII	hypothetical protein	-0.96
sll1807	rpl24	50S ribosomal protein L24	-0.96
sll1803	rpl22	50S ribosomal protein L22	-0.96
slr8015	parA	plasmid partitioning protein, ParA family	-0.96
sll1809	rps8	30S ribosomal protein S8	-0.95
sll1281	psbZ	photosystem II PsbZ protein	-0.95
sll1473	ccaS	a part of phytochrome-like sensor histidine kinase gene (disrupted by insertion of IS)	-0.95
slr0943	fda	fructose-bisphosphate aldolase, class I	-0.95
sll1994	hemB	porphobilinogen synthase (5-aminolevulinate dehydratase)	-0.95
sll1808	rpl5	50S ribosomal protein L5	-0.94
sll1580	cpcC	phycobilisome rod linker polypeptide	-0.94
slr2051	cpcG	phycobilisome rod-core linker polypeptide	-0.94
sll1679	hhoA	periplasmic protease HhoA	-0.93
sll1599	mntA	manganese transport system ATP-binding protein MntA	-0.93*
sll8006		type I restriction-modification system, S subunit	-0.93
slr2033	rubA	membrane-associated rubredoxin, essential for photosystem I assembly	-0.92
sll1737	ycf60	hypothetical protein YCF60	-0.92
slr2006	mrpC	hypothetical protein	-0.91
sll1876	hemN1	coproporphyrinogen III oxidase, anaerobic (oxygen-independent)	-0.90
slr1986	apcB	allophycocyanin beta subunit	-0.90
slr2016	pilA10	type 4 pilin-like protein, essential for motility	-0.89
smr0009	psbN	photosystem II PsbN protein	-0.89
slr2067	apcA	allophycocyanin alpha subunit	-0.88*
sml0003	psbM	photosystem II reaction center M protein	-0.88
sll0017	hemL	glutamate-1-semialdehyde aminomutase	-0.88
sll0807	cfxE	pentose-5-phosphate-3-epimerase	-0.86
sll1806	rpl14	50S ribosomal protein L14	-0.86
slr1124	gpmB	phosphoglycerate mutase	-0.86

Figure 42: List of the 69 annotated transcripts with decreased abundance under mixotrophy in the $\Delta cp12$ mutant.

WT and $\Delta cp12$ cells were cultivated 24 hrs in mixotrophy (glucose 55 mM, 1000 luxes). Fold-change values (FC) are displayed as log₂ ratios ($p < 0,01$, $N = 2$). Asterix indicate genes with p -values $< 0,05$. Genes with FC values below -1 are displayed in the left table while those slightly above the threshold are listed in the right table. Asterix indicate genes with p -values $< 0,05$.

Au premier abord, cette réponse transcriptionnelle peut paraître contradictoire. En effet pour une fonction donnée (*i.e* le métabolisme du carbone, de l'azote et le transport d'électrons) certains transcrits sont enrichis tandis que d'autres sont moins abondants. Cependant, l'analyse approfondie de ces résultats révèlent une réponse très structurée.

La réponse génique au niveau du métabolisme des sucres traduit un remodelage des voies favorisant la dégradation des hexoses phosphate par la voie des pentoses phosphate puis leur entrée dans le cycle de Calvin via PRK, qui n'est plus régulée en absence de CP12. En dépit de la diminution de certains transcrits des enzymes de la glycolyse (*gpmB*), la forte abondance de *gap1* et la diminution de celle de l'aldolase et de la ribulose-5-phosphate isomérase (*cfxE*, régénération du Ru5P) suggèrent que les trioses sont préférentiellement dégradés en pyruvate, puis stockés sous forme de PHB pour compenser la dérégulation de Gap2. Le pyruvate est également le précurseur métabolique du cycle de Krebs et de la respiration mais l'augmentation de l'expression de ces gènes n'est pas significative. Néanmoins, la surexpression de l'opéron *hox* ainsi que de *hypD* questionne les relations évoquées entre hydrogénase et chaîne respiratoire dans l'introduction.

Au niveau du métabolisme de l'azote, la réponse du mutant $\Delta cp12$ comprend une diminution des transcrits codant pour les peptides inhibiteurs de la GS au niveau transcriptionnel (*gifB*) et post-traductionnel (protéolyse de GifA par Prp1 et Prp2 [277]). On note à nouveau un enrichissement du transcrit d'une protéase (*nblA*) nécessaire à la dégradation des phycobilisomes lors d'une carence d'azote. Celle-ci est corrélée à une induction du gène codant pour la protéine P_{II} (*glnB*), le régulateur global de la balance C/N. Plus largement, les gènes des voies de biosynthèse des pigments et des composants de la chaîne photosynthétique sont réprimés et suggèrent un arrêt de la photosynthèse dans la souche $\Delta cp12$.

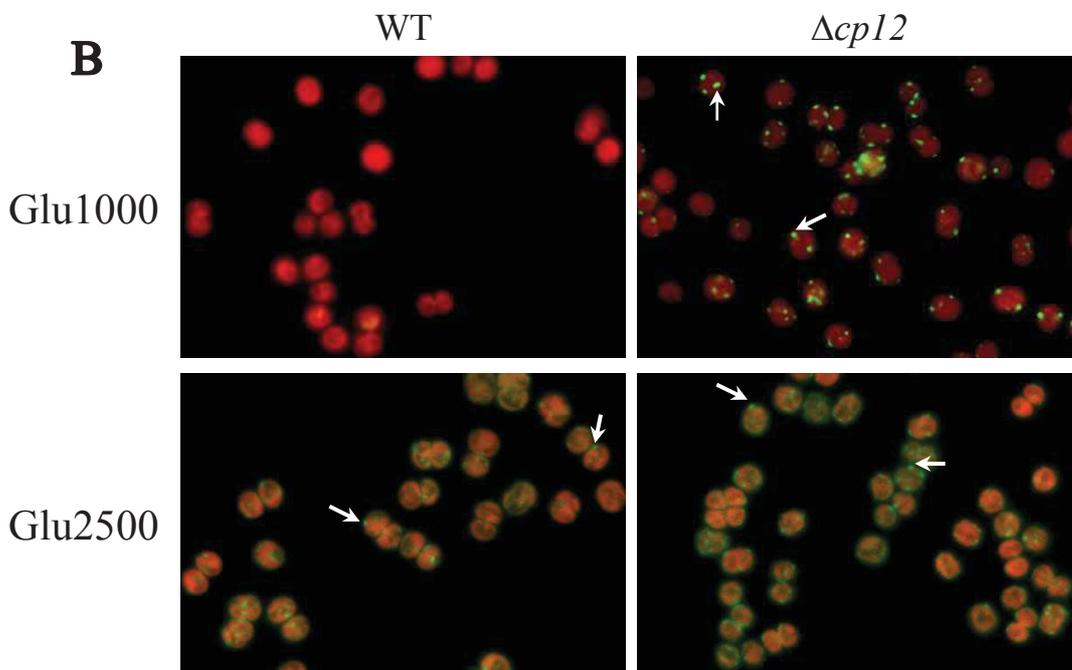
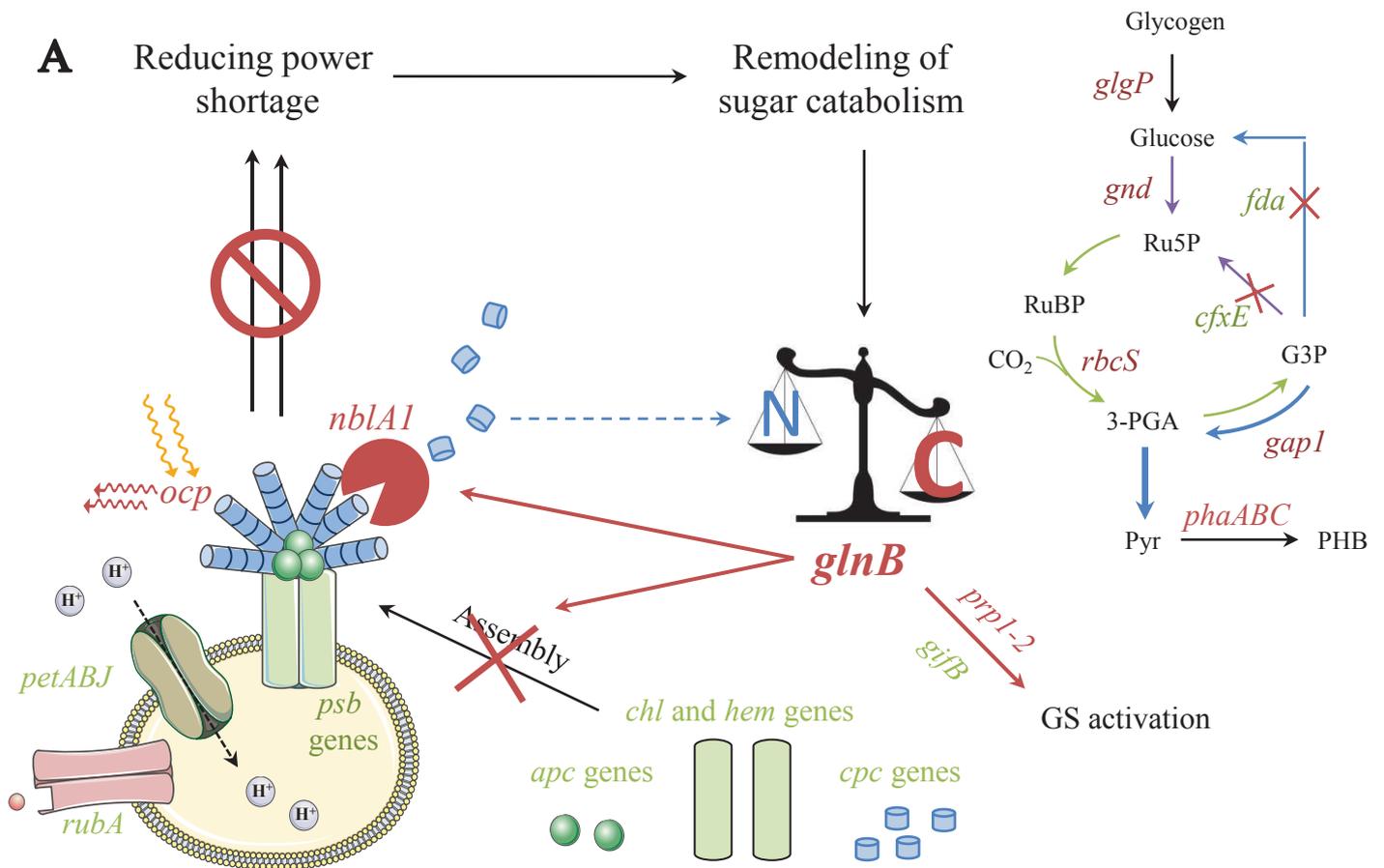


Figure 43: Transcriptomic response and Nile Red staining of intracellular PHB granules in WT and $\Delta cp12$ strains during mixotrophic growth.

- A. Schematic representation of the early (24 hrs) transcriptomic response in the $\Delta cp12$ strain during mixotrophic growth. *prp* = processing proteases; *gjfB* = Glutamine synthase (GS) inactivating factor B; *apc* = allophycocyanin; *cpc* = C-phycocyanin.
- B. Cells were cultivated for 24 hrs in mixotrophic conditions under low (1000 luxes; Glu1000) or standard (2500 luxes; Glu2500) light. PHB granules (white arrows) appear as green dots while red fluorescence is emitted by chlorophyll.

Ce constat est contre-intuitif car la croissance du mutant est limitée par le rendement photosynthétique mais il explique pourtant pourquoi celle-ci cesse de manière précoce (Figure 43-A). En effet, si le mutant accélère ses voies cataboliques pour générer du pouvoir réducteur et de l'ATP, il favorise l'accumulation de métabolites carbonés et notamment d' α -KG. Celui-ci va alors déclencher la cascade de régulation médiée par P_{II} et l'activation des effecteurs de la carence d'azote. Or cette réponse induit une dégradation des antennes photosynthétiques et limite la synthèse des pigments ainsi que l'assemblage *de novo* des photosystèmes. Cette réponse est donc une impasse physiologique qui accentue le déficit en pouvoir réducteur faute de préserver l'intégrité de la chaîne photosynthétique.

Les granules intracellulaires de PHB sont considérés comme étant des marqueurs de la carence d'azote [278] qui peuvent être aisément mis en évidence à l'aide de Nile Red, un fluorophore lipophile. Ce marquage révèle que dans ces mêmes conditions et contrairement à la WT, le mutant $\Delta cp12$ produit des PHB et répond donc à un déséquilibre C/N (Figure 43-B). Lorsque la croissance est restaurée à 2500 lux, les deux souches en produisent un peu et de manière comparable.

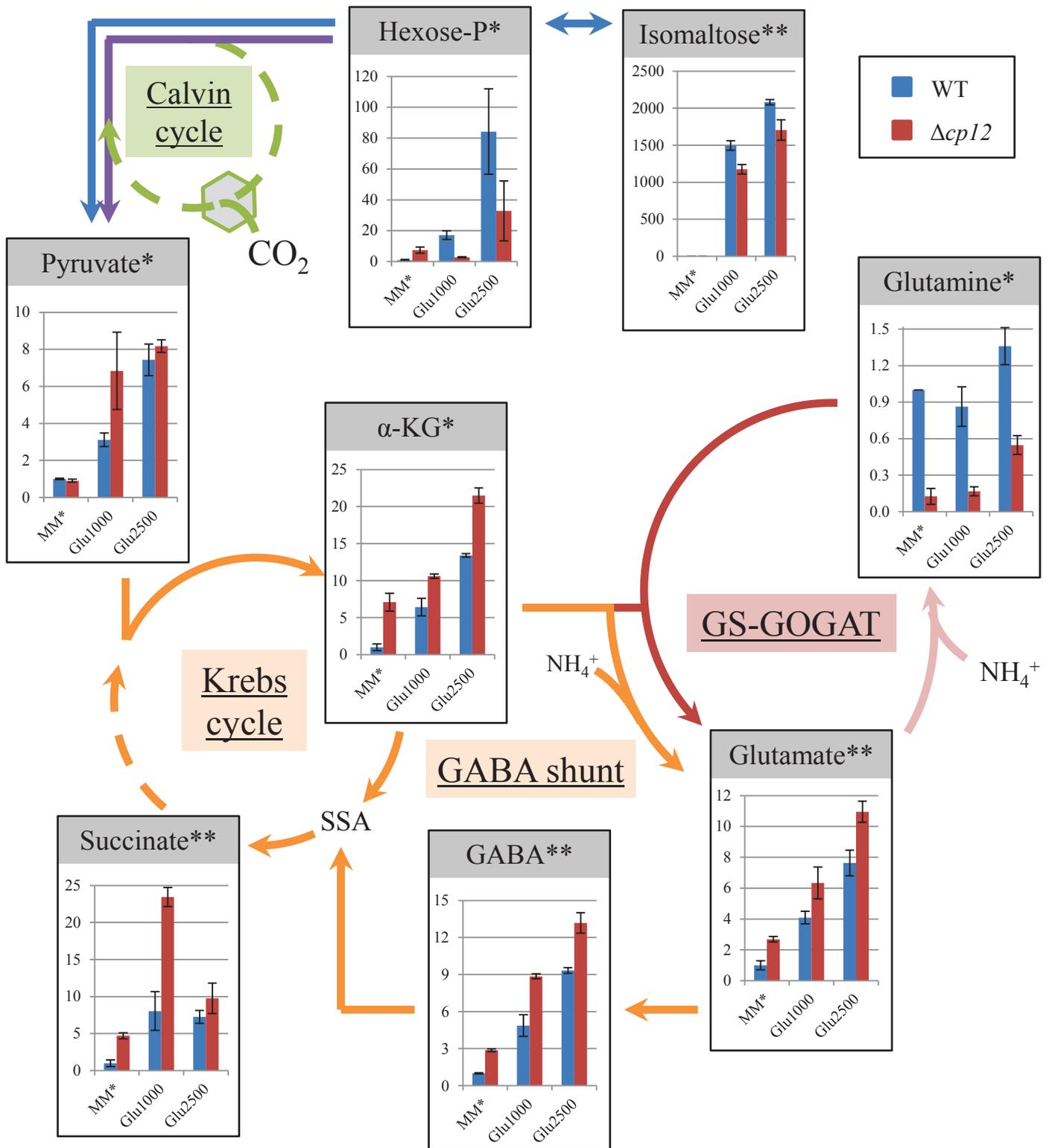


Figure 44: Metabolomic analysis of the main pathways of carbon metabolism in the WT and $\Delta cp12$ mutant grown in mixotrophy with different light intensities

Cells were cultivated for 24 hrs in standard conditions (MM*, 2500 lux) or in mixotrophic conditions by adding 55 mM glucose under low (1000 luxes; Glu1000) or standard (2500 luxes; Glu2500) light. Quantities are displayed relative to the WT strain in standard conditions (set to 1) and were calculated after normalization of peaks areas to the cell number. Error bars represent the mean SD for all samples (N = 2). All metabolites presented passed either one (*) or both (**) statistical analyses between ANOVA and the Kruskal-Wallis test with $p < 0.05$.

Hexose-P = Hexoses phosphate (pool of glucose-1-phosphate, fructose-1/6-phosphate, mannose-1/6-phosphate and galactose-1-phosphate); α -KG = α -ketoglutarate; GABA = γ -aminobutyrate; SSA = Succinate semialdehyde

D. Analyse métabolomique

Enfin grâce à nos collaborateurs, j'ai réalisé une analyse métabolomique des souches WT et $\Delta cp12$ en mixotrophie lorsque l'intensité lumineuse est faible (1000 lux ; Glu1000) et lorsqu'elle restaure la croissance du mutant (2500 lux; Glu2500). Cette démarche nous permet notamment de déterminer quelle est l'empreinte métabolique du paradoxe transcriptionnel observé mais également d'identifier la compensation métabolique induite à 2500 lux (toutes les valeurs sont exprimées par rapport à la WT en conditions standards).

L'image ainsi obtenue du métabolisme du carbone confirme plusieurs éléments issus du transcriptome (Figure 44). Tout d'abord dans le mutant $\Delta cp12$, les hexoses phosphates sont peu abondants à 1000 lux (x3) par rapport à la WT (x17) mais s'accumulent fortement dans les deux souches à 2500 lux (x33 et x84 respectivement). Ces différences se répercutent de manière similaire sur le contenu en pyruvate et en isomaltose (produit par la dégradation du glycogène) à la seule différence qu'à 1000 lux, le pyruvate est largement plus abondant dans le mutant comparé à la WT (x7 contre x3). Bien que cet aperçu des voies cataboliques des sucres soit limité à ces trois métabolites, leurs abondances relatives confirment l'hypothèse formulée sur le remodelage des flux du carbone organique (accumulation de pyruvate) dans le mutant.

En revanche contrairement à l'analyse transcriptomique, cette approche décrit le devenir du pyruvate à 1000 lux dans le mutant $\Delta cp12$. Dans chaque souche (WT/ $\Delta cp12$), celui-ci est effectivement dirigé vers le cycle de Krebs et son shunt GABA comme en témoigne l'accumulation d' α -KG (x6/x11), de glutamate (x4/x6), de GABA (x5/x9) et particulièrement de succinate (x8/x23). Cette accumulation est encore plus importante à 2500 lux à l'exception du succinate dont la concentration n'est pas modifiée dans la WT et diminue dans le mutant (x10). Par ailleurs, les acides aminés dérivés du pyruvate comme l'alanine et l'isoleucine (représentée par le méthyl-oxovalérate, un intermédiaire de sa biosynthèse) sont enrichis dans le mutant et pourraient favoriser l'évacuation du pyruvate (Figure 45).

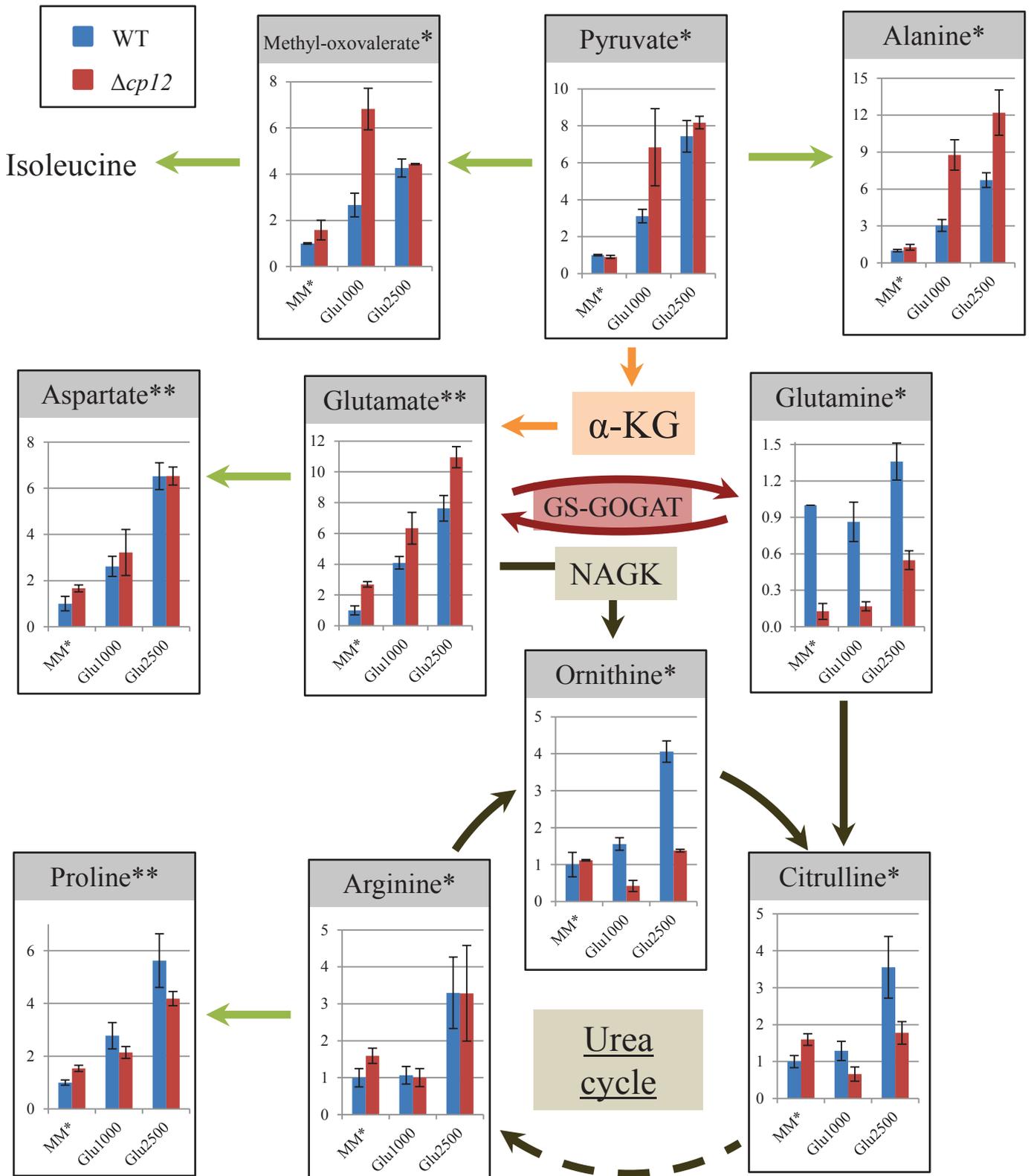


Figure 45: Metabolomic analysis of amino acids in the WT and $\Delta cp12$ mutant grown in mixotrophy with different light intensities

Cells were cultivated for 24 hrs in standard conditions (MM*, 2500 lux) or in mixotrophic conditions by adding 55 mM glucose under low (1000 luxes; Glu1000) or standard (2500 luxes; Glu2500) light. Quantities are displayed relative to the WT strain in standard conditions (set to 1) and were calculated after normalization of peaks areas to the cell number. Error bars represent the mean SD for all samples (N = 2). All metabolites presented passed either one (*) or both (**) statistical analyses between ANOVA and the Kruskal-Wallis test with $p < 0.05$.

Seul le contenu en glutamine est fortement (x0,17) ou modérément diminué (x0,55) dans la souche $\Delta cp12$ à 1000 et 2500 lux respectivement. Ce résultat est surprenant puisque les mécanismes d'inhibition de la GS sont supprimés au niveau transcriptionnel. Le déséquilibre entre α -KG, glutamine et glutamate déjà décelé en conditions standards subsiste donc en mixotrophie. L'exploration du métabolisme des acides aminés dans ces conditions révèle pourtant qu'il pourrait être à l'origine de la carence d'azote mise en évidence pour le mutant à 1000 lux (Figure 45). En effet la quantité d'ornithine, produite à partir de glutamate par la NAGK, diminue significativement dans le mutant (x0,4) et concorde avec une inhibition de l'enzyme par l' α -KG [279]. La citrulline (second métabolite du cycle de l'urée) est également affectée par cette diminution (x0,66). Celle-ci est synthétisée à partir de NH_4^+ ou de glutamine, peu abondante également. L'alimentation du cycle de l'urée en précurseurs est donc limitée dans le mutant $\Delta cp12$ en mixotrophie, particulièrement à 1000 lux, contrairement à ce qui a été décrit en conditions standards.

L'arginine (quatrième et dernier métabolite de ce cycle) est produite par condensation de l'argininosuccinate (non détecté) avec l'aspartate. La quantité de ces deux acides aminés (ainsi que de la proline, dérivée de l'arginine) varie entre WT et $\Delta cp12$ quelle que soit la lumière fournie en mixotrophie. Mais lors d'une carence d'azote, ces deux acides aminés sont produits par dégradation de la cyanophycine (un polymère d'aspartate et d'arginine), une réserve d'azote intracellulaire majeure. Celle-ci approvisionne alors le cycle de l'urée et permet de redistribuer l'azote au métabolisme via la production et l'hydrolyse de l'urée en ammonium. Pourtant le contenu en ornithine et en citrulline décroît à cause de l'inhibition de la NAGK et l'insuffisance de glutamine. Cette rupture provient donc de la production d'urée et de son recyclage par l'uréase, dont la chaperone UreG (essentielle à son activation) est fortement réprimée dans le mutant $\Delta cp12$. Si l'azote contenu dans l'urée ne peut être récupéré, sa perte doit être compensée par une plus grande assimilation de l'azote minéral (réduction du nitrate et assimilation du NH_4^+). Contrairement à l'uréase, ces réactions enzymatiques consomment du pouvoir réducteur qui est vraisemblablement épuisé par Gap2 en absence de CP12.

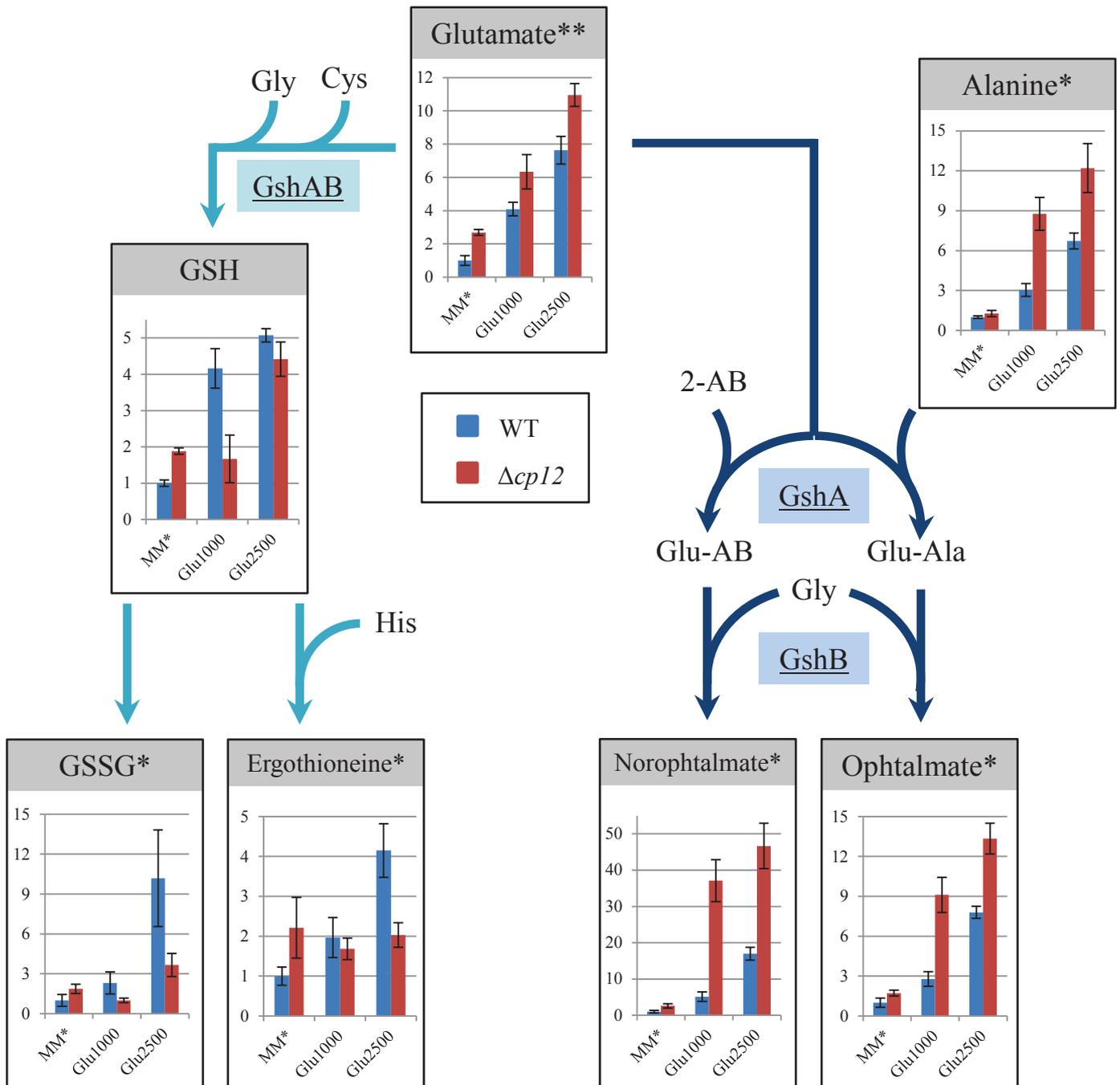


Figure 46: Metabolomic analysis of the glutathione pathway in the WT and $\Delta cp12$ mutant grown in mixotrophy with different light intensities

Cells were cultivated for 24 hrs in standard conditions (MM*, 2500 lux) or in mixotrophic conditions by adding 55 mM glucose under low (1000 luxes; Glu1000) or standard (2500 luxes; Glu2500) light. Quantities are displayed relative to the WT strain in standard conditions (set to 1) and were calculated after normalization of peaks areas to the cell number. Error bars represent the mean SD for all samples (N = 2). All metabolites presented passed either one (*) or both (**) statistical analyses between ANOVA and the Kruskal-Wallis test with $p < 0.05$. GSH was measured independently using the DTNB assay (see Material and Methods).

Gly = Glycine; Cys = Cysteine; GSH = Glutathione (reduced); GSSG = Glutathione (oxidized); His = Histidine; 2-AB = 2-aminobutyrate; GshA = glutamate cysteine ligase; GshB = glutathione synthase.

Ainsi à 1000 lux dans le mutant $\Delta cp12$, le cycle de l'urée fonctionne grâce à une réserve épuisable d'azote. Le possible défaut d'activité uréase empêche cependant de le redistribuer efficacement au métabolisme. En absence de CP12, ce déficit ne peut pas être compensé par la réduction du nitrate car le cycle de Calvin épuise l'ATP et/ou le pouvoir réducteur. Par conséquent, les enzymes assurant l'alimentation du cycle de l'urée sont inhibées par des effecteurs comme l' α -KG ou ne disposent pas de substrat en quantité suffisante (NH_4^+ , glutamine...).

Au contraire lorsque l'intensité lumineuse augmente, les cellules disposent de davantage d'électrons et d'énergie pour compenser en partie l'absence du recyclage de l'urée par la réduction du nitrate. En retour, elles restaurent partiellement la production de glutamine et l'alimentation du cycle de l'urée. Dans la WT cette augmentation de l'intensité lumineuse génère, à quelques exceptions près, une augmentation globale des flux métaboliques.

Cette différence de disponibilité du pouvoir réducteur se traduit également au niveau de la voie de biosynthèse du glutathion (GSH) et de ses dérivés (Figure 46). Le mutant $\Delta cp12$ possède notamment moins de métabolites antioxydants comme le GSH et l'ergothionéine [117] et semble donc subir moins de stress oxydant quelle que soit l'intensité lumineuse. En revanche dans ces conditions, il y a davantage d'ophtalmate (environ x40) et de norophtalmate (x10) dans le mutant $\Delta cp12$ en comparaison de la WT. Ces molécules sont des analogues non-rédox du glutathion dont la cystéine est remplacée soit par de l'alanine ou du 2-aminobutyrate mais sont produits par les mêmes enzymes (GshAB) lors de déplétion en cystéine. Leur fonction chez les cyanobactéries est inconnue [117] mais deux hypothèses sont actuellement avancées : soit elles jouent le rôle de molécule signal de la carence en soufre (et donc de stress oxydant) soit elles remplacent le GSH dans des fonctions inconnues ne nécessitant pas le groupement thiol de la cystéine.

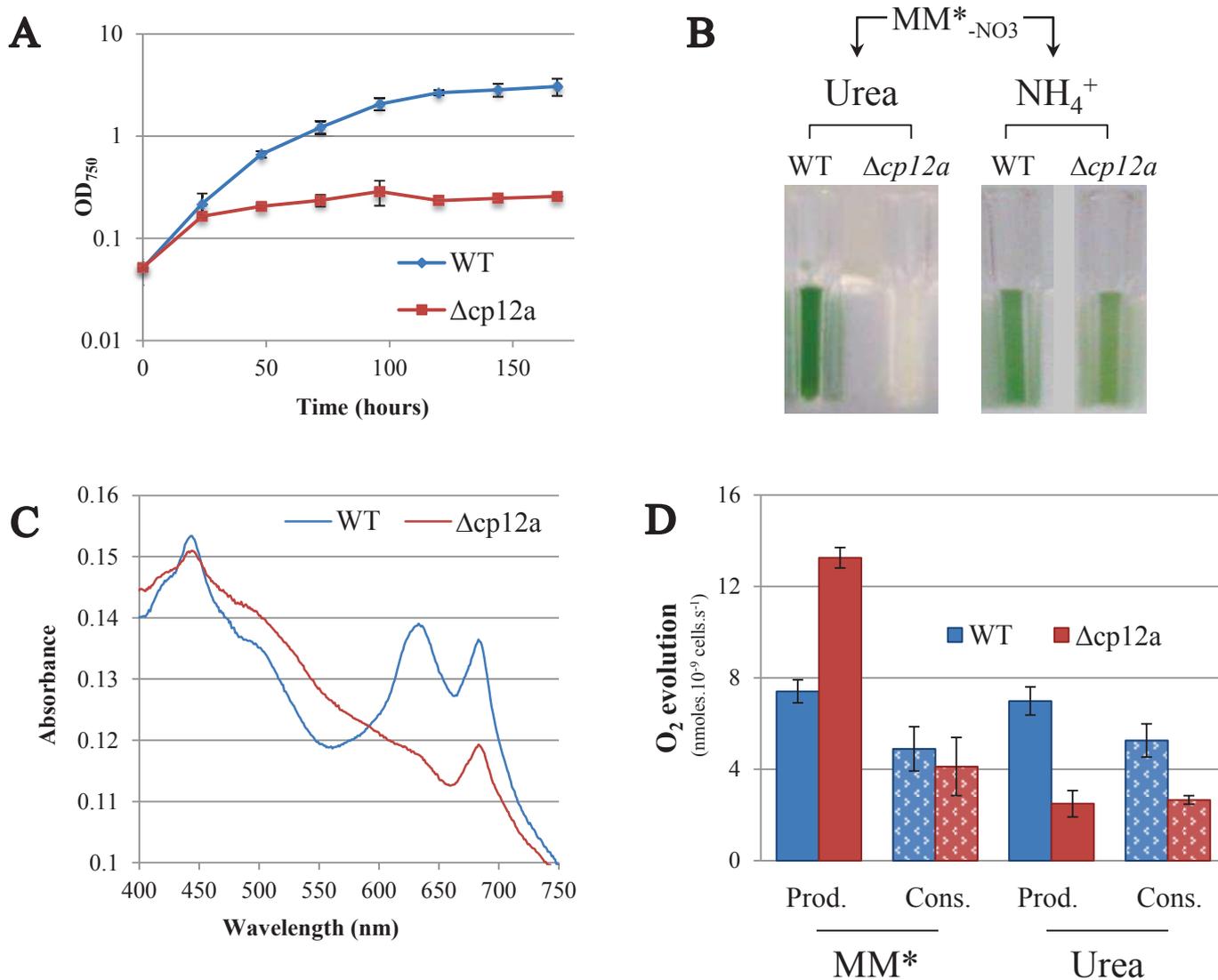


Figure 47: Analysis of WT and $\Delta cp12$ strains during growth on urea medium

- Growth curves of WT and $\Delta cp12$ strains grown in $MM^*_{-NO_3}$ medium supplemented with 5 mM urea and 1 μM Ni (urea medium; 2500 luxes). Error bars represent the mean SD for all samples ($N = 3-4$).
- Pictures of WT and $\Delta cp12$ cultures grown in $MM^*_{-NO_3}$ medium supplemented with either 5 mM urea and 1 μM Ni (left; 7 days) or 10 mM ammonium chloride alone (right; 4 days).
- Spectra analysis of cells grown during 48 hrs in urea medium. Each spectrum is the average of 2 replicates.
- Histograms showing O_2 -evolving capacities of WT and $\Delta cp12$ strains grown during 24 hrs in standard and urea media. Production was obtained under saturating light in the electrode chamber whereas consumption was obtained by incubation in the dark. Error bars represent the mean SD for all samples ($N \geq 2$)

Partie III

Apparition d'une mutation secondaire perturbant le métabolisme de l'urée dans le contexte génétique $\Delta cp12$

Synechocystis peut utiliser différentes sources d'azote et notamment l'urée. J'ai donc étudié le phénotype des différentes souches WT et *cp12* mutantes dans un milieu contenant de l'urée (5 mM) à la place du nitrate contenu dans le milieu conventionnel. L'urée peut être importée dans le cytoplasme par des transporteurs membranaires puis hydrolysé en NH_4^+ par l'uréase. L'uréase étant une enzyme à nickel (présent à l'état de traces dans le MM*), ce milieu a été systématiquement supplémenté avec 1 μM de nickel (NiSO_4).

Comme évoqué dans l'introduction, l'urée est aussi une source d'azote très intéressante pour les biotechnologies. D'une part, c'est un déchet important des activités humaines que l'on retrouve dans des eaux non-potables et utilisables pour la culture des cyanobactéries comme l'eau de mer. D'autre part, son hydrolyse ne consomme ni énergie, ni pouvoir réducteur qui peuvent donc être dirigés vers la synthèse d'un produit d'intérêt. Cette approche m'a ainsi permis de déterminer l'influence de ce substrat sur le métabolisme et la croissance de la WT.

Dans un souci de clarté, **le mutant $\Delta cp12$ étudié jusqu'ici sera désormais nommé $\Delta cp12a$** pour le distinguer du mutant $\Delta cp12$ -bis introduit dans cette partie.

A. Le mutant $\Delta cp12a$ n'est pas capable d'utiliser l'urée comme source d'azote

1. La croissance du mutant $\Delta cp12a$ en milieu urée mime une carence d'azote

A 2500 lux, lorsque le mutant $\Delta cp12a$ dispose uniquement d'urée comme source d'azote, sa croissance est fortement affectée par rapport à la WT (Figure 47-A). En effet, il cesse rapidement de se diviser et la culture atteint une densité optique maximale dix fois inférieure à la souche sauvage, qui elle est peu affectée par cette substitution de nutriment (temps de génération et densité cellulaire similaires aux conditions standards). Dans le mutant, ce défaut de croissance s'accompagne d'un jaunissement des cultures qui ne se produit pas lorsque le nitrate est remplacé par de l'ammonium (Figure 47-B). Il provient d'une forte baisse des pics d'absorbance de la chlorophylle et de la phycocyanine ainsi que

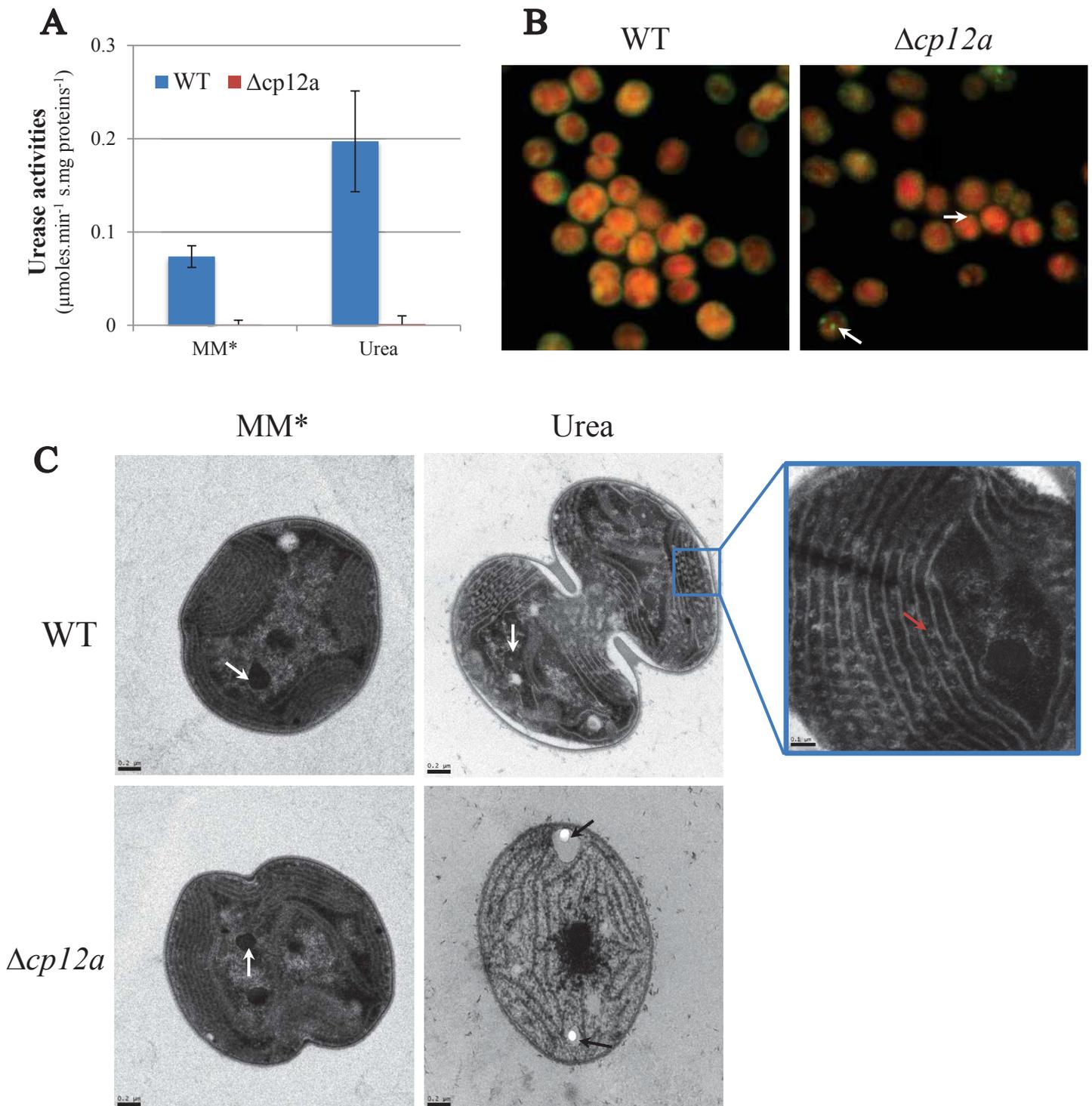


Figure 48: Investigation of urease activities in WT and $\Delta cp12$ strains and influence on cell morphology during growth with urea as the sole nitrogen source

- Urease activities of WT and $\Delta cp12$ strains grown in MM* or urea medium supplemented with 1 μM Ni. Error bars represent the mean SD for all samples ($N \geq 6$)
- Fluorescence imaging of intracellular PHB granules stained with Nile Red (white arrows). Cells were cultivated for 24 hrs on urea medium (+ 1 μM Ni). PHB granules appear as green dots while red fluorescence is emitted by chlorophyll.
- Electron micrographs of WT and $\Delta cp12$ strains grown in standard MM* or urea medium (+1 μM Ni) during 24 hrs. Electron-opaque bodies corresponding to carboxysomes and PHB granules are pointed by white and black arrows, respectively. The red arrow points toward unidentified structures located in WT thylakoid membranes during growth in urea medium.

d'une augmentation de l'absorbance des caroténoïdes (Figure 47-C). Cette perte des pigments photosynthétiques dans le mutant engendre une chute de 80% de la production d'oxygène alors qu'elle est inchangée dans la WT (Figure 47-D). Sa consommation diminue également de 35% en absence de CP12.

Ce phénotype suggère que contrairement à la WT, lorsque l'urée est l'unique source d'azote disponible, le mutant mobilise ses réserves d'azote (antennes photosynthétiques) de manière similaire à une réponse à la carence d'azote. Puisque l'ammonium est capable de soutenir la croissance de cette souche, les résultats indiquent que l'activité uréase pourrait être altérée dans le mutant.

J'ai donc mis au point un dosage colorimétrique de cette activité enzymatique basé sur la détection de l'ammonium par le réactif de Berthelot et inspiré d'un protocole existant chez *H. pylori* [280,281]. Cette méthode est adaptée pour les cyanobactéries et permet de mesurer spécifiquement l'activité uréase à partir d'extraits cellulaires totaux indépendamment des pigments et des activités libérant du NH_4^+ (absorbance parasite). Par ailleurs, il convient de noter que 90% de cette activité est perdue lorsque ces extraits sont centrifugés (14000rpm, 15min, 4°C). Ceci pourrait, en plus de la différence de méthode employée, expliquer pourquoi les activités mesurées dans ce travail sont bien supérieures à celles précédemment reportées chez *Synechocystis* [282].

Ce dosage a été appliqué à la WT et au mutant $\Delta cp12a$ cultivés en présence de nitrate (MM*) ou d'urée (Figure 48-A). Les résultats révèlent que l'activité uréase de la souche sauvage augmente fortement en présence d'urée (x2-3) alors qu'elle est indétectable dans le mutant $\Delta cp12a$ quelle que soit la source d'azote fournie. Celui-ci présente donc une perte totale et constitutive de sa capacité à hydrolyser l'urée. Le marquage au Nile Red après 24 heures de culture en milieu urée révèle la présence de granules de PHB dans la souche $\Delta cp12a$ qui sont absents dans la WT (Figure 48-B). Ceci confirme que le mutant subit une carence d'azote. Les observations en microscopie électronique, réalisées en collaboration avec Raul Gonzalez et Cheryl Kerfeld (Plant Research Laboratory, Michigan State University), illustrent également que dans ces conditions, les membranes photosynthétiques du mutant se désagrègent et qu'il possède des structures nucléées légèrement opaques aux électrons, fréquemment associées aux granules de PHB [283] (Figure 48-C). Par ailleurs en présence d'urée et spécifiquement dans la WT, des structures sphériques transparentes aux électrons de nature inconnue constellent le réseau membranaire photosynthétique des cellules (Figure 48-C, cadre bleu).

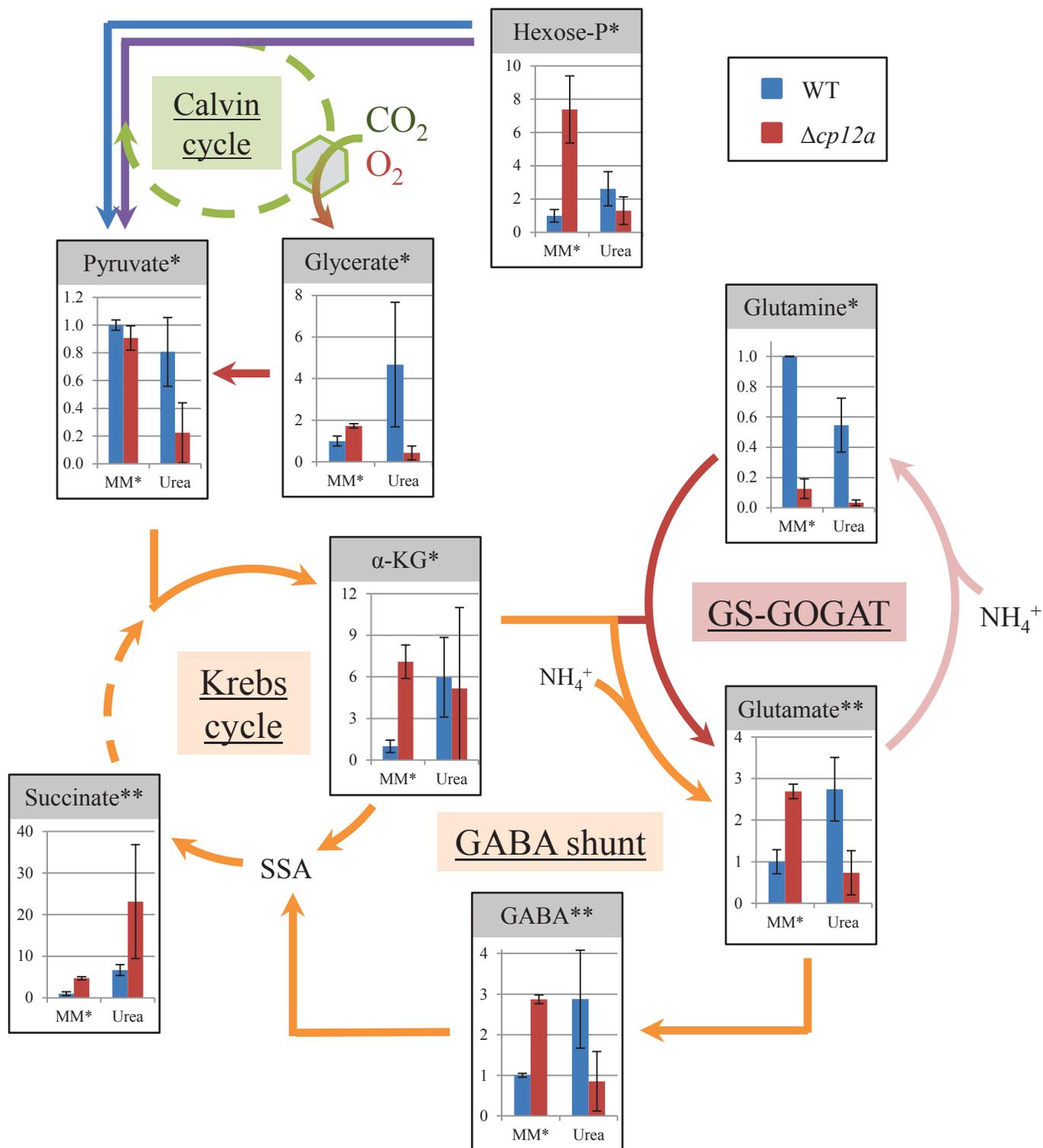


Figure 49: Metabolomic analysis of the main pathways of carbon metabolism in the WT and $\Delta cp12a$ mutant grown with urea as the sole N source

Cells were cultivated for 24 hrs in standard (MM*) or MM*_{-NO3} medium supplemented with 5 mM urea and 1 μ M Ni (Urea) under standard light (2500 luxes). Quantities are displayed relative to the WT strain in standard conditions (set to 1) and were calculated after normalization of peaks areas to the cell number. Error bars represent the mean SD for all samples (N = 2). All metabolites presented passed either one (*) or both (**) statistical analyses between ANOVA and the Kruskal-Wallis test with $p < 0.05$.

Hexose-P = Hexoses phosphate (pool of glucose-1-phosphate, fructose-1/6-phosphate, mannose-1/6-phosphate and galactose-1-phosphate); α -KG = α -ketoglutarate; GABA = γ -aminobutyrate; SSA = Succinate semialdehyde

Ainsi, mes résultats montrent que la perte de l'activité uréase dans le mutant $\Delta cp12a$ l'empêche de croître aux dépens de l'urée. Ce résultat était inattendu et suggère qu'il existe potentiellement une relation entre CP12 et l'uréase ou ses chaperones. On peut faire l'hypothèse qu'il s'agit d'une interaction protéine-protéine régulatrice permise par la flexibilité structurale de CP12 mais également d'une coopération sur la capture du nickel étant donné que CP12 présente une affinité pour certains métaux divalents, dont le nickel, chez *C. reinhardtii* [180,284].

2. Influence de l'urée comme source d'azote sur le métabolisme

Dans le but d'identifier la réponse métabolique de la WT lorsque le nitrate est remplacé par de l'urée mais également celle du mutant qui ne peut la métaboliser, j'ai répété notre approche métabolomique dans ces conditions (résultats exprimés par rapport au contenu mesuré dans la WT en MM* pour chaque métabolite). Les résultats obtenus pour la souche sauvage présentent globalement une plus grande variabilité entre les réplicats analysés. Elle pourrait provenir des agrégats habituellement présents les premiers jours de culture (WT uniquement) qui pourraient influencer le rendement de l'extraction au méthanol.

Concernant le métabolisme du carbone dans la WT, l'abondance des métabolites de la glycolyse varie peu (Figure 49) excepté une sensible augmentation pour les hexoses phosphates (x2,6). Le mutant $\Delta cp12a$ présente une diminution de son contenu en pyruvate (x0,2) et en glycérate (x0,43), un intermédiaire dans la détoxification du 2-PG (photorespiration). Les quantités des métabolites du cycle de Krebs (α -KG et succinate) augmentent dans la WT (x6 et x7 respectivement). Dans le mutant, le succinate présente aussi une forte hausse (x23) non corrélée à l' α -KG. Les composés du shunt GABA sont également plus abondants dans la WT (x3) alors qu'ils subissent une baisse légère dans le mutant (x0,8). Enfin, la glutamine est moins abondante dans les deux souches et est à peine détectable dans le mutant $\Delta cp12a$ (x0,5 et x0,03 respectivement).

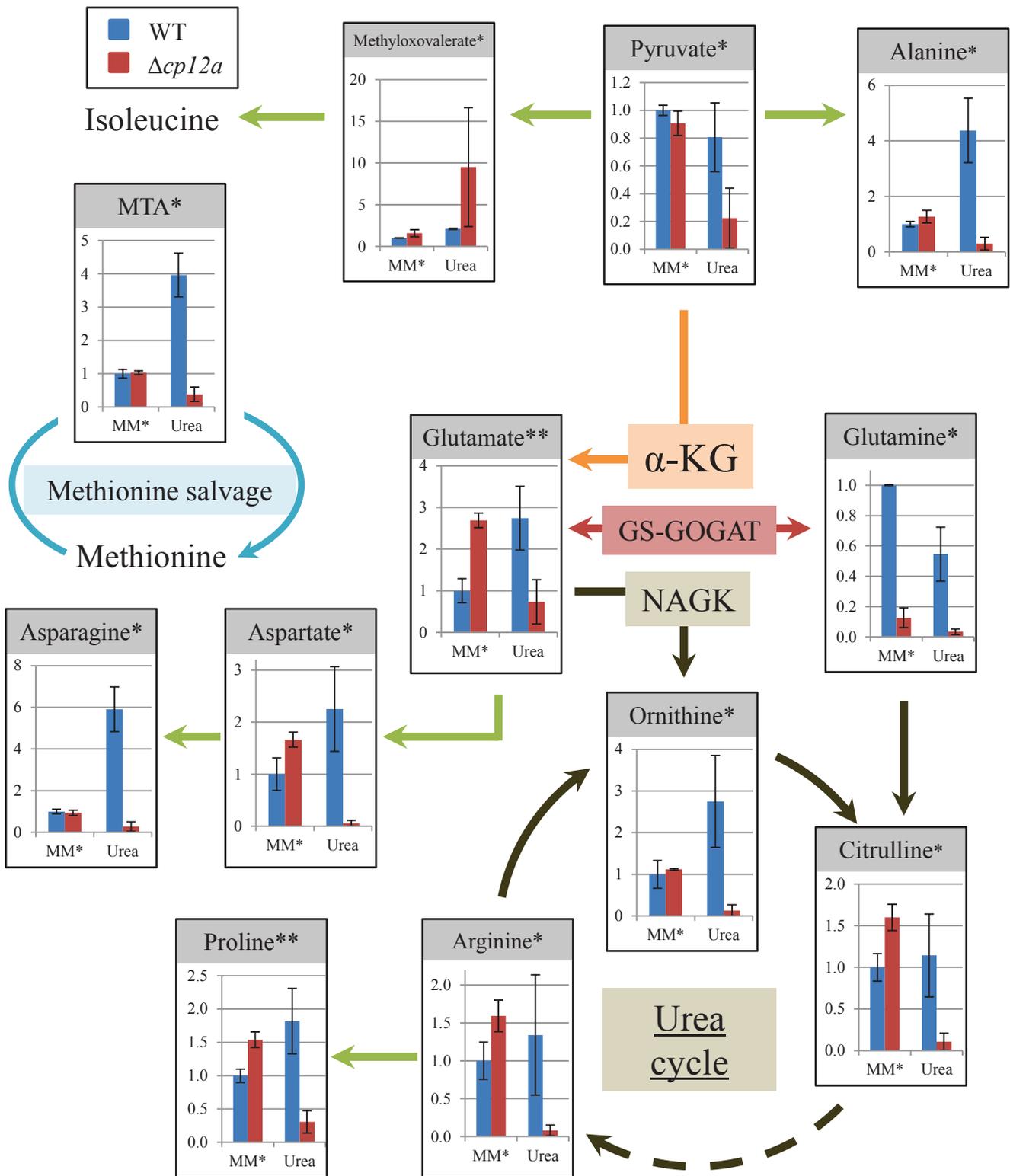


Figure 50: Metabolic analysis of amino acids in the WT and $\Delta cp12a$ mutant grown with urea as the sole N source

Cells were cultivated for 24 hrs in standard (MM*) or MM*_{-NO₃} medium supplemented with 5 mM urea and 1 μ M Ni (Urea) under standard light (2500 luxes). Quantities are displayed relative to the WT strain in standard conditions (set to 1) and were calculated after normalization of peaks areas to the cell number. Error bars represent the mean SD for all samples (N = 2). All metabolites presented passed either one (*) or both (**) statistical analyses between ANOVA and the Kruskal-Wallis test with $p < 0.05$.

Au niveau du métabolisme des acides aminés (Figure 50), la WT présente une augmentation de l'abondance de l'alanine (x4), l'aspartate (x2), l'asparagine (x6), l'ornithine (acide aminé du cycle de l'urée; x2,8) et du méthyl-oxovalérate (x2). Ce dernier est un intermédiaire carboné de la biosynthèse de l'isoleucine. De manière intrigante, on note également une forte augmentation de la MTA (x4, méthylthioadénosine) qui appartient à la voie du « methionine salvage » permettant de recycler le soufre du métabolisme des polyamines. Le mutant présente quant à lui une diminution drastique (x0,06 à maximum x0,3) de toutes les molécules détectées, excepté pour le méthyl-oxovalérate (x9,5; forte variabilité).

La voie de biosynthèse du glutathion est fortement dépendante de la disponibilité en acides aminés (Figure 51). Dans la souche sauvage, la quantité de GSSG ne varie pas significativement par rapport aux conditions standards mais on observe cependant une augmentation des molécules analogues ou dérivées du glutathion. Ainsi, la quantité d'ergothionéine (produite à partir de GSH et d'histidine) augmente d'un facteur 4 tandis que celle des analogues non-rédox du GSH (remplacement de la cystéine par l'alanine ou le 2-aminobutyrate) augmentent d'un facteur 4 (ophtalmate) et 9 (norophtalmate), respectivement. Dans le mutant $\Delta cp12a$ en revanche, la quantité de GSSG, d'ergothionéine et d'ophtalmate diminue grandement (entre x0,04 et x0,52).

Ces résultats montrent que lorsque l'urée est l'unique source d'azote, le métabolisme central de la souche sauvage ne subit pas de modifications drastiques. Les principales variations sont liées aux quantités de glutamate et des molécules dont il est le précurseur (ornithine, aspartate, asparagine, ergothionéine, ophtalmate, norophtalmate). Dans la WT, la production d'ammonium sans coût énergétique semble stimuler la synthèse de cet acide aminé essentiel ainsi que de ces dérivés, incluant ceux du shunt GABA. De manière surprenante, elle ne s'accompagne pas d'une disparition des squelettes carbonés fournis par le cycle de Krebs. Il est donc possible que l'hydrolyse de l'urée, en produisant du CO_2 , favorise aussi l'activité carboxylase de la RuBisCO et donc la production de carbone organique. Malheureusement, le faible nombre de métabolites identifiés dans ces expériences ne permet pas de vérifier directement cette hypothèse.

Par contre dans le mutant $\Delta cp12a$, l'incapacité à métaboliser l'urée engendre un épuisement de ces métabolites azotés et une accumulation de leurs précurseurs comme le méthyl-oxovalérate (isoleucine). Enfin, le catabolisme du glucose favorise l'accumulation des intermédiaires du cycle de Krebs et particulièrement du succinate.

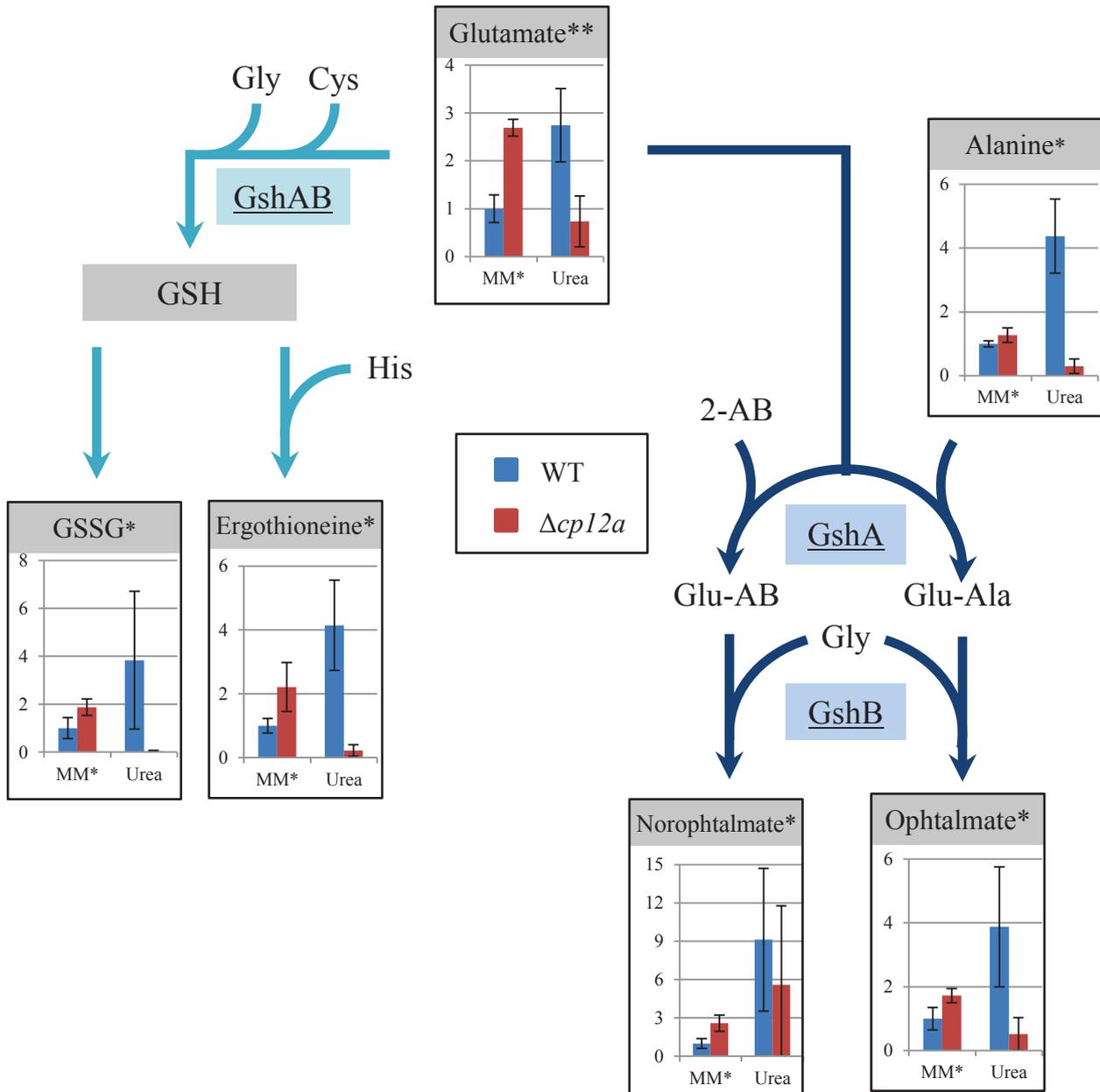


Figure 51: Metabolomic analysis of the glutathione pathway in the WT and $\Delta cp12a$ mutant grown with urea as the sole N source

Cells were cultivated for 24 hrs in standard (MM*) or MM*_{-NO₃} medium supplemented with 5 mM urea and 1 μ M Ni (Urea) under standard light (2500 luxes). Quantities are displayed relative to the WT strain in standard conditions (set to 1) and were calculated after normalization of peaks areas to the cell number. Error bars represent the mean SD for all samples (N = 2). All metabolites presented passed either one (*) or both (**) statistical analyses between ANOVA and the Kruskal-Wallis test with $p < 0.05$.

Gly = Glycine; Cys = Cysteine; GSH = Glutathione (reduced); GSSG = Glutathione (oxidized); His = Histidine; 2-AB = 2-aminobutyrate; GshA = glutamate cysteine ligase; GshB = glutathione synthase.

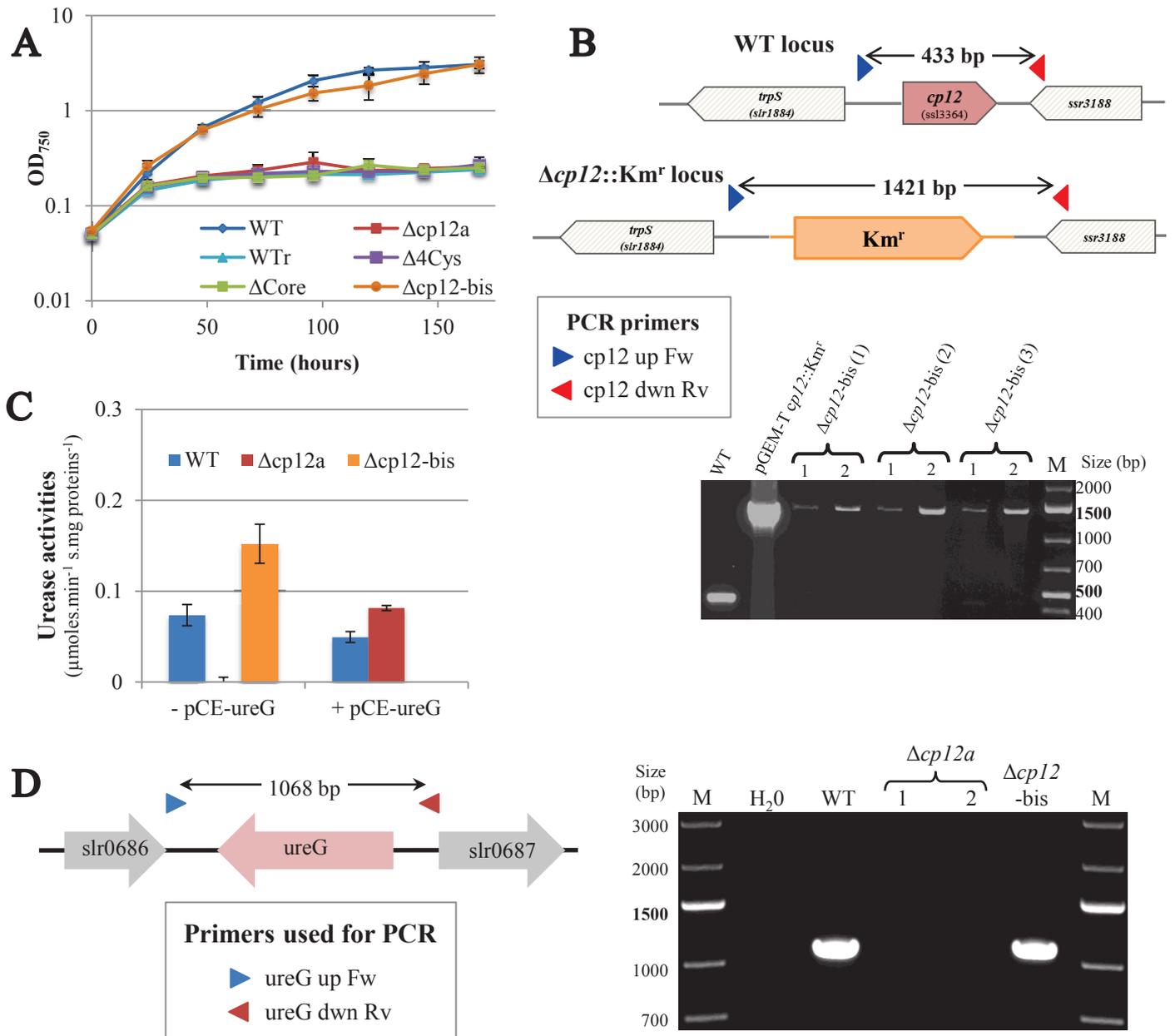


Figure 52: Growth analysis of the *cp12* sequence variants in urea medium and genetic study of *ureG* influence in urease-deficient mutants.

- Growth curves of WT, $\Delta cp12a$, WTr, $\Delta 4Cys$, $\Delta Core$ and $\Delta cp12$ -bis strains grown in $MM^*_{-NO_3}$ medium supplemented with 5 mM urea and 1 μM Ni (urea medium; 2500 luxes). Error bars represent the mean SD for all samples (N = 3-4).
- Representation and PCR analysis of the *cp12* gene locus in *Synechocystis* WT and $\Delta cp12$ -bis strains (same as in Figure 38).
- Urease activities of WT, $\Delta cp12a$, $\Delta cp12^2$ and ureG-overexpressing related strains in standard conditions. Error bars represent the mean SD of all samples (N = 2-4).
- Representation of the *ureG* genomic locus in *Synechocystis* and UV-light image of the agarose gel showing the 1.07 kb PCR product resulting from amplification of the *ureG* region. Genes are represented by arrows pointing in their transcription direction. Forward and reverse primers used to verify the size and sequence of the *ureG* promoter and coding sequence are displayed as blue and red arrows, respectively. Resulting PCR product is depicted by a double arrow with its expected sizes in WT cells shown in the middle.

3. Le défaut de croissance du mutant $\Delta cp12a$ en urée est dû à une mutation secondaire dans son génome

Pour déterminer l'implication des motifs conservés de CP12 dans le maintien de l'activité uréase, les mutants ponctuels construits ont été cultivés dans le milieu urée conçu (Figure 52-A). Mes résultats indiquent que la croissance cesse rapidement dans toutes les souches issues du mutant $\Delta cp12a$, y compris la WT reconstituée où le gène *cp12* sauvage a été réintroduit. Cet arrêt de la croissance est associé au même phénomène de dépigmentation décrit dans ce milieu pour le mutant $\Delta cp12a$. Cette répétition du phénotype, notamment sur la WTr (absence de complément fonctionnelle), suggère qu'il existe une altération acquise dans le mutant de délétion initial. Les mutants ponctuels issus de cette souche $\Delta cp12a$ portent donc probablement cette modification. Pour déterminer si l'apparition de cette mutation secondaire a été sélectionnée pour compenser l'absence de CP12 ou si elle est fortuite, j'ai réalisé une nouvelle transformation avec la cassette de délétion du gène *cp12*. Un second mutant $\Delta cp12$ a ainsi été généré à partir de la WT ($\Delta cp12$ -bis) jusqu'à obtenir à nouveau une ségrégation complète de la mutation sur 3 clones indépendants (Figure 52-B). L'analyse de sa croissance en milieu urée révèle que contrairement à son homologue $\Delta cp12a$ initialement analysé, il peut croître aux dépens de l'urée de manière identique à la WT (Figure 52-A).

Ceci confirme que la perte d'activité uréase dans le mutant $\Delta cp12a$ est issue d'un évènement génétique secondaire. Les deux transcriptomes réalisés ont montré une diminution de la quantité du transcrit *ureG* (chaperone à nickel de l'uréase) dans le mutant $\Delta cp12a$ par rapport à la WT (Figures 34 et 42). Il est donc probable que la perte d'activité uréase soit due à l'absence de cette chaperone essentielle à son assemblage. Pour le vérifier, j'ai construit des mutants de pseudo-complémentation en clonant le gène *ureG* sauvage sous contrôle du promoteur p_R dans le vecteur d'expression constitutive (pCE-*ureG*, voir Article-Figure S6 et Tableau 7). Ce plasmide a été introduit par conjugaison dans les souches WT et $\Delta cp12a$ pour générer les mutants CE-*ureG* et $\Delta cp12$ CE-*ureG*, respectivement.

L'activité uréase dans ces deux nouveaux mutants cultivés en conditions standard (MM*; nitrate) a ensuite été quantifiée (Figure 52-C). Ces mesures montrent tout d'abord que le mutant $\Delta cp12$ -bis est capable d'hydrolyser l'urée et renforcent l'hypothèse d'un défaut d'assemblage de l'uréase dans le mutant $\Delta cp12a$. Paradoxalement dans la nouvelle souche $\Delta cp12$ -bis, l'activité uréase est multipliée par deux en comparaison de la WT. Lorsque le gène *ureG* est exprimé à partir du promoteur p_R fort et constitutif (pCE-*ureG*), on observe une

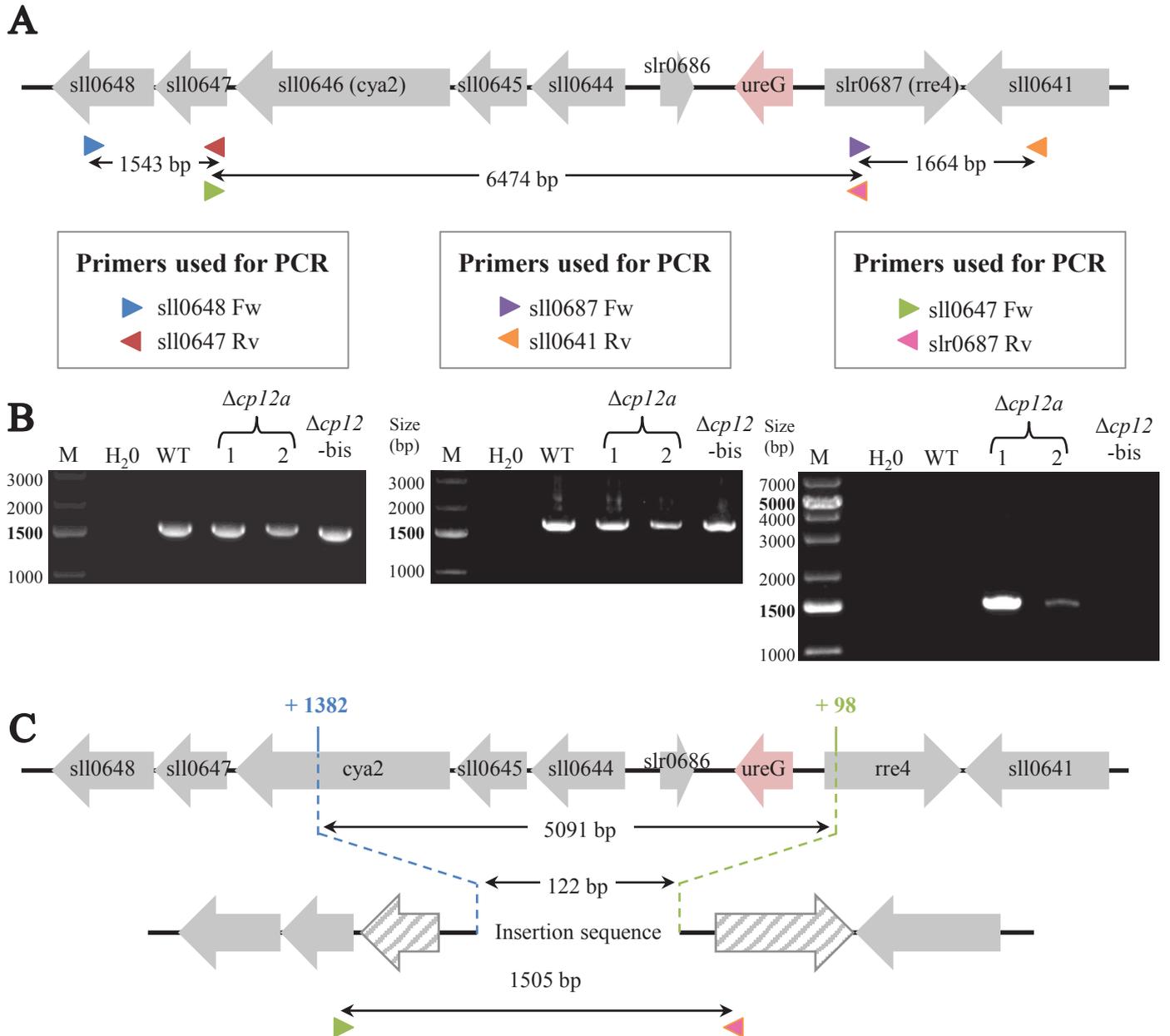


Figure 53: Analysis of *ureG* genomic locus in WT and $\Delta cp12a$ strains.

- A. Representation of the *ureG* genomic locus in *Synechocystis*. Genes are represented by arrows pointing in their transcription direction. Forward and reverse primers used to verify the size of different genomic regions are displayed as blue + red, green + pink and purple + orange arrows, respectively. Resulting PCR products are displayed by double arrows with their expected sizes in WT cells shown in the middle.
- B. UV-light images of the agarose gels showing the 1.54 kb (left) and 1.66 kb (middle) PCR products resulting from amplification of either upstream or downstream *ureG* region. The right panel corresponds to PCR products obtained after amplification of the region between these fragments. Size marker (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); lanes H₂O and WT correspond to positive controls (no matrix and size product control respectively). For the $\Delta cp12a$ strain, two independent clones (named 1 and 2 respectively) as well as one clone generated after a second WT cells transformation were analyzed.
- C. Representation of the *ureG* genomic locus in WT (top) and $\Delta cp12a$ (bottom) strains. Truncated ORFs are displayed as hatched arrows in the mutant whereas positions of the deletion in WT cells (relative to each ATG codon) are displayed in blue (upstream; sll0646) and green (downstream; slr0687). Forward and reverse primers yielding the 1.5 kb PCR product in the $\Delta cp12a$ mutant (C, right panel) are represented by green and pink arrows with its corresponding size in the middle.

baisse d'environ 30% de l'activité dans la souche sauvage mais une augmentation de celle du mutant $\Delta cp12a$ à un niveau comparable à la WT.

Cette restauration de l'activité uréase suggère que la protéine UreG ou son expression est modifiée dans le mutant $\Delta cp12a$ initialement étudié. Afin de mettre en évidence des mutations ou des remaniements (présence d'IS, délétion...) dans la séquence codante ou le promoteur du gène *ureG*, une PCR a été réalisée sur de l'ADN génomique de la souche sauvage et des deux mutants $\Delta cp12$ en utilisant des amorces amplifiant la séquence codante ainsi qu'environ 220 pb de part et d'autre du gène (Figure 52-D et Tableau 8). Des produits PCR de taille attendue (dont la séquence a été vérifiée) sont obtenus pour les souches WT et $\Delta cp12$ -bis. En revanche, aucune amplification n'est obtenue en présence d'ADNg du mutant $\Delta cp12a$ malgré plusieurs tentatives et l'étude de deux clones de transformation indépendants. Cette absence d'amplification et a priori d'hybridation de nos amorces suggère que le gène *ureG* et/ou la région adjacente pourraient être délétés ou remaniés. De manière surprenante, ce remaniement chromosomique est présent sur toutes les copies du chromosome car aucune copie sauvage n'est amplifiée. Il s'est donc propagé jusqu'à éliminer l'ensemble des copies de chromosomes $\Delta cp12$ dans deux clones $\Delta cp12a$ indépendants et sans pression sélective (clones obtenus et maintenus dans du milieu MM* avec nitrate). Ceci suggère qu'il n'est pas apparu de manière fortuite lors des premières transformations mais son origine reste inconnue.

Une analyse approfondie de ce locus a été menée pour identifier précisément la nature et l'étendue de ce remaniement (Figure 53-A). J'ai employé une approche de « marche sur le chromosome » à l'aide de différents couples d'amorces pour situer, en amont et en aval, les régions génomiques intactes les plus proches dans le mutant $\Delta cp12a$ (Tableau 7). Celles-ci sont localisées au niveau du gène *sll0647* et *slr0687* (Figure 53-B). Nous avons alors réalisé une nouvelle PCR à l'aide des équivalents antiparallèles des amorces internes (*sll0647* Fw et *slr0687* Rv) pour déterminer la séquence et le contenu en gènes du locus remanié (Figure 53-C). Aucune amplification n'est obtenue en utilisant l'ADN de la WT probablement à cause des conditions PCR choisies et la taille de cette région (plus de 6 kb). En revanche à partir d'ADNg du mutant $\Delta cp12a$, on obtient un fragment d'environ 1,5 kb. L'analyse de sa séquence révèle qu'un large fragment du locus WT (≈ 5 kb) est absent dans le mutant $\Delta cp12a$. Cette région inclut les gènes *sll0645*, *sll0644*, *slr0686* et *sll0643* (*ureG*) et une délétion partielle des gènes *sll0646* en amont (*cya2*) et *slr0687* (*rre4*) en aval comprenant leur codon d'initiation. Le gène *cya2* code pour une guanylate cyclase produisant du GMP cyclique (GMPc) à partir de GTP tandis que *rre4* code pour un système à deux composants

dont le rôle n'est pas connu [285]. Dans le mutant, l'intégralité de ce fragment est remplacée par une courte séquence de 122 pb homologue à une séquence d'insertion (IS). Ce remaniement secondaire est survenu très tôt car il est présent dans les premiers stocks de cellules *Δcp12a* congelées immédiatement après confirmation par PCR de la ségrégation des mutants et n'est pas présent dans la souche sauvage utilisée à ce moment-là.

Les IS sont des éléments génétiques mobiles pouvant induire des remaniements génomiques (insertion, inversion, délétion...). Elles sont classées en plusieurs familles et certaines codent pour des transposases fonctionnelles dont l'activité est déclenchée par une grande variété de facteurs biotiques et abiotiques (pour revue [286]). L'IS identifiée ici appartient à la famille des IS4 et présente une identité parfaite avec une transposase codée par le gène *slr1522* [287]. De telles IS ont été identifiées chez *Synechocystis* mais les mécanismes responsables de leur transposition sont peu compris [288]. Plusieurs travaux ont cependant montré que les IS sont des moteurs de l'évolution associés à l'apparition de sous-populations au sein des communautés bactériennes de l'environnement ou même aux réductions de génome lors de la mise en place de relations symbiotiques [289,290]. Elles favorisent ainsi l'adaptation des espèces à leur environnement et aux stress auxquels elles font face.

De ce point de vue, les cyanobactéries sont des micro-organismes présentant une grande plasticité génétique. Dans de nombreuses espèces, elle repose en partie sur la recombinaison de l'ADN au niveau de séquences homologues pouvant générer des inversions, des délétions ou des duplications de régions génomiques. En biotechnologie, cette capacité à altérer des fragments génomiques affecte fréquemment la synthèse du produit désiré, notamment lorsque celui-ci est toxique à forte dose. En effet, les souches ayant acquis des mutations dans les gènes nécessaires à la synthèse du composé sont sélectionnées au cours du temps car leur temps de génération est plus faible (adaptation).

Parallèlement, elles possèdent des systèmes de réparation de l'ADN efficaces et parfois redondants qui incluent par exemple les mécanismes de réparation directe (photolyase), l'excision de nucléotide, la réparation par recombinaison... Ils leur permettent d'éliminer rapidement les mutations spontanées qui peuvent être favorisées par les stress environnementaux tels que les UV, les radiations ou le stress oxydant.

Une étude comparative de ces mécanismes de réparation et de recombinaison de l'ADN chez les cyanobactéries et leurs impacts sur les procédés biotechnologiques a été publiée dans une revue dont je suis deuxième auteur et est disponible en annexe [291].

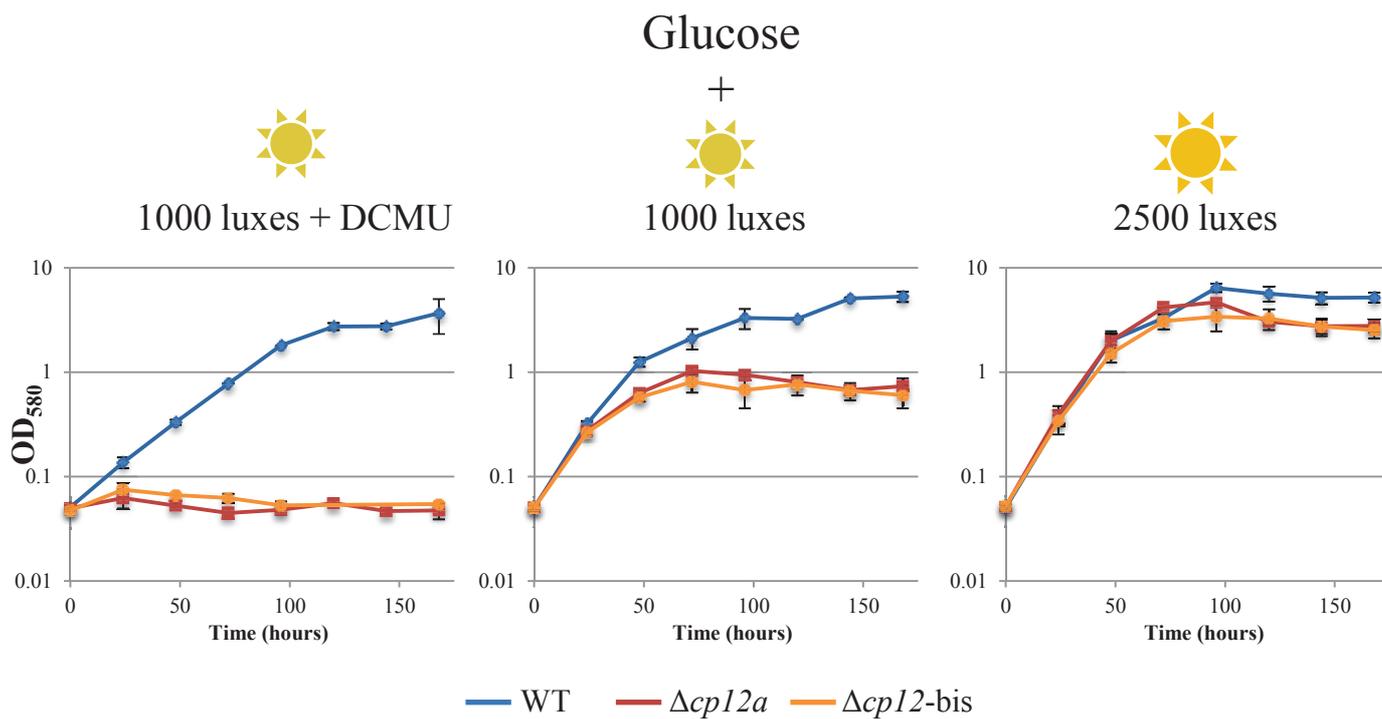


Figure 54: Mixotrophic growth analysis of WT, $\Delta cp12a$ and $\Delta cp12$ -bis strains under different photosynthetic regimes.

Mixotrophy was obtained by addition of 55 mM glucose to the standard MM* medium. PSII inhibitor DCMU was supplied at 10 μ M. Error bars represent the mean SD for all samples (N = 2-5).

Dans le cas du mutant $\Delta cp12a$ décrit dans notre travail, la cause de cette transposition est inconnue. En effet, celle-ci est survenue de manière parfaitement identique dans deux clones de transformation indépendants alors que les cultures ont été maintenues dans des conditions standards favorables à la croissance. La ségrégation complète de cette seconde mutation indique néanmoins que celle-ci a conféré un avantage sélectif suffisamment fort pour se fixer dans la population en absence de marqueur de sélection. Des phénomènes similaires de dérive génétique (SNP, indels...) ont déjà été reportés chez *Synechocystis*, dont une duplication de 110 kb [292-294]. Dans notre cas, cet évènement ne s'est pas reproduit lors de la sélection des nouveaux mutants obtenus deux ans plus tard. Par conséquent, nous avons analysé le phénotype du mutant $\Delta cp12$ -bis en mixotrophie pour déterminer si cette mutation contribuait significativement au phénotype observé dans la souche initiale et les mutants ponctuels qui en sont issus (Figure 54). Les résultats montrent que les deux mutants de délétion du gène *cp12* présentent le même phénotype photo-dépendant en présence de glucose. La mutation décelée dans *ureG* dans les premières souches $\Delta cp12a$ ne semble pas avoir une forte influence sur le déséquilibre induit par l'addition de glucose.

Par ailleurs, les résultats collectés pour le mutant $\Delta cp12a$ ont mis en évidence plusieurs déséquilibres métaboliques cryptiques dans les conditions standards (capacité photosynthétique, gestion du pouvoir réducteur, approvisionnement du cycle de Krebs...). Si de tels déséquilibres sont délétères pour la croissance, cela peut signifier que la perte d'activité uréase permet d'en compenser les effets. Il est en revanche impossible de préciser si le réarrangement génomique en est la cause ou s'il mitige ces perturbations. Pour cela, il serait nécessaire de répéter les mesures de production d'oxygène et les analyses métaboliques pour les comparer à celles des premiers mutants.

B. Compensation métabolique et interaction entre uréase et hydrogénase

Chez *Synechocystis*, l'uréase est l'une des deux seules enzymes à nickel et requiert des chaperones spécifiques pour la capture et le transfert du nickel de UreG vers son site actif suite à l'hydrolyse de GTP. La seconde métalloenzyme à nickel est l'hydrogénase qui est maturée des chaperones spécifiques (HypA-F et HoxW, voir Chapitre IV et [295]). Le transfert du nickel repose également sur l'hydrolyse du GTP réalisé par le dimère HypA1B1. Le nickel est un métal présent uniquement à l'état de traces dans le milieu MM* et ces métallochaperones sont donc en compétition pour sa capture.

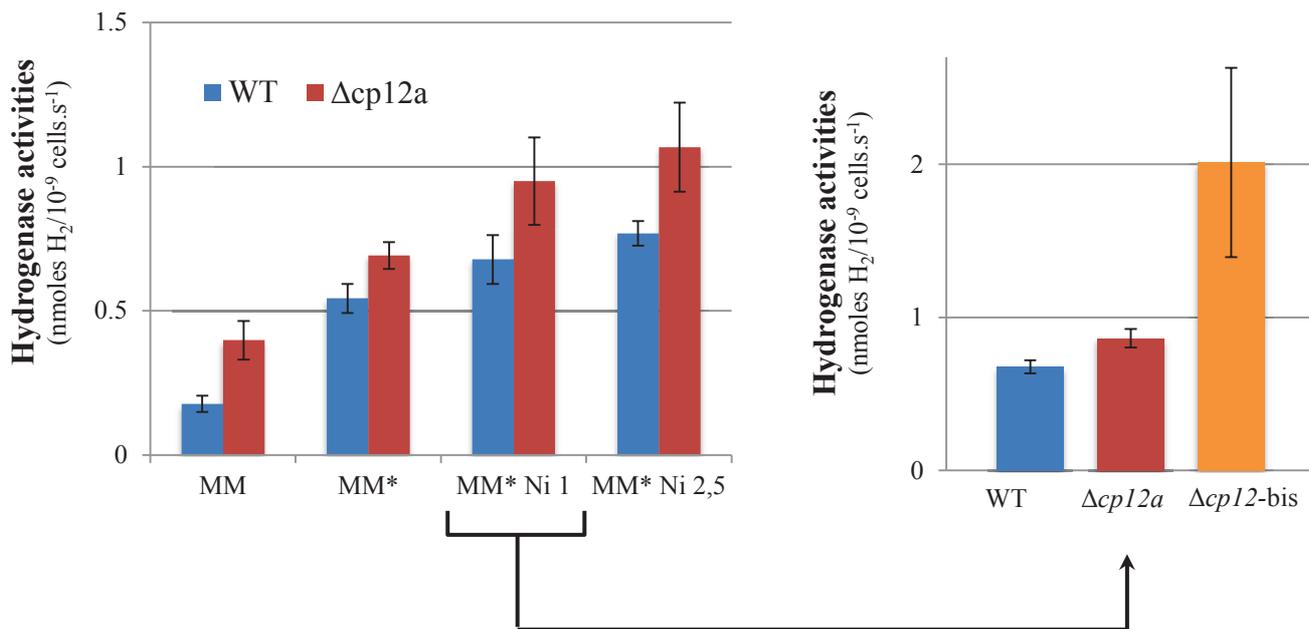


Figure 55: Hydrogenase activities of WT and $\Delta cp12$ strains in standard conditions and with increasing iron/nickel supply.

MM and MM* contained 17 and 34 μM iron supplied as ammonium ferric citrate respectively. MM* was further supplemented with either 1 or 2.5 μM nickel as NiSO_4 . Hydrogenase activities were measured following a 30 minutes dark incubation in an anaerobic chamber as described in material and method. Error bars represent the mean SD for all samples (N = 2-7). Variations between strains were statistically significant (unpaired t-tests, $p < 0.05$).

En collaboration avec Hervé Bottin (Equipe de Photocatalyse et Biohydrogène, CEA), j'ai mesuré l'activité hydrogénase du mutant $\Delta cp12a$ dans les conditions standards de croissance ainsi qu'en modifiant la disponibilité en fer et en nickel, nécessaires au fonctionnement de l'enzyme (Figure 55). Les résultats montrent que lorsque la concentration en fer est divisée par deux (MM; 17 μM de Fe), l'activité hydrogénase de la WT diminue d'un facteur 3 par rapport aux conditions standards (MM* ; 34 μM de Fe). Réciproquement, chaque augmentation de la quantité de nickel dans le milieu (1 et 2,5 μM) entraîne une augmentation de 20% de cette activité. Dans le mutant $\Delta cp12a$, l'activité hydrogénase est supérieure de 20 à 55% à celle de la souche sauvage dans toutes les conditions testées. La quantité d'hydrogénase active dans cette souche semble moins dépendante de la disponibilité en fer que dans la WT (diminution de 40% en MM par rapport au MM*). En revanche de manière similaire à la WT, chaque supplémentation en nickel du MM* entraîne une augmentation de 25% de cette activité.

J'ai également mesuré la quantité d'hydrogénase active dans le mutant $\Delta cp12$ -bis lorsque les deux métaux sont présents (Figure 55; MM* + 1 μM de Ni). De manière surprenante, celle-ci est trois fois plus élevée que dans la WT et cette différence est statistiquement significative malgré la variabilité des mesures. Ce résultat renforce l'hypothèse qu'il existe un lien entre la fonction de CP12 et l'activité de l'hydrogénase. Le mutant $\Delta cp12$ -bis possède une activité uréase similaire à la WT mais nous ne pouvons exclure la possibilité qu'il porte d'autres mutations secondaires stimulant la production d'hydrogénase mature, par exemple au niveau des gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels de l'opéron *hox* comme LexA ou AbrB2 [297,298]. Ceci pourrait être vérifié en mesurant l'activité hydrogénase d'une WT reconstituée à partir de ce mutant $\Delta cp12$ -bis.

C. Discussion complémentaire

En résumé, le gène *cp12* n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire chez *Synechocystis* mais semble induire des déséquilibres physiologiques qui conduisent à l'acquisition de mutations secondaires. Cette instabilité génomique complique l'interprétation des résultats et pourrait être d'une ampleur plus grande encore (mutation d'autres loci).

Dans le mutant $\Delta cp12a$ initial, j'ai détecté des perturbations dans l'abondance de différents acides aminés suggérant une altération latente du métabolisme de l'azote dans cette souche (glutamate, glutamine et dans une moindre mesure, arginine et citrulline). Or il a été

montré que chez les Archées ou chez *Crocospaera watsonii* (une cyanobactérie unicellulaire diazotrophique), l'expression des transposases corrèle avec la disponibilité des nutriments, notamment azotés [299,300]. Chez *Microcystis aeruginosa*, une cyanobactérie unicellulaire produisant des toxines, la présence d'urée induit également des effets similaires qui sont associés à l'apparition de sous-populations issues d'évènements de recombinaison au niveau de « hotspots » génomiques [301]. J'ai montré que la présence d'urée dans le milieu induisait une augmentation de l'activité uréase de la souche sauvage de *Synechocystis* mais également que dans le mutant $\Delta cp12$ -bis, cette activité augmentait fortement. Le remaniement génétique de ces souches pourrait donc provenir de l'accumulation d'urée dans le cytoplasme dont l'origine n'a pas pu être démontrée dans mon travail. Cependant étant donné que la déplétion de CP12 dérégule le cycle de Calvin et le métabolisme du carbone, il est raisonnable de penser que cela induit également une intensification du métabolisme de l'azote et du cycle de l'urée nécessaire pour maintenir l'équilibre C/N dans les conditions standards.

Néanmoins, le remaniement du locus *ureG* décrit n'a pas d'influence sur le phénotype des mutants en mixotrophie. J'ai ainsi pu démontrer que la régulation du cycle de Calvin par CP12 est essentielle à la croissance dans ces conditions. Ses quatre cystéines sont indispensables à cette fonction qui est renforcée par les résidus acides du consensus central. Cette régulation est vraisemblablement essentielle à la fois pour aiguiller le flux du carbone (inhibition de PRK) et économiser le NADPH (inhibition de Gap2). En absence de CP12, *Synechocystis* déclenche une réponse transcriptionnelle qui est une impasse physiologique engendrant un gaspillage des substrats bioénergétiques (ATP et pouvoir réducteur).

Enfin, j'ai également démontré que la délétion du gène *cp12* affectait l'homéostasie rédox à plusieurs niveaux chez *Synechocystis*. Tout d'abord, la forte production d'O₂ dans ce mutant est associée à une induction des gènes codant pour les composants des antennes photosynthétiques et à une possible augmentation de la taille des pools de cofacteurs (NAD⁺ et NADP⁺) et de glutathion. De plus, la synchronisation entre photosynthèse et consommation du pouvoir réducteur est perdue dans le mutant $\Delta cp12a$. Ces perturbations corrèlent avec une augmentation constitutive de la quantité d'hydrogénase active et une accumulation des métabolites du cycle de Krebs. Ceci suggère que cette souche produit et consomme potentiellement beaucoup d'électrons photosynthétiques. En contrepartie, elle dirige une partie du carbone vers le cycle de Krebs qui pourrait être articulé avec la respiration par l'hydrogénase pour favoriser la synthèse d'ATP.

Partie IV

Surproduction de l'hydrogénase et sélection de mutants adaptés pour une croissance prolongée en dégradant l'urée

Les résultats obtenus dans les différents mutants $\Delta cp12$ soulignent que notre compréhension du métabolisme de l'hydrogène chez *Synechocystis* est seulement partielle. Elle est cependant indispensable pour envisager l'exploitation à grande échelle de sa capacité à produire du H₂. J'ai donc approfondi l'analyse de mutants surproduisant toutes les protéines liées à la production d'hydrogénase active (opéron *hox*, gènes *hyp* et *hoxW*) dans l'optique de concevoir un châssis biologique possédant une forte capacité de production de cette molécule. Ceux-ci m'ont également permis d'étudier les relations existant entre l'hydrogénase et l'uréase tout en soulignant l'intérêt de l'urée en biotechnologie grâce à la sélection de mutants adaptés à sa dégradation prolongée.

A. Objectifs, résultats et article

Ce projet s'inscrit dans la continuité des travaux du laboratoire précédemment publiés sur la machinerie de production de l'hydrogène chez *Synechocystis* [267,297,302,303]. Il vise à surproduire simultanément l'ensemble des 5 protéines de l'hydrogénase (codées par l'opéron *hox*), ses 6 chaperones Hyp ainsi que la protéase de maturation HoxW. Cette approche génétique a d'abord pour but de maximiser la capacité de production de H₂ chez *Synechocystis* à l'aide des outils génétiques disponibles pour encourager le développement d'un châssis biologique au fort potentiel biotechnologique. Elle pourrait également permettre de résoudre pour la première fois la structure d'une hydrogénase à nickel-fer de cyanobactérie. L'absence de cette structure est actuellement un frein à la conception d'une hydrogénase recombinante possédant une tolérance accrue à l'oxygène et pouvant donc produire davantage d'hydrogène dans les conditions photosynthétiques. Enfin, l'étude de ces souches surexprimant les 12 gènes codant pour les protéines HoxEFUYHW et HypABCDEF est requise pour améliorer notre compréhension du métabolisme de l'hydrogène dans les cyanobactéries et en optimiser la production.

Ainsi en résumé, nous avons construit une cassette ADN afin d'insérer le gène *hoxW* (slr1876) suivi d'un gène de résistance à la gentamycine (Gm^r) immédiatement en aval du

gène *hoxH* de l'opéron *hox*. Cette construction place le gène *hoxW* sous contrôle du même promoteur et génère donc un opéron *hoxEFUYHW*. La souche surexprimant l'opéron *hox* à partir du promoteur p_R fort et constitutif (mutant CE1) précédemment construite au laboratoire peut être transformée avec ce plasmide pour générer un mutant de surexpression des gènes *hoxEFUYHW*. De la même manière, le mutant CE2 (surexpression constitutive et simultanée de l'opéron *hox* naturel et des gènes *hyp* réunis dans un vecteur d'expression) a été transformé pour générer le mutant CE5 (surexpression de l'ensemble des 12 gènes).

Nous avons montré que lorsque ces nouvelles souches CE4 et CE5 sont cultivées dans un milieu approprié (ajout de 17 μM de fer et 2,5 μM de nickel), leur activité hydrogénase peut être jusqu'à 25 fois supérieure à celle de la WT cultivée en conditions standard.

Au cours de ces travaux, nous nous sommes également intéressés à la croissance de ces souches sur un milieu contenant 5 mM d'urée à la place du nitrate (17,6 mM). Etant donné que l'uréase est une enzyme nécessitant du nickel, ce milieu urée a également été supplémenté avec 2,5 μM de nickel. Toutes les souches étudiées présentent une croissance similaire à la WT dans ces conditions et toutes les cultures subissent invariablement un changement de pigmentation (jaunissement) après 14 jours de culture. Au cours de cette analyse, nous avons néanmoins isolé des clones CE4 et CE5 tolérant une culture prolongée dans ce milieu et nommés CE4u et CE5u.

Ces mutants secondaires présentent une activité uréase réduite qui, de manière contre-intuitive, leur permet de produire davantage de biomasse lorsqu'ils sont cultivés sur milieu urée. Un reséquençage ciblé sur les gènes *ureABCDEFG* de ces souches a permis d'identifier une mutation dans le gène *ureG* codant pour la GTPase nécessaire au transfert du nickel dans la sous-unité catalytique de l'uréase. L'activité uréase de ces clones CE4u et CE5u peut être restaurée en exprimant le gène *ureG* sauvage sur un plasmide (complémentation fonctionnelle). La modélisation *in silico* de cette protéine UreG de *Synechocystis* a permis de localiser cette mutation (A85V) au niveau d'une zone d'interaction entre UreG et le complexe de maturation de l'uréase.

Ces résultats indiquent que la surproduction des protéines Hox et Hyp et l'optimisation des conditions de culture permettent d'accroître fortement l'activité hydrogénase de *Synechocystis*. L'étude des clones CE4u et CE5u a également révélé qu'une réduction de l'activité uréase améliore la tolérance aux effets toxiques de l'urée ainsi que la production de biomasse à partir de cette source d'azote d'intérêt biotechnologique.

1 **Overproduction of the cyanobacterial hydrogenase and selection of a mutant thriving**
2 **on urea for sustainable production of hydrogen**

3
4
5 **Théo Veaudor, Marcia Ortega-Ramos, Thichakorn Jittawuttipoka, Hervé Bottin, Corinne**
6 **Cassier-Chauvat and Franck Chauvat**

7
8
9 *Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ Paris- Sud, Université*
10 *Paris- Saclay, 91191, Gif- sur- Yvette cedex, France*

11
12 Correspondence to franck.chauvat@cea.fr

13 Tel. 33 (0) 1 69 08 78 11
14

15 **Abstract**

16 As an important step towards the development of powerful cell factories for high-level
17 production of hydrogen from solar energy and polluted waters, we have overproduced the complex
18 hydrogen production machine in the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. The
19 corresponding strains overproduce all twelve following proteins: HoxEFUYH (hydrogen
20 production), HoxW (maturation of the HoxH subunit of hydrogenase) and HypABCDE (assembly
21 of the [NiFe] redox center of HoxHY hydrogenase). These strains growing in the presence of
22 suitable nickel and iron availabilities reported here exhibit a strong (25-fold) increase in
23 hydrogenase activity, as compared to the WT strain growing in the standard medium. These strains
24 are very interesting for structural analyses of the cyanobacterial [NiFe] hydrogenase and the
25 engineering of an oxygen resistant hydrogenase to optimize the photoproduction of hydrogen.
26 Furthermore, we also report the counterintuitive notion that lowering the activity of the
27 *Synechocystis* urease can improve the photoproduction of biomass, and in turn hydrogen, from urea-
28 polluted waters. Such cyanobacterial factories with a strong hydrogenase activity and a healthy
29 growth on urea constitute an important step towards the future development of cost-saving
30 industrial processes coupling H₂ production from solar energy, CO₂ and urea, to wastewaters
31 treatment.

32
33 **Key words**

34 Cyanobacteria; hydrogenase activity; urease activity; RSF1010 plasmid, lambda-phage promoter

1 **Introduction**

2 In response to the constant increase in energy consumption and resulting pollution by the
3 growing world population, it important to develop new energy sources that are plentiful, renewable
4 and environmentally friendly. Hence, the solar driven production of hydrogen (H₂) is of special
5 interest for the following reasons. The annual solar flux received by Earth is in huge excess of the
6 total energy used by our society, and the burning of hydrogen liberates a high amount of energy
7 (142 MJ/kg for H₂ vs. 44.2 MJ/kg for oil) while producing only water (H₂O) as its by-product.

8 Consequently, there is a growing interest in cyanobacteria, the photosynthetic microorganisms that
9 can use solar energy, water, mineral salts and CO₂ for the production of H₂, while saving arable
10 soils, fertilizers and fresh waters for crops production (for recent reviews see (Cassier-Chauvat et al.
11 2014; Khanna and Lindblad 2015; Puggioni et al. 2016)). Furthermore, cyanobacteria are robust
12 organisms that colonize most (fresh and salt) waters and soils (including deserts) where they
13 outcompete most other organisms, a primary concern of mass cultivations. Moreover, several model
14 cyanobacteria have a small sequenced genome easily manipulable with versatile plasmid vectors,
15 such as the presently studied unicellular strain *Synechocystis* PCC6803 (hereafter designated as
16 *Synechocystis*). A powerful genetics is welcome because cyanobacteria need to be genetically
17 manipulated to improve their low hydrogen production and reach levels of industrial interest.

18 The complex H₂ production machine is best studied in *Synechocystis* where it is the sole enzyme
19 capable of combining electrons with protons to produce H₂ under specific conditions (Cassier-
20 Chauvat et al. 2014). The pentameric hydrogenase enzyme (HoxEFUYH; Hox for hydrogen
21 oxidation) has a bias toward H₂ production (McIntosh et al. 2011), and is reversibly inactivated by
22 oxygen (Cournac et al. 2004).

23 The *Synechocystis* HoxEFUYH complex is encoded by the weakly expressed (Dutheil et al. 2012)
24 operon *hoxEFUYH* encompassing the genes *hoxE*, *hoxF*, *sll1222*, *hoxU*, *hoxY*, *ssl2420*, *sll1225* and
25 *hoxH* in that order (the function of *sll1222*, *ssl2420* and *sll1225* is not known). The HoxEFU
26 diaphorase transfers the NAD(P)H-transported electrons originating from photosynthesis and/or
27 sugar catabolism, to the [NiFe] hydrogenase sub-complex HoxHY. In addition, a recent *in vitro*
28 analysis proposed that the HoxHY enzyme could also be reduced by ferredoxin or flavodoxin
29 (Gutekunst et al. 2014). During HoxHY assembly, the C-terminus part of HoxH subunit is cleaved
30 off by the HoxW protease (Hoffmann et al. 2006). Then, the [NiFe] HoxEFUYH complex is
31 assembled by the six proteins encoded by the *hypABCDEF* genes that are scattered in the
32 *Synechocystis* chromosome.

33 To try to increase the low H₂ production of *Synechocystis*, we characterized and then eliminated the
34 AbrB2 repressor of the *hoxEFUYH* operon (Dutheil et al. 2012; Sakr et al. 2013) with a moderate
35 success (two fold increase in hydrogenase activity). Other workers replaced the weak promoter of

1 the *hoxEFUYH* operon by the light-inducible promoter of the photosynthetic gene *psbAII* and
2 obtained a three-fold increase in H₂ production (Germer et al. 2009). Similarly, we replaced the
3 promoter of the *hoxEFUYH* operon by the strong lambda-phage promoter λp_R . We also we cloned
4 the *hypABCDE*F genes under the control of the λp_R promoter of our overexpression vector derived
5 from the RSF1010 promiscuous plasmid that replicates at 10 copies per cell like the chromosome
6 (Mermet-Bouvier et al. 1993; Mermet-Bouvier and Chauvat 1994). The resulting mutants strongly
7 overproduced HoxEFUYH alone or in combination with HypABCDE but showed no similar high
8 increase in hydrogenase activity (Ortega-Ramos et al. 2014). These findings indicated that
9 increasing the abundance of the HoxEFUYH and HypABCDE proteins is not sufficient to
10 maximize H₂ production. One factor possibly limiting the hydrogenase activity of mutants
11 overproducing HoxEFUYH without or with HypABCDE, is the level of the HoxW protein that
12 normally maturates HoxH (processing of its C-terminus for assembling the [NiFe] cluster) (Carrieri
13 et al. 2011; Eckert et al. 2012; Hoffmann et al. 2006). To test this hypothesis, we have constructed
14 and analyzed strains that simultaneously overproduce HoxEFUYH and HoxW, without or with
15 HypABCDE. We report that the best gain is conferred by the overproduction of HoxEFUYHW
16 together with HypABCDE. This hydrogenase overproducing strain is of high interest for
17 biochemical and structural studies of the cyanobacterial [NiFe] hydrogenase, to engineer an
18 oxygen-resistant hydrogenase for a powerful photoproduction of hydrogen.

19 Apart from the level of production, one potential approach to constrain the cost of hydrogen
20 production is to couple it with the treatment of wastewaters, which are often polluted with urea
21 originating from mammalian wastes or its massive use as an agricultural fertilizer (Su et al. 2013).
22 Most organisms that can use urea (CO(NH₂)₂) as a nitrogen source employ a nickel-dependent
23 metalloenzyme urease (EC 3.5.1.5, also called urea amidohydrolase) to catalyze the ATP-
24 independent hydrolysis of urea into ammonia (NH₃) and carbon dioxide (CO₂) (Carter et al. 2009).
25 Furthermore, the urease activity consumes no NAD(P)H, the spare quantity of which can be used
26 for hydrogen production driven by the HoxEFUYH enzyme. In most bacteria and cyanobacteria, the
27 urease enzyme is a trimer of three subunits (UreA, UreB and UreC) that requires up to four
28 (accessory) chaperone proteins (UreD, UreE, UreF and UreG) for activation and incorporation of
29 two nickel atoms into its metallocenter active site (Carter et al. 2009). In this study, we have tested
30 the influence of urea on the production of the biomass and hydrogenase activity of our hydrogenase
31 overproducing strains. We show that (i) decreasing the activity of urease is beneficial for cell
32 growth on urea as the sole nitrogen source, and (ii) the activity of hydrogenase was similar in cell
33 growing on urea or nitrate. These novel results and strains have important implications for future
34 industrial production of H₂ from solar energy, CO₂ and urea-polluted waters.

35

1 **Materials and Methods**

2 **Bacterial strains and growth conditions**

3 *Synechocystis* PCC6803 (*Synechocystis*) was grown at 30°C under continuous white light
4 (2,500 lux; 31.25 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on the mineral medium BG11 (Rippka and Stanier 1979) enriched
5 with 3.78 mM Na_2CO_3 (Domain et al. 2004) hereafter designated as MM. For some experiments
6 MM was supplemented with 1-2.5 μM NiSO_4 and/or 17 μM Fe (provided as green ferric
7 ammonium citrate) and/or nitrate was replaced by urea (5 mM) and/or ammonium chloride (1-
8 20 mM) as indicated. in these latter cases nitrate-grown cells were washed twice with sterile water
9 before resuspension in urea- and/or ammonium-containing mediums).

10 *E. coli* strains used for gene manipulations (DH5 α or TOP10, Invitrogen®) or conjugative transfer
11 (Mermet-Bouvier et al. 1993; Mermet-Bouvier and Chauvat 1994) to *Synechocystis* (CM404) of
12 replicative plasmids derived from our expression vector pFC1 (Supplementary data, Table S1) were
13 grown on LB medium at 37°C (TOP10 and DH5 α), or at 30°C (CM404 and TOP10 cells
14 propagating pFC1 derivatives). Antibiotic selections were as follows for *E. coli*: ampicillin (Ap)
15 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, gentamycin (Gm) 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, kanamycin (Km) 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ and spectinomycin (Sp)
16 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; for *Synechocystis*: Gm 2.5-5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, Km 50-300 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, Sp 2.5-5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ and Sm
17 2.5-5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

18

19 **Gene cloning and manipulation**

20 *Synechocystis* DNA was PCR amplified with specific primers (Supplementary data, Table S2)
21 to generate the studied genes that were either overexpressed or eliminated. For overexpression, the
22 studied protein coding sequences were cloned downstream of the strong λp_R promoter and
23 associated ribosome binding site of our replicative plasmid vector derived from the broad-host-
24 range plasmid RSF1010 (Mermet-Bouvier and Chauvat 1994). The resulting plasmids were
25 introduced by conjugation in *Synechocystis* (Mermet-Bouvier et al. 1993). For deletion, the
26 genomic regions encompassing each studied gene were PCR amplified, or synthesized (Eurofins),
27 prior to replacing each studied gene by an antibiotic resistant marker for selection. The resulting
28 deletion cassettes (Supplementary data, Table S1) were introduced by transformation in
29 *Synechocystis* (Labarre et al. 1989) where homologous DNA recombinations occurring between the
30 deletion cassette and the recipient chromosome integrated the antibiotic resistant marker in place of
31 the studied gene.

32 All DNA constructions were verified through PCR and DNA sequencing (Big Dye kit, ABI Perking
33 Elmer, or Eurofins), before and after propagation in *Synechocystis*. PCR were also used to test
34 whether the segregation between the mutant (antibiotic resistant) and WT copies of the polyploid

1 chromosome (about 10 per cell, (Labarre et al. 1989) was complete (the studied gene is dispensable
2 to cell growth) or not (the gene is essential to cell viability).

3

4 **RNA isolation and analysis by quantitative RT-PCR**

5 Cells growing exponentially were rapidly harvested and broken (Eaton press), prior to RNA
6 purification and analysis by quantitative RT-PCR using primers (Supplementary data, Table S2)
7 that generated DNA fragments of similar size (163-234 bp), as we described (Dutheil et al. 2012;
8 Ortega-Ramos et al. 2014). Each assay was triplicated to calculate the mean threshold cycle value
9 (C_T) for each studied gene, which was converted to gene copy number per ng of template cDNA.

10

11 **Western blot analysis of the HoxF and HoxH proteins**

12 40 μ g of *Synechocystis* proteins were separated, transferred to nitrocellulose membrane
13 (Invitrogen) and immunodetected with rabbit anti-HoxF and anti-HoxH antibodies, and the R800
14 goat anti-rabbit IgG secondary antibodies, as described (Dutheil et al. 2012; Ortega-Ramos et al.
15 2014).

16

17 **Hydrogenase activities**

18 They were measured by the standard amperometric method in an anaerobic glove box
19 equipped with an inversed Clark-type electrode (Hansatech, UK), using Na-dithionite (20 mM,
20 reducing agent) and methylviologen (5 mM, electron donor) as described (Dutheil et al. 2012;
21 Ortega-Ramos et al. 2014).

22

23 **Urease activities**

24 They were monitored by the release of ammonia from urea (van Vliet et al. 2001). Cells
25 collected by centrifugation (5,000 rpm, 10 min, 20°C) were resuspended in 400-1000 μ L of buffer
26 (PBS 1X pH 7.5, EDTA 10 mM, Protease Inhibitor Cocktail, Roche) and disrupted in a pre-cooled
27 Eaton press, as described (Ortega-Ramos et al. 2014). 10 μ g of total proteins (measured with the
28 Bradford protein assay from Biorad) were mixed with 90 μ L of PBS EDTA buffer lacking (reaction
29 blank) or containing (samples) 50 mM urea and incubated for 10 min at 30°C. Tubes were
30 transferred on ice before the addition of 150 μ L of phenol nitroprusside (Sigma-Aldrich), 150 μ L of
31 alkaline hypochlorite (Sigma-Aldrich) and 700 μ L H₂O. Chromophore formation was achieved at
32 37°C for 10 min before measuring absorbances at 570 nm of blanks and samples. After subtracting
33 the A_{570} values of blank reactions, the ammonia concentration of the samples was determined from
34 a standard curve constructed with several NH₄Cl concentrations.

35

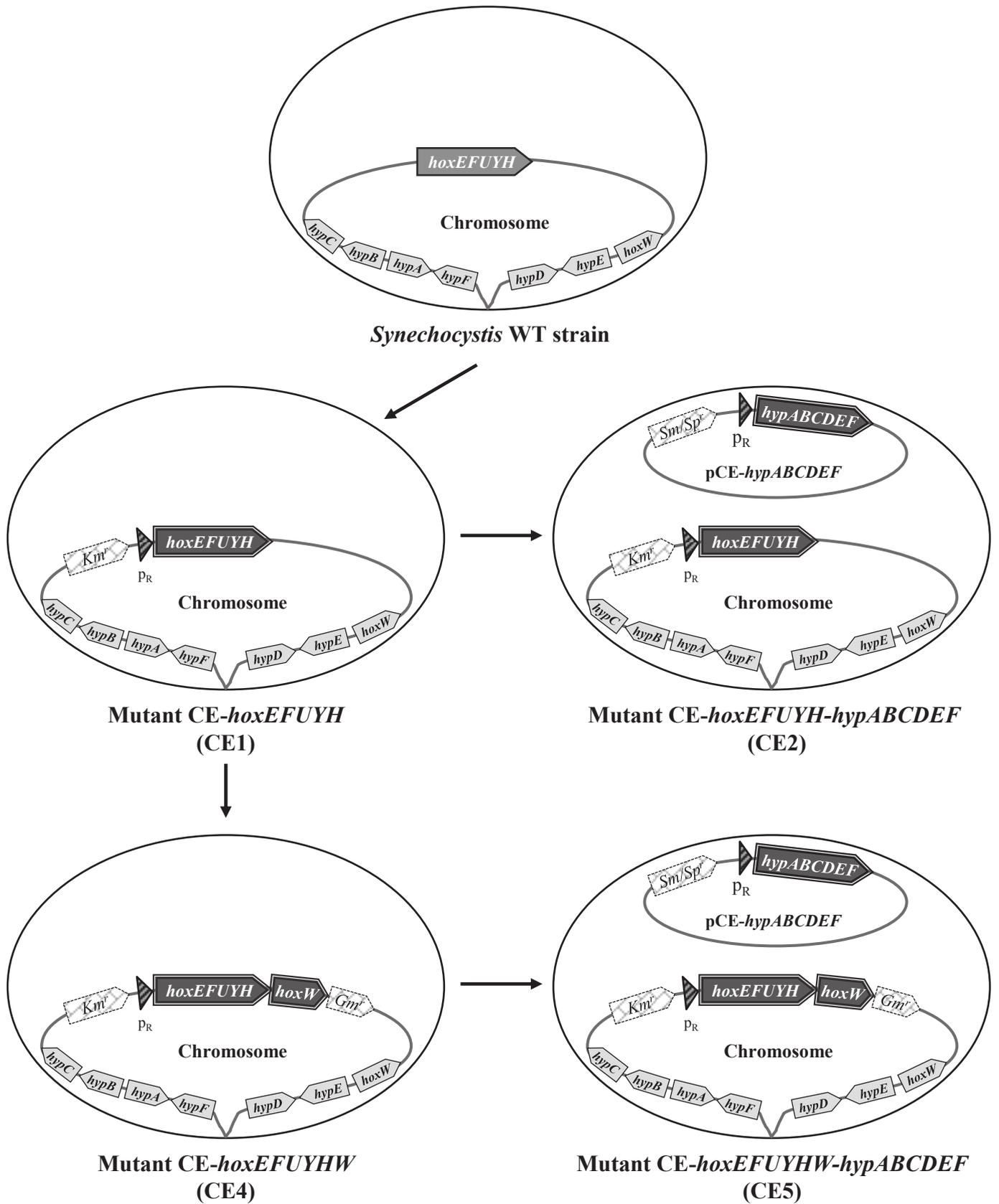


Fig. 1. Schematic representation of the *Synechocystis* strains constructed in this study.

Synechocystis cells are represented by oval shapes showing their chromosome attached to the cell membrane. The pCE-*hypABCDEF* replicating plasmid is represented by circles. The *hoxEFUYHW* and *hypABCDEF* genes and the antibiotic resistance markers are shown by large arrows pointing towards the direction of their transcription. The triangle represents the strong lambda-phage pR promoter (λp_R); CE for strong constitutive expression.

1 ***In silico* modeling and docking simulations**

2 Each amino acids (AA) sequence was modelled with the intensive search mode of Phyre2
3 (Kelley et al. 2015). Poorly modelled AA residues or regions were manually removed with Swiss
4 PDB Viewer. For each structure, a Ramachandran plot was generated using Chimera to verify that
5 less than 5% of residues were modelled with conflicting sidechain orientations. Reliability of
6 models was further evaluated using ModFOLD, ModEval and Qmean servers. (Benkert et al. 2009;
7 McGuffin 2008; Pieper et al. 2011). Multimeric complexes were obtained with Chimera by
8 superposition of final models to published oligomeric structures.

10 **Results**

11 **Construction and analysis of a mutant for high level expression all *hoxEFUYHW* genes from 12 the strong lambda-phage p_R promoter**

13 In our previous attempt to engineer *Synechocystis* for high-level photoproduction of H₂, we
14 increased the expression of the *hoxEFUYH* operon by replacing its weak natural promoter (Dutheil
15 et al. 2012) by the strong λp_R (lambda-phage) promoter (Ferino and Chauvat 1989), thereby
16 yielding the CE-*hoxEFUYH* mutant also called CE1 (CE for constitutive strong expression)
17 (Ortega-Ramos et al. 2014) and this work (Fig. 1). This CE1 mutant over-producing the *hoxEFUYH*
18 transcripts (at least 100-fold) and HoxEFUYH proteins exhibited only a small gain in hydrogenase
19 activity as compared to wild-type (WT) cells (Ortega-Ramos et al. 2014) and this work (Fig. 2). We
20 also showed that the hydrogenase activity of both WT and CE1 cells could be increased by growing
21 the cells in the mineral medium appropriately supplemented with extra iron (17 μ M) and nickel (2.5
22 μ M) atoms that are required for the [NiFe] hydrogenase cluster. Furthermore, the gains conferred
23 by the genetic engineering and the growth-medium improvement could be cumulated since the
24 hydrogenase activity of the CE1 mutant growing in the improved medium was about ten-fold higher
25 than hydrogenase activity of WT cells growing in the standard medium cells (Ortega-Ramos et al.
26 2014) and this work (Fig. 2). However, this overall gain in hydrogenase activity was modest in
27 comparison to the strong increase in abundance of the HoxEFUYH transcripts and proteins in the
28 CE1 mutant (Ortega-Ramos et al. 2014) and this work (Fig. 2). Thus, we reasoned that the natural
29 (low) level of the HoxW protein required for the maturation of HoxH, might be limiting in CE1
30 cells that overproduce the HoxEFUYH proteins. This assumption is consistent with the finding that
31 several cyanobacteria (*Synechococcus* PCC7335, *Halotheca* PCC741 and *Leptolyngbya* PCC7375)
32 harbor several copies (two-three) of *hoxW* while they maintain *hoxEFUYH* as single copy genes
33 (Puggioni et al. 2016). To further increase the level of hydrogenase activity of our CE1 mutant we
34 cloned the *hoxW* protein-coding-sequence, downstream of its chromosomal *hoxEFUYH* operon that
35 is expressed from the strong (Ferino and Chauvat 1989) λp_R promoter. Practically, a *hoxW*-Gm^r

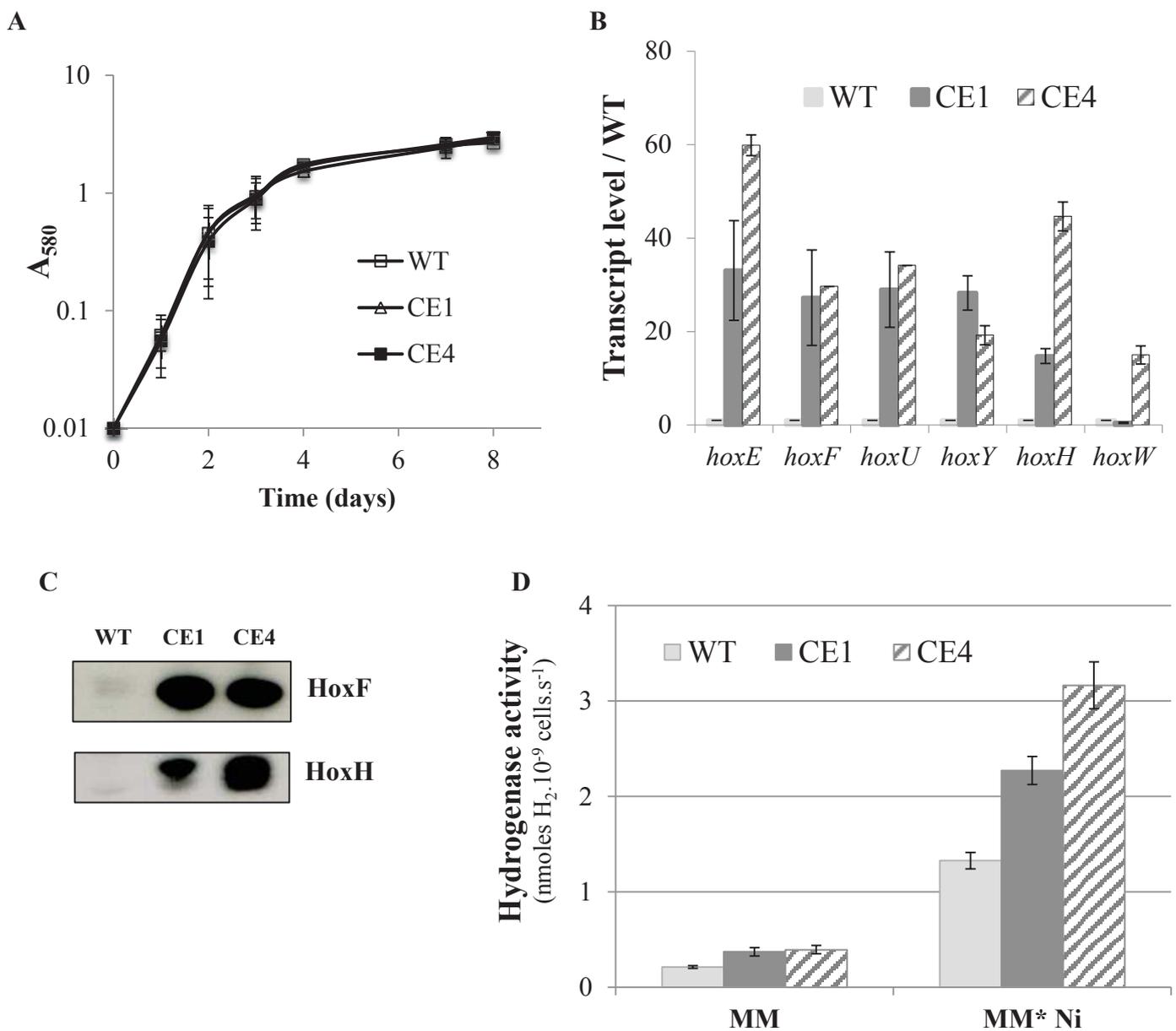


Fig. 2. Comparative analysis of the CE1 and CE4 strains for strong expression of the *hoxEFUYH* (CE1) or *hoxEFUYHW* (CE4) genes.

All experiments were performed at least three times.

(A) Typical growth of the wild type (WT; squares), CE-*hoxEFUYH* (CE1; white triangles) and CE-*hoxEFUYHW* (CE4; black triangles) cells incubated in standard conditions.

(B) Histogram plot representation of the transcript abundance (measured by Real-time quantitative PCR) of the *hoxEFUYHW* genes in the strains WT (small light-grey bars), CE1 (dark grey rectangles) and CE4 (hatched bars) mutants.

(C) Western blot analysis of the abundance of the HoxF and HoxH proteins in WT, CE1 and CE4 cells.

(D) Histograms representation of the hydrogenase activities of WT (light grey), CE1 (dark grey) or CE4 cells (hatched bars) growing in standard medium (MM) or MM* (MM + 17 μ M Fe) supplemented with 2.5 μ M NiSO₄.

1 DNA cassette was constructed by PCR in such a way that it was flanked by appropriate
2 *Synechocystis* DNA sequences to serve as platforms of homology for DNA recombinations
3 promoting the introduction of the *hoxW*-Gm^r cassette downstream of *hoxH* (Supplementary data,
4 Fig. S1). The resulting *hoxW*-Gm^r cassette was verified by PCR (Supplementary data, Fig. S2) and
5 nucleotide sequencing, and subsequently transformed (Labarre et al. 1989) to CE1 cells (Km^r),
6 yielding Km^r-Gm^r clones. The resulting Km^r-Gm^r mutant grew as fit as the WT strain in standard
7 photoautotrophic conditions (Fig. 2). This mutant was analyzed by PCR (Supplementary data, Fig.
8 S2) to verify that the *hoxW* protein-coding-sequence had been integrated downstream of the *hoxH*
9 gene of the *hoxEFUYH* operon, thereby generating the *hoxEFUYHW* operon as expected.
10 Furthermore, we found that all copies (about 10) of the *Synechocystis* polyploid chromosome
11 (Labarre et al. 1989), harbor the *hoxEFUYHW* operon, as expected. This mutant was hereafter
12 designated as CE4 (constitutive strong expression of the *hoxEFUYHW* genes, Fig.1). We verified
13 through PCR that CE4 cells possessed only CE4-type (*hoxEFUYHW*-Gm^r) chromosomes copies,
14 even after growth in absence of Gm to allow re-invasion of CE1 (Gm^s) chromosome copies in case
15 there had been any left (Supplementary data, Fig. S2). Then, we verified with quantitative RT-PCR
16 that the CE4 strain produced (i) similar high levels of *hoxEFUYH* transcripts as the CE1 mutant; (ii)
17 more abundant (about 20-fold) *hoxW* mRNA than WT and CE1 cells (Fig. 2). Collectively, these
18 data demonstrated that the overexpression of the *hoxEFUYHW* genes is not detrimental to cell life.
19 This finding is consistent with the absence of negative physiological effects of the overexpression
20 of the *hoxEFUYH* genes, on one hand (CE1 cells (Ortega-Ramos et al. 2014), and Fig. 2), and *hoxW*,
21 on the other hand (Fig. 2). We also cloned *hoxW* just behind the strong (Ferino and Chauvat 1989)
22 λp_R promoter of our plasmid vector for maximal expression (pFC1 Δ cl₈₅₇, Supplementary data,
23 Table S1), and found that the resulting cells grew very well (data not shown).
24 As expected, the hydrogenase activity of CE4 cells was higher than those of CE1 and WT cells, in
25 that order (Fig. 2), growing in the standard MM medium or the improved medium supplemented
26 with Fe (17 μ M) and Ni (2.5 μ M) atoms (the Hox hydrogenase uses a [NiFe] redox center). The
27 higher hydrogenase activity of CE4, as compared to CE1, was consistent with the positive role of
28 HoxW on the hydrogenase activity of (maturation of the HoxH subunit (Hoffmann et al. 2006)).
29 This finding indicates that the increased expression of *hoxW* in CE4 was necessary to mature the
30 large quantity of HoxH, and by extension, the natural level of HoxW in CE1 cells was insufficient
31 to mature the large amount of HoxH. This interpretation was also supported by the Western blot
32 analysis of the HoxF and HoxH proteins (Fig. 2). In WT cells, the very faint HoxF and HoxH
33 signals are consistent with the low abundance of these proteins in *Synechocystis* that we showed
34 with western blots and quantitative proteomics (Ortega-Ramos et al. 2014). In CE1 cells (Fig. 2),
35 the more abundant Western bands of HoxF and HoxH (mostly the large form of HoxH not yet

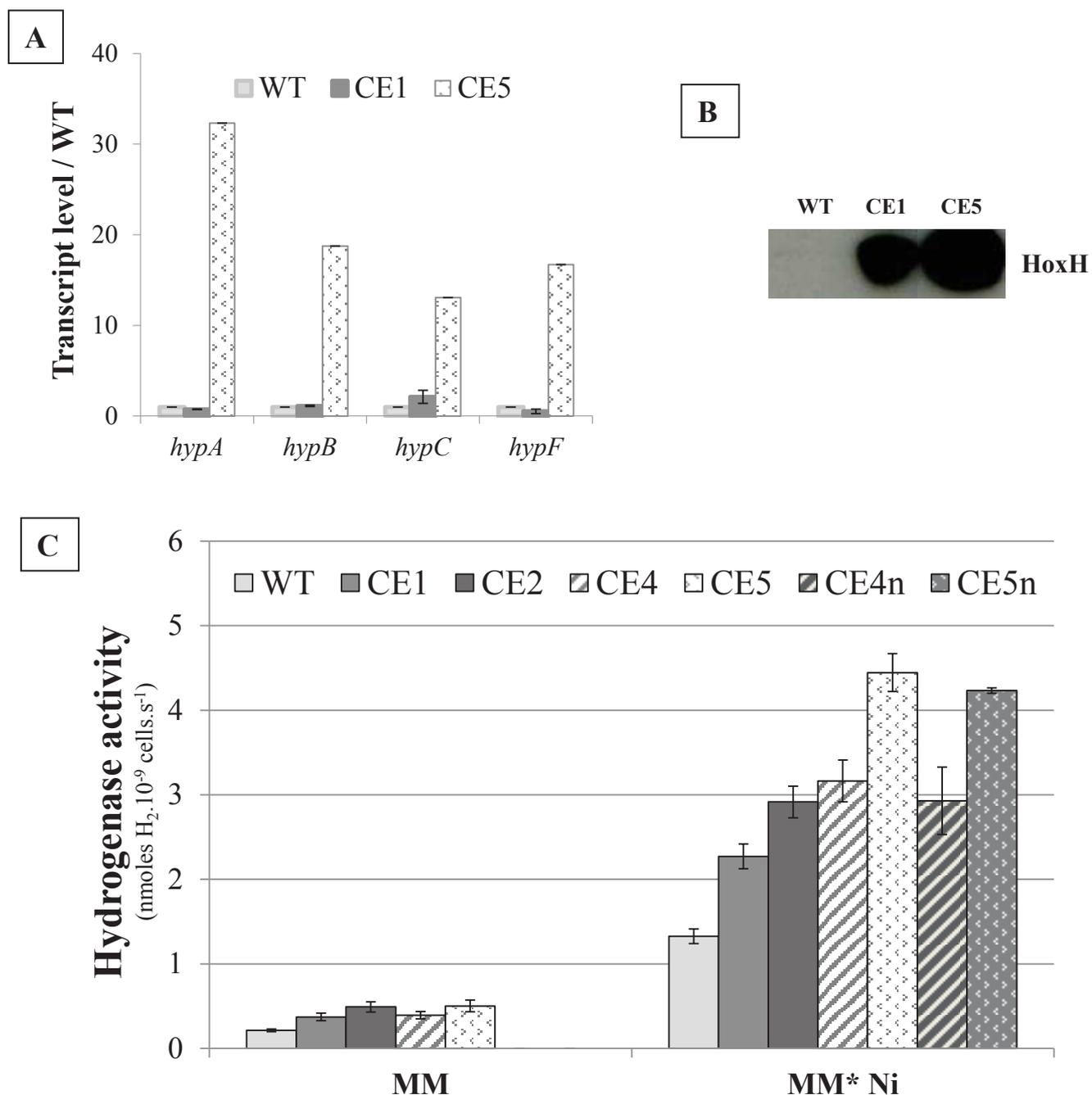


Fig. 3. Analysis of the strains for strong expression of the *hoxEFUYHW* genes alone (CE1) or together with the *hypABCDEF* genes (CE-*hoxEFUYHW-hypABCDE*; CE5).

All experiments were performed at least three times.

(A) Histogram plot representation of the transcript abundance (RT-qPCR) of the *hypABC-F* genes in the strains WT (light-grey rectangles), CE1 (dark grey) and CE5 (hatched bars).

(B) Western blot analysis of the HoxH protein in WT, CE1 and CE5 cells.

(C) Histograms representation of the hydrogenase activities of WT (light grey), CE1 (dark grey) or CE4 cells (hatched bars) growing in standard medium (MM) or MM* (MM + 17 μ M Fe) supplemented with 2.5 μ M NiSO₄.

1 matured by the low natural quantity of HoxW) also confirmed our previous report (Ortega-Ramos
2 et al. 2014). The present new data (Fig. 2) show that CE4 cells (overexpression of *hoxEFUYHW*)
3 produce similar high quantities of HoxF and HoxH as CE1 (overexpression of *hoxEFUYH*) as
4 expected. The thicker HoxH signal observed in CE4 as compared to CE1 is likely due to the
5 increased abundance of the small form of HoxH cleaved by the increased level of HoxW.

6

7 **Construction and analysis of a mutant for strong constitutive expression of all *hoxEFUYHW*** 8 **and *hypABCDEF* genes in *Synechocystis***

9 In a previous study we showed that the gain in hydrogenase activity conferred by the
10 overproduction of the *hoxEFUYH* proteins can be further increased by the simultaneous
11 overproduction of the *HypABCDEF* proteins directed by the (Sm^r/Sp^r) plasmid pCE-*hypABCDEF*
12 (Ortega-Ramos et al. 2014). This pCE-*hypABCDEF* vector, derived from the promiscuous plasmid
13 RSF1010 that replicates autonomously at the same 10-20 copies number per cell as the
14 chromosome (Mermet-Bouvier and Chauvat 1994), strongly express the *hypABCDEF* genes from
15 the strong λp_R promoter (Ortega-Ramos et al. 2014). Consequently, we decided to overproduce
16 simultaneously all *HoxEFUYHW* proteins and all *HypABCDEF* proteins. Therefore, we introduced
17 the Sm^r/Sp^r pCE-*hypABCDEF* plasmid by conjugation (Mermet-Bouvier et al. 1993) into the Km^r -
18 Gm^r CE-*hoxEFUYHW* (CE4) mutant (Fig. 1). This yielded the CE-*hoxEFUYHW-hypABCDEF*
19 mutant (Fig. 1) designated as CE5 (note that CE5 cells also carry the weakly expressed WT alleles
20 of *hoxW* and *hypABCDEF* in their chromosome). CE5 cells grew as fit as WT and CE4 cells in
21 standard photoautotrophic conditions (Fig. 3). As expected, the CE5 strain strongly expressed the
22 *hoxEFUYHW* and *hypABCDEF* genes (Fig. 3) and, consistently, its hydrogenase activity was higher
23 than those of the CE4, CE1 and WT strains, in that order (Fig. 3). Altogether, the constitutive
24 overexpression of the *hoxEFUYHW* and *hypABCDEF* genes, and the increased Ni- and Fe-
25 availabilities led to the strongest increase in active hydrogenase (25-fold) as compared to WT cells
26 cultivated in the normal medium (Fig. 3).

27

28 **Influence of urea and urease activity on cell growth and hydrogenase activity**

29 As a step towards the future development of a cost-effective cyanobacterial process for the
30 photoproduction of H_2 coupled with wastewaters treatment, we have tested the influence of urea (a
31 frequent water pollutant) on the biomass production and hydrogenase activity of our strains.
32 Therefore, *Synechocystis* WT was incubated for increasing periods of time in liquid mineral
33 medium containing urea as the sole nitrogen source, and nickel (both urease and hydrogenase
34 require Ni). WT cells grew well on urea up to 5 mM, whereas higher urea concentrations reduced
35 the duration of healthy growth and the production of biomass (Supplementary data, Fig. S3). Then,

1 we tested the influence of 5 mM urea on the growth and hydrogenase activity of the WT and CE1-5
2 strains, and the previously constructed delta *hoxEFUYH* mutant (Ortega-Ramos et al. 2014). They
3 all grew well and displayed the normal blue green color for more than seven days. During this time
4 the hydrogenase activity of the WT and CE5 strains did not vary (data not shown).

5 After fourteen days of cultivation on urea (5 mM, sole N source) and Ni (2.5 μ M) cells reaching the
6 stationary phase of growth ($OD_{750} > 5.0$) turned invariably yellowish (Supplementary data, Fig. S3).
7 Once the chlorosis process became visibly detectable, a strong decrease in cell viability (capability
8 to form colony on solid medium) was detected by plating assay on solid standard growth medium
9 containing nitrate, not urea). A similar urea-induced chlorosis was observed when the cyanobacteria
10 *Anabaena cylindrica* and *Synechococcus* PCC7002 (distantly related to *Synechocystis* PCC6803)
11 were cultivated on urea as the sole N source (Mackerras and Smith 1986; Sakamoto et al. 1998).
12 These articles showed that the urea-mediated chlorosis and cell death did not occur in a urease
13 defective mutant harboring an inactivated allele of *ureC*, the gene normally encoding the large
14 urease subunit. To test whether the same is true in *Synechocystis*, we inactivated its *ureC* gene as
15 follows. The first 971 bp of *ureC* were replaced by the Km^r marker gene (Supplementary data, Fig.
16 S4), yielding the $\Delta ureC::Km^r$ DNA cassette. Following transformation to *Synechocystis* (Labarre et
17 al. 1989) Km^r clones growing in standard medium (i.e. on nitrate as the sole nitrogen source)
18 supplemented with Km were analyzed by PCR to verify that all chromosome copies harbor the
19 $\Delta ureC::Km^r$ cassette in place of *ureC* (Supplementary data, Fig. S4). The complete absence of WT
20 (*ureC*⁺) chromosome copies in the $\Delta ureC::Km^r$ mutant was confirmed by analyzing cells that were
21 subsequently grown in absence of Km to allow a possible re-invasion of *ureC*⁺ chromosome copies
22 if there had been any left. We also verified that the $\Delta ureC::Km^r$ mutant had lost the urease activity
23 and the capability to grow on urea as the sole nitrogen source (data not shown). These results
24 showed that the *Synechocystis ureC* gene is essential for urease activity and cell growth on urea as
25 the sole nitrogen source, as observed in the distantly related cyanobacteria *Synechococcus* PCC7002
26 (Sakamoto et al. 1998) and *Synechococcus* PCCWH7805 (Collier et al. 1999).

27 During the time course of our study, we happened to find one mutant clone of each hydrogenase
28 overproducing strains CE4 and CE5 that grew stably on urea as the sole N source and retained the
29 normal blue-green color. These clones escaping the urea-promoted chlorosis (Supplementary data,
30 Fig. S3) were termed CE4u and CE5u (u for withstanding urea as the sole nitrogen source).
31 Interestingly, the CE4u and CE5u mutants retained their advantageous high hydrogenase activity
32 (Fig. 3). Knowing that the urea-mediated chlorosis depends on an active urease (see above), we
33 anticipated the urease of CE4u and CE5u to be much less efficient than those of WT, CE4 and CE5
34 strains, and found that this was the case (Supplementary data, Fig. S3). To identify the mutation in
35 CE4u and CE5u responsible for their low urease activity, we used appropriate oligonucleotide

1 primers for PCR amplification and nucleotide sequencing of all urease genes (*ureABCDEFG*)
2 including their upstream and downstream regions (about 200 bp in each case). We also used qRT-
3 PCR to monitor and compare the expression of the *ureABCDEFG* genes in CE4u and CE5u (urea-
4 tolerant) and WT (urea-sensitive) strains. The results showed that the expression of *ureABCDEFG*
5 was not affected in CE4u and CE5u (Supplementary data, Fig. S5 and data not shown).
6 Interestingly, both CE4u and CE5u carried the same (single) mutation, a C to T transition at
7 position 254 of the *ureG* coding sequence, which substituted the alanine amino-acid residue at
8 position 85 by a valine residue (Supplementary data, Fig. S5). To confirm that the low urease
9 activity of CE4u is due to the A85V mutation in *ureG*, we performed a plasmid complementation
10 test as follows. First, we cloned the WT *ureG* protein-coding-sequence in our replicative plasmid
11 vector for strong constitutive gene expression (Supplementary data, Fig. S6). The resulting plasmid
12 pCE-*ureG* was introduced by conjugation in CE4u, which has the *ureG_{A85V}* gene in its chromosome,
13 and in the WT, CE1 and CE4 control strains, which have *ureG* in their chromosome. As expected,
14 in the CE4u/pCE-*ureG* test strain, the strong expression of *ureG* from the pCE-*ureG* plasmid
15 increased the urease activity well above the level driven by of the CE4u strain carrying the
16 *ureG_{A85V}* gene in its chromosome (Supplementary data, Fig. S5). By contrast, in the control strains
17 WT/pCE-*ureG*, CE1/pCE-*ureG*, CE4/pCE-*ureG* harboring *ureG* in both their chromosome and
18 their pCE-*ureG* plasmid, exhibited no increase in urease activity as compared to their parental
19 strains WT, CE1 and CE4 expressing *ureG* only from their chromosome. It even seems that the
20 stronger level of *ureG* expression driven by both the plasmid and the chromosome slightly
21 decreased the overall urease activity for an unknown reason (Supplementary data, Fig. S5 ; compare
22 WT/pCE-*ureG* with WT).

23 The alanine 85 aminoacid residue of UreG belongs to an α -helix located near the Ni-binding site of
24 UreG, which physically interacts with the groove formed by the UreF dimer (Supplementary data,
25 Fig. S5). Hence, it is possible that the steric hindrance generated by the A85V mutation somehow
26 impaired the UreG-UreF physical interaction thereby decreasing the incorporation of Ni atoms in
27 the urease active site. Collectively, these findings showed that UreG plays a crucial role on urease
28 activity of *Synechocystis* as observed in the evolutionary distant cyanobacterium *Anabaena*
29 PCC7120 (Valladares et al. 2002). Also interestingly, a similar alanine to valine mutation (A142V)
30 near the Ni-binding of the soybean UreG (A142 corresponds to G64 in the *Synechocystis* protein)
31 was also able to decrease urease activity (Freyermuth et al. 2000). Finally, we also found that the
32 hydrogenase activity is not affected by the decline in urease activity (Fig. 3).

33

34 **Discussion**

35 We presently showed that the simultaneous overproduction of all HoxEFUYHW and

1 HypABCDEF proteins involved in the synthesis, maturation and assembly of the [NiFe]
2 hydrogenase complex, combined to medium improvement, led to a strong (about 25-fold) increase
3 in the level of active hydrogenase. We also showed the counterintuitive notion that lowering the
4 activity of the *Synechocystis* urease can improve the photoproduction of biomass, and in turn H₂,
5 from urea-polluted waters. The sophisticated strains constructed during this work displayed higher
6 levels of expression of the *hoxEFUYH* and *hypABCDEF* genes than that of active hydrogenase.
7 This finding indicates that limiting post-transcriptional factors should be dealt with in order to
8 engineer a powerful H₂ producer of industrial importance. We think that the presently described
9 strains with a healthy growth and an increased abundance of active hydrogenase are suitable for this
10 important objective. Indeed, they can be used for purification and structural analyses of
11 hydrogenase so as to define meaningful strategies to improve its tolerance to O₂ that is massively
12 produced by photosynthesis. As recent *in vitro* data suggested that hydrogenase can receive
13 electrons from not only NAD(P)H but also the well conserved (Cassier-Chauvat and Chauvat 2014)
14 ferredoxins (Gutekunst et al. 2014). It will be interesting to try to increase the hydrogenase activity
15 of the presently reported strains by overproducing each nine *Synechocystis* ferredoxins (Cassier-
16 Chauvat and Chauvat 2014). It will also be important to pay attention to the redox state of the
17 cysteine amino-acids of hydrogenase since those of HoxH and HoxF can be oxidized (Chardonnet
18 et al. 2015; Guo et al. 2014). This finding emphasizes on the importance of the crosstalks between
19 hydrogen production and redox (oxidative) stress (Cassier-Chauvat et al. 2014).

20 In conclusion, the presently reported cyanobacterial factories with a strong hydrogenase
21 activity and a healthy growth on urea will be very useful for the purification of large hydrogenase
22 quantities for biochemical and structural analyses, in order to better understand this important
23 enzyme and improve its tolerance to O₂. Such work has important implications for future cost-
24 saving industrial production of H₂ from solar energy, CO₂ and urea-polluted waters.

25

26 **Acknowledgements**

27 We thank Aurelia Czarnecka-Kwasiborski for technical assistance and Genevieve Guedeney
28 (BIAM CEA-Cadarache France) for the gift of the anti-HoxF and anti-HoxH antibodies.

29 **Appendix A. Supplementary data**

30 Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at

31

32 **Compliance with ethical standards**

33

1 **Funding** This study was supported by the CEA and ANR (ANR-09-BIOE- 002-01 ; project
2 EngineeringH2cyano). Théo Veaudor and Marcia Ortega-Ramos received a PhD fellowship from
3 CEA and ANR, respectively.

4
5 **Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

6
7 **Ethical approval** This article does not contain any studies with human participants or animals
8 performed by any of the authors.

9 10 **References**

- 11 Benkert P, Kunzli M, Schwede T (2009) QMEAN server for protein model quality estimation.
12 Nucleic Acids Res 37(Web Server issue):W510-4 doi:10.1093/nar/gkp322
- 13 Carrieri D, Wawrousek K, Eckert C, Yu J, Maness PC (2011) The role of the bidirectional
14 hydrogenase in cyanobacteria. Bioresour Technol 102(18):8368-77
15 doi:10.1016/j.biortech.2011.03.103
- 16 Carter EL, Flugga N, Boer JL, Mulrooney SB, Hausinger RP (2009) Interplay of metal ions and
17 urease. Metallomics : 1(3):207-21 doi:10.1039/b903311d
- 18 Cassier-Chauvat C, Chauvat F (2014) Function and Regulation of Ferredoxins in the
19 Cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803: Recent Advances. Life (Basel) 4(4):666-80
20 doi:10.3390/life4040666
- 21 Cassier-Chauvat C, Veaudor T, Chauvat F (2014) Advances in the function and regulation of
22 hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Int J Mol Sci 15(11):19938-51
23 doi:10.3390/ijms151119938
- 24 Chardonnet S, Sakr S, Cassier-Chauvat C, Le Marechal P, Chauvat F, Lemaire SD, Decottignies P
25 (2015) First proteomic study of S-glutathionylation in cyanobacteria. J Proteome Res
26 14(1):59-71 doi:10.1021/pr500625a
- 27 Collier JL, Brahamsha B, Palenik B (1999) The marine cyanobacterium *Synechococcus* sp.
28 WH7805 requires urease (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) to utilize urea as a nitrogen
29 source: molecular-genetic and biochemical analysis of the enzyme. Microbiol 145:447-459
- 30 Cournac L, Guedeney G, Peltier G, Vignais PM (2004) Sustained photoevolution of molecular
31 hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-
32 dehydrogenase complex. J Bacteriol 186(6):1737-46
- 33 Domain F, Houot L, Chauvat F, Cassier-Chauvat C (2004) Function and regulation of the
34 cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: LexA is critical to the survival of cells facing
35 inorganic carbon starvation. Mol Microbiol 53(1):65-80 doi:10.1111/j.1365-
36 2958.2004.04100.x
- 37 Dutheil J, Saenkham P, Sakr S, Leplat C, Ortega-Ramos M, Bottin H, Cournac L, Cassier-Chauvat
38 C, Chauvat F (2012) The AbrB2 autorepressor, expressed from an atypical promoter,
39 represses the hydrogenase operon to regulate hydrogen production in *Synechocystis* strain
40 PCC6803. J Bacteriol 194(19):5423-33 doi:10.1128/JB.00543-12
- 41 Eckert C, Boehm M, Carrieri D, Yu J, Dubini A, Nixon PJ, Maness PC (2012) Genetic analysis of
42 the Hox hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveals subunit
43 roles in association, assembly, maturation, and function. J Biol Chem 287(52):43502-15
44 doi:10.1074/jbc.M112.392407
- 45 Ferino F, Chauvat F (1989) A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium,
46 *Synechocystis* PCC6803. Gene 84(2):257-66

- 1 Freyermuth SK, Bacanamwo M, Polacco JC (2000) The soybean *Eu3* gene encodes an Ni-binding
2 protein necessary for urease activity. *Plant J* 21(1):53-60 doi:Doi 10.1046/J.1365-
3 313x.2000.00655.X
- 4 Germer F, Zebger I, Saggi M, Lenzian F, Schulz R, Appel J (2009) Overexpression, isolation, and
5 spectroscopic characterization of the bidirectional [NiFe] hydrogenase from *Synechocystis*
6 sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 284(52):36462-72 doi:10.1074/jbc.M109.028795
- 7 Guo J, Nguyen AY, Dai Z, Su D, Gaffrey MJ, Moore RJ, Jacobs JM, Monroe ME, Smith RD,
8 Koppelaar DW, Pakrasi HB, Qian WJ (2014) Proteome-wide light/dark modulation of thiol
9 oxidation in cyanobacteria revealed by quantitative site-specific redox proteomics. *Mol Cell*
10 *Prot* 13(12):3270-85 doi:10.1074/mcp.M114.041160
- 11 Gutekunst K, Chen X, Schreiber K, Kaspar U, Makam S, Appel J (2014) The Bidirectional NiFe-
12 hydrogenase in *Synechocystis* sp. PCC 6803 Is Reduced by Flavodoxin and Ferredoxin and
13 Is Essential under Mixotrophic, Nitrate-limiting Conditions. *J Biol Chem* 289(4):1930-7
14 doi:10.1074/jbc.M113.526376
- 15 Hoffmann D, Gutekunst K, Klissenbauer M, Schulz-Friedrich R, Appel J (2006) Mutagenesis of
16 hydrogenase accessory genes of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Additional homologues of
17 *hypA* and *hypB* are not active in hydrogenase maturation. *FEBS J* 273(19):4516-27
18 doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05460.x
- 19 Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ (2015) The Phyre2 web portal for
20 protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protoc* 10(6):845-58
21 doi:10.1038/nprot.2015.053
- 22 Khanna N, Lindblad P (2015) Cyanobacterial hydrogenases and hydrogen metabolism revisited:
23 recent progress and future prospects. *Int J Mol Sci* 16(5):10537-61
24 doi:10.3390/ijms160510537
- 25 Labarre J, Chauvat F, Thuriaux P (1989) Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic
26 resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J*
27 *Bacteriol* 171(6):3449-57
- 28 Mackerras AH, Smith GD (1986) Urease Activity of the Cyanobacterium *Anabaena Cylindrica*. *J*
29 *Gen Microbiol* 132:2749-2752
- 30 McGuffin LJ (2008) The ModFOLD server for the quality assessment of protein structural models.
31 *Bioinformatics* 24(4):586-7 doi:10.1093/bioinformatics/btn014
- 32 McIntosh CL, Germer F, Schulz R, Appel J, Jones AK (2011) The [NiFe]-Hydrogenase of the
33 Cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 Works Bidirectionally with a Bias to H₂-
34 Production. *J Am Chem Soc* 133(29):11308-11319 doi:Doi 10.1021/Ja203376y
- 35 Mermet-Bouvier P, Cassier-Chauvat C, Marraccini P, Chauvat F (1993) Transfer and replication of
36 RSF1010-derived plasmids in several cyanobacteria of the genera *Synechocystis* and
37 *Synechococcus*. *Curr Microbiol* 27:323-327
- 38 Mermet-Bouvier P, Chauvat F (1994) A conditional expression vector for the cyanobacteria
39 *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942
40 and PCC6301. *Curr Microbiol* 28(3):145-8
- 41 Ortega-Ramos M, Jittawuttipoka T, Saenkham P, Czarnecka-Kwasiborski A, Bottin H, Cassier-
42 Chauvat C, Chauvat F (2014) Engineering *Synechocystis* PCC6803 for hydrogen
43 production: influence on the tolerance to oxidative and sugar stresses. *Plos One* 9(2):e89372
44 doi:10.1371/journal.pone.0089372
- 45 Pieper U, Webb BM, Barkan DT, Schneidman-Duhovny D, Schlessinger A, Braberg H, Yang Z,
46 Meng EC, Pettersen EF, Huang CC, Datta RS, Sampathkumar P, Madhusudhan MS,
47 Sjolander K, Ferrin TE, Burley SK, Sali A (2011) ModBase, a database of annotated
48 comparative protein structure models, and associated resources. *Nucleic Acids Res*
49 39(Database issue):D465-74 doi:10.1093/nar/gkq1091
- 50 Puggioni V, Tempel S, Latifi A (2016) Distribution of Hydrogenases in Cyanobacteria: A Phylum-
51 Wide Genomic Survey. *Front Genet* 7:223 doi:10.3389/fgene.2016.00223

- 1 Rippka R, Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., and, Stanier R (1979) Generic assignments,
2 strains histories and properties of pure culture of cyanobacteria. J Gen Microbiol 111:1-61
- 3 Sakamoto T, Delgaizo VB, Bryant DA (1998) Growth on urea can trigger death and peroxidation of
4 the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. Appl Environ Microb 64(7):2361-
5 2366
- 6 Sakr S, Dutheil J, Saenkham P, Bottin H, Leplat C, Ortega-Ramos M, Aude JC, Chapuis V,
7 Guedeney G, Decottignies P, Lemaire SD, Cassier-Chauvat C, Chauvat F (2013) The
8 activity of the *Synechocystis* PCC6803 AbrB2 regulator of hydrogen production can be post-
9 translationally controlled through glutathionylation. Int J Hydrogen Energy 38:13547-13555
10 doi:10.1016/j.ijhydene.2013.07.124
- 11 Su J, Jin LL, Jiang Q, Sun W, Zhang FL, Li ZY (2013) Phylogenetically Diverse ureC Genes and
12 Their Expression Suggest the Urea Utilization by Bacterial Symbionts in Marine Sponge
13 *Xestospongia testudinaria*. Plos One 8(5) doi:UNSP e6484810.1371/journal.pone.0064848
- 14 Valladares A, Montesinos ML, Herrero A, Flores E (2002) An ABC-type, high-affinity urea
15 permease identified in cyanobacteria. Mol Microbiol 43(3):703-715 doi:Doi
16 10.1046/J.1365-2958.2002.02778.X
- 17 van Vliet AH, Kuipers EJ, Waidner B, Davies BJ, de Vries N, Penn CW, Vandenbroucke-Grauls
18 CM, Kist M, Bereswill S, Kusters JG (2001) Nickel-responsive induction of urease
19 expression in *Helicobacter pylori* is mediated at the transcriptional level. Infect Immun
20 69(8):4891-7 doi:10.1128/IAI.69.8.4891-4897.2001
- 21

Table S1. Characteristics of the plasmids used in this study

Plasmid use and name	Relevant feature(s)	Reference
Cloning and construction of various DNA cassettes		
pEX-A	Amp ^r cloning vector	Eurofins
pUC19	Amp ^r cloning vector	Invitrogen
pKNOCK-Gm	Gm ^r cloning vector	Addgen
pUC4K	Source of the Km ^r cassette without TT	Pharmacia
pFC1	Sm ^r /Spr ^r Replicating plasmid for temperature-regulated gene expression in cyanobacteria the strong lambda-phage pR promoter and associated ribosome binding site	(Mermet-Bouvier & Chauvat, 1994)
pFC1ΔcI ₈₅₇	Constitutive expression vector corresponding to pFC1 where the cI ₈₅₇ repressor gene was truncated after <i>PsiI</i> digestion & religation	This study
Targeted deletion of <i>ureC</i> and <i>hoxW</i> genes in <i>Synechocystis</i>		
pEX-A <i>ureC</i> up-dwn	pEX-A containing the upstream and downstream regions of the <i>Synechocystis ureC</i> gene (sl11750) spaced by a <i>SmaI</i> restriction site.	This study
pEX-A <i>ureC</i> ::Km ^r	pEX-A <i>ureC</i> up-dwn with the Km ^r marker cloned in the <i>SmaI</i> site. This plasmid allows to replace the <i>ureC</i> CS (its first 971 bp) by the Km ^r marker	This study
pEX-A <i>hoxW</i> up-dwn	pEX-A containing the upstream and downstream regions of the <i>Synechocystis hoxW</i> gene (slr1876) spaced by a <i>EcoRV</i> restriction site.	This study
pEX-A <i>hoxW</i> ::Km ^r	pEX-A <i>hoxW</i> up-dwn with the Km ^r marker cloned in the <i>EcoRV</i> site. This plasmid allows to replace the <i>hoxW</i> CS (its first 298 bp) by the Km ^r marker	This study
Cloning of <i>hoxW</i> behind the <i>Synechocystis hoxEFUYH</i> operon		
pUC- <i>hoxW</i> -Gm ^r -TT	pUC19 with the <i>hoxW</i> -Gm ^r -TT DNA cassette flanked by <i>Synechocystis</i> DNA regions mediating the integration of the <i>hoxW</i> -Gm ^r -TT DNA cassette behind <i>hoxH</i> (in place of the 23 bp region behind its stop).	This study
Constitutive overexpression of genes in <i>Synechocystis</i>		
pCE- <i>hypABCDEF</i>	Plasmid for high-level expression of the <i>hypABCDEF</i> genes in <i>Synechocystis</i>	(Ortega-Ramos et al., 2014)
pCE- <i>hoxW</i>	pFC1ΔcI ₈₅₇ with the <i>Synechocystis hoxW</i> gene (slr1876) cloned under the control of the strong lambda-phage pR promoter	This study
pCE- <i>ureG</i>	pFC1ΔcI ₈₅₇ with the <i>Synechocystis ureG</i> gene (sl10643) cloned under the control of the strong lambda-phage pR promoter	This study

CS, Protein Coding Sequence; Δ, deletion; TT, transcriptional terminator

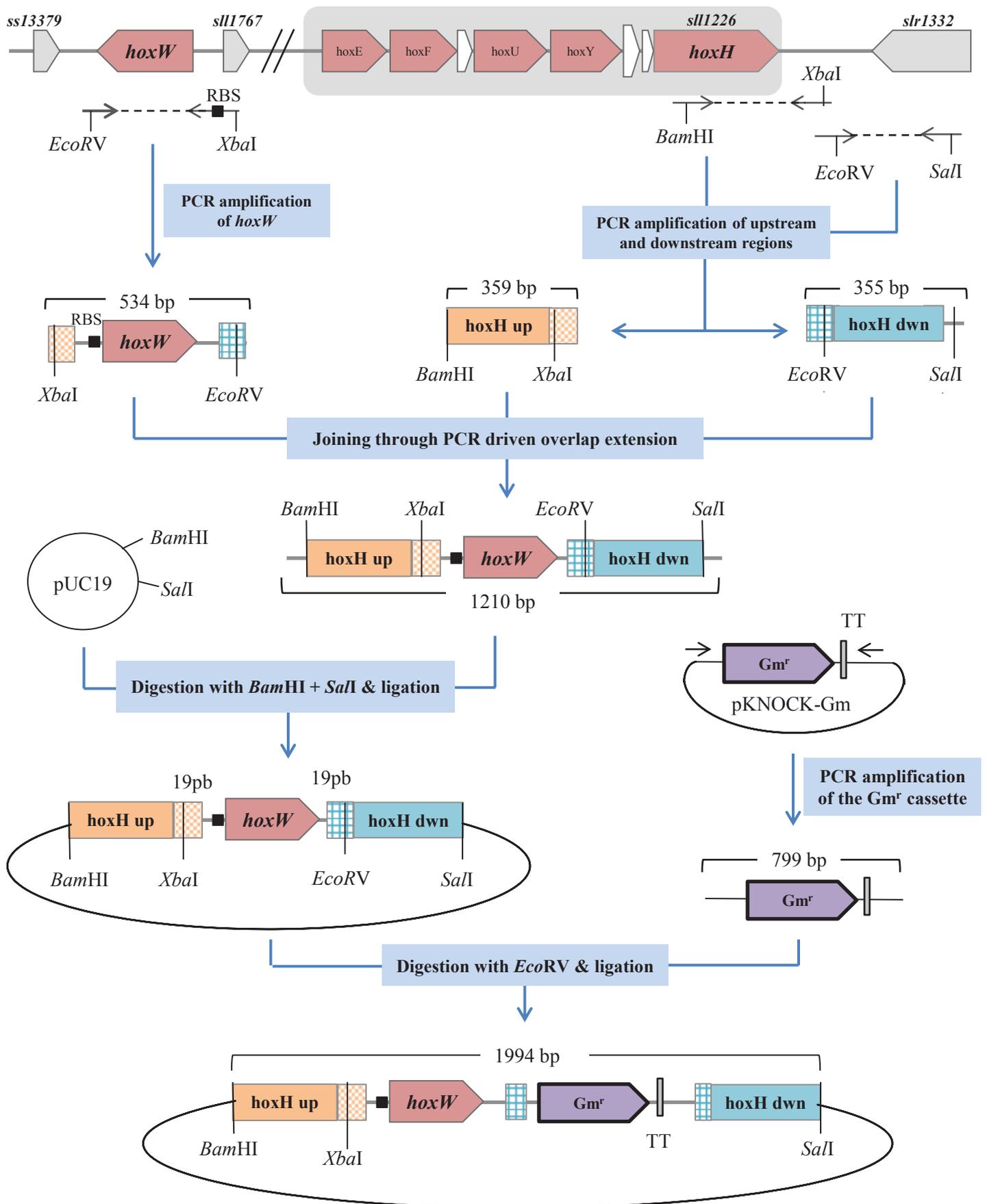
Supplementary Table S2 List of the PCR primers used in this study

Name	Sequence 5'→3'	Purpose
hoxH up <i>Bam</i> HI Fw	ATTAATGGATCCGAAGCGGTGGGAGTGAG	Amplification of the <i>hoxH</i> upstream region flanked by <i>Bam</i> HI and <i>Xba</i> I restriction sites
hoxH up <i>Xba</i> I Rv	GGTAATTTAGGGGTCTAGATTGTTTAA TCCCGCTGGATGGACT	
hoxH down <i>Eco</i> RV Fw	AGCCAAGGGATATCACAAAAACATTCAGACGGTC	Amplification of the <i>hoxH</i> downstream region flanked by <i>Eco</i> RV and <i>Sal</i> I sites
hoxH down <i>Sal</i> I Rv	TTTCCC GTCGACT TTTGTCCGCATTGAATCAGTTC	
hoxW SD <i>Xba</i> I Fw	TCTAGACCCCTAAATTACCC CAGCTGAGGAGGGAAAATTGAATGCC	Amplification of the <i>hoxW</i> CS with a <u>RBS</u> flanked by <i>Eco</i> RV and <i>Xba</i> I sites
hoxW <i>Eco</i> RV Rv	TTTGTGATATCCCTTGGCTTTATCTCTCCC	
Gm Fw	TGACATAAGCCTGTTCGG	Amplification of the Gm ^r cassette
Gm TT Rv	CTCGAATTGACGCGTCGGCC	
hox up <i>Bam</i> HI Fw	GGCATTGATAATGGATCCCTCGTAGGTCTAA	Assay of chromosome segregation in CE1 mutant
hoxE Rv	GCCAATACCGCTTCGTCATTCT	
hoxH up <i>Bam</i> HI Fw	ATTAATGGATCCGAAGCGGTGGGAGTGAG	Assay of chromosome segregation in CE4 mutants
hox dwn Rv bis	ACCGGACGTCAAGTCTCGTTGACAAAA	
Km <i>Hinc</i> II Fw	ACCTGCAGGGGG TTCGAC GGAAAGCCA C	Amplification of the Km ^r gene of pUC4K with a <i>Hinc</i> II site
Km <i>Hinc</i> II Rv	GGCGCTGAG GTTCGAC CTCGTGAAGAA G	
pEX-A Fw	GGAGCAGACAAGCCCGTCAGG	Verification of the Km ^r cassette in plasmids pEX-A <i>ureC</i> ::Km ^r and pEX-A <i>hoxW</i> ::Km ^r .
KmR9 Rv	CGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGT TGAATATGGCTC	
KmA9 Fw	GCTCTCATCAACCGTGGCTCCCTCACTT TCTGGCTGGATGATGGGGCG	Verification of the Km ^r cassette in plasmids pEX-A <i>ureC</i> ::Km ^r and pEX-A <i>hoxW</i> ::Km ^r .
pEX-A Rv	CAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC	
<i>ureC</i> a Fw	TCGCTGTCTAACTACCACCTTGA	Assay of chromosome segregation in Δ <i>ureC</i> ::Km ^r clones
<i>ureC</i> b Rv	CGTTTGCCAAGTACGACAGATAA	
hoxW a Fw	GATAGGTTTTGCGGACTGTGCTA	Assay of chromosome segregation in Δ <i>hoxW</i> ::Km ^r clones
hoxW b Rv	ATCTGGGCTAAGGCTTCGGCTT	
hoxW <i>Nde</i> I Fw	CCAGCTGGTTAACGAAAATCATATGCCAGGCCAAT	Amplification of <i>hoxW</i> with a <i>Nde</i> I restriction site before its ATG start codon
hoxW <i>Eco</i> RI Rv	AGCCTAACTTTTCAATTTTGAATTCCCC TTGGCTT	Amplification of <i>hoxW</i> with a <i>Eco</i> RI site downstream its stop codon
<i>ureG</i> <i>Nde</i> I Fw	CCTGTTAGTACCATTTAGTCATATGGCTCAAATC	Amplification of <i>ureG</i> with a <i>Nde</i> I site before its ATG start codon
<i>ureG</i> <i>Eco</i> RI Rv	TAAAAAGGCTCTTAAGCTTGAATTCAT TAACTTGC	Amplification of <i>ureG</i> with a <i>Eco</i> RI site downstream its stop

		codon
pFC1 p _R -AI Fw	GGCGACGTGCGTCCTCAAGC	Sequencing of the genes (coding sequences) cloned in pFC1-derived plasmids
pFC1 ReR1 Rv	GTGTAACAAGGGTGAACAC	
ureA seq Fw	AAAGCATCGTCGCCAAAGCAGTGAT	Verification of the <i>ureA</i> gene and 200 bp flanking regions
ureA seq Rv	GGCTAGGCAGTCTCGATAACAGTTCGT	
ureB seq Fw	AGTGTGGCTTTGGGGAGTATCTTCGT	Amplification and sequence of the <i>ureB</i> gene and 200 bp flanking regions
ureB seq Rv	ACCAAATCATTTCCTCAAAGCCAACCTGC	
ureC seq Fw	GCTGAGATTCAAAGTTTTTCGCACCCAA C	Amplification and sequence of the <i>ureC</i> gene and 200 bp flanking regions
ureC seq Rv	TTGTAATCCTTGACGCAACCAATCGC	
ureD seq Fw	TTGGTCACCTAGAACGATTGGATGC	Amplification and sequence of the <i>ureD</i> gene and 200 bp flanking regions
ureD seq Rv	AACCAGTTAGATAAAGTTCGGCAAAGC T	
ureE seq Fw	AATCGGGACAGTATCCGCAAGTTAC	Amplification and sequence of the <i>ureE</i> gene and 200 bp flanking regions
ureE seq Rv	CTGAGGTTGGGAGGATTGAGGTTTGAT T	
ureF seq Fw	CTCTGTTGTTGGAGGTATTCACCGATCT	Amplification and sequence of the <i>ureF</i> gene and 200 bp flanking regions
ureF seq Rv	CTGTAACAGTAGCAGTCATAGGATGAG GT	
ureG seq Fw	ATCTGATAGTGAGGCTTAGGGAGTTCA	Amplification and sequence of the <i>ureG</i> gene and 200 bp flanking regions
ureG seq Rv	TTATCAGCAGCTTGTTGACTGTCGGT	
rnpB qPCR Fw	GTGAGGACAGTGCCACAGAA	qPCR assay of <i>rnpB</i> expression
rnpB qPCR Rv	GGCAGGAAAAAGACCAACCT	
rrnA qPCR Fw	CACACTGGGACTGAGACAC	qPCR assay of <i>rrnA</i> expression
rrnA qPCR Rv	CTGCTGGCACGGAGTTAG	
hoxW qPCR Fw	TATTTCCACCCATCAACTCA	qPCR assay of <i>hoxW</i> expression
hoxW qPCR Rv	ATTTTAGCCAGGGTCAAGAG	
ureA qPCR Fw	CAAACCTCAACTATCCCGAAGCC	qPCR assay of <i>ureA</i> expression
ureA qPCR Rv	GTCACCAGTTTAGTGCCATCG	
ureB qPCR Fw	TCAAGTGGGTTCCCATACCAT	qPCR assay of <i>ureB</i> expression
ureB qPCR Rv	CACCAAGCCATTGAAGCCATAG	
ureC qPCR Fw	GTCAAAGCTGATGTGGGCATTA	qPCR assay of <i>ureC</i> expression
ureC qPCR Rv	TAAGGCCGTTTCAATCTGTTGG	
ureD qPCR Fw	CGGCGGGAAAGATTTATCGTAG	qPCR assay of <i>ureD</i> expression
ureD qPCR Rv	AAACGGACAATTTCCCAACCTT	
ureE qPCR Fw	GATAAACCTGGCTTTCCGTCTC	qPCR assay of <i>ureE</i> expression
ureE qPCR Rv	CACATGGCGATTACCCAAATGA	
ureF qPCR Fw	GACACAGCCATTATGGTTCGAG	qPCR assay of <i>ureF</i> expression
ureF qPCR Rv	TGCACAGTAGGCTCTAAATCCA	
ureG qPCR Fw	GGGAGATAATTTAGCAGCCACC	qPCR assay of <i>ureG</i> expression
ureG qPCR Rv	TTTGCATCCCGATCCATGATTC	

The restriction sites are written in bold letters; CS, coding sequence; RBS, ribosome binding site. Fw and Rv in the primers names stand for “forward” and “reverse”, respectively

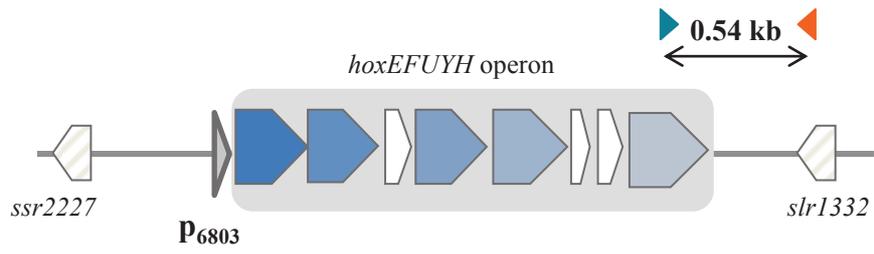
Organization of the *Synechocystis* chromosome around the *hoxEFUYH* operon



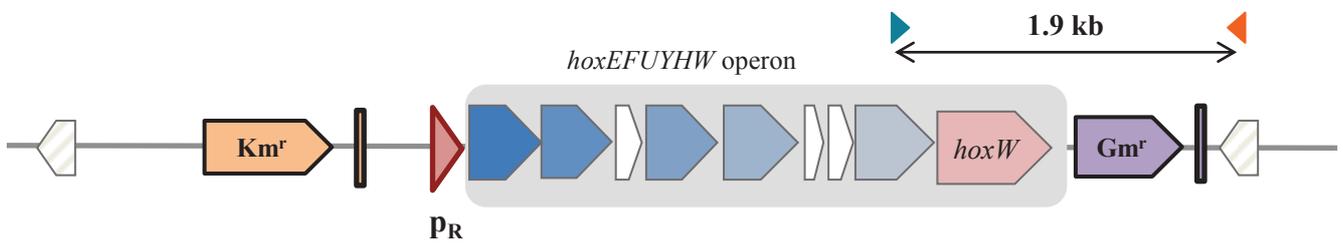
Supplementary Fig. S1 Construction of the *hoxW*-Gm^r DNA cassette for cloning *hoxW* behind *hoxH*, the last gene of the *hoxEFUYH* operon. The genes are represented by large arrows pointing towards the direction of their transcription. The black square indicates the ribosome binding site introduced in front of the *hoxW* coding sequence. The grey rectangle noted TT designates the transcription and translation stop signals (TT), which prevent read-through of gene expression from the Gm^r marker. The *hoxH*-up and *HoxH*-dwn DNA regions served as platform for homologous recombinations that occurred during transformation and led to the introduction of the *hoxW*-Gm^r DNA cassette behind the *hoxEFUYH* operon.

A

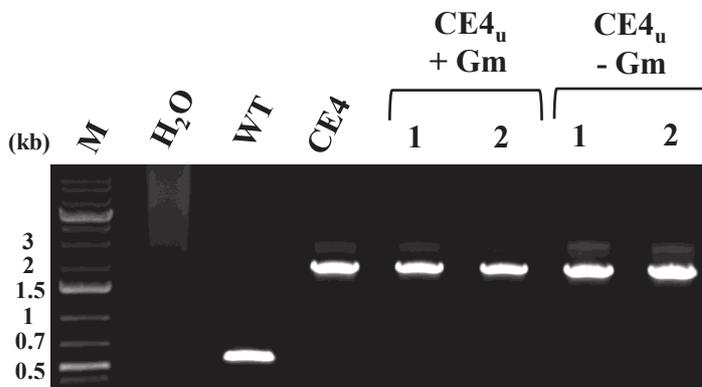
WT chromosome



CE4 chromosome



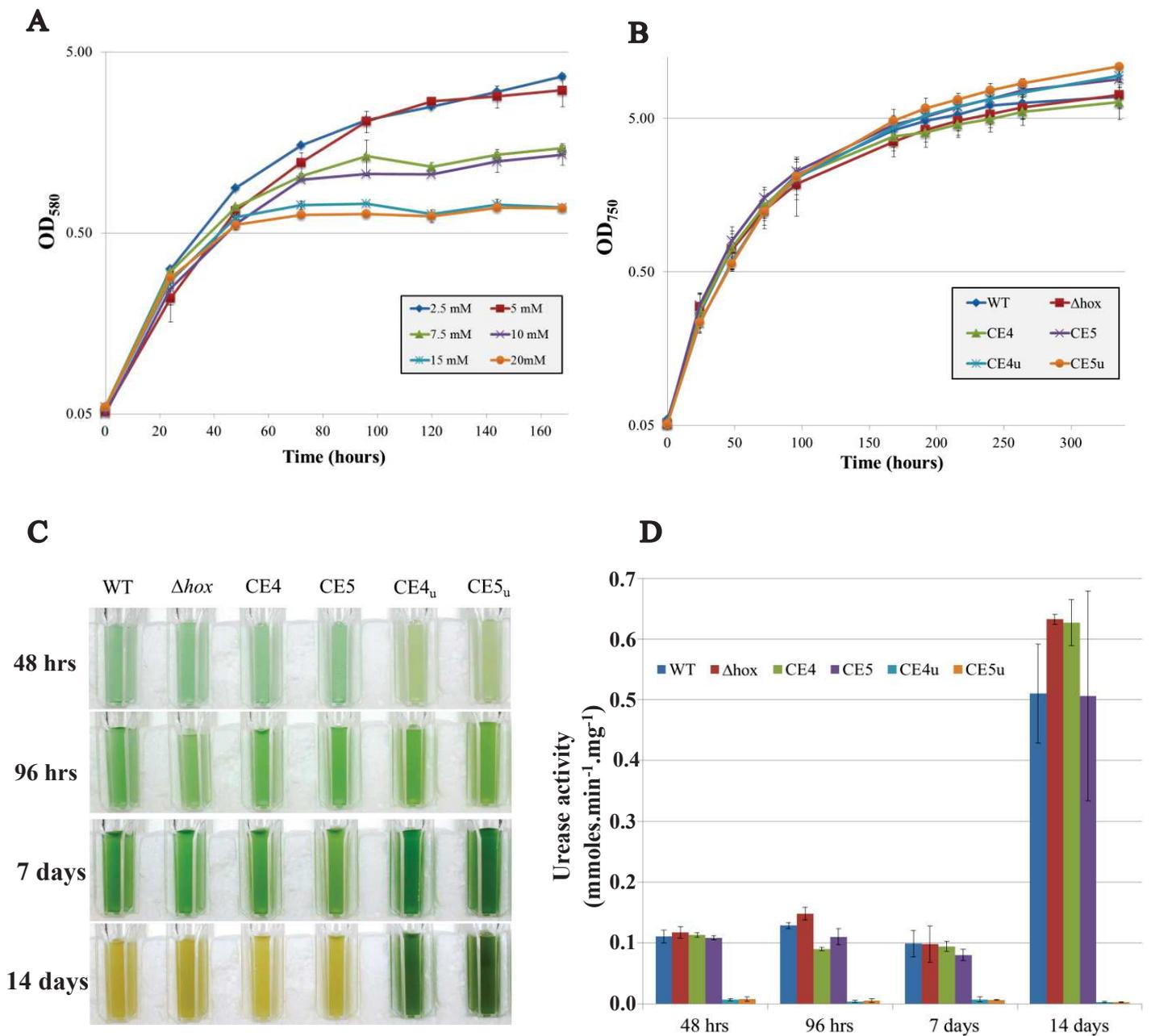
B



Primers used for PCR

- ▶ hoxH up *Bam*HI Fw
- ◀ hox dwn Rv bis

Supplementary Fig. S2. PCR verification of the *CE-hoxEFUYHW* mutant (CE4) for strong constitutive expression of the *hoxEFUYHW* genes. **(A)** Schematic representation of the *hoxEFUYH* operon in the WT strain and the CE4 mutant (*CE-hoxEFUYHW*) which harbors the Km^r - λp_R DNA cassette in place of the weak promoter of the *hoxEFUYH* operon, and the *hoxW*- Gm^r DNA cassette behind the *hoxEFUYH* operon. The oligonucleotides primers represented by small colored triangles (Table S2) served for the PCR verifications indicated by double arrows. **(B)** UV-light image of the agarose gel showing the 0.54 kb and 1.9 kb PCR DNA products typical of the WT strain and the CE4 mutant, respectively. Marker (M) = GeneRuler™ 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). The lane noted H₂O correspond to a negative control with no DNA-template.



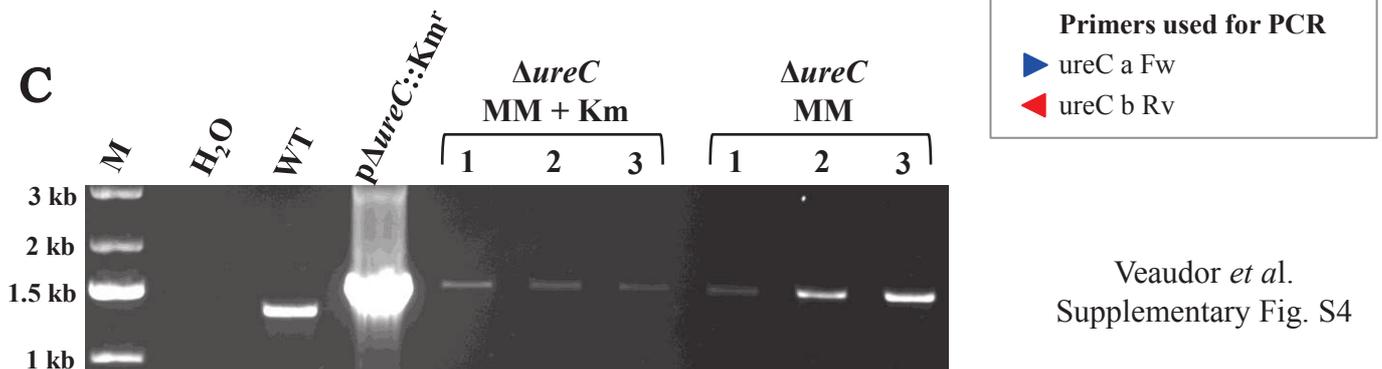
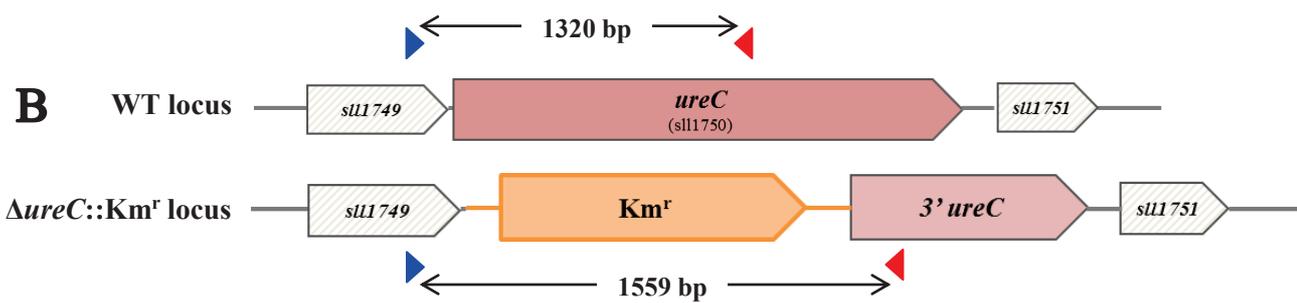
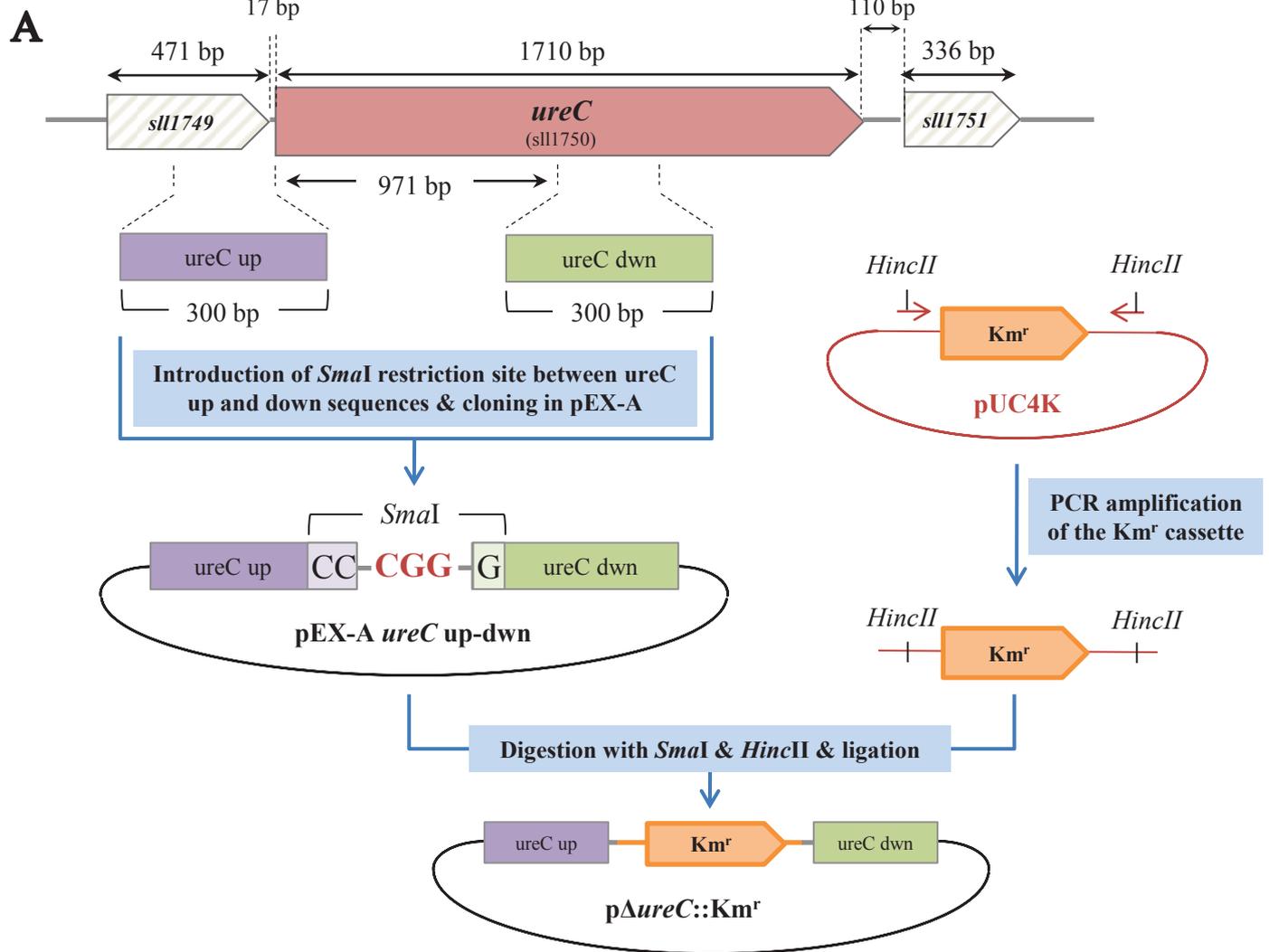
Veaudor *et al.* Supplementary Fig. S3

Supplementary Fig. S3. Influence of urea on the growth of *Synechocystis* WT and mutants overexpressing the *hoxEFUYHW* genes alone (CE4) or in combination with the *hypABCDEF* genes (CE5).

All experiments were performed at least three times.

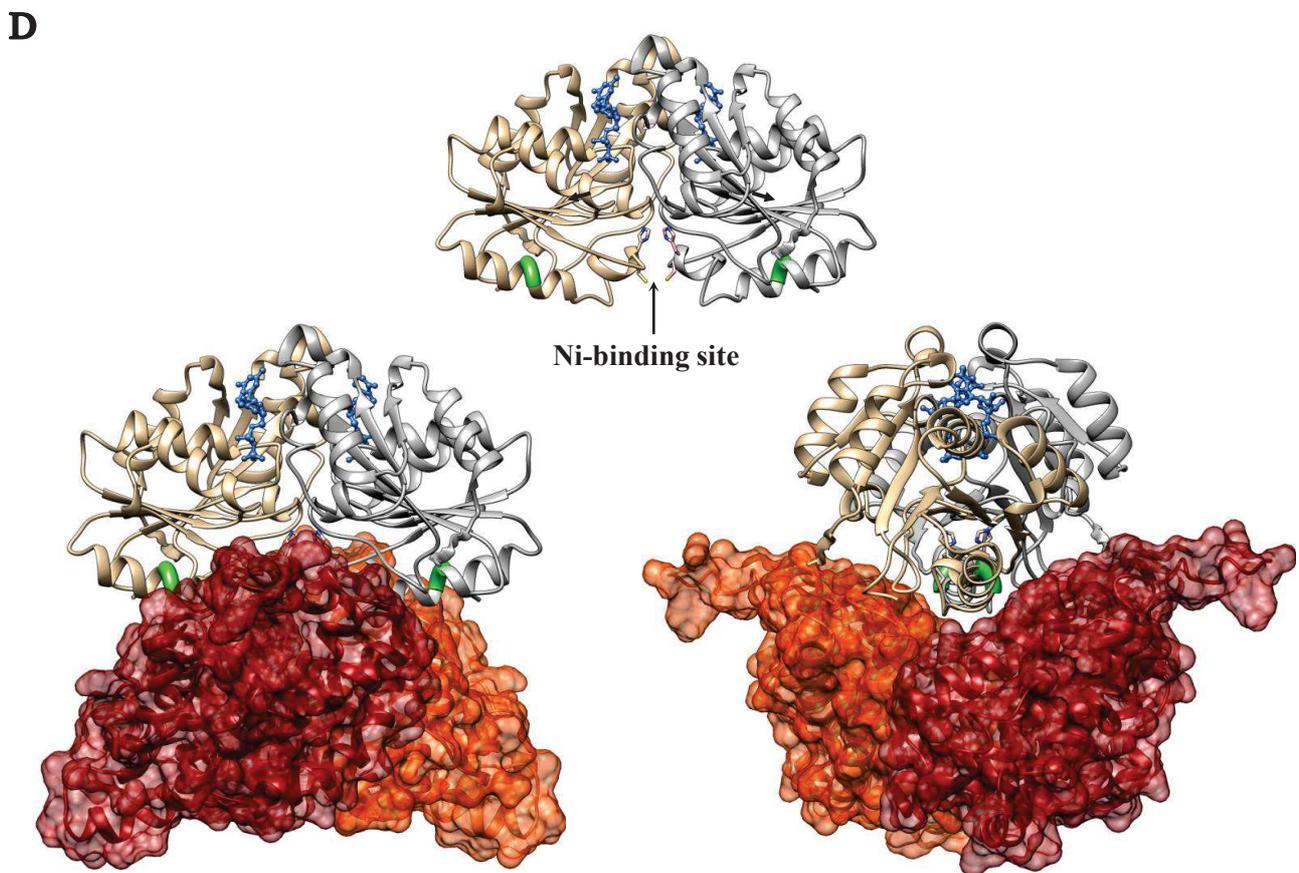
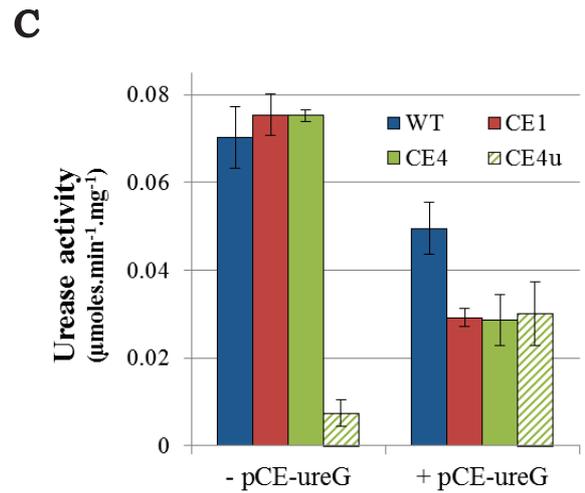
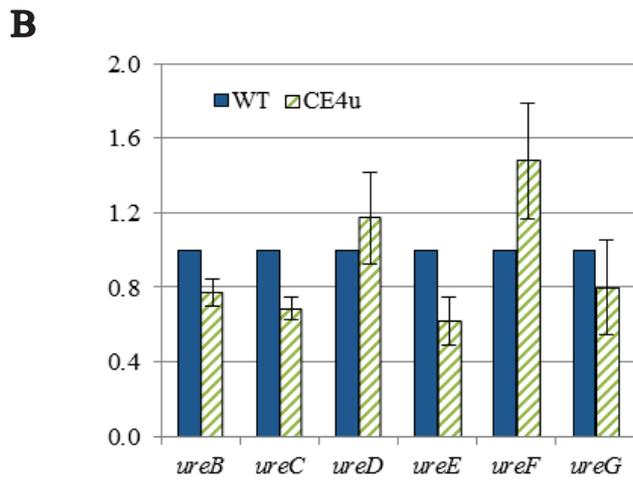
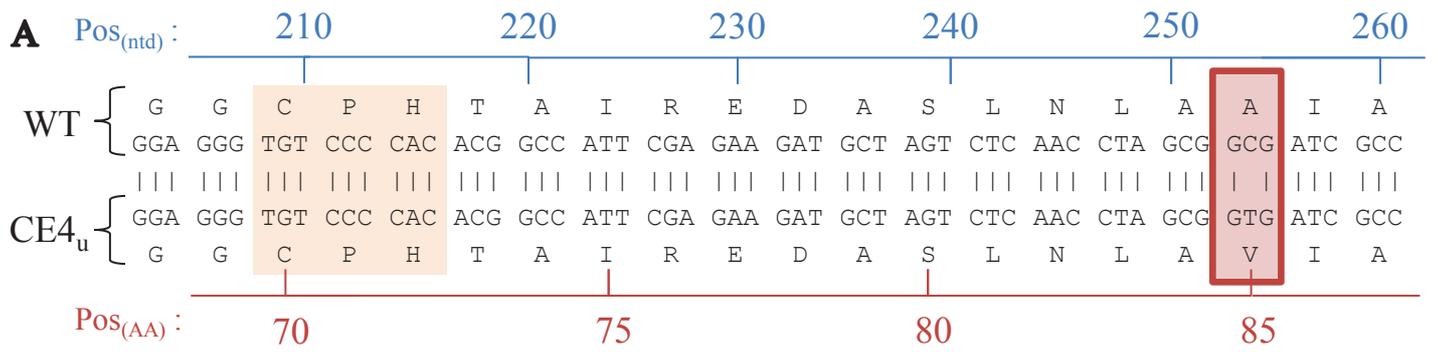
(A) Typical growth of WT cells cultivated on medium containing Ni (1 μ M) and urea (2.5-20 mM) as the sole nitrogen source. (B) Typical growth on urea (5 mM as the sole nitrogen source) and Ni (2.5 μ M) of the WT strain, and the CE4 and CE5 strain without or with (CE4u and CE5u) a mutation in *ureC*. Influence of prolonged growth on urea (5 mM as the sole nitrogen source) and Ni (2.5 μ M) on the typical appearance (C) and urease activity (D) of the studied strains.

Organization of the *Synechocystis* genomic region around the *ureC* gene



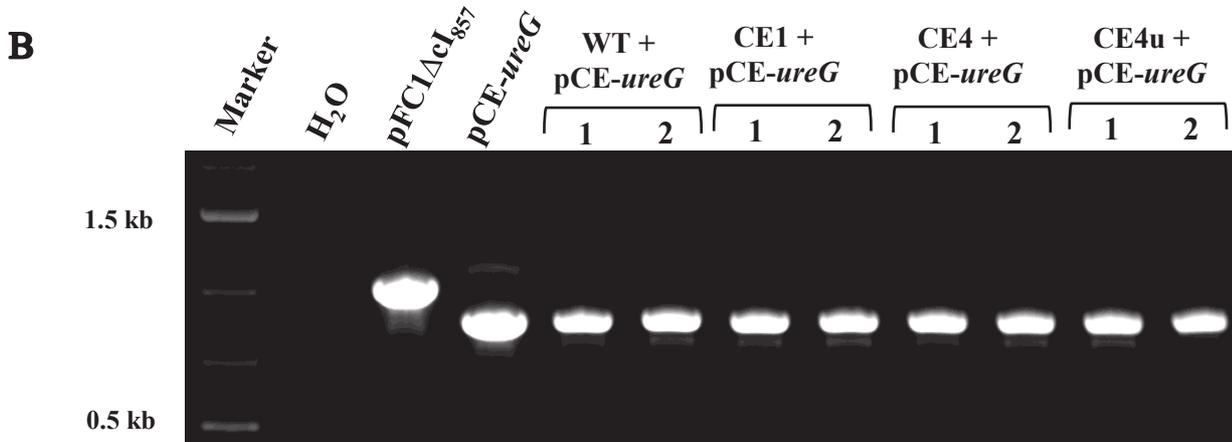
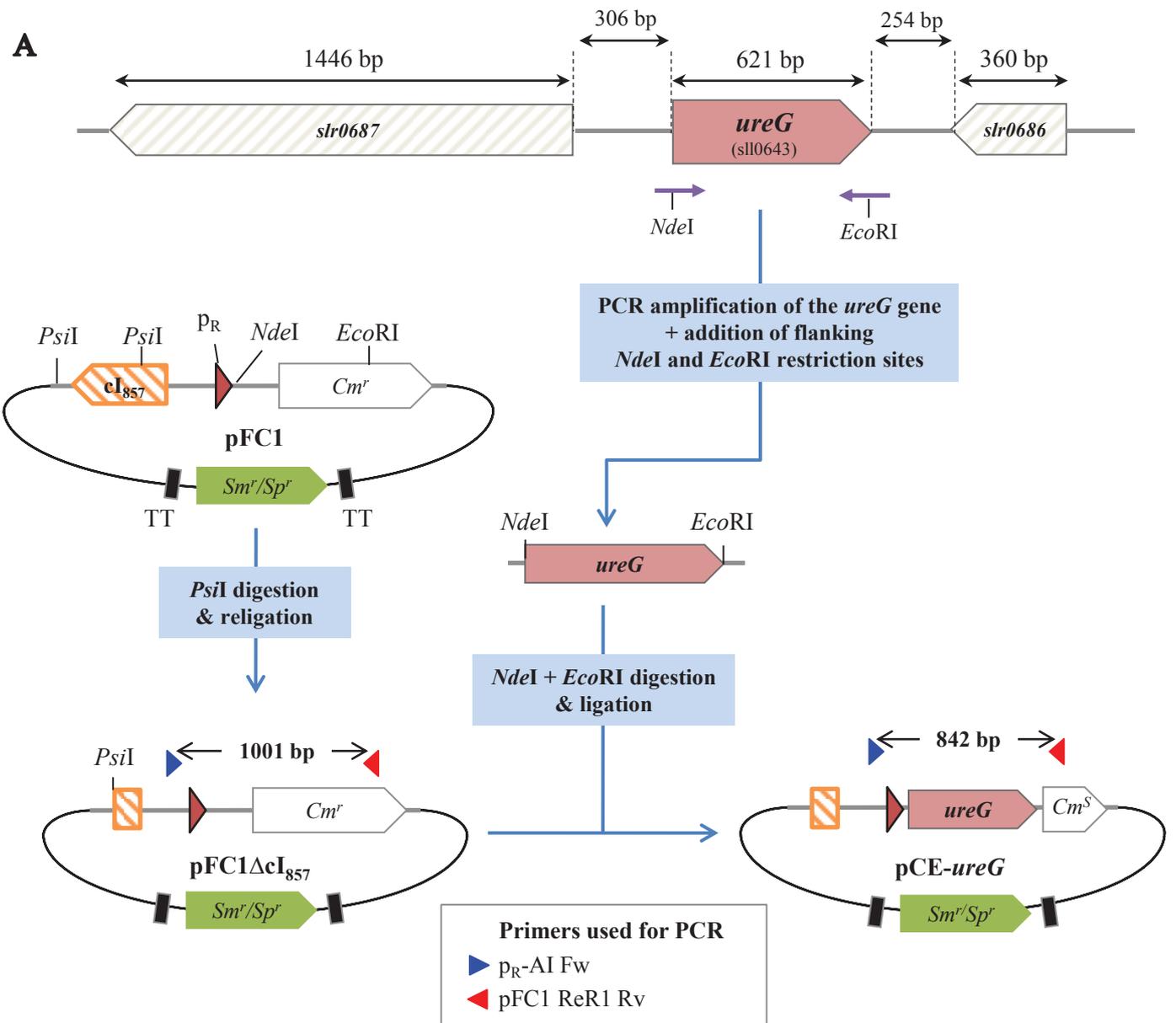
Veaudor *et al.*
Supplementary Fig. S4

Supplementary Fig. S4. Inactivation of the *ureC* gene. (A) Construction of the $\Delta ureC::Km^r$ DNA cassette. The genes are represented by large arrows pointing towards the direction of their transcription. The *ureC*-up and *ureC*-dwn DNA regions served as platform for homologous recombinations promoting the targeted replacement of *ureC* by the Km^r gene, upon transformation to *Synechocystis*. (B) Schematic representation of the *ureC* locus in the wild-type strain (WT) and the $\Delta ureC::Km^r$ mutant, which harbors the Km^r marker in place of the first 971 bp of the *ureC* coding sequence. The blue and red triangles represent the oligonucleotides primers that generated the PCR DNA segments (double arrows) typical of the WT strain or the $\Delta ureC::Km^r$ mutant. (C) UV-light image of the agarose gel showing the PCR products typical of the chromosome organization in the WT strain and the $\Delta ureC::Km^r$ mutant growing in standard conditions. Marker (M) = GeneRuler™ 1Kb plus DNA Ladder (Fermentas). The lane noted H₂O served as a negative control (no DNA template) while pEX-*A ureC::Km^r* served as a positive control for the three $\Delta ureC::Km^r$ mutants clones cultivated in the presence (MM + Km) or absence (MM) of kanamycin.



Supplementary Fig. S5. Influence of the spontaneous single mutation in *ureG* coding sequence (A85V) of the CE4 clone (termed CE4u) on the expression of the urease genes and urease activity. **(A)** Positions of the nucleotide (blue) and amino-acids (red) sequence of the relevant part of *ureG* showing the mutation (red rectangle) and the conserved nickel binding site (orange rectangle). **(B)** Histogram representation of the transcript abundance (RT-qPCR) of the urease genes in the WT strain (blue rectangles) and CE4u (hatched-green bars) mutant. **(C)** Urease activity of the WT, CE1, CE4 and CE4u strains (blue, red, green and hatched-green rectangles, respectively) lacking (noted as -) or containing (+) the pCE-*ureG* replicative plasmid that overexpresses ureG. **(D)** Structural models of the *Synechocystis* urease accessory proteins (chaperones) UreG and UreF. Subunits of the UreG dimer (top) are represented in their GDP-bound form and colored in light brown and grey, respectively. The mutated A85 residues are highlighted by thick green coils while GDP molecules are depicted in blue. Nickel-binding residues (Cys and His) are represented as sticks. Black arrows point to the G64 residues (Ni binding site). Front (bottom left) and side (bottom right) views of the UreG dimer interacting with the UreF subunits, colored in orange and red.

Organization of the *Synechocystis* genomic region containing *ureG*



Supplementary Fig. S6. Construction of the pCE-*ureG* plasmid for strong expression of the *ureG* gene. **(A)** Schematic representation of the *Synechocystis* chromosome region harboring *ureG*. The genes are represented by large arrows pointing towards the direction of their transcription. The pFC1 expression vector (Mermet-Bouvier & Chauvat, 1994) was digested by *PsiI* and religated to inactivate the λcI_{857} repressor gene, which normally controls the otherwise strong and constitutive λp_R promoter (red triangle) yielding the pFC1 ΔcI_{857} (also called pCE). Meanwhile *ureG* was amplified with oligonucleotide primers that introduced a *NdeI* site (embedding its ATG start codon) and an *EcoRI* site (behind its stop codon). After *NdeI/EcoRI* double digestion *ureG* was cloned between the *NdeI* and *EcoRI* sites of pCE, yielding the pCE-*ureG* plasmid. **(B)** UV-light image of the agarose gel showing the PCR products typical of the pCE-*ureG* plasmid replicating in the WT, CE1, CE4 and CE4u strains. Marker (M) = GeneRuler™ 1Kb plus DNA Ladder (Fermentas). The lane noted H₂O served as a negative control (no DNA template) while those noted pFC1 ΔcI_{857} and pCE-*ureG* served as a positive control of the presence of the corresponding plasmid in the studied *Synechocystis* strains (two clones analyzed in every case).

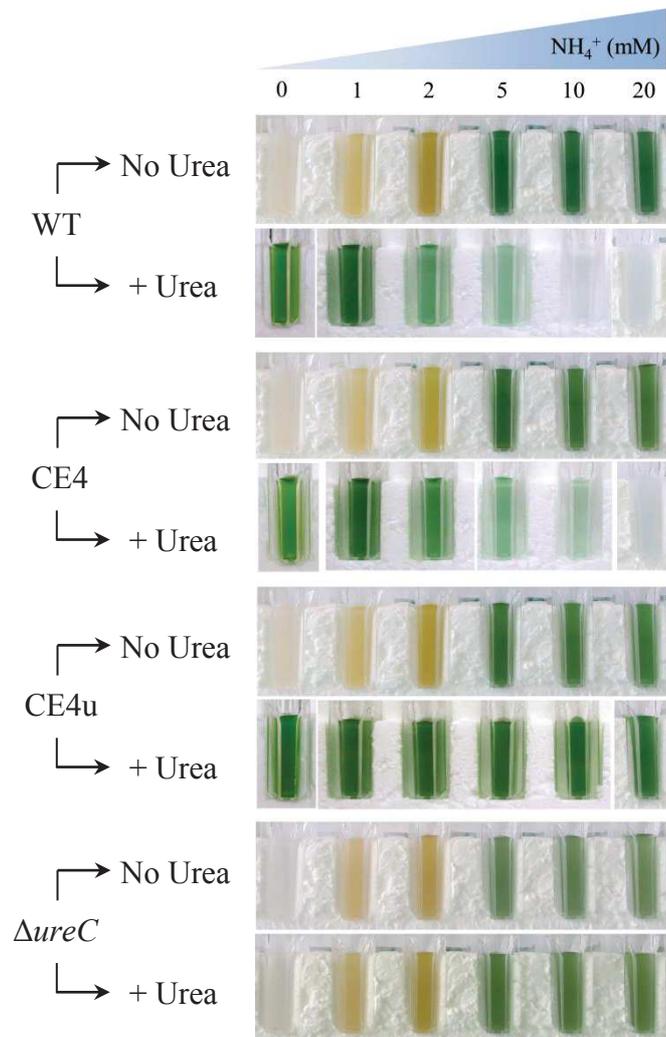


Figure 56: Analysis of urea and ammonia cross-effects on growth of urease mutants

Pictures of WT, CE4, CE4u and $\Delta ureC$ strains after 7 days of incubation in MM*_{-NO₃} medium supplemented with 5 mM urea and 2.5 μ M Ni combined with increasing ammonia concentrations (0-20 mM).

B. Résultats complémentaires et discussion

Les travaux précédemment publiés ont montré que la toxicité de l'urée chez *Synechococcus* PCC7002 provient de la peroxydation des lipides et est associée à la production et l'excrétion d'ions NH_4^+ [303]. Les auteurs ont également montré qu'un mutant dépourvu d'activité uréase était insensible aux effets de l'urée dans cet organisme. J'ai donc utilisé une approche similaire pour étudier le phénotype des mutants CE4, CE4u et $\Delta ureC$ en présence d'urée seule ou combinée à des concentrations croissantes de NH_4^+ (Figure 56).

Les résultats montrent qu'en présence des deux substrats, la WT et le mutant CE4 subissent une dépigmentation proportionnelle à la concentration en NH_4^+ , qui est totale à partir de 10 mM. Par ailleurs, le NH_4^+ seul ne produit pas cet effet, sauf à faibles concentrations (≤ 2 mM) où il est probablement limitant pour la croissance. En accord avec les résultats obtenus chez *Synechococcus* PCC7002, le mutant $\Delta ureC$ de *Synechocystis* est insensible à la combinaison des deux nutriments. Le mutant CE4u est capable de croître aux dépens de l'urée mais résiste à ces effets croisés observés dans les contrôles WT et CE4. Or ce mutant possède une activité uréase réduite qui limite la production intracellulaire de NH_4^+ .

Ces observations sont en accord avec le modèle proposé chez *Synechococcus* PCC7002 qui suggère qu'en présence d'urée, la production d'ammonium peut excéder sa consommation par les cellules. Lorsqu'il s'accumule, il pourrait indirectement engendrer des dommages oxydatifs (acidification du cytoplasme) et perturber la photosynthèse [304]. Ainsi, une réduction ou une perte de l'activité uréase neutralise ces effets. Ceci est particulièrement intéressant pour des mutants comme les nôtres qui pourraient être cultivés à grande échelle aux dépens de l'urée sans en subir les effets toxiques.

De plus, j'ai approfondi l'analyse de nos divers mutants CE4 et CE5 (avec et sans mutation *ureG*) au cours de leur croissance en présence d'urée uniquement (Figure 57).

Tout d'abord, les spectres d'absorbance des souches possédant une activité uréase identique à la WT varie globalement peu (Figure 57-A). On observe néanmoins une diminution progressive des pics correspondant à la phycocyanine (618 nm) et à la chlorophylle (660 nm) à partir de 7 jours de culture, en ligne avec les résultats publiés (Figure S3-C). Les souches CE4u et CE5u présentent quant à elle une variation considérable de leur contenu en pigments au cours du temps. Après 24 heures de culture, ces souches présentent une légère baisse du contenu en phycocyanine et une augmentation de la quantité de caroténoïdes. Cette dernière se poursuit dans les deux mutants jusqu'à 96 heures, où elle

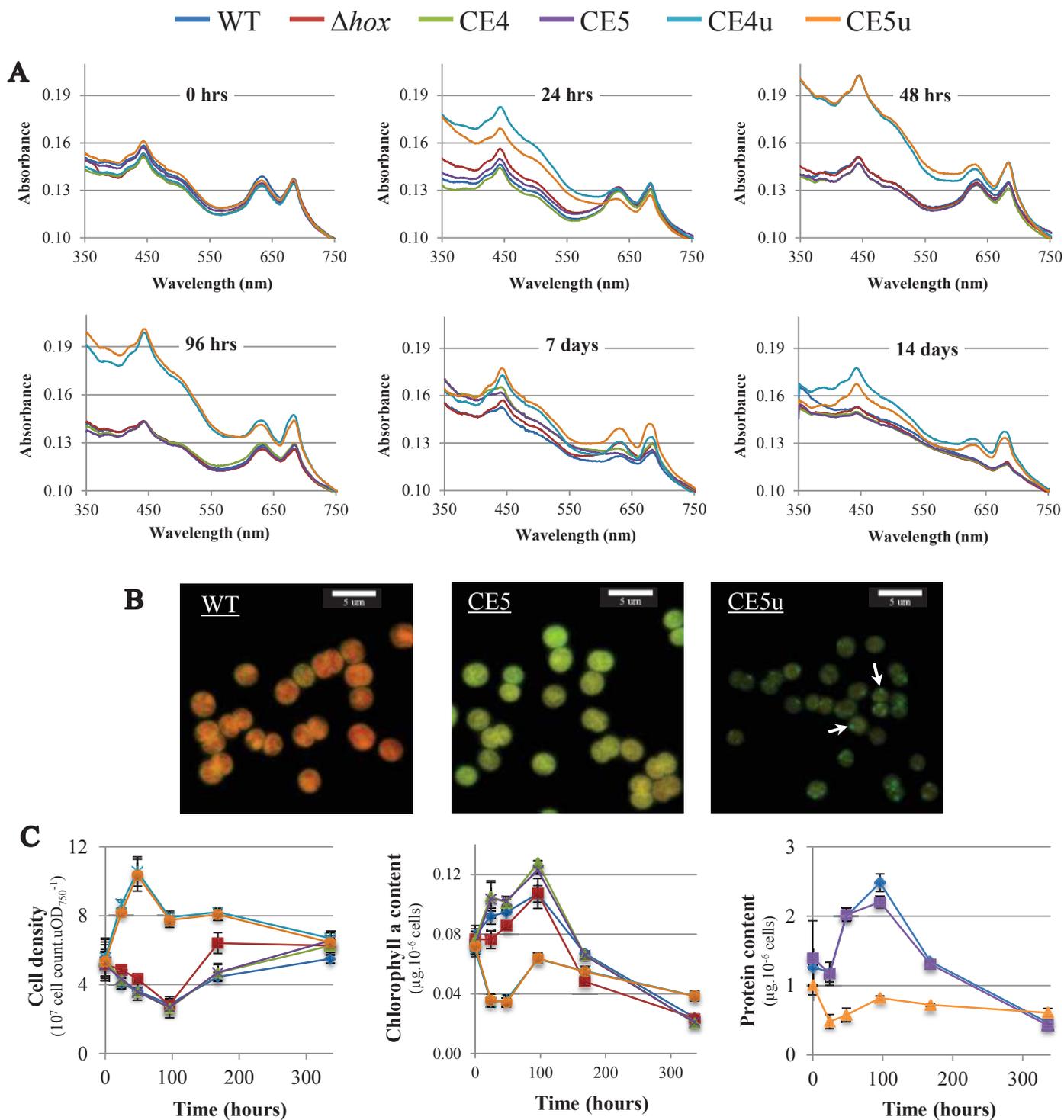


Figure 57: Phenotypic analysis of our hydrogenase mutants during urea-sustained growth

- A. Spectra analysis of WT, Δhox , CE4, CE5, CE4u and CE5u strains after 0 hours, 24 hours, 48 hours, 96 hours, 7 days and 14 days incubation on urea medium. All samples ($N = 2$) were resuspended at $OD_{750} = 0.1$.
- B. Fluorescence imaging of intracellular PHB granules stained with Nile Red (see material and methods) after 24 hours cultivation on urea medium ($+2.5 \mu\text{M Ni}$). Scale bars = $5 \mu\text{m}$. PHB granules are shown by white arrows.
- C. Cell density (left), chlorophyll a content (middle) and protein content (right) of WT, Δhox , CE4, CE5, CE4u and CE5u strains during growth on urea medium supplemented with $2.5 \mu\text{M Ni}$. Error bars represent the mean SD for all samples ($N \geq 3$).

atteint son maximum. A ce même temps, on observe un léger décalage du pic de la chlorophylle à 660 nm qui suggère une accumulation de IsiA, une protéine du mécanisme de photoprotection du photosystème I (antenne auxiliaire, voir Introduction, Chapitre II, B.2). A partir de 7 jours, leur contenu en pigments diminue mais reste nettement supérieures à ceux des souches possédant une activité uréase comparable à la WT.

La modification initiale du contenu en pigments (jaunissement) des souches portant la mutation *ureG* et leur faible activité uréase m'ont conduit à étudier leur statut C/N. Pour cela, un marquage des PHB a été réalisé après 24 heures de culture (Figure 57-B). Les résultats montrent que le mutant CE5u produit des granules de PHB alors que son homologue CE5 n'en accumule pas. De plus, les cellules du mutant CE5u sont environ 2 fois plus petites que la WT et le CE5. Lorsque l'activité uréase est réduite, le mutant CE5u semble donc subir une carence d'azote lors des premiers jours de culture. La restauration du contenu en phycocyanine à partir de 48 heures suggère que cette carence se dissipe rapidement, bien que cela n'ait pas été vérifié à l'aide de ce même marquage.

Etant donné les impacts physiologiques de la carence d'azote (dépigmentation, réduction de la taille des cellules et du contenu en protéines...), j'ai également quantifié divers paramètres lors d'une culture en milieu urée (Figure 57-C). Les mesures effectuées montrent que la densité cellulaire (nombre de cellules par unité de DO) des mutants CE4u et CE5u est presque doublée après 48 heures de culture, ce qui est concordant avec une baisse du diamètre cellulaire. Celle-ci diminue ensuite progressivement jusqu'à atteindre un niveau comparable au temps initial après 14 jours. Inversement, les souches dont l'activité uréase est préservée présentent tout d'abord une baisse de ce ratio, possiblement associé à une légère augmentation de la taille des cellules, qui est progressivement restauré.

Les contenus en chlorophylle a et en protéines suivent globalement la même évolution au cours du temps. Dans les souches contrôles (WT, Δhox , CE4 et CE5), ils augmentent jusqu'à atteindre leur maximum à 96 heures (phase de transition) puis diminuent graduellement à partir de 7 jours. Les mutants CE4u et CE5u en revanche montrent une forte réduction (environ 50%) de ces contenus à 48 heures. Ils augmentent sensiblement à 96 heures mais diminuent à nouveau à partir de 7 jours.

Mes résultats indiquent que le phénotype des mutants possédant une activité uréase réduite est très dynamique lors d'une culture en présence d'urée. Les différentes conclusions

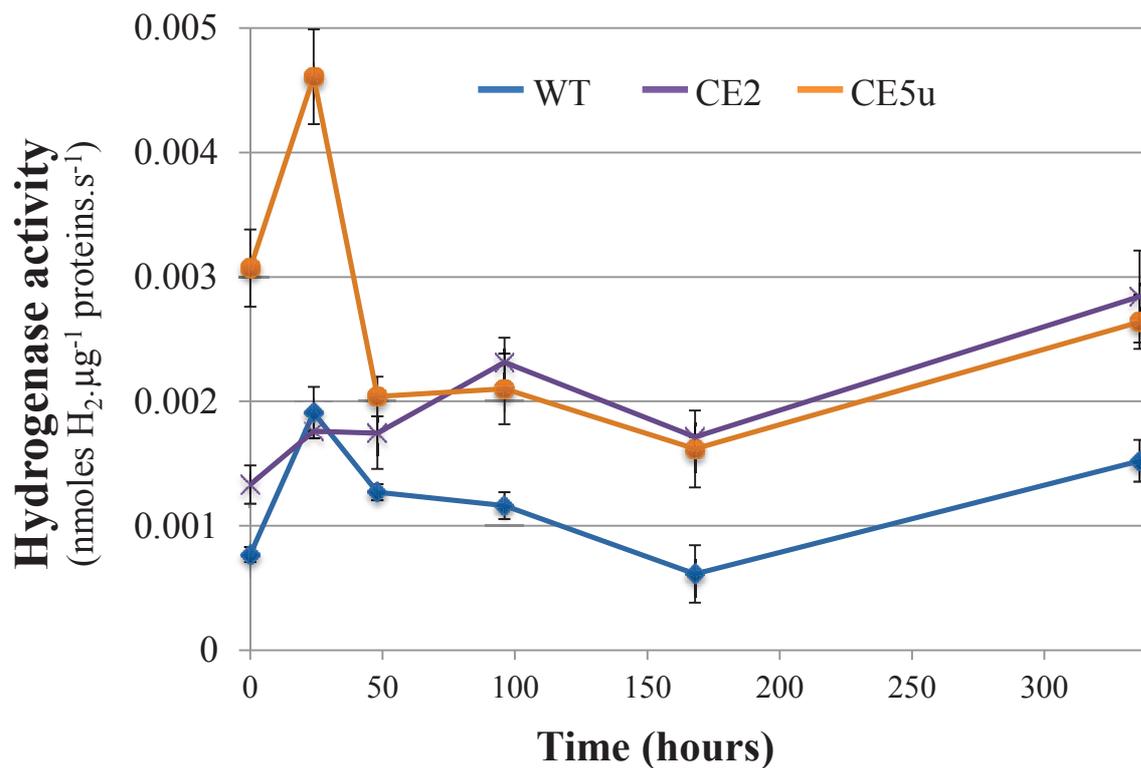


Figure 58: Time-course measurements of hydrogenase activities during growth on urea medium.

Hydrogenase activity assays obtained at different time during growth of WT, CE2 and CE5u strains on urea medium supplemented with 2.5 μM Ni. Hydrogen production was measured after resuspension of frozen cell pellets followed by a 30 minutes anaerobic incubation as described in material and methods. Error bars represent the mean SD for all samples (N = 2-4).

tirées suggèrent que, jusqu'à environ 96 heures, ces mutants se développent tout en étant limité par l'assimilation de l'azote. Au-delà de 7 jours, ils semblent entrer en phase stationnaire mais finissent néanmoins par produire d'importantes quantités de biomasse et conservent une pigmentation verte prononcée (Figures S3-B et C).

J'ai mesuré la quantité d'hydrogénase active dans le mutant CE5u en me basant sur le contenu en protéine plutôt que le nombre de cellules (Figure 58). En effet, bien que ce paramètre varie au cours du temps, il est plus fiable que le nombre de cellules pour estimer la biomasse et surtout l'activité métabolique. Les résultats ainsi obtenus montrent que le CE2 (surexpression de l'opéron *hox* et des gènes *hyp*) possède environ deux fois plus d'hydrogénase active que la WT mais que leurs activités respectives varient peu au cours de la culture sur milieu urée. Le mutant CE5u en revanche présente un fort enrichissement de l'activité hydrogénase après 24 heures de culture. Celui-ci diminue rapidement à un niveau comparable au CE2, dont il ne se distingue plus jusqu'à 14 jours (x2 par rapport à la WT).

Ces observations confirment que la mutation *ureG* semble avoir peu d'impact sur l'activité hydrogénase de nos mutants et que ceux-ci conservent leur forte capacité de production de H₂ en utilisant l'urée comme substrat azoté. Néanmoins, l'enrichissement de cette activité dans le mutant CE5u à 24 heures est intrigante car elle intervient dans un contexte de limitation en azote où les cellules recyclent leur protéome pour synthétiser les protéines nécessaires à la survie dans ces conditions.

Cette préservation de l'activité hydrogénase suggère donc qu'elle pourrait être bénéfique aux cellules lorsque l'azote est limitant pour la croissance. Or quand les cellules souffrent d'une carence d'azote, la chaîne de transport des électrons photosynthétiques est rapidement saturée (voir Introduction, Chapitre III, D.1). Ceci active les mécanismes de photoprotection incluant l'accumulation de la protéine IsiA (observée grâce au décalage du pic d'absorbance de la chlorophylle à 96 heures). Ce stress oxydant active également le flux d'électrons cyclique entre le PSI et les plastoquinones pour sauvegarder la production d'ATP. Celle-ci peut également être maintenue grâce à la respiration et au cycle de Krebs, dont les intermédiaires s'accumulent durant les phases de carence d'azote [245].

Compte tenu des hypothèses formulées dans l'introduction (Chapitre IV, C.2), l'activité de l'hydrogénase pourrait être préservée lorsque l'azote est limitant pour stimuler l'oxydation du NADH produit par le cycle de Krebs et la synthèse d'ATP par la respiration.

Conclusion et perspectives

Les cyanobactéries sont des systèmes biologiques issus de plusieurs milliards d'années d'évolution. Au cours du temps, elles ont développé des processus performants comme la photosynthèse et l'assimilation du CO₂ sur lesquels s'articule un réseau complexe de voies offrant une grande flexibilité métabolique. Celle-ci leur confère une robustesse physiologique leur permettant de survivre à de nombreux stress environnementaux. Certains de ces stress (UV, radiations, production de ROS...) provoquent des dégâts à l'ADN qui peuvent générer des mutations diverses. Comme chez de nombreuses bactéries, les cyanobactéries possèdent des systèmes sophistiqués de réparation de ces lésions permettant de limiter l'apparition de mutations délétères. Elles conservent néanmoins une plasticité génétique remarquable grâce aux principaux mécanismes bactériens de transfert du matériel génétique (transformation, conjugaison, transduction). Elles peuvent ainsi acquérir des avantages sélectifs grâce à ces processus qui ont également permis le développement des outils génétiques en laboratoire.

Grâce à ces nombreuses propriétés, elles sont aujourd'hui perçues comme des hôtes prometteurs pour le développement des biotechnologies de troisième génération. Ces approches sont essentiellement basées sur l'introduction de voies métaboliques absentes dans l'organisme original ou sur l'ingénierie des flux existants par génie génétique. Elles sont conçues à partir d'un précurseur produit naturellement par l'hôte et généralement carboné (pyruvate, acétyl-CoA...) dont l'accumulation doit être favorisée pour soutenir la production de la substance désirée. De manière générale en photoautotrophie, l'alimentation en précurseurs carbonés est régie par l'activité du cycle de Calvin. Le carbone organique qu'il produit est distribué entre les différentes chaînes de biosynthèse des molécules biologiques (acides aminés et nucléiques, lipides, sucres complexes et polymères de stockage).

Cette répartition du carbone est finement contrôlée pour atteindre un équilibre offrant la meilleure fitness (temps de génération, maintenance et recyclage des composants cellulaires, production de réserves). Ceci est particulièrement le cas du ratio entre carbone et azote organique qui gouverne la physiologie du vivant de manière quasi-universelle. La redirection des flux métaboliques doit donc respecter cette balance pour éviter une baisse de la fitness mais nécessite une compréhension avancée du métabolisme et de sa régulation dans l'organisme choisi. En effet quel que soit le produit désiré en utilisant une cyanobactérie, son rendement est nécessairement fonction de l'efficacité de la fixation du CO₂ et donc de la biomasse produite, *i.e* une souche extrêmement productive n'a pas d'intérêt industriel si sa croissance est limitée. D'autre part, certaines substances produites naturellement par les

cyanobactéries sont des métabolites qui ont un rôle physiologique parfois peu connu. Dans le cas du H₂, sa production par l'hydrogénase des cyanobactéries est liée au stress oxydant mais certaines relations phylogénétiques suggèrent un rôle plus global dans le métabolisme notamment entre le cycle de Krebs et la respiration.

Synechocystis est l'espèce modèle des cyanobactéries unicellulaires et possède de nombreux attraits en biotechnologie (outils génétiques, temps de génération, flexibilité nutritionnelle, production naturelle de métabolites d'intérêt). Elle possède un gène *cp12* dont la fonction n'a jamais été étudiée alors qu'il s'agit d'un régulateur majeur du cycle de Calvin chez les algues et les plantes.

Mes résultats indiquent que cette fonction est conservée chez *Synechocystis* et qu'elle a donc probablement été héritée par les Eucaryotes photosynthétiques. Chez les cyanobactéries, cette régulation semble étroitement liée à la répartition du carbone en photoautotrophie. En effet, l'analyse métabolomique de la souche $\Delta cp12$ a révélé une fluctuation significative de plusieurs métabolites carbonés (hexoses phosphates, pyruvate, acides organiques...). En mixotrophie, cette régulation est essentielle pour coordonner deux voies métaboliques en opposition : le catabolisme des sucres (glucose) et la production anabolique de carbone organique par assimilation du CO₂. En absence de CP12, l'hyperactivité du cycle de Calvin induit un déséquilibre C/N qui active les effecteurs de la carence d'azote. Le démantèlement de l'appareil photosynthétique prive alors les cellules d'une source importante de pouvoir réducteur et d'ATP qui sont rapidement épuisés par l'anabolisme. Grâce à ce phénotype, j'ai pu étudier le rôle des différents motifs conservés de CP12 vis-à-vis de cette régulation. Malgré l'instabilité génétique de la souche $\Delta cp12$, j'ai ainsi montré que les cystéines, les capteurs rédox de CP12, étaient essentielles à cette fonction chez *Synechocystis*. La séquence consensus centrale semble quant à elle nécessaire pour obtenir une inhibition complète et posséderait donc une fonction support. Au regard de ce que l'on sait à propos de la formation du complexe CP12-GAPDH (changement de conformation et exposition de charges négatives), mes résultats confortent une implication des charges positives de ce motif dans le recrutement de PRK sur le précomplexe.

Bien que le gène *cp12* ne soit pas essentiel à la viabilité cellulaire ni létal lorsqu'il est surexprimé en conditions standards, sa délétion initiale s'est accompagnée d'un évènement génétique secondaire de grande ampleur. Ce remaniement est issu d'une transposition et a occasionné le remplacement d'environ 5 kb au niveau du locus *ureG* par une courte séquence

d'insertion. De plus, cette mutation a irrévérablement éliminé tous les chromosomes $\Delta cp12$ initiaux. Le facteur ayant déclenché cette transposition est inconnu mais pourrait être endogène puisque les cellules sont maintenues dans des conditions stables et favorables à la croissance. La délétion du gène *cp12* aurait ainsi causé un déséquilibre interne rapidement compensé par la perte de tout ou partie des gènes présents dans cette région (*rre4*, *ureG*, *slr0686*, *sll0644*, *sll0645* et *cya2*). Le rôle de la plupart de ces gènes n'a pas été démontré chez *Synechocystis* ni dans d'autres cyanobactéries pour ceux possédant des homologues au sein du phylum. Seuls les gènes *cya2* et *ureG* codent pour des protéines de fonctions connues, une guanylate cyclase et la chaperone à nickel de l'uréase respectivement. Dans la souche $\Delta cp12$, la déplétion de UreG empêche le transfert du nickel dans la sous-unité catalytique et donc l'activation de l'uréase. Son activité, qui n'est pas essentielle à la croissance lorsque la seule source d'azote est le nitrate, est donc perdue.

Chez *Synechocystis*, seules l'uréase et l'hydrogénase nécessitent du nickel pour fonctionner. C'est un métal présent en quantités infinitésimales dans le milieu conventionnel pour lequel s'instaure une compétition entre les voies de maturation de ces enzymes.

Chez de nombreuses cyanobactéries possédant une hydrogénase, des variants du gène *cp12* sont cotranscrits avec l'opéron *hox*. La surreprésentation des motifs régulateurs N-terminaux des protéines CP12 qu'ils codent suggère qu'il existe une synergie entre l'interaction de CP12 avec PRK et l'activité hydrogénase. Au niveau métabolique l'inhibition de PRK permet d'économiser de l'ATP et bloque l'entrée des pentoses phosphates dans le cycle de Calvin. De cette manière, elle favorise vraisemblablement leur dégradation en trioses phosphates et leur conversion dans le cycle de Krebs. D'autre part, l'hydrogénase présente une convergence structurale remarquable avec la tête soluble du complexe respiratoire NDH-I qui oxyde les cofacteurs réduits pour produire de l'ATP. Elle pourrait donc activement contribuer au maintien de la charge énergétique dans les cellules. Si cette coopération entre CP12 et hydrogénase est perdue, la quantité d'ATP pourrait diminuer (hydrolyse par PRK et épuisement des substrats du cycle de Krebs). Pour pallier à ce défaut, le nickel pourrait être préférentiellement dirigé vers l'hydrogénase pour en favoriser la maturation au détriment de celle de l'uréase. L'augmentation de cette activité permettrait alors de stimuler la force proton-motrice et la phosphorylation oxydative.

A l'aide des mutants surproduisant l'hydrogénase et ses protéines de maturation du laboratoire, j'ai obtenu des indices supplémentaires sur la compétition existant avec la maturation de l'uréase. Mes résultats indiquent en effet qu'au cours de la stratégie génétique conçue, un allèle *ureG* portant une mutation réduisant l'efficacité de translocation du nickel vers UreC a été sélectionné. Cette mutation est vraisemblablement apparue au cours de notre stratégie visant à surproduire l'ensemble des protéines Hox et Hyp. Or de telles constructions sont susceptibles de dépasser la capacité de maturation de l'enzyme par les chaperones Hyp ou de causer un déficit en nickel. La plupart de ces mutants ne possèdent pas cette mutation mais leur activité uréase est préservée. L'acquisition et la propagation de cette mutation confère donc un avantage sélectif probablement moindre que dans le mutant $\Delta cp12$ pour lequel il est apparu rapidement. Cette compensation apparaît cependant toujours liée à la distribution du nickel en faveur de l'hydrogénase dans les conditions standards.

Plusieurs études ont montré que l'opéron *hox* n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire en photoautotrophie mais qu'il améliore la tolérance aux stress oxydant et métabolique [97,267,283]. Notre laboratoire a également prouvé que le catabolisme des sucres (et notamment du glucose) pouvait générer du stress oxydant en diminuant l'activité du cycle de Calvin [100]. L'ensemble de ces études indique que les stress métabolique et oxydant sont intimement liés aux flux du carbone chez *Synechocystis*. Par ailleurs, le cycle de Krebs est un pourvoyeur de pouvoir réducteur qui est consommé par la chaîne respiratoire pour produire de l'ATP et maintenir la balance ATP/NAD(P)H. Ainsi, un découplage entre le cycle de Krebs et la respiration risque de produire du stress oxydant et une diminution de la synthèse d'ATP. L'hydrogénase pourrait être le pivot métabolique renforçant la communication entre le métabolisme du carbone, l'oxydation du NADH et la force proton-motrice.

En photoautotrophie, la production d'O₂ inhibe l'hydrogénase [306]. Pourtant, mes travaux montrent que l'altération du métabolisme du carbone et de l'hydrogène conduit à une accumulation de mutations secondaires stimulant son activation (approvisionnement en nickel). Ces mutations affectent exclusivement le gène *ureG* ou sa région qui pourrait constituer un « hotspot » génomique de variabilité. Dans leur habitat naturel comme en laboratoire, les cyanobactéries sont exposées à des microenvironnements et des fluctuations physico-chimiques (teneur en O₂ et CO₂, pH, lumière...) qui affectent directement leur physiologie. L'adaptation du métabolisme à ces variations doit être rapide, notamment pour sauvegarder la balance ATP/NAD(P)H, la clef de voute des processus bioénergétiques.

Ces résultats soulignent également la nécessité d'appréhender correctement la physiologie et la versatilité génétique des cyanobactéries. En effet, elles sont facilement manipulables et constituent d'excellents candidats pour l'ingénierie métabolique. Elles sont néanmoins capables de compenser rapidement les déséquilibres si ceux-ci diminuent leur fitness. Cette faculté repose à la fois sur la présence d'éléments génétiques mobiles et, malgré leur arsenal de protéines de réparation de l'ADN, leur propension à acquérir et fixer des mutations avantageuses. L'étude approfondie de leur métabolisme sert donc un double objectif : l'identification des verrous biologiques limitant la biosynthèse des produits d'intérêt ainsi que les facteurs endogènes d'instabilité génétique pouvant compromettre les rendements.

Un autre élément entravant le développement à grande échelle des biotechnologies de troisième génération est de satisfaire la demande en nutriments. Dans le cas des cyanobactéries mais également des algues, les quantités d'engrais azotés et phosphorés à fournir sont énormes et incitent à la conception de milieux alternatifs à l'impact environnemental réduit. L'urée, en tant que déchet des activités humaines, est un substrat prometteur pour la culture à grande échelle des organismes photosynthétiques pouvant la métaboliser. Chez les cyanobactéries, elle présente tout de même une toxicité liée à l'activité uréase et l'accumulation d'ammonium pouvant induire la mort cellulaire [304]. La caractérisation des mutants réalisée au cours de mon travail a révélé qu'une diminution de cette activité était favorable pour une culture prolongée avec de l'urée comme seule source d'azote. Cette altération est le fruit d'une mutation compensatoire mais est intervenue dans un fond génétique conçu pour augmenter la capacité de production de H₂ chez *Synechocystis*. Ces souches conservent une activité hydrogénase élevée lorsque le nitrate est substitué par de l'urée et présentent même un enrichissement en hydrogénase active lorsque l'hydrolyse de l'urée en ammonium intracellulaire est limitante pour la croissance. Au-delà de ces multiples intérêts biotechnologiques, l'analyse de ces mutants indique que la flexibilité nutritionnelle et l'ingénierie génétique peuvent être conjointement exploitées pour soutenir la production durable de substances par les cyanobactéries.

L'effort d'ingénierie du métabolisme de *Synechocystis* doit donc être poursuivi parallèlement aux approches fondamentales permettant d'améliorer notre compréhension de sa physiologie et de ses réseaux de régulation.

Chez *Synechocystis*, CP12 est un régulateur central de l'homéostasie rédox et du métabolisme du carbone dont l'absence a des répercussions pléiotropiques. De plus en tant qu'IDP, il est tout à fait envisageable qu'elle interagisse avec d'autres protéines que PRK et GAPDH. Une analyse protéomique minutieuse de ses interactants fournirait de précieux indices pour déterminer quels sont les effets primaires de sa déplétion et lesquels résultent de régulations secondaires. Par exemple, j'ai mesuré une forte augmentation de la production d'O₂ ainsi qu'une accumulation des métabolites du cycle de Krebs dans le mutant $\Delta cp12$ sans avoir pu en élucider l'origine. Afin d'étudier finement la formation de ces complexes, il faudrait néanmoins disposer d'anticorps reconnaissant les protéines CP12 des cyanobactéries, ce qui n'est pas le cas des anticorps dirigés contre la protéine CP12 de *C. reinhardtii* (37% d'identité avec celle de *Synechocystis*). La production de protéines CP12 recombinantes requiert toutefois un soin particulier pour contrôler ou minimiser toute interférence entre les tags d'affinité et ses fonctions régulatrices. Idéalement, l'addition d'un site TEV permettrait de retirer ce tag après purification. L'obtention d'anticorps affins permettrait également d'extraire davantage de protéines et/ou de complexes et d'en obtenir la structure cristallographique. Celle-ci éluciderait notamment les zones et les résidus en interaction entre PRK et CP12 et constituerait la première structure résolue de PRK chez les cyanobactéries.

Ce régulateur est également idéal pour étudier les fluctuations du cycle de Calvin et de ses métabolites lorsque les cellules sont soumises à différentes conditions de culture (lumière, mixotrophie, source d'azote...). Chez *Synechocystis*, les études métabolomiques offriraient des informations sur les leviers biologiques mis en place pour pallier à la dérégulation de l'assimilation du CO₂. Plus particulièrement, les remodelages des flux du carbone pourraient être exploités pour approvisionner les voies de biosynthèse de composés d'intérêt.

D'autre part, mon travail a permis d'identifier une large mutation compensatoire dans le mutant $\Delta cp12$. Ce mutant pourrait néanmoins présenter d'autres remaniements cryptiques. Au-delà des questions que ces événements génétiques posent en termes de stabilité génétique, ils trahissent aussi les relations existant entre la fonction altérée et les processus cellulaires capables d'assurer une compensation. Grâce aux progrès des technologies de séquençage, le reséquençage des génomes bactériens est accessible et permet de détecter rapidement ces mutations. Par extension, une telle approche pourrait permettre d'identifier les modifications génétiques générant des révertants dérivés du mutant $\Delta cp12$ en mixotrophie. Ceux-ci présentent probablement une réorganisation des flux du carbone permettant de restaurer leur croissance (par exemple via des mutations dans les gènes codant pour PRK ou Gap2).

De plus, ces analyses génomiques permettent d'évaluer la dérive génétique, un élément indispensable pour étudier spécifiquement les mutations ponctuelles introduites dans certaines protéines. Dans le cas de CP12, mon travail sur les motifs conservés a été réalisé dans un contexte génétique inattendu. Bien que celui-ci ait apporté des réponses sur leur rôle, il serait prudent de répéter ces expériences dans un fond génétique $\Delta cp12$ intact avant d'en approfondir l'étude. Par la suite, il serait pertinent de muter séparément les paires de cystéines ainsi que chaque cystéine pour déterminer si, comme chez les Eucaryotes photosynthétiques, elles régulent spécifiquement PRK ou GAPDH mais également si elles perçoivent d'autres signaux rédox (glutathionylation). De la même manière, l'introduction de charges positives dans le consensus central permettrait de confirmer le rôle des résidus chargés négativement présents dans la protéine CP12 de *Synechocystis*. Plus largement, cette stratégie de mutagenèse pourrait permettre d'altérer les hélices α de CP12 et d'étudier leur influence sur l'inhibition de PRK et GAPDH mais également d'exprimer des fusions CBS-CP12, une isoforme exclusivement présente chez les cyanobactéries. Le rôle de ces modules est encore peu compris mais ils semblent liés à la régulation de PRK et aux opérons *hox*. A terme, la dissection des différents motifs de CP12 pourrait conduire à la conception de régulateurs synthétiques « à la carte » ciblant spécifiquement PRK et l'aiguillage du carbone organique ou Gap2 et la consommation du pouvoir réducteur généré par la photosynthèse.

Il reste également beaucoup d'interrogations sur le métabolisme de l'hydrogène chez les cyanobactéries. Premièrement, mes résultats n'excluent pas la possibilité d'une interaction directe ou indirecte avec la chaîne respiratoire et notamment le complexe NDH-I avec lequel elle présente une forte similarité structurale. A ce jour, cette relation est encore débattue et pourrait être plus complexe encore car elle n'a jamais été mise en évidence ni clairement infirmée [307,308]. A l'aide des outils de protéomique et/ou de microscopie, il serait pertinent de déterminer dans un premier temps si ces complexes interagissent ou s'ils co-localisent dans les cellules de *Synechocystis*. De plus, l'analyse métabolomique des différents mutants de délétion et de surexpression permettrait éventuellement d'identifier des déséquilibres au niveau des métabolites du cycle de Krebs si l'hydrogénase en favorise la consommation.

D'autre part, l'alignement tridimensionnel des modules diaphorase et hydrogénase de l'enzyme avec NDH-I suggère qu'ils seraient physiquement séparés au sein du module NADH-oxydoréductase soluble. Cette possibilité de fonctionnement indépendant des modules reste néanmoins à démontrer chez les cyanobactéries et soulèverait d'autres questions vis-à-

vis du module diaphorase. En effet contrairement à l'hydrogénase, il n'est pas inhibé par l'oxygène et n'a pas d'autre substrat connu que les cofacteurs rédox.

L'opéron *hox* comprend également 3 ORF de fonction inconnue chez *Synechocystis*. Ces séquences codantes sont difficiles à étudier individuellement à cause de cette organisation génomique et sont donc généralement, comme dans le travail présenté ici, délétées ou surexprimées conjointement avec l'ensemble de l'opéron.

Les mutants de surexpression construits pourraient être néanmoins utilisés pour améliorer les rendements d'extraction de l'hydrogénase, dont la structure cristallographique n'a jamais été résolue chez les cyanobactéries. Afin d'étudier plus particulièrement son rôle dans le métabolisme, il serait également pertinent de pouvoir mesurer la photoproduction *in vivo* de H₂, *i.e* dans des conditions photosynthétiques où l'oxygène est présent. C'est également cette activité qui importe pour les biotechnologies (titration, stabilité dans le temps...). La méthode couramment utilisée, qui est également la nôtre, mesure la quantité d'hydrogénase active en anaérobie (saturation en substrat) mais ne mesure pas la production photosynthétique de H₂. Certaines méthodes existent pour cela mais reposent sur des échanges isotopiques entre atomes d'hydrogène et de deutérium qui sont détectés par spectrométrie de masse, une technique fastidieuse et onéreuse. A l'avenir, si des protocoles plus accessibles sont développés, il serait judicieux de quantifier cette production avec nos différents mutants (possédant ou non la mutation dans le gène *ureG*) en conditions standards mais surtout en substituant le nitrate par de l'urée. Ces résultats fourniraient des informations sur le bénéfice biotechnologique réel obtenu en surproduisant simultanément l'hydrogénase et ses chaperones dans ces conditions. De plus, ils permettraient de déterminer s'il existe ou non une relation fonctionnelle entre uréase et hydrogénase.

De manière plus générale, l'urée est un substrat prometteur pour le développement des biotechnologies basées sur l'utilisation des cyanobactéries mais présente une toxicité à forte dose. Il est donc nécessaire de poursuivre l'étude de son impact physiologique chez *Synechocystis* et d'autres cyanobactéries possédant une uréase pour en évaluer précisément la balance bénéfique/risque. Ces efforts doivent être entrepris pour encourager la valorisation et l'exploitation de nutriments alternatifs et moins coûteux qui ancreront durablement les biotechnologies vertes dans les sociétés.

Matériel & Méthodes

I. Matériel

A. *Synechocystis sp.* PCC6803

La souche sauvage de *Synechocystis sp.* PCC6803 utilisée dans ce travail provient de la collection de l'Institut Pasteur (Paris). Elle est cultivée en conditions standard à 30°C dans le milieu minéral (MM) qui correspond au milieu BG11 supplémenté avec 3,78 mM de Na₂CO₃ (Tableaux 3 et 4), 17 µM de fer (sous-forme de citrate d'ammonium ferrique) et tamponné à pH=7 avec 3 mM d'HEPES (acide N-2 hydroxyéthylepipérazine-N'-éthane-sulfonique). Les compositions finales de ce milieu et des éléments traces sont respectivement décrites dans les tableaux 3, 4 et 5.

Tableau 3 : Composition du BG11 modifié

Composé	Concentration finale (mM)
NaNO ₃	17,6
K ₂ HPO ₄	0,18
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,30
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,25
Na ₂ CO ₃	3,78
EDTA	0,003
Acide citrique	0,029
Ammonium citrate ferrique	0,017

Tableau 4 : Composition en éléments traces du milieu minéral

Composé	Concentration finale (µM)
H ₃ BO ₃	46
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0,17
CuSO ₄	0,32
MnCl ₂	9,2
NaMo ₄ 2H ₂ O	1,6
ZnSO ₄	0,77

Tableau 5 : Préparation et composition des milieux dérivés du milieu minéral

Composé	Ajouté sous forme...	Concentration mère	Concentration finale
Ammonium citrate ferrique	Filtrée	34 mM	34 μ M
NH ₄ Cl	Filtrée	5 M	1-20 mM
Urée	Filtrée	5 M	5 mM
NiSO ₄	Filtrée	2,5 mM	1-2,5 μ M
Glucose	Filtrée	2,75 M	5 ou 55 mM
DCMU	Filtrée	10 mM	10 μ M
Citrate	Filtrée	0,5 M	0,5 mM

Les cultures liquides sont réalisées en erlenmeyers dans un agitateur orbital à rampes lumineuses (Infors HT Multitron II) à 140 rpm. Le milieu solide est obtenu par ajout de Bacto Agar (Difco) à 10 g/L. La lumière blanche est obtenue grâce à des néons (Sylvania, cool white) dont l'intensité lumineuse est mesurée à l'aide d'un luxmètre (Testo 545). En conditions standards, cette intensité est fixée à 2500 lux ($\approx 33,8 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$).

La concentration cellulaire est estimée par mesure de la densité optique (DO) à 580 nm ($1 \text{ uDO}_{580} = 5 \cdot 10^7$ cellules/mL) et 750 nm ($1 \text{ uDO}_{750} = 4,5 \cdot 10^7$ cellules/mL).

Les antibiotiques de sélection sont utilisés, pour *Synechocystis*, aux concentrations indiquées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Concentrations finales des antibiotiques utilisés selon l'organisme cultivé

Antibiotique	Abréviation	Concentration utile chez <i>E. coli</i> ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Concentration utile chez <i>Synechocystis</i> ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)
Ampicilline	Amp	100	-
Kanamycine	Km	50	50-300
Streptomycine/Spectinomycine	Sm/Sp	25/75	5/5
Gentamycine	Gm	10	2,5-5
Chloramphénicol	Cm	25	-

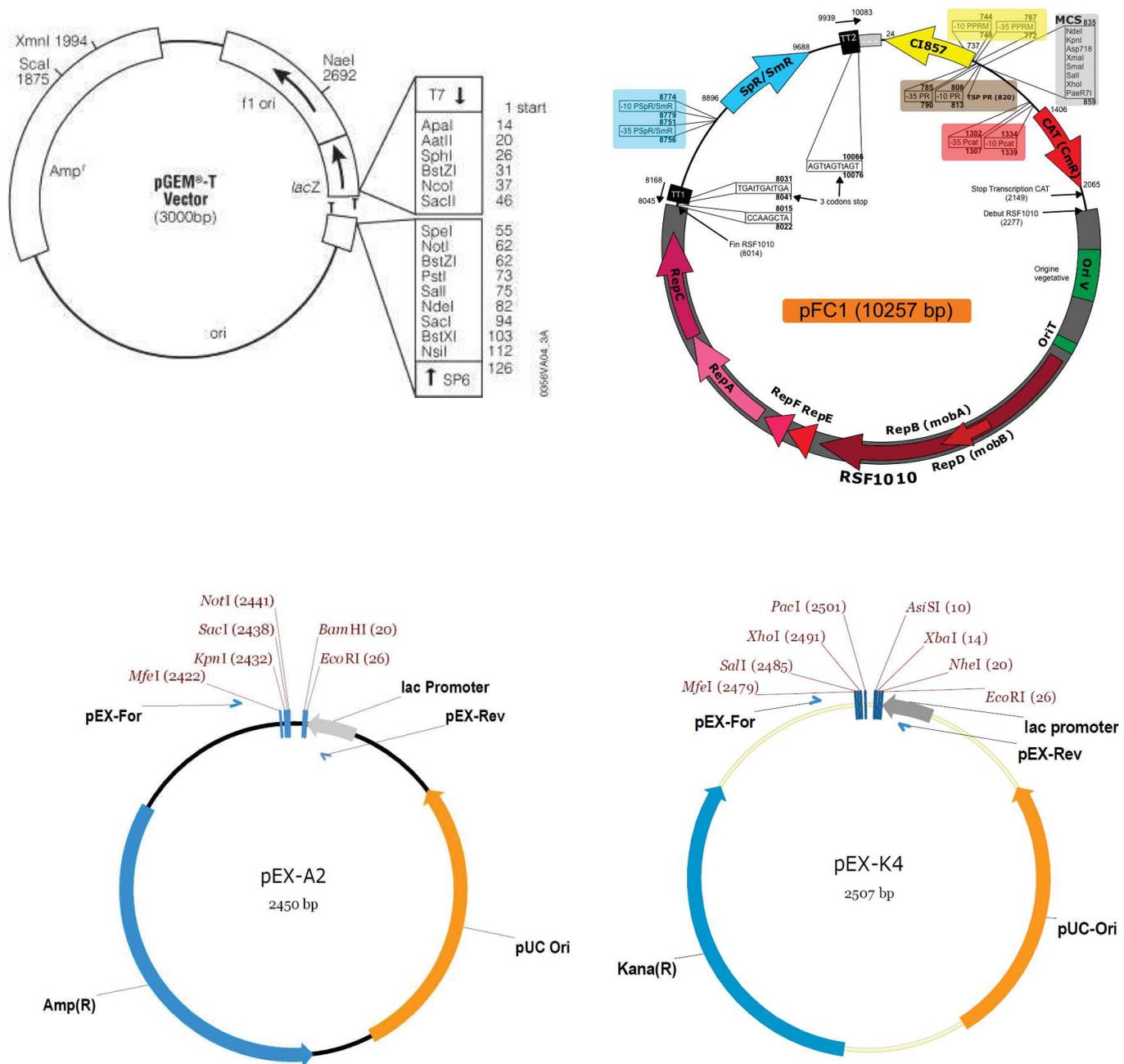


Figure 59 : Cartes des différents vecteurs de clonage et d'expression utilisés

Le pGEM-T® est un vecteur A-T commercialisé par Promega utilisé pour le clonage des cassettes de délétion. Les vecteurs pEX-A2 et pEX-K4 proviennent d'Eurofins Genomics et sont utilisés pour conditionner les fragments d'ADN produits par synthèse de gènes. Le pFC1 est un vecteur d'expression thermorégulée développé au laboratoire et est dérivé du plasmide RSF1010 à large spectre d'hôtes [112]. Il comporte un gène *CI₈₅₇* codant pour un répresseur thermosensible se fixant sur le site opérateur du promoteur p_R (phage λ) ainsi qu'un gène de résistance à la streptomycine/spectinomycine (Sm/Sp^r).

B. *Escherichia coli*

La souche d'*E. coli* TOP10 (*F*- *mcrA* Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ *M15* Δ *lacX74* *nupG* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galE15* *galK16* *rpsL*(*Str*^R) *endA1* λ ⁻, Invitrogen) a été utilisée pour amplifier les vecteurs utilisés pour les clonages et constructions (délétion, surexpression). Elle est cultivée à 30°C ou 37°C en milieu Luria-Bertani (LB) contenant les antibiotiques adéquats aux concentrations indiquées dans le tableau 5.

La souche d'*E. coli* CM404 dérivée de la souche HB101 possédant le plasmide mobilisateur autotransférable pRK2013 (Km^r) a été utilisée pour introduire les plasmides réplicatifs chez *Synechocystis* par conjugaison. Cette souche est cultivée à 30°C en raison de la réplication thermosensible du pRK2013.

C. Plasmides

Le plasmide pGEM-T (Promega, voir Tableau 7 et Figure 59) est un « AT cloning vector » à haut nombre de copies (origine de replication *oriC*) portant un gène de résistance à l'ampicilline (*Amp*^R). Il est utilisé pour cloner efficacement les produits PCR obtenus après un faible nombre de cycles (moins de 10) avec la Taq polymérase. Cette étape permet de leur ajouter des A flottants qui facilitent la ligation (bouts cohésifs) tout en limitant l'apparition de mutations liée à la Taq polymérase, peu fidèle.

Les plasmides pEX-A et pEX-K (Tableau 7 et Figure 59) sont des vecteurs commerciaux (Eurofins Genomics) dérivés du pUC18 portant respectivement des gènes de résistance à l'ampicilline (*Amp*^R) et la kanamycine (*Km*^R). Les fragments synthétiques sont initialement clonés dans ces vecteurs.

Le plasmide pFC1 est un outil génétique développé au laboratoire (Figure 59 et [112]). Il est dérivé du plasmide RSF1010, un vecteur à large spectre d'hôtes (essentiellement à Gram-négatif) possédant sa propre machinerie de réplication. De plus, il comprend des gènes de résistance au chloramphénicol (*Cm*^R) et à la streptomycine/spectinomycine (*Sm/Sp*^r) ainsi qu'un système d'expression thermorégulée. Celui-ci consiste en un promoteur fort dérivé du bactériophage lambda (*P_R*) et de son site opérateur sur lequel peut se fixer un répresseur thermolabile codé par un gène adjacent (*cI₈₅₇*). Un site *Nde*I unique (5'-CA/TATG-3') présent à proximité immédiate du *P_R* permet de cloner rapidement les ORF des gènes d'intérêt en phase avec ce promoteur fort.

Ainsi à 30°C, le répresseur est fonctionnel et prévient toute activité du P_R en se fixant au site opérateur. A 39°C, le répresseur est dénaturé et permet de surexprimer le gène cloné en aval du P_R. Il est également possible de moduler le facteur d'expression en utilisant des températures intermédiaires (33 - 37°C).

Un dérivé du pFC1 est utilisé lorsque la surexpression à 39°C du gène étudié n'est pas létale en conditions standard chez *Synechocystis*. Ce plasmide, pFC1Δ*cI*₈₅₇, a été obtenu par religation du pFC1 après digestion par *Psi*I (2 sites), générant une ORF *cI*₈₅₇ tronquée de 532 pb. Cette inactivation du répresseur permet de surexprimer constitutivement le gène cloné.

Tableau 7 : Liste et caractéristiques des vecteurs utilisés et constructions dérivées

Plasmid use and name	Relevant feature(s)	Reference
Cloning vectors and construction of DNA cassettes		
pGEM-T	AT-cloning vector with Amp ^r marker	Promega
pEX-A	Default subcloning vector for synthetic fragments with Amp ^r marker	Eurofins
pEX-K	Subcloning vector for synthetic fragments with Km ^r marker	Eurofins
pUC4K	Vector used for PCR amplification of the Km ^r cassette without TT	Pharmacia
pFC1	Replicating plasmid for temperature-regulated gene expression in <i>Synechocystis</i>	Mermet <i>et al.</i> , 1994)
pFC1Δ <i>cI</i> ₈₅₇	pFC1 plasmid where the <i>cI</i> ₈₅₇ repressor gene was truncated after <i>Psi</i> I digestion.	This study
pUC19	Cloning vector with Amp ^r marker	Invitrogen
Targeted deletion of <i>cp12</i>, <i>ureC</i> and <i>hoxW</i> genes in <i>Synechocystis</i>		
pGEM-T <i>cp12</i> ::Km ^r	pGEM-T with the Km ^r marker flanked by the up- and downstream regions of the <i>cp12</i> (<i>ssl3364</i>) gene of <i>Synechocystis</i> . The construct allows complete replacement of the ORF by the Km ^r cassette (+1 to +225 relative to the start codon)	This study
pEX-K <i>cp12</i> _{up} -MCS-SmSp ^r +TT- <i>cp12</i> _{down}	pEX-K with the SmSp ^r + TT marker flanked by the up- and downstream regions of the <i>cp12</i> gene of <i>Synechocystis</i> . The upstream region is followed by <i>Nco</i> I and <i>Pst</i> I restriction sites (MCS) allowing subcloning of mutated <i>cp12</i> genes.	This study
pEX-A <i>cp12</i> _{up} -MCS-SmSp ^r +TT- <i>cp12</i> _{down}	pEX-A obtained after subcloning of the synthetic <i>cp12</i> _{up} -MCS-SmSp ^r +TT- <i>cp12</i> _{down} fragment described above.	This study
pEX-A <i>cp12</i> _{WT} ::SmSp ^r	pEX-A with the WT <i>cp12</i> ORF cloned after <i>Nco</i> I and <i>Pst</i> I digestion. This construct allows replacement of the Km ^r marker of the Δ <i>cp12</i> mutant by the <i>cp12</i> _{WT} gene followed by the SmSp ^r cassette.	This study
pEX-A <i>cp12</i> Δ4Cys::SmSp ^r	pEX-A with the <i>cp12</i> Δ4Cys ORF cloned after <i>Nco</i> I and <i>Pst</i> I digestion. This construct allows replacement of the Km ^r marker of the Δ <i>cp12</i> mutant by a mutated <i>cp12</i> gene (Cys to Ala substitutions) and followed by the SmSp ^r cassette.	This study

pEX-A cp12ΔCore::SmSp ^r	pEX-A with the <i>cp12</i> ΔAWD ORF cloned after <i>NcoI</i> and <i>PstI</i> digestion. This construct allows replacement of the Km ^r marker of the Δ <i>cp12</i> mutant by a mutated <i>cp12</i> gene (Asp and Glu to Ala substitutions) and followed by the SmSp ^r cassette.	This study
pEX-A <i>ureC</i> ::Km ^r	pEX-A with the Km ^r marker flanked by the up- and downstream regions of the <i>ureC</i> (sll1750) gene of <i>Synechocystis</i> . Replacement of the <i>ureC</i> ORF by the Km ^r cassette occurs from +1 to +971 bp relative to the <i>ureC</i> ATG start codon.	This study
pEX-A <i>hoxW</i> ::Km ^r	pEX-A with the Km ^r marker flanked by the up- and downstream regions of the <i>hoxW</i> (slr1876) gene of <i>Synechocystis</i> . Replacement of the <i>hoxW</i> ORF by the Km ^r cassette occurs from +1 to +298 bp relative to the <i>hoxW</i> ATG start codon.	This study

Replacement of the *Synechocystis hox* operon by a cassette for constitutive expression

pCE- <i>hox</i>	pTR- <i>hox</i> digested with <i>PstI</i> and self-ligated. This plasmid is no longer harboring the active repressor <i>cI</i> ₈₅₇ . The <i>hox</i> -upstream region (-691 bp to +1 bp of <i>hoxE</i> ATG) was replaced by a strong constitutive promoter site (<i>p</i> _R) and a Km ^r +TT marker	Ortega-Ramos <i>et al.</i> , 2014
-----------------	--	-----------------------------------

Addition of *hoxW* in *hox* operon in *Synechocystis*

pUC- <i>hoxEFUYHW</i>	pUC19 with <i>hoxW</i> gene followed by the Gm ^r +TT marker between the flanking sequences of <i>Synechocystis</i> downstream region of <i>hoxH</i> gene (sll1226). The downstream region of <i>hoxH</i> was replaced by the <i>hoxW</i> gene and the SmSp ^r + TT marker from +1 bp after <i>hoxH</i> stop to +23 bp after <i>hoxH</i> stop.	This study
-----------------------	--	------------

Constitutive overexpression of genes in *Synechocystis*

pCE- <i>cp12</i>	pFC1Δ <i>cI</i> ₈₅₇ with the <i>Synechocystis cp12</i> gene (ssl3364) cloned under control of the constitutive <i>p</i> _R promoter	This study
pCE- <i>hypA-F</i>	pTR- <i>hypA-F</i> digested with <i>PstI</i> and self-ligated. This plasmid is no longer harboring the active repressor <i>cI</i> ₈₅₇ .	Ortega-Ramos <i>et al.</i> , 2014
pCE- <i>hoxW</i>	pFC1Δ <i>cI</i> ₈₅₇ with the <i>Synechocystis hoxW</i> gene (slr1876) cloned under control of the constitutive <i>p</i> _R promoter	This study
pCE- <i>ureG</i>	pFC1Δ <i>cI</i> ₈₅₇ with the <i>Synechocystis ureG</i> gene (sll0643) cloned under control of the constitutive <i>p</i> _R promoter	This study

Thermoregulated over-expression of the *hoxW* gene in *Synechocystis*

pTR- <i>cp12</i>	pFC1 with the <i>Synechocystis cp12</i> gene (ssl3364) cloned under control of the temperature-regulated <i>p</i> _R promoter	This study
pTR- <i>hoxW</i>	pFC1 with the <i>Synechocystis hoxW</i> gene (slr1876) cloned under control of the temperature-regulated <i>p</i> _R promoter	This study

II. Méthodes

A. Biologie moléculaire

1. Extraction et purification des acides nucléiques

a. Resuspension et dosage des préparations

Les extraits d'ADNg, plasmides et fragments PCR sont par défaut resuspendus dans un tampon T0,1E (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5). Leur concentration est déterminée par mesure de la densité optique à 260 nm (NanoDrop, ThermoFisher). Leur pureté est évaluée grâce aux ratios DO_{260}/DO_{280} (contamination protéique) et DO_{260}/DO_{230} (contaminants organiques). Un extrait d'ADN est considéré pur si ceux-ci sont respectivement supérieurs à 1,8 (ou 2 pour de l'ARN) et 2.

b. Extraction d'ADN génomique (ADNg) et plasmidique

L'ADNg de *Synechocystis* est extrait à partir de culture en phase exponentielle de croissance ($DO_{580} \approx 0,6$) en suivant le protocole décrit précédemment avec modifications [107]. Brièvement, les cellules sont centrifugées, lavées dans de l'eau stérile puis resuspendues dans 400 μ L de tampon TENS (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, SDS 2%). 100 μ L de billes de verre puis 400 μ L de phénol-chloroforme alcool isoamylique (Sigma-Aldrich) sont ajoutées à la suspension cellulaire. Le mélange est vortexé 1 minute à vitesse maximale (Vibrax®, IKA), placé 1 minute à 60°C puis à nouveau vortexé 3 minutes (vitesse maximale, à 4°C). Après une première centrifugation (14000 rpm, 5 min, 4°C) la phase aqueuse est récupérée et centrifugée une seconde fois pour éliminer les débris. Le surnageant est à nouveau soigneusement mélangé dans un volume équivalent de phénol-chloroforme et centrifugé (14000 rpm, 10 min, 4°C). Enfin, le surnageant ainsi obtenu est mélangé volume à volume avec du chloroforme (Merck), centrifugé (14000 rpm, 10 min, 4°C) et les acides nucléiques contenus dans la phase aqueuse sont précipités à l'éthanol.

Les plasmides amplifiés chez *E. coli* sont extraits à l'aide du Kit NucleoSpin Plasmid Easypure (Macherey-Nagel) en suivant les instructions du fabricant. Les cellules sont obtenues après culture en milieu LB (avec pression de sélection) à 37°C ou 30°C (pour les vecteurs à expression thermorégulée).

c. Purification des fragments d'ADN

Les produits PCR obtenus sans amplification aspécifique et d'une taille compris entre 200 et 8000 pb sont purifiés à l'aide du kit QIAquick PCR purification (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant. Ce kit a également été utilisé pour éliminer les fragments d'ADN de petite taille (moins de 100 pb) issus de certaines restrictions enzymatiques.

Dans le cas où le produit de restriction désiré ne peut pas être séparé des sous-produits à éliminer, le mélange réactionnel est déposé sur gel d'agarose. Après migration, la bande correspondant au fragment d'intérêt est découpée sur table UV et purifiée à l'aide du kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur.

Lorsque nécessaire (présence d'impuretés, réactions sensibles à la présence de sels...) les extraits sont purifiés par précipitation à l'éthanol. Après ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2 (Sigma-Aldrich), les extraits sont soigneusement mélangés et maintenus sur glace 5 minutes. La précipitation est initiée par ajout de 2,5 volumes d'éthanol absolu froid et gardée à -20°C pendant au moins 2 heures. Les échantillons sont ensuite centrifugés (14000 rpm, 4°C, 30 min) et lavés à 2 reprises avec de l'éthanol 70% froid. Les culots d'ADN sont séchés au Speedvac 10 minutes avant d'être resuspendus.

d. Extraction des ARN totaux

Le contenu total en ARN est extrait à partir de cultures en phase exponentielle (de 50 à 200 mL de cultures selon les conditions de croissance) rapidement récoltées à 30°C par filtration sous vide, en présence de lumière. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 0,6 – 2 mL de tampon Tris-HCl EDTA 50 mM, pH 8 et rapidement transférées dans des presses d'Eaton refroidies à -80°C (bain éthanol/carboglace). La cryofracturation est réalisée en appliquant une pression de 250 MPa aux cellules ainsi congelées.

L'extraction des ARN est réalisée grâce au Kit RNeasy (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant. L'éluat obtenu est traité 2 fois 1 heure à la DNase I (Ambion, DNase I RNase-free) à 37°C avant d'être précipité par ajout de 0,1V d'acétate de sodium 3 M et 0,7V d'isopropanol à -20°C. Après centrifugation (14000 rpm, 30 min, 4°C), le surnageant est retiré et le culot lavé 2 fois avec 1 mL d'éthanol 70% froid. Après séchage (10min, température ambiante) le culot est resuspendu dans 500 µL d'eau stérile et stocké à -80°C. L'intégrité des ARN obtenus est vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose 1%. De même, l'absence d'ADN est vérifiée en réalisant une PCR sur le gène de ménage *rnpB*.

2. Ligation et transformation de *E. coli* par choc thermique

Les ligations sont effectuées avec le QuickLigation™ Kit (New England Biolabs) en suivant les instructions du fabricant. Un ratio vecteur/insert de 1:3 est utilisé dans le cas d'extrémités cohésives, 1:5 s'il s'agit de bouts francs.

Les cellules compétentes de *E. coli* TOP10 sont préparées par traitement au chlorure de rubidium, transformées par choc thermique et étalées sur milieu LB sélectif en suivant le protocole précédemment décrit [309].

3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et déclinaisons

a. PCR générique

La PCR a été utilisée pour amplifier les gènes étudiés à partir de l'ADNg de *Synechocystis* ainsi que pour vérifier la taille, l'orientation et les séquences de ces constructions génétiques. De plus, l'introduction des vecteurs répliatifs et la propagation des cassettes introduites chez *Synechocystis* ont été suivies avec cette méthode.

Les réactions de routine sont réalisées avec la Taq Polymerase (Invitrogen) en suivant les instructions du fabricant. Pour les fragments nécessitant une absence de mutations (amplification et fusion de plateformes d'homologies, amplification initiale de gène à partir d'ADNg...), une enzyme possédant une activité de proof-reading a été utilisée (Phusion High-Fidelity DNA polymerase, ThermoFisher) selon les instructions du fournisseur. La liste de l'ensemble des amorces utilisées est fournie dans le tableau 8.

Tableau 8 : Liste des amorces utilisées

Name	Sequence 5'→3'	Use
Construction and PCR verification of the $\Delta cp12::Km^r$, $\Delta ureC::Km^r$, $\Delta hoxW::Km^r$, $cp12_{WT}::SmSp^r$, $cp12\Delta Cys::SmSp^r$ and $cp12\Delta AWD::SmSp^r$ mutants.		
cp12 Fw	GGGCTGAACTCCAGAAAGGA	Forward and reverse primers used for amplification of the <i>cp12</i> gene upstream region and <i>SmaI</i> restriction site addition
cp12 <i>SmaI</i> Rv	CCATCAGCCCCCGGGAAAGTTTAACCGCC TACGATTGTCTACAGA	
cp12 <i>SmaI</i> Fw	GTAAACTTTCCCGGGGGGCTGATGGGGCA AACCCAATGGCCGCAA	
cp12 Rv	GGCTACTCCATCAAGGGGAC	
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG	Forward and reverse primers used for size and sequence checking of products cloned in the pGEM-T vector.
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
cp12 up Fw	GGTCAGCAAAGTGAGGAAAA	Forward and reverse primers used to monitor segregation in $\Delta cp12::Km^r$ clones
cp12 dwn Rv	AGGTAATTGTCACTGCTTCA	
Km Fw	TCGAGGCCGCGATTAAATTC	Forward and reverse primers used to monitor elimination of the Km^r marker in $cp12::SpSm^r$ clones
Km Rv	GCGATTCCGACTCGTCCAAC	
SpSm Fw	AAGCGGTGATCGCCGAAGTA	Forward and reverse primers used to monitor spreading of the $SpSm^r$ marker in $cp12::SpSm^r$ clones
SpSm Rv	TGGTGATCTCGCCTTTCACG	
Km <i>HincII</i> Fw	ACCTGCAGGGGGT CGAC GGAAAGCCAC	Forward and reverse primers used for Km^r cassette amplification and <i>HincII</i> restriction sites addition
Km <i>HincII</i> Rv	GGCGCTGAGGT CGAC CTCGTGAAGAAG	
pEX-A Fw	GGAGCAGACAAGCCCGTCAGG	Forward and reverse primers used to check <u>upstream</u> orientation of the Km^r cassette in pEX-A $ureC::Km^r$ and pEX-A $hoxW::Km^r$ vectors. Also used for recombination platforms sequencing in those vectors.
KmR9 Rv	CGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGA ATATGGCTC	
KmA9 Fw	GCTTCATCAACCGTGGCTCCCTCACTTTCT GGCTGGATGATGGGGCG	Forward and reverse primers used to check <u>downstream</u> orientation of the Km^r cassette in pEX-A $ureC::Km^r$ and pEX-A $hoxW::Km^r$ vectors. Also used for recombination platforms sequencing in those vectors.
pEX-A Rv	CAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC	
ureC a Fw	TCGCTGTCTAACTACCACCTTGA	Forward and reverse primers used to monitor segregation in $\Delta ureC::Km^r$ clones
ureC b Rv	CGTTTGCCAAGTACGACAGATAA	
hoxW a Fw	GATAGGTTTTGCGGACTGTGCTA	Forward and reverse primers used to monitor segregation in $\Delta hoxW::Km^r$ clones
hoxW b Rv	ATCTGGGCTAAGGCTTCGGCTT	

Construction and PCR verification of the pTR-*cp12*, pCE-*cp12*, pTR-*hoxW*, pCE-*hoxW* and pCE-*ureG* mutants

cp12 Fw NdeI	CAATCGTAGGCGGTAAACCATATG	Forward primer used for <i>cp12</i> gene amplification and <i>NdeI</i> restriction site addition
cp12 Rv EcoRI	GCCATTGGGTTTGCCCCATGAATTC	Reverse primer used for <i>cp12</i> gene amplification and <i>EcoRI</i> restriction site addition
<i>cl₈₅₇</i> Fw	GTGTCCTTGGTTCGATTCCG	Forward and reverse primers used to sequence the p _R region after cloning of the <i>cp12</i> gene and <i>PsiI</i> digestion of the <i>cl₈₅₇</i> ORF in pFC1 vector.
5' cp12 Rv	TGGCTAGCTCCTGTTCGATT	
hoxW NdeI Fw	CCAGCTGGTTAACGAAAATCATATGCCAGG CCAAT	Forward primer used for <i>hoxW</i> gene amplification and <i>NdeI</i> restriction site addition
hoxW EcoRI Rv	AGCCTAACTTTTCAATTTTGAATTCCTTG GCTT	Reverse primer used for <i>hoxW</i> gene amplification and <i>EcoRI</i> restriction site addition
ureG NdeI Fw	CCTGTTAGTACCATTTAGTCATATGGCTCA AACTC	Forward primer used for <i>ureG</i> gene amplification and <i>NdeI</i> restriction site addition
ureG EcoRI Rv	TAAAAAGGCTCTTAAGCTTGAATTCATTAA CTTGC	Reverse primer used for <i>ureG</i> gene amplification and <i>EcoRI</i> restriction site addition
pFC1 p _R -AI Fw	GGCGACGTGCGTCCTCAAGC	Forward and reverse primers used for size and sequence checking of products cloned under p _R control in pFC1 vectors.
pFC1 ReR1 Rv	GTGTAACAAGGGTGAACAC	

PCR verification of the CE-*hoxEFUYH* (CE1²), p₆₈₀₃-*hoxEFUYHW* and CE-*hoxEFUYHW* (CE4²) mutants

hox up <i>Bam</i> HI Fw	GGCATTGATAATGGATCCCTCGTAGGTCTA A	Forward and reverse primers used to monitor segregation in CE1 ² mutant
hoxE Rv	GCCAATACCGCTTCGTCATTCT	
hoxH up <i>Bam</i> HI Fw	ATTAATGGATCCGAAGCGGTGGGAGTGAG	Forward and reverse primers used to monitor segregation in p ₆₈₀₃ - <i>hoxEFUYHW</i> and CE4 ² mutants
hox dwn Rv bis	ACCGGACGTCAAGTCTCGTTGACAAAA	

Amplification and sequencing of *ureABCDEF* genes regions

ureA seq Fw	AAAGCATCGTCGCCAAAGCAGTGAT	Forward and reverse primers used to amplify and sequence the <i>ureA</i> promoter, ORF and terminator regions.
ureA seq Rv	GGCTAGGCAGTCTCGATAACAGTTCGT	
ureB seq Fw	AGTGTGGCTTTGGGGAGTATCTTCGT	Forward and reverse primers used to amplify and sequence the <i>ureB</i> promoter, ORF and terminator regions.
ureB seq Rv	ACCAAATCATTTCCAAAGCCAAGTGC	
ureC seq Fw	GCTGAGATTCAAAGTTTTCGCACCCAAC	Forward and reverse primers used to amplify and sequence the <i>ureC</i> promoter, ORF and terminator regions.
ureC seq Rv	TTGTAATCCTTGACGCAACCAATCGC	
ureD seq Fw	TTGGTCACCTAGAACGATTGGATGC	Forward and reverse primers used to amplify and sequence the <i>ureD</i> promoter, ORF and terminator regions.
ureD seq Rv	AACCAGTTAGATAAAGTTCGGCAAAGCT	
ureE seq Fw	AATCGGGACAGTATCCGCAAGTTAC	Forward and reverse primers used to amplify and sequence the <i>ureE</i> promoter, ORF and terminator regions.
ureE seq Rv	CTGAGGTTGGGAGGATTGAGGTTTGATT	
ureF seq Fw	CTCTGTTGTTGGAGGTATTCACCGATCT	Forward and reverse primers used to amplify and sequence the <i>ureF</i> promoter, ORF and terminator regions.
ureF seq Rv	CTGTAACAGTAGCAGTCATAGGATGAGGT	

In-depth size and sequence analyses of the region surrounding the *ureG* gene

sll0648 Fw	CGGTCAATATTATCTCATTGC	Forward and reverse primers used to amplify most of the <i>sll0648</i> coding sequence.
sll0648 Rv	TGGGCAGGATTGAAGTTATAG	
sll0647 Fw	TAACCTAACCTTTCTTGGCTCC	Forward and reverse primers used to amplify most of the <i>sll0647</i> coding sequence. The reverse primer was also used for sequencing of the mutated locus.
sll0647 Rv	GGAGCCAAGAAAGGTTAGGTTA	
sll0646 Rv	TATTAGGATCGGGGTATTTAT	Reverse primer used to amplify the region between <i>sll0646</i> and <i>slr0687</i> genes, including the <i>ureG</i> ORF.
ureG up Fw	ATCTGATAGTGAGGCTTAGGGAGTTCA	Forward and reverse primers used to amplify and sequence the <i>ureG</i> promoter, ORF and terminator regions.
ureG dwn Rv	TTATCAGCAGCTTGTTGACTGTCTGGT	
slr0687 Fw	GTGGTTATTTACCGTTGCTATT	Forward and reverse primers used to amplify most of the <i>slr0687</i> coding sequence. The reverse primer was also used for amplification of the region between <i>sll0646</i> and <i>slr0687</i> genes and sequencing of the mutated locus.
slr0687 Rv	GGGAATAGCAACGGTAAATAA	
sll0641 Fw	TGGTTACATTACGATTTTAGTCC	Forward and reverse primers used to amplify most of the <i>sll0641</i> coding sequence.
sll0641 Rv	GGCTTACTTCTAAAGGAGTGTTT	

qPCR analysis of *cp12*, *hoxW* and *ureABCDEFG* expression

rnpB qPCR Fw	GTGAGGACAGTGCCACAGAA	Forward and reverse primers used for qPCR assay of <i>rnpB</i> expression (housekeeping gene)
rnpB qPCR Rv	GGCAGGAAAAAGACCAACCT	
rrnA qPCR Fw	CACACTGGGACTGAGACAC	Forward and reverse primers used for qPCR assay of <i>rrnA</i> expression (housekeeping gene)
rrnA qPCR Rv	CTGCTGGCACGGAGTTAG	
cp12 qPCR Fw	TCAAGAAAAAATCGAACAGG	Forward and reverse primers used for qPCR assay of <i>cp12</i> expression
cp12 qPCR Rv	GTCGTAAATGCGGCACTC	
hoxW qPCR Fw	TATTTCCACCCATCAACTCA	Forward and reverse primers used for qPCR assay of <i>hoxW</i> expression
hoxW qPCR Rv	ATTTTAGCCAGGGTCAAGAG	
ureA qPCR Fw	CAAACCTCAACTATCCCGAAGCC	Forward and reverse primers used for qPCR assay of <i>ureA</i> expression
ureA qPCR Rv	GTCACCAGTTTAGTGCCATCG	
ureB qPCR Fw	TCAAGTGGGTTCCATTACCAT	Forward and reverse primers used for qPCR assay of <i>ureB</i> expression
ureB qPCR Rv	CACCAAGCCATTGAAGCCATAG	
ureC qPCR Fw	GTCAAAGCTGATGTGGGCATTA	Forward and reverse primers used for qPCR assay of <i>ureC</i> expression
ureC qPCR Rv	TAAGGCCGTTTCAATCTGTTGG	
ureD qPCR Fw	CGGCGGGAAAGATTTATCGTAG	Forward and reverse primers used for qPCR assay of <i>ureD</i> expression
ureD qPCR Rv	AAACGGACAATTTCCCAACCTT	
ureE qPCR Fw	GATAAACCTGGCTTTCCGTCTC	Forward and reverse primers used for qPCR assay of <i>ureE</i> expression
ureE qPCR Rv	CACATGGCGATTACCCAAATGA	
ureF qPCR Fw	GACACAGCCATTATGGTTCGAG	Forward and reverse primers used for qPCR assay of <i>ureF</i> expression
ureF qPCR Rv	TGCACAGTAGGCTCTAAATCCA	
ureG qPCR Fw	GGGAGATAATTTAGCAGCCACC	Forward and reverse primers used for qPCR assay of <i>ureG</i> expression
ureG qPCR Rv	TTTGCATCCCGATCCATGATTC	

b. PCR assemblage

La PCR assemblage a été choisie pour construire les cassettes de délétion ou de remplacement de gène à introduire chez *Synechocystis* et comprend 2 étapes.

La première consiste à amplifier les 2 fragments adjacents à la région génomique d'intérêt. Les amorces de cette première étape sont conçues de telle sorte que les 2 produits d'amplification présentent un chevauchement d'au moins 10 nucléotides. Si nécessaire, celui-ci peut inclure un site de restriction franc et unique (typiquement *Sma*I ou *Eco*RV) pour l'insertion ultérieure d'une cassette de résistance à un antibiotique.

La fusion est réalisée lors d'une seconde étape d'amplification en hybridant les deux fragments à une température inférieure au T_m de cette zone de recouvrement et en utilisant les amorces extérieures.

c. PCR quantitative (qPCR)

La rétrotranscription est réalisée avec la M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) combinée aux random primers (Roche), RNasin (Promega) et RNase H (Ambion). Les ADNc sont synthétisés à partir de 5 µg d'ARN totaux en suivant les instructions du kit M-MLV puis stockés à -20°C.

Les solutions d'ADNc sont normalisées à une concentration de 1 µg/µL puis diluées de 4 en 4 (facteurs de dilutions de 4 à 16384). La taille des produits d'amplification varie entre 190 et 210 pb. L'efficacité de réaction pour chaque couple d'amorces est obtenue grâce au dépôt sur plaque des dilutions sérielles d'ADNc (de 156,25 à 0,15 ng déposés). Les mélanges réactionnels sont préparés avec le kit Mesa Green qPCR MasterMix (Eurogentec) en suivant les instructions du fabricant. Les réactions sont réalisées sur plaque 96 puits (iQ™ 96-well PCR plates, BioRad) dans un volume final de 25 µL comprenant 2,5 µL d'ADNc dilués (facteur de dilution choisit pour obtenir un Ct idéalement compris entre 18 et 22). Les cycles d'amplification et la mesure de fluorescence sont réalisés à l'aide d'un iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BioRad) en utilisant le programme suivant : 2 minutes à 50°C, 2 minutes à 95°C puis 60 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C.

Le calcul des facteurs d'expression est réalisé à partir des valeurs de Ct ainsi obtenues et en utilisant 2 gènes de référence (*rnpB* et *rrnA*).

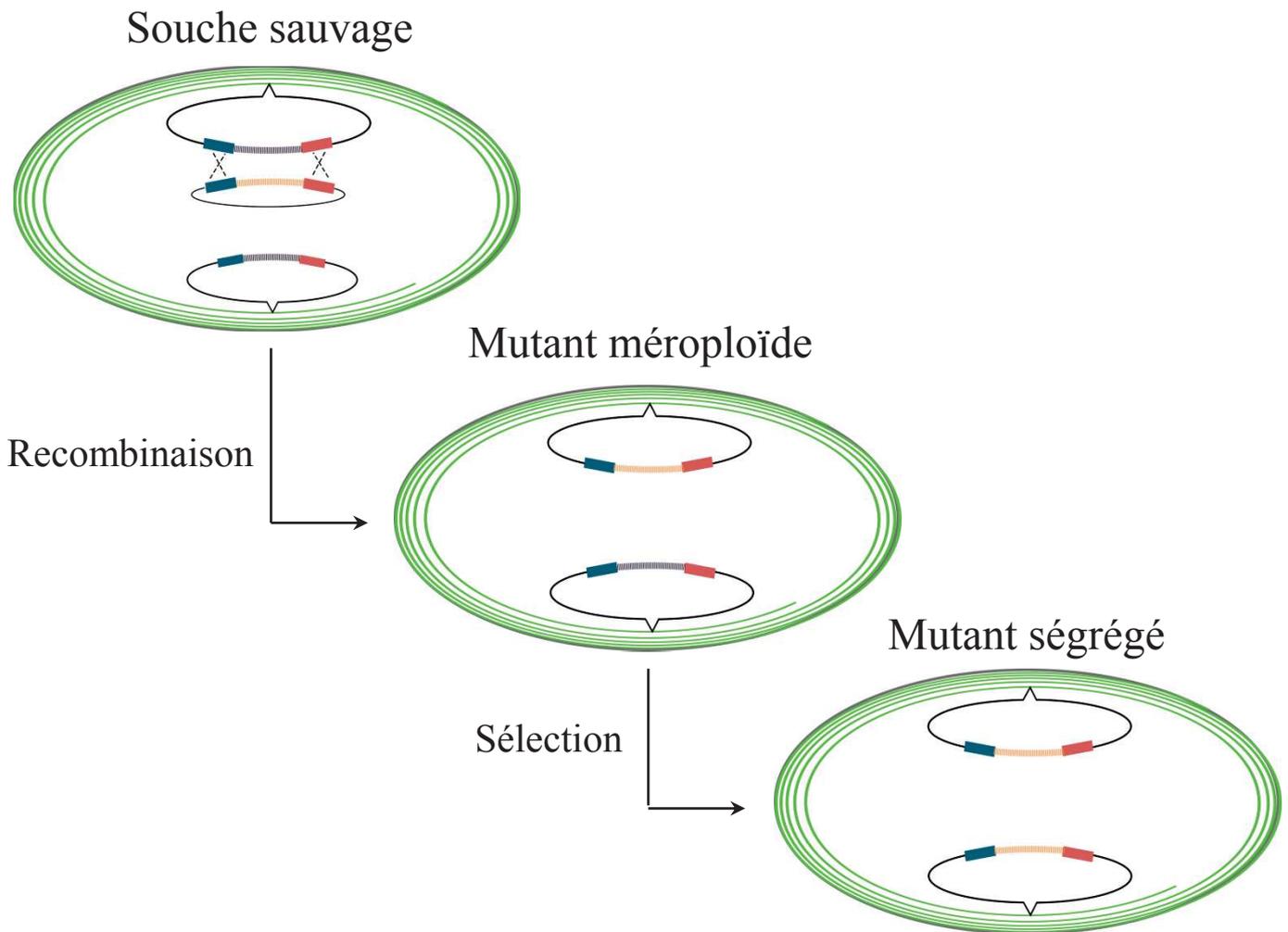


Figure 60 : Principe de transformation et de ségrégation des mutations chez *Synechocystis*.

Les plasmides portant les différentes cassettes de délétion sont introduites chez *Synechocystis* par transformation. La recombinaison homologue induit le remplacement de la région génomique ciblée. Les clones de *Synechocystis* ayant intégré le fragment d'intérêt sont sélectionnés grâce à une pression de sélection (antibiotique). Celle-ci est maintenue pendant plusieurs générations pour favoriser la propagation des copies de chromosome mutées dans les cellules car celles-ci présentent jusqu'à 12 copies du génome par cellule en phase exponentielle de croissance. Cette ségrégation est suivie par PCR à l'aide d'amorces spécifiques et peut rester incomplète lorsque la région délétée est essentielle à la viabilité cellulaire (mutant méroplöide). A l'inverse, une disparition irréversible des copies de chromosome sauvage indique que le gène n'est pas indispensable en conditions de laboratoire (mutant homoploïde).

4. Transcriptomique sur puce à ADN

La synthèse des ADNc est réalisée avec la transcriptase inverse Superscript II (Invitrogen) à partir de 10 µg d'ARN totaux en suivant les instructions du fabricant et en présence d'aminallyl-dUTP (Invitrogen), un analogue réactif du dUTP se conjugant spontanément aux fluorophores. Les ADNc sont ensuite successivement purifiés à l'aide du kit QIAquick PCR purification (Qiagen) et précipités à l'éthanol. Après resuspension dans le tampon de couplage (bicarbonate de soude 100 mM, pH 9), les ADNc sont mélangés avec un volume égal de fluorophore (Cy3 ou Cy5 fournis dans le CyTMDye Post-labeling Reactive Dye Pack, GE Healthcare Life Sciences) et incubés 1 heure à l'obscurité. Les échantillons ainsi marqués sont à nouveau purifiés sur colonne. La quantité d'ADNc récupérée et l'efficacité de marquage sont vérifiées au NanoDrop.

Le blocage, la fragmentation, l'hybridation et le scan sont réalisés en utilisant les produits et protocoles d'Agilent Technologies. Brièvement, des quantités égales d'ADNc issus des échantillons à comparer (l'un marqué en Cy3, l'autre en Cy5) sont mélangés et additionnés d'agent bloquant et de tampon de fragmentation. Le mélange (et le témoin en dye swap correspondant) est ensuite déposé dans la chambre d'hybridation et placé dans un four à hybridation pendant 17 heures (65°C, 10 rpm). Après lavages et scan de la lame, les données brutes de fluorescence sont extraites à l'aide du logiciel GenePix®. L'analyse bioinformatique est effectuée selon la méthodologie décrite [302].

B. Manipulation génétique chez *Synechocystis*

1. Inactivation de gène par transformation

Synechocystis est une bactérie naturellement compétente et est donc capable de prélever l'ADN du milieu extracellulaire. S'il comporte des régions homologues au génome, cet ADN exogène est pris en charge et induit une recombinaison homologue grâce à la machinerie codée par le génome de *Synechocystis* [310]. Cette propriété est utilisée pour effectuer des inactivations de gènes en flanquant un marqueur de sélection (typiquement une cassette de résistance à un antibiotique) avec les régions amont et aval du gène cible (plateformes d'homologie, Figure 60). Après transformation, les cellules ayant subi un événement de recombinaison (*i.e* acquisition d'une copie de chromosome mutée ayant perdu le gène étudié mais portant la cassette de résistance) sont sélectionnées en présence d'antibiotique. *Synechocystis* est un organisme polyploïde (environ 10 copies du chromosome

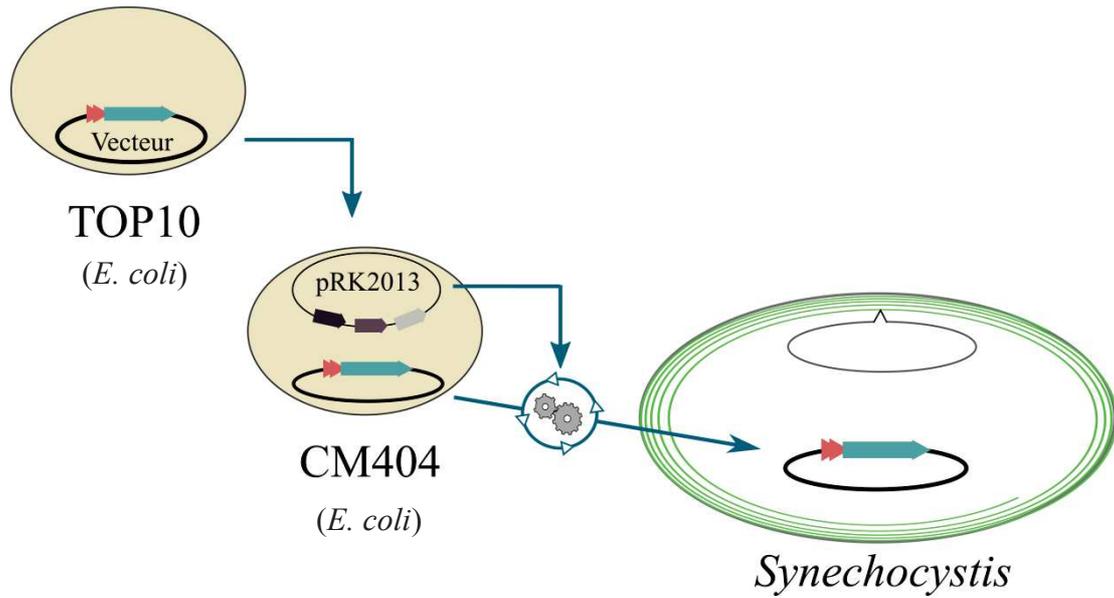


Figure 61 : Principe de la conjugaison à trois partenaires chez *Synechocystis*.

La conjugaison à trois partenaires est réalisée en incubant simultanément la souche d'*E. coli* TOP10 transformée avec le vecteur répliatif d'intérêt (par exemple le pFC1 portant le gène étudié en bleu sous contrôle d'un système de surexpression représenté en rouge), la souche d'*E. coli* CM404 qui dispose du plasmide mobilisateur pRK2013 (gènes indiqués en violet et gris codant pour la machinerie de transfert par conjugaison) et la souche de *Synechocystis* d'intérêt. Après conjugaison, les clones sont sélectionnés en appliquant une pression de sélection (antibiotique) et la présence du vecteur est finalement vérifiée par PCR.

par cellule en phase exponentielle de croissance, Labarre *et al*, 1989), il est donc nécessaire de favoriser la propagation de cette copie mutée pour obtenir un mutant totalement ségrégué pour cette mutation. Ceci est réalisé en augmentant la concentration en antibiotique jusqu'à l'extinction totale des copies sauvages (suivie par PCR). Par ailleurs, si le gène cible est essentiel dans les conditions standard de croissance, une proportion plus ou moins grande de chromosomes sauvages subsistera dans le mutant (hétéropléidie).

La souche à transformer est maintenue en phase exponentielle de croissance pendant 7 jours avant d'être centrifugée et lavée 2 fois dans du milieu frais. Après resuspension, 1mL de la suspension est incubée avec 1-2 µg d'ADN dilué dans du T0,1E (pH 7,5). Le mélange est déposé dans des tubes en verre stériles et placé à 3500 lux, 30°C sans agitation pendant 1h30. Les suspensions sont ensuite étalées sur boîte (sans pression de sélection) et incubées à différentes intensités lumineuses pendant 20 heures. 0,4 mL de solution d'antibiotiques aux concentrations adéquates (Tableau 5) sont ensuite ajoutés sous la gélose. Après environ 10 jours, les transformants obtenus sont cultivés à des doses croissantes d'antibiotique jusqu'à ségrégation complète.

2. Transfert de plasmide répliatif par conjugaison

Il est également possible d'introduire des réplicons autonomes chez *Synechocystis* par conjugaison. Ces plasmides répliatifs offrent notamment de nombreuses possibilités quant à l'expression de gènes, qu'ils soient hétérologues ou non, sans affecter l'intégrité chromosomique. En effet, ce type d'outil génétique comporte souvent un promoteur (de force variable, avec ou sans système d'induction) conçu pour exprimer des fusions de gènes (Tag de purification, fusions GFP...), des gènes hétérologues (codant par exemple des enzymes nécessaires à la production de composés naturellement absents) ou encore pour surexprimer des gènes chromosomiques.

La conjugaison est un transfert à 3 partenaires : la souche d'*E.coli* TOP10 portant le vecteur d'intérêt, la souche d'*E. coli* CM404 portant le plasmide mobilisateur pRK2013 (intermédiaire transférant le plasmide de la souche TOP10 vers *Synechocystis*) et la souche receveuse de *Synechocystis* (Figure 61). Les cultures sont récoltées, lavées 2 fois dans du milieu frais puis mélangées à raison de $3 \cdot 10^8$ cellules pour chaque souche. 30 µL de cette coculture sont déposés sur boîte MM sans antibiotique et incubés 24h à 30°C, 2500 lux. Le spot de conjugaison est ensuite resuspendu et étalé sur boîte MM avec l'antibiotique adéquat. La présence du plasmide dans les conjuguants obtenus est vérifiée par PCR.

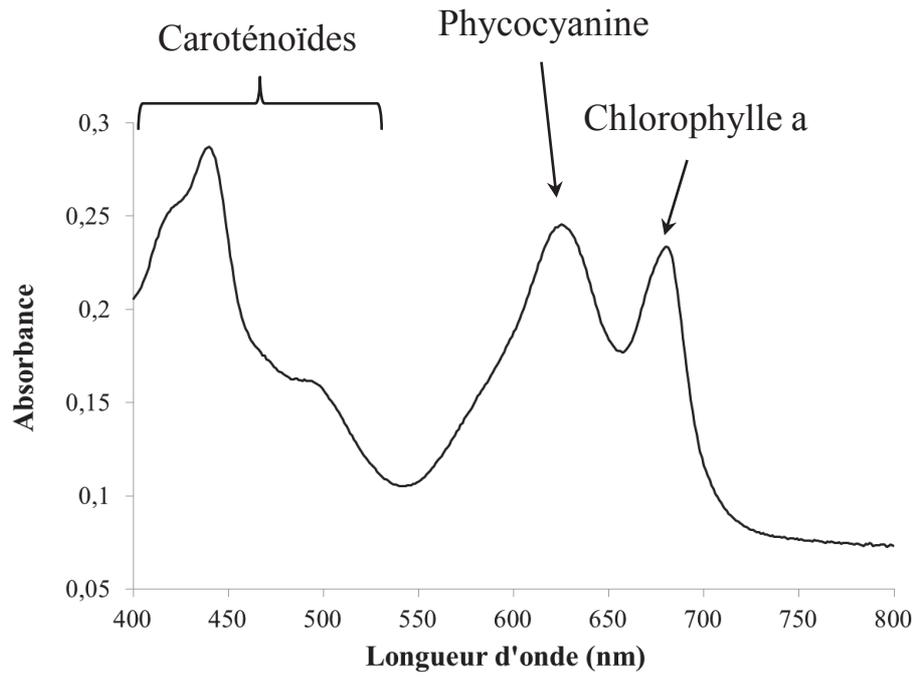


Figure 62 : Spectre d'absorbance typique des cellules de *Synechocystis*.

C. Tests de croissance

Les tests de croissance sur milieu solide (ou spot tests) sont réalisés à partir de cultures en phase exponentielle ($DO_{580} = 0,5$) des souches à étudier. Chacune de ces cultures est diluée 7 fois en cascade (facteur de dilution = 5) dans du milieu stérile. 10 μ L de chaque dilution sont ensuite déposés sur une boîte contenant la substance d'intérêt (voir Tableau 6) et incubée à 30°C à la lumière indiquée. Après 5-7 jours, les éventuels effets sur les différentes souches sont mis en évidence en comparant la croissance (nombre et/ou couleur) des dépôts réalisés.

Les tests de croissance sur milieu liquide sont aussi réalisés à l'aide de cultures en phase exponentielle mais celles-ci sont utilisées pour ensemercer directement du milieu frais contenant les substances étudiées (voir Tableau 6). Ces nouvelles cultures sont préparées à $DO_{580} = 0,05$ et incubées dans les conditions indiquées (par défaut 30°C à 2500 lux).

D. Mesure des pigments de *Synechocystis*

1. Evaluation globale

Le contenu en pigments de *Synechocystis* est évalué par mesure du spectre d'absorbance de 350 à 800 nm (Figure 62) à l'aide d'un spectrophotomètre (Secomam, Uvikon XL). Tous les échantillons sont normalisés à $DO_{750} = 0,1$.

2. Extraction et dosage spectrophotométrique de la chlorophylle a

Pour obtenir une mesure précise de la quantité en chlorophylle a, environ 10^8 cellules sont prélevées, centrifugées et resuspendues dans un faible volume d' H_2O stérile (<50 μ L). 1 mL de méthanol absolu est ajouté à chaque suspension puis agité 2 heures à 4°C sur un Vibrax® (1500 rpm). Les extraits sont ensuite centrifugés 5 min (14000 rpm, 4°C) et l'absorbance du surnageant est mesurée à 666 nm.

La concentration en chlorophylle est obtenue en considérant un coefficient d'extinction spécifique de la chlorophylle a de 79,29 L/g/cm (Li *et al*, 2012) dans une solution de méthanol 100%.

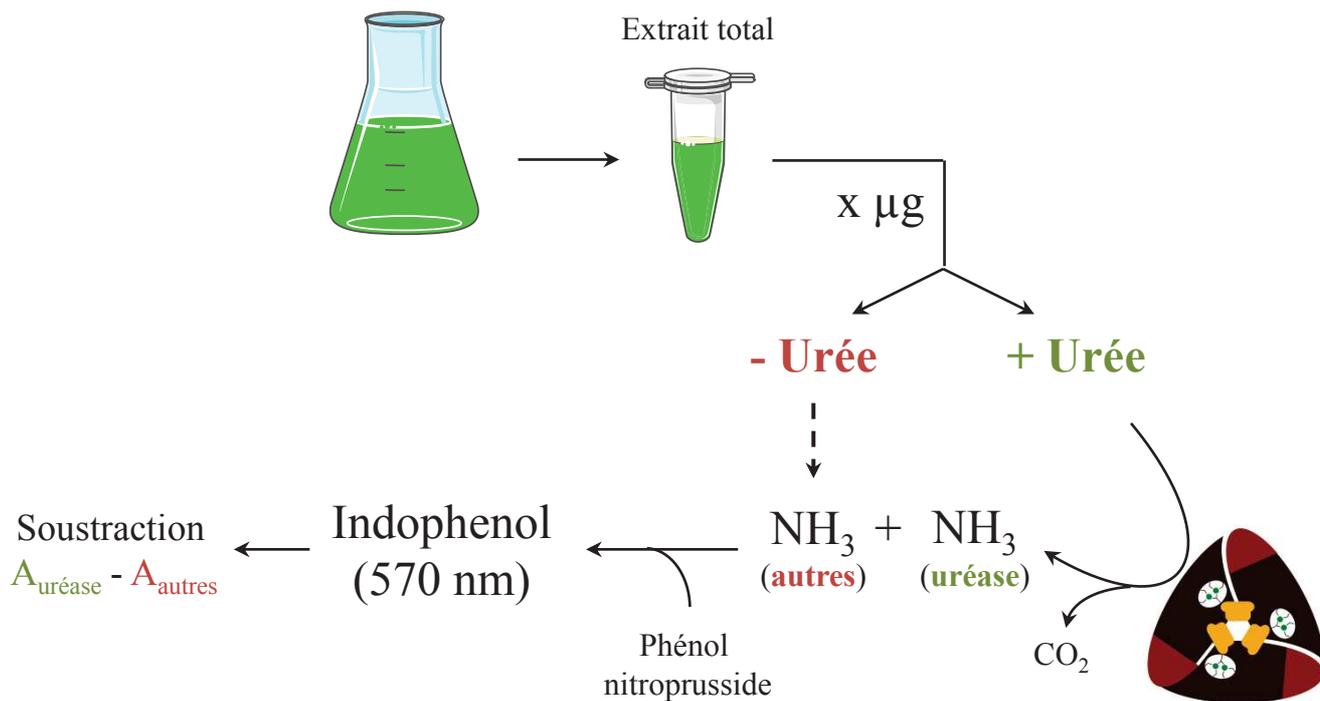


Figure 63 : Protocole de quantification de l'activité uréase chez *Synechocystis*.

E. Dosages des activités enzymatiques

1. Activités PRK, GAPDH et G6PDH

Les cultures de *Synechocystis* en phase exponentielle sont centrifugées (10min, 5000rpm, température ambiante) puis resuspendues dans 1mL de tampon (Tris-HCl 15 mM, EDTA 4 mM, NAD⁺ 0,1 mM, L-cystéine 2 mM, cocktail inhibiteur de protéases 0,5 µg.mL⁻¹, glycérol 10%, pH = 7,9). Après cassage à la presse de Eaton, les extraits sont centrifugés (20 min, 14000 rpm, 4°C) et les surnageants sont stockés à -80°C avant dosage.

Premièrement, la concentration en protéines de chaque extrait est mesurée à l'aide du dosage de Bradford. Pour chaque activité, une quantité identique de protéines est ensuite incubée 20 minutes à température ambiante : avec aucun additif (conditions natives), 20 mM de DTT réduit (conditions réductrices) ou 20 mM de DTT oxydé (conditions oxydantes). Les dosages sont ensuite réalisés comme précédemment décrits pour les activités NADH-dépendante [186] et NADPH-dépendante de la GAPDH [185], la PRK [185,311] et la G6PDH [312].

2. Activité uréase

Le protocole utilisé pour mesurer l'activité uréase a été adapté aux cyanobactéries à partir de celui conçu pour *Helicobacter pylori* par van Vliet *et al* [282]. Il repose sur la détection de l'ammonium en solution grâce à la réaction de Berthelot (Figure 63). Celle-ci est réalisée par ajout de phénol nitroprusside qui se complexe aux ions NH₄⁺ en conditions alcalines pour former de l'indophénol, un chromophore de couleur bleue (mesuré par spectrophotométrie à $\lambda = 570$ nm).

Les souches d'intérêt sont cultivées dans les conditions désirées puis centrifugées (10 min, 5000 rpm, température ambiante). Le culot de cellules est resuspendu dans 700 µL de tampon PBS EDTA 10 mM pH 7,5 contenant un cocktail inhibiteur de protéases (Roche) et transféré dans les presses de Eaton refroidies à -80°C. Après cassage, la concentration en protéines de ces extraits bruts est évaluée en suivant la méthode de Bradford [313]. Pour chaque échantillon, il est indispensable de coupler la réaction de dosage "globale" à une réaction témoin dont l'absorbance sera soustraite au dosage correspondant. En effet, la présence de phycocyanine ou d'activités enzymatiques (autres que l'uréase) produisant de l'ammonium vont biaiser la mesure finale d'absorbance à 570 nm.

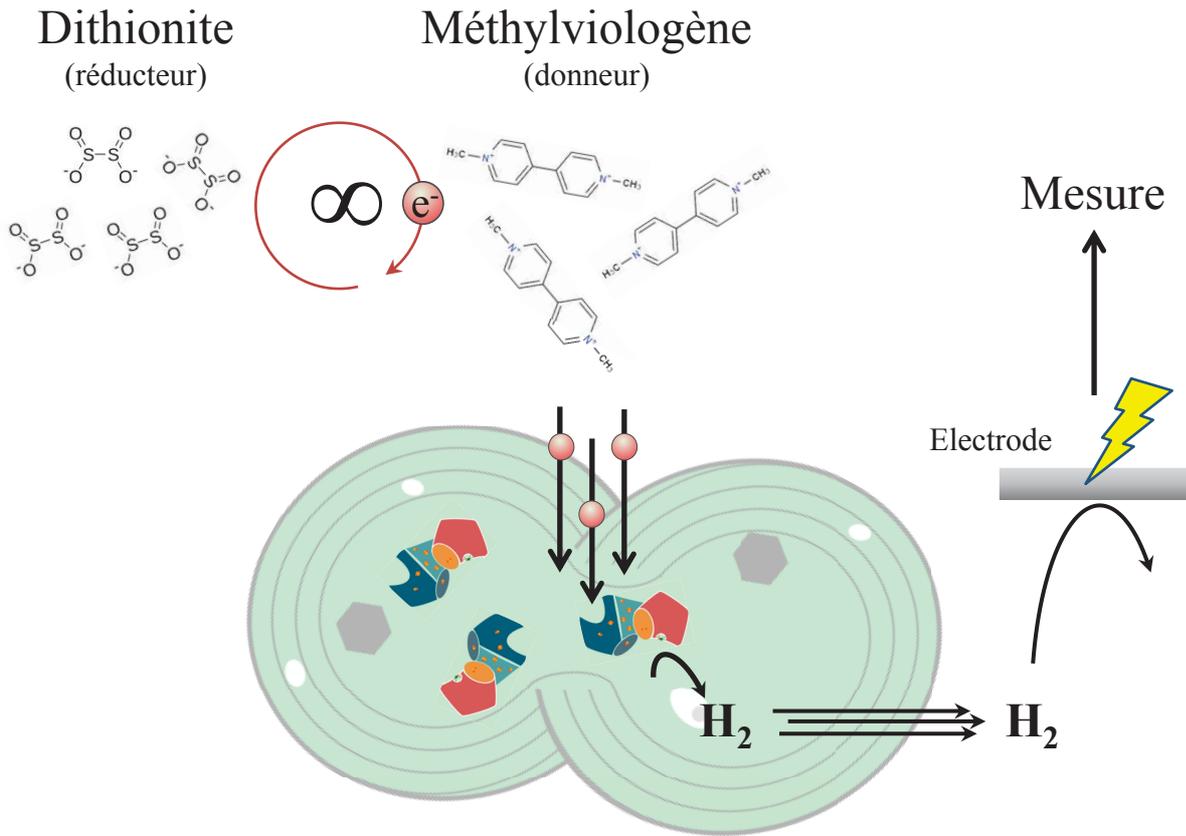


Figure 64 : Méthode d'analyse de l'activité hydrogénase de *Synechocystis*.

Les complexes colorés à l'intérieur de la cellule représentent la forme mature et active de l'hydrogénase dont l'activité est mesurée en présence de substrat en excès (méthylviologène réduit).

Ainsi, 10 µg de protéines sont incubés dans un tampon PBS EDTA 10 mM pH 7,5 (réaction témoin) tandis que 10 µg supplémentaires sont incubés dans le même tampon supplémenté avec 50 mM d'urée (volumes finaux = 100 µL). Chaque couple est ensuite placé 10 minutes à 30°C. Les réactions sont brutalement stoppées par ajout de 150 µL de phénol nitroprusside (Sigma-Aldrich) puis 150 µL de solution hypochlorite alcaline (Sigma-Aldrich). 700 µL d'H₂O sont ensuite ajoutés et la formation du chromophore est réalisée par incubation 10 min à 37°C. Après lecture de la densité optique à 570 nm, la valeur d'absorbance obtenue pour chaque réaction témoin est soustraite à son échantillon respectif. La quantité d'ammonium produit est déterminée par inférence sur une gamme de NH₄Cl obtenue en suivant le même protocole. L'activité uréase est exprimée en µmoles d'urée hydrolysée/min/mg de protéines.

3. Activité hydrogénase

7 unités de DO ($\approx 3,5 \cdot 10^8$ cellules) de chaque culture sont centrifugées (10 min, 5000 rpm, 20°C) avant retrait complet des surnageants. Les culots de cellules ainsi obtenus sont stockés à -80°C avant dosage. Après décongélation, les échantillons sont introduits dans une hôte anaérobie, resuspendus dans 175 µL de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) et incubés 30 minutes à l'obscurité. 25 µL de cellules sont ensuite injectés dans la chambre d'une électrode de Clark inversée préalablement immergée dans une solution de dithionite de sodium (agent réducteur) à 20 mM et de méthylviologène (donneur d'électrons) à 5 mM (Figure 64). Pour chaque série de mesures, l'équivalence entre voltage et quantité de H₂ est obtenue grâce à une injection de solution saturée de dihydrogène comme précédemment décrit [267].

F. Etude *in situ* des processus cellulaires

1. Production et consommation du pouvoir réducteur

2 mL de culture en phase exponentielle sont centrifugés (1 min, 13000 rpm, température ambiante) et les cellules sont lavées 2 fois dans du milieu stérile. La suspension cellulaire finale est diluée à $DO_{580} = 0,5$ (mesurée sur un spectrophotomètre Aminco DW2). 1 mL de cette suspension est ensuite placé dans un fluorimètre DUAL-PAM (Walz, Allemagne) équipé du module NADPH/9-AA. Les cellules sont préadaptées 10 minutes (sous agitation) à l'obscurité avant analyse et l'agitation est stoppée 30 secondes avant chaque série de mesure.

☀ = Production NAD(P)H + activation des voies le consommant

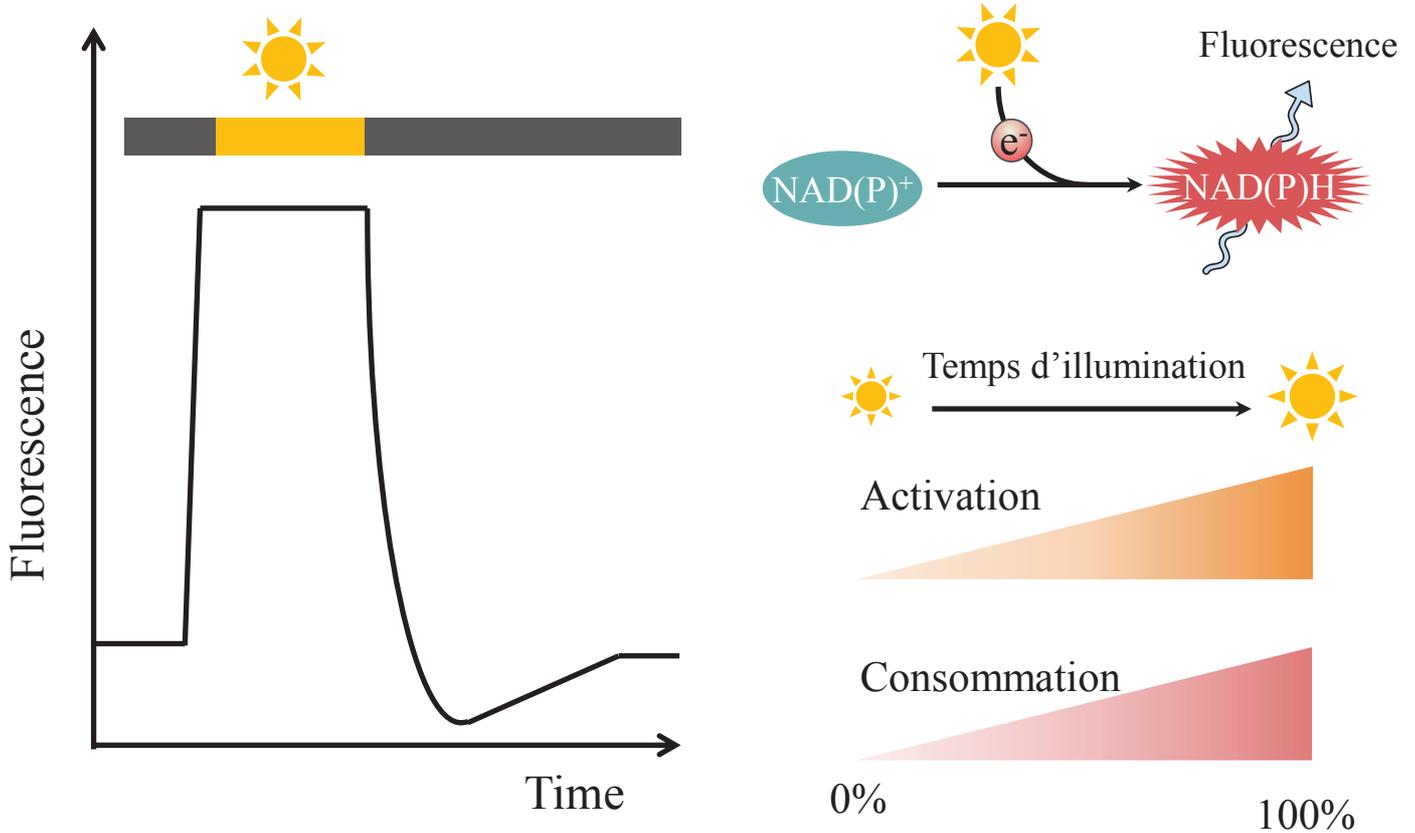


Figure 65: Principe de mesure de la dynamique du pouvoir réducteur par DUAL-PAM chez *Synechocystis*.

En présence de lumière (symbolisée par un soleil), la photosynthèse produit du pouvoir réducteur en réduisant les cofacteurs oxydés (NAD⁺ et NADP⁺). Sous leur forme réduite NAD(P)H, ces cofacteurs émettent de la fluorescence lorsqu'ils sont excités à 365 nm (enregistrement du signal à 420-580 nm). La photosynthèse induit progressivement l'activation des voies anaboliques (réduction des ponts disulfures régulateurs, déglutathionylation...) et stimule donc la consommation du pouvoir réducteur qu'elle produit. Lorsque l'éclairement des cellules est stoppé, la vitesse de consommation (proportionnelle à la durée d'illumination) peut être mesurée via la décroissance du signal de fluorescence.

Le montage expérimental est strictement identique à celui décrit précédemment [277]. La production de pouvoir réducteur est déclenchée par l'excitation des pigments photosynthétiques avec une lumière actinique saturante (620-635 nm). L'excitation à 365 nm des cofacteurs réduits (NADPH et NADH) déclenche une émission de fluorescence ($\lambda = 420-580$ nm) mesurée grâce à un filtre chromatique à bande large (Figure 65). Durant les phases d'illumination, la fréquence de mesure est fixée à 5000 Hz. En revanche, elle est abaissée à 100 Hz au cours des phases d'obscurité pour éviter une excitation significative des pigments et donc la production d'un signal de fluorescence parasite. Les signaux de fluorescence obtenus pour chaque série de mesures sont également calibrés grâce à un standard de NADPH de concentration connue (entre 2 et 4 μM).

2. Production et consommation d'oxygène

Après centrifugation (2 min, 13000 rpm, température ambiante) et lavage dans du milieu frais, les cellules sont resuspendues à $\text{DO}_{580} = 0,5$. 1 mL est ensuite transféré dans la chambre d'une électrode de Clark (Hansatech). Les cellules sont préadaptées à une lumière blanche saturante pendant 10 minutes avec agitation modérée (60 rpm) avant enregistrement. L'équivalence entre le voltage et la quantité d'oxygène est fournie par le logiciel du fabricant après calibration de l'électrode à l'aide de milieu frais puis d'une solution de dithionite de sodium. La production nette et la consommation d'oxygène (exprimées en $\text{nmoles} \cdot 10^{-9} \text{cellules} \cdot \text{s}^{-1}$) sont calculées après extraction manuelle des coefficients directeurs des pentes obtenues durant les phases d'illumination et d'obscurité respectivement.

G. Analyse des métabolites de *Synechocystis*

1. Dosage enzymatique du glutathion (GSH) intracellulaire total

50 mL de culture en phase exponentielle de croissance sont centrifugés (10min, 5000 rpm, température ambiante) puis resuspendus dans 1 mL de PBS contenant 1 mM d'EDTA 5% d'acide sulfosalicylique (m/v). Les suspensions sont soumises à 3 cycles de congélation (azote liquide), de décongélation (30°C) et d'agitation au Vibrax (10 min, 2000 rpm). Les lysats obtenus sont centrifugés (14000 rpm, 5 min, 4°C) et 500 μL de surnageant sont ensuite filtrés par centrifugation (14000 rpm, 20 min, 4°C) sur colonne Amicon Ultra-0,5 30K (Millipore). Les filtrats sont stockés à -80°C avant analyse.

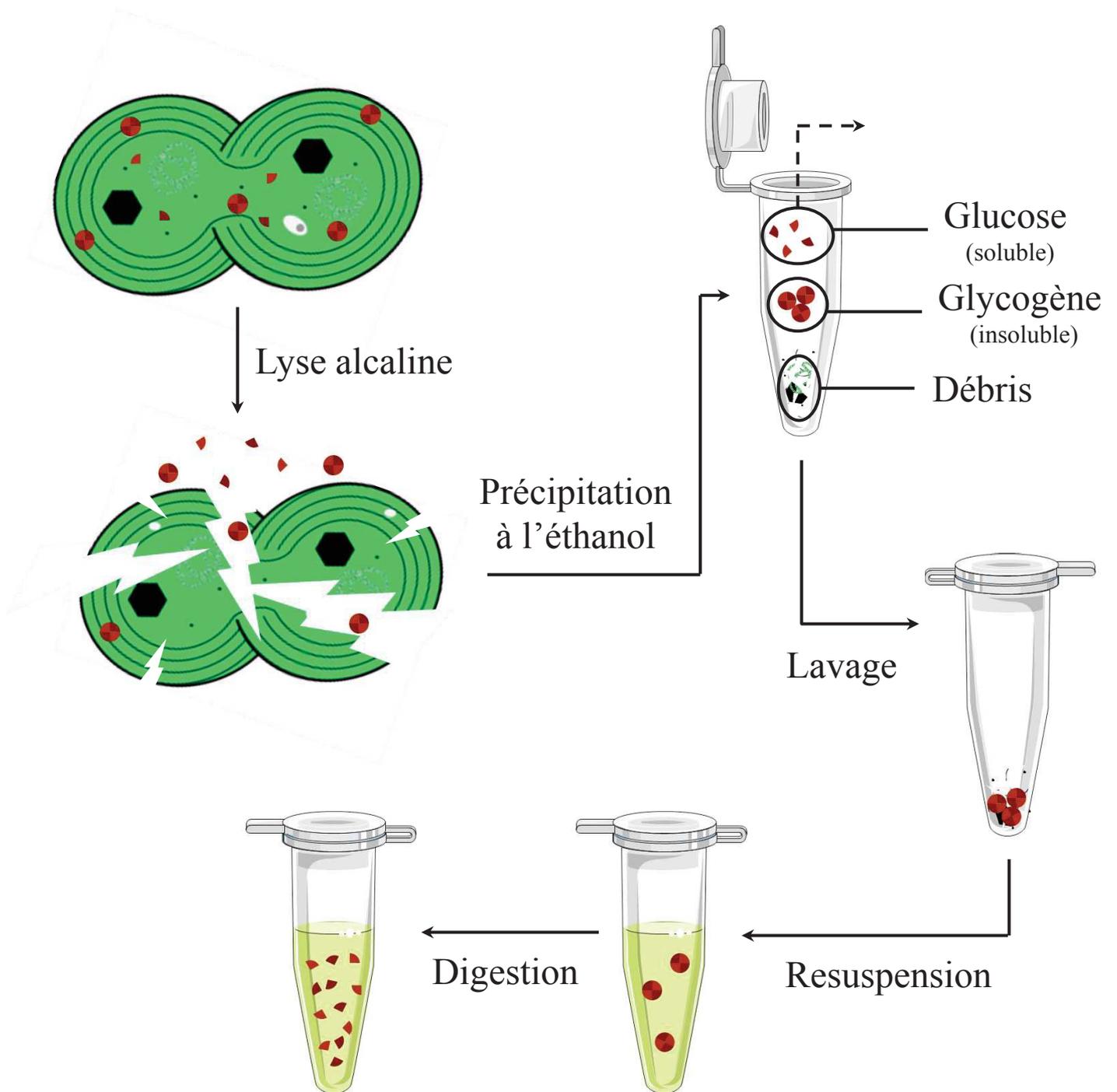


Figure 66 : Principe d'extraction et dosage du glycogène chez *Synechocystis*.

La réaction de dosage repose sur la réduction du DTNB par la glutathion réductase en consommant le glutathion de l'extrait. Le mélange réactionnel est composé de 315 μL de PBS-EDTA (1 mM) additionné de 7,5 μL de DTNB (1,5 mg/mL) et 7,5 μL de glutathion réductase de levure (6 U/mL). 10 μL d'échantillon sont utilisés pour le dosage. La réaction est initiée par ajout de 10 μL de NADPH (2 mg/mL). La réduction du DTNB produit du TNB, un chromophore dont l'apparition est mesurée à 412 nm sur un spectrophotomètre (Secomam, Uvikon XL). La pente extraite pour chaque échantillon est proportionnelle à la quantité de GSH présent. Elle est inférée sur une gamme de glutathion obtenue de la même manière à partir de solutions de concentrations connues. Le contenu en GSH des cellules (mM) est calculé à partir du nombre de cellules et en considérant un volume cellulaire de $1,76 \cdot 10^{-12}$ mL.

2. Dosage enzymatique du glycogène

2 mL de culture sont centrifugés (2 min, 14000 rpm, température ambiante) et lavés 2 fois avec 250 μL d'eau stérile. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 200 μL d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 30% (Figure 66). La lyse est obtenue par incubation des suspensions à 95°C pendant 2 heures. Les lysats sont ensuite incubés 5 minutes sur glace avant addition de 850 μL d'éthanol absolu froid et incubation pendant 2 heures sur glace. Les échantillons sont centrifugés (10 min, 14000 rpm, 4°C) et les culots sont lavés une première fois avec 1 mL d'éthanol froid à 70% puis, après une nouvelle centrifugation, avec 1 mL d'éthanol absolu. Après une dernière centrifugation, les culots sont séchés et stockés à -80°C avant de procéder au dosage.

Les échantillons sont resuspendus dans 190 μL d'acétate de sodium 100 mM (pH = 3,5) avant ajout de 10 μL d'amyloglucosidase (30 mg.mL⁻¹) et ajustement du pH à 5, si nécessaire. Les échantillons sont ensuite placés pendant 2 heures à 60°C puis centrifugés (10 min, 14000 rpm, température ambiante) pour récupérer les surnageants. 10 μL de surnageant sont ensuite mélangés avec 1 mL de Glucose Hexokinase Reagent (Thermo Fisher Scientific) dans une cuve UV de spectrophotomètre. L'augmentation d'absorbance à 340 nm (réduction du NAD⁺) est suivie jusqu'au plateau à l'aide d'un spectrophotomètre Secomam Uvikon (Servilab). L'amplitude de la variation ($A_{\text{max}} - A_{\text{min}}$) est inférée sur une gamme étalon obtenue à partir de surnageants de concentration connue de glucose (digestion de quantités connues de glycogène). Les valeurs sont ensuite converties à l'aide du nombre de cellules prélevé et du volume cellulaire ($1,76 \cdot 10^{-12}$ mL) pour être finalement exprimées en concentration intracellulaire de glucose (mM).

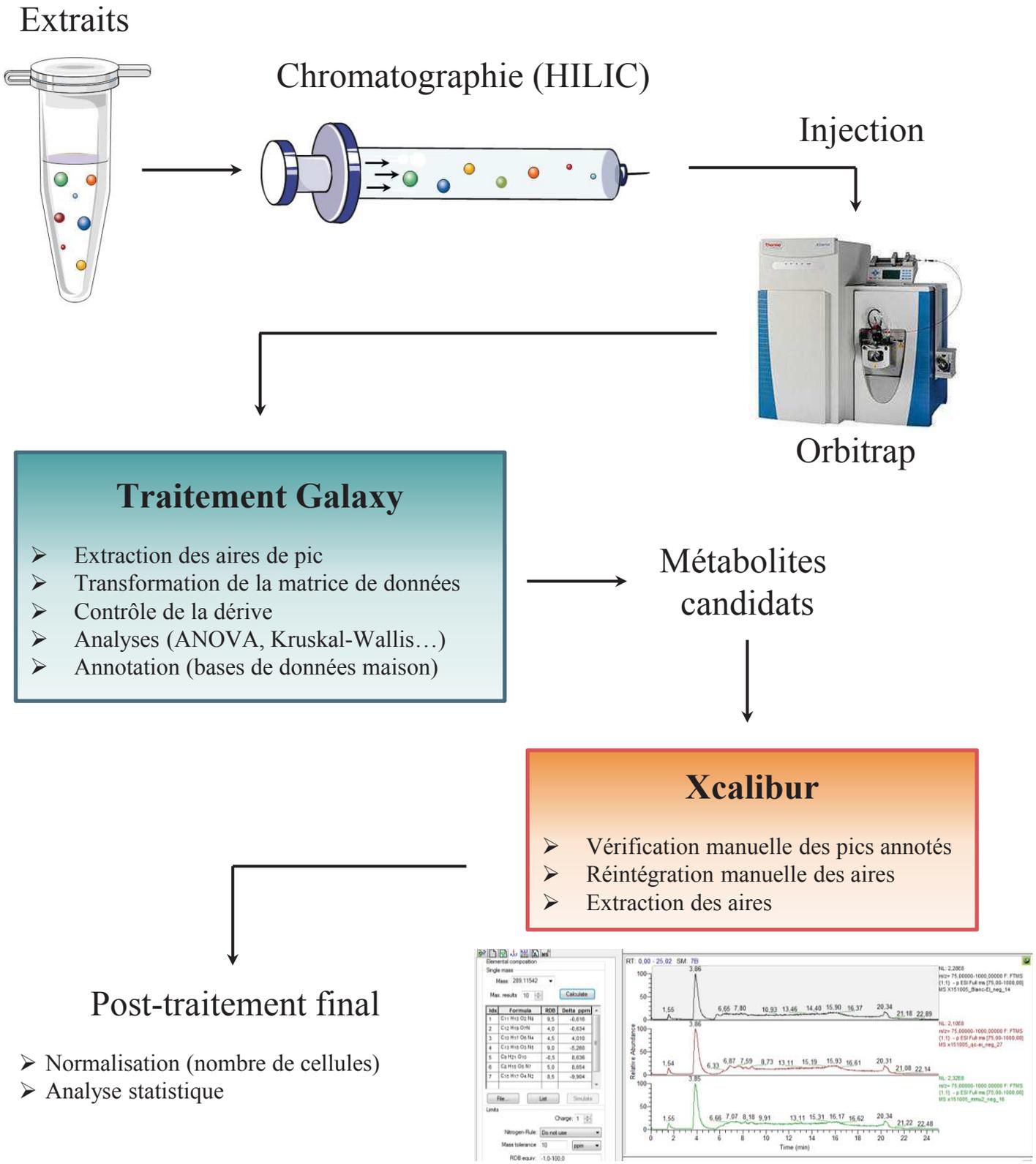


Figure 67 : Procédure d'analyse du métabolome chez *Synechocystis*.

3. Quantification relative de métabolites par spectrométrie de masse

Après 24 heures de culture dans les conditions spécifiées, les cellules sont rapidement filtrées à 30°C sous lumière, récupérées à l'aide d'un grattoir de cellules et resuspendues dans 500 µL de tampon de lyse (méthanol 50%, formate d'ammonium 50mM, pH = 3,4) maintenu à -20°C. Les agrégats de cellules sont totalement resuspendus après 5 minutes d'agitation sur un Vibrax® (2000 rpm, 4°C). La lyse complète est obtenue après 3 cycles de congélation dans l'azote liquide, décongélation sur glace et agitation au Vibrax (15 minutes, 2000 rpm, 4°C). Les lysats sont ensuite centrifugés (10 min, 14000 rpm, 4°C) et les surnageants filtrés par centrifugation (20 min, 14000 rpm, 4°C) sur colonnes Amicon Ultra-0,5 30K (Millipore). Les filtrats sont stockés à -80°C avant analyse.

100 µL de chaque échantillon (ou de tampon d'extraction seul pour le blanc) sont ensuite évaporés sous vide puis resuspendus dans 100µL de tampon (ammonium carbonate 10 mM, pH = 10,5). Les échantillons de contrôle qualité (QC) sont obtenus de la même manière à partir d'un mélange équivolumique de tous les filtrats (Figure 67). La chromatographie (30 minutes) est réalisée sur colonne ZIC-p-HILIC (ThermoFisher) en collaboration avec l'équipe de Christophe Junot (Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, SPI, CEA). Les phases mobiles sont composées d'un mélange d'eau/acétonitrile à 95/5% et 5/95% respectivement. La colonne est couplée à un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap (ThermoFisher) dans lequel 10 µL d'échantillon sont injectés et ionisés par électrospray (mode positif et négatif). Les ratios m/z de 75 à 1000 sont retenus pour analyse avec une résolution de masse de 100000 FWHM. L'extraction des pics, la transformation des données et l'analyse statistique ont été réalisés sur le serveur Workflow4metabolomics [314]. Les annotations ont été obtenues à partir de base de données privées de nos collaborateurs et tous les pics annotés et retenus après analyse statistique ont été vérifiés manuellement à l'aide du logiciel XCalibur (Version 2.2). Leurs aires ont également réintégréées manuellement à l'aide de ce logiciel pour être ensuite normalisées par le nombre de cellules (Figure 67).

H. Méthodes de microscopie

1. Microscopie à fluorescence

Pour les observations de routine (sans marquage), 1 mL de culture est centrifugé (1 min, 13000 rpm, température ambiante), lavé 2 fois et resuspendu dans 75 μL d'eau stérile. 3 μL de cette suspension concentrée sont prélevés pour l'assemblage de la lame et le dépôt d'huile à immersion. L'observation est réalisée à l'aide d'un objectif x100 (Zeiss) monté sur un microscope inversé à fluorescence (Leica DM IRE2). La configuration et les propriétés des filtres passe-bande sont présentées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Configuration et propriétés optiques des filtres passe-bande du Leica DM IRE2.

Position	Référence du filtre	Spectre d'excitation	Spectre d'émission
Bleu	Semrock DAPI 1160b-LSC-Zero	387 nm (\pm 11)	447 nm (\pm 60)
Vert	Semrock FITC 2024b-LSC-Zero	485 nm (\pm 20)	524 nm (\pm 24)
Rouge	Semrock TxRed 4040c-LSC-Zero	562 nm (\pm 40)	624 nm (\pm 40)
Rouge lointain	Semrock Cy5 4040c- LSC-Zero	628 nm (\pm 40)	692 nm (\pm 40)

Le marquage intracellulaire des granules de polyhydroxybutyrate (PHB) est réalisé à l'aide de Nile Red (Sigma). Brièvement, 50 μL de cellules lavées sont mélangés avec 50 μL de solution de marquage (10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) et incubés 10 minutes sous agitation à l'obscurité (température ambiante). Les spectres d'excitation et d'émission du Nile Red étant variables en fonction du solvant [315], celui-ci a été dissout et utilisé dans de l'heptane pour répondre aux contraintes des filtres à disposition. Après marquage, les cellules sont centrifugées et lavées deux fois à l'eau stérile. Les observations présentées sont issues du traitement des images à l'aide d'ImageJ et combinent les canaux vert (PHB marqués) et rouge (fluorescence de la chlorophylle).

2. Microscopie électronique à transmission

Les cultures en phase exponentielle sont centrifugées (10 min, 5000 rpm, température ambiante) avant resuspension des culots de cellules dans le tampon de fixation (NaPO_4 50 mM, glutaraldéhyde 2%, pH = 7,2). Les échantillons sont incubés 2 heures à température ambiante sous légère agitation. Les cellules sont ensuite centrifugées (20 min, 1000 rpm, température ambiante), lavées à deux reprises puis resuspendues dans 120 μL de tampon phosphate (sans fixateur). Ces suspensions sont mélangées avec un volume égal de solution d'agarose 2% refroidie puis découpées après solidification. Les blocs sont ensuite placés dans des tubes borosilicatés, lavés deux fois avec du tampon phosphate puis expédiés à froid dans ce même tampon.

Références

1. Miller SL (1953) A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science* 117: 528-529.
2. Parker ET, Cleaves HJ, Dworkin JP, Glavin DP, Callahan M, et al. (2011) Primordial synthesis of amines and amino acids in a 1958 Miller H₂S-rich spark discharge experiment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 5526-5531.
3. Robertson MP, Miller SL (1995) An efficient prebiotic synthesis of cytosine and uracil. *Nature* 375: 772-774.
4. Patel BH, Percivalle C, Ritson DJ, Duffy CD, Sutherland JD (2015) Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism. *Nat Chem* 7: 301-307.
5. Ritson D, Sutherland JD (2012) Prebiotic synthesis of simple sugars by photoredox systems chemistry. *Nat Chem* 4: 895-899.
6. A. B (1861) Bildung einer zuckerartigen Substanz durch Synthese. *Annalen Chemie* 20: 295-298.
7. Kuhn H (1972) Self-organization of molecular systems and evolution of the genetic apparatus. *Angew Chem Int Ed Engl* 11: 798-820.
8. White HB, 3rd (1976) Coenzymes as fossils of an earlier metabolic state. *J Mol Evol* 7: 101-104.
9. Fedor MJ, Williamson JR (2005) The catalytic diversity of RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 399-412.
10. Szathmary E, Demeter L (1987) Group selection of early replicators and the origin of life. *J Theor Biol* 128: 463-486.
11. Vaidya N, Walker SI, Lehman N (2013) Recycling of informational units leads to selection of replicators in a prebiotic soup. *Chem Biol* 20: 241-252.
12. Ichihashi N, Usui K, Kazuta Y, Sunami T, Matsuura T, et al. (2013) Darwinian evolution in a translation-coupled RNA replication system within a cell-like compartment. *Nat Commun* 4: 2494.
13. Matsuura T, Yamaguchi M, Ko-Mitamura EP, Shima Y, Urabe I, et al. (2002) Importance of compartment formation for a self-encoding system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7514-7517.
14. Kurihara K, Tamura M, Shohda K, Toyota T, Suzuki K, et al. (2011) Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA. *Nat Chem* 3: 775-781.
15. Pressman A, Blanco C, Chen IA (2015) The RNA World as a Model System to Study the Origin of Life. *Curr Biol* 25: R953-963.
16. Adamala K, Szostak JW (2013) Competition between model protocells driven by an encapsulated catalyst. *Nat Chem* 5: 495-501.
17. Wachtershauser G (1988) Before enzymes and templates: theory of surface metabolism. *Microbiol Rev* 52: 452-484.
18. Battistuzzi FU, Feijao A, Hedges SB (2004) A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evol Biol* 4: 44.
19. Schuchmann K, Muller V (2014) Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol* 12: 809-821.
20. Shen Y, Buick R, Canfield DE (2001) Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the early Archaean era. *Nature* 410: 77-81.
21. Fuchs G (2011) Alternative pathways of carbon dioxide fixation: insights into the early evolution of life? *Annu Rev Microbiol* 65: 631-658.

22. Kaster AK, Moll J, Parey K, Thauer RK (2011) Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2981-2986.
23. Muller V (2003) Energy conservation in acetogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 69: 6345-6353.
24. Martin WF (2012) Hydrogen, metals, bifurcating electrons, and proton gradients: the early evolution of biological energy conservation. *FEBS Lett* 586: 485-493.
25. Michaelis W, Seifert R, Nauhaus K, Treude T, Thiel V, et al. (2002) Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science* 297: 1013-1015.
26. Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5088-5090.
27. Xiong J, Fischer WM, Inoue K, Nakahara M, Bauer CE (2000) Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis. *Science* 289: 1724-1730.
28. Hofmann HJ, Grey K, Hickman AH, Thorpe RI (1999) Origin of 3.45 Ga coniform stromatolites in Warrawoona Group, Western Australia. *Geological Society of America Bulletin* 111: 1256-1262.
29. Johnson JE, Webb SM, Thomas K, Ono S, Kirschvink JL, et al. (2013) Manganese-oxidizing photosynthesis before the rise of cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 11238-11243.
30. Drews G (2011) The Evolution of Cyanobacteria and Photosynthesis. In: Peschek GA, Obinger C, Renger G, editors. *Bioenergetic Processes of Cyanobacteria: From Evolutionary Singularity to Ecological Diversity*. Dordrecht: Springer Netherlands. pp. 265-284.
31. Blankenship RE (1992) Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynth Res* 33: 91-111.
32. Raymond J, Zhaxybayeva O, Gogarten JP, Gerdes SY, Blankenship RE (2002) Whole-genome analysis of photosynthetic prokaryotes. *Science* 298: 1616-1620.
33. Cardona T, Murray JW, Rutherford AW (2015) Origin and Evolution of Water Oxidation before the Last Common Ancestor of the Cyanobacteria. *Mol Biol Evol* 32: 1310-1328.
34. Jansson C, Northen T (2010) Calcifying cyanobacteria--the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Curr Opin Biotechnol* 21: 365-371.
35. Nutman AP, Bennett VC, Friend CR, Van Kranendonk MJ, Chivas AR (2016) Rapid emergence of life shown by discovery of 3,700-million-year-old microbial structures. *Nature* 537: 535-538.
36. Kopp RE, Kirschvink JL, Hilburn IA, Nash CZ (2005) The Paleoproterozoic snowball Earth: a climate disaster triggered by the evolution of oxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11131-11136.
37. Des Marais DJ (2000) When Did Photosynthesis Emerge on Earth? *Science* 289: 1703-1705.
38. Hamilton TL, Bryant DA, Macalady JL (2016) The role of biology in planetary evolution: cyanobacterial primary production in low-oxygen Proterozoic oceans. *Environ Microbiol* 18: 325-340.
39. Sagan L (1967) On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 14: 255-274.
40. Bhattacharya D, Medlin L (1995) THE PHYLOGENY OF PLASTIDS: A REVIEW BASED ON COMPARISONS OF SMALL-SUBUNIT RIBOSOMAL RNA CODING REGIONS. *Journal of Phycology* 31: 489-498.

41. Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G, Bhattacharya D (2004) A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol* 21: 809-818.
42. Nakayama T, Archibald JM (2012) Evolving a photosynthetic organelle. *BMC Biol* 10: 35.
43. Schirrmeyer BE, de Vos JM, Antonelli A, Bagheri HC (2013) Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 1791-1796.
44. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 6578-6583.
45. Kallmeyer J, Pockalny R, Adhikari RR, Smith DC, D'Hondt S (2012) Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 16213-16216.
46. Stewart EJ (2012) Growing unculturable bacteria. *J Bacteriol* 194: 4151-4160.
47. Kang Y, McMillan I, Norris MH, Hoang TT (2015) Single prokaryotic cell isolation and total transcript amplification protocol for transcriptomic analysis. *Nat Protoc* 10: 974-984.
48. Yilmaz S, Singh AK (2012) Single cell genome sequencing. *Curr Opin Biotechnol* 23: 437-443.
49. Bomar L, Maltz M, Colston S, Graf J (2011) Directed Culturing of Microorganisms Using Metatranscriptomics. *mBio* 2.
50. Siegl A, Kamke J, Hochmuth T, Piel J, Richter M, et al. (2011) Single-cell genomics reveals the lifestyle of Poribacteria, a candidate phylum symbiotically associated with marine sponges. *ISME J* 5: 61-70.
51. Cameron DE, Bashor CJ, Collins JJ (2014) A brief history of synthetic biology. *Nat Rev Microbiol* 12: 381-390.
52. JGI Genome Portal. <http://genome.jgi.doe.gov/>.
53. Koksharova OA, Wolk CP (2002) Genetic tools for cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 123-137.
54. Rosgaard L, de Porcellinis AJ, Jacobsen JH, Frigaard NU, Sakuragi Y (2012) Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants. *J Biotechnol* 162: 134-147.
55. Angermayr SA, Gorchs Rovira A, Hellingwerf KJ (2015) Metabolic engineering of cyanobacteria for the synthesis of commodity products. *Trends Biotechnol* 33: 352-361.
56. Nozzi NE, Oliver JWK, Atsumi S (2013) Cyanobacteria as a Platform for Biofuel Production. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 1: 7.
57. Liu X, Fallon S, Sheng J, Curtiss R (2011) CO₂-limitation-inducible Green Recovery of fatty acids from cyanobacterial biomass. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 6905-6908.
58. Dexter J, Armshaw P, Sheahan C, Pembroke JT (2015) The state of autotrophic ethanol production in Cyanobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 119: 11-24.
59. Atsumi S, Higashide W, Liao JC (2009) Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nat Biotechnol* 27: 1177-1180.
60. Pattanaik B, Lindberg P (2015) Terpenoids and their biosynthesis in cyanobacteria. *Life (Basel)* 5: 269-293.
61. Eckert C, Xu W, Xiong W, Lynch S, Ungerer J, et al. (2014) Ethylene-forming enzyme and bioethylene production. *Biotechnology for Biofuels* 7: 33-33.

62. Khetkorn W, Incharoensakdi A, Lindblad P, Jantaro S (2016) Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by overexpression of its native biosynthetic genes. *Bioresour Technol* 214: 761-768.
63. Takahama K, Matsuoka M, Nagahama K, Ogawa T (2003) Construction and analysis of a recombinant cyanobacterium expressing a chromosomally inserted gene for an ethylene-forming enzyme at the *psbAI* locus. *J Biosci Bioeng* 95: 302-305.
64. Dienst D, Georg J, Abts T, Jakorew L, Kuchmina E, et al. (2014) Transcriptomic response to prolonged ethanol production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnology for Biofuels* 7: 21-21.
65. Pate R, Klise G, Wu B (2011) Resource demand implications for US algae biofuels production scale-up. *Applied Energy* 88: 3377-3388.
66. Huo Y-X, Wernick DG, Liao JC (2012) Toward nitrogen neutral biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology* 23: 406-413.
67. Hoffman L (1999) Marine cyanobacteria in tropical regions: diversity and ecology. *European Journal of Phycology* 34: 371-379.
68. Rindi F (2007) Diversity, Distribution and Ecology of Green Algae and Cyanobacteria in Urban Habitats. In: Seckbach J, editor. *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. Dordrecht: Springer Netherlands. pp. 619-638.
69. Norris TB, Castenholz RW (2006) Endolithic photosynthetic communities within ancient and recent travertine deposits in Yellowstone National Park. *FEMS Microbiology Ecology* 57: 470-483.
70. Couradeau E, Benzerara K, Moreira D, Gerard E, Kazmierczak J, et al. (2011) Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLoS One* 6: e28767.
71. Lukešová A (2001) Soil Algae in Brown Coal and Lignite Post-Mining Areas in Central Europe (Czech Republic and Germany). *Restoration Ecology* 9: 341-350.
72. Couradeau E, Karaoz U, Lim HC, Nunes da Rocha U, Northen T, et al. (2016) Bacteria increase arid-land soil surface temperature through the production of sunscreens. *Nat Commun* 7: 10373.
73. Friedmann EI, Ocampo-Friedmann R (1984) The antarctic cryptoendolithic ecosystem: Relevance to exobiology. *Origins of life* 14: 771-776.
74. Taton A, Grubisic S, Balthasart P, Hodgson DA, Laybourn-Parry J, et al. (2006) Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes. *FEMS Microbiology Ecology* 57: 272-289.
75. Sadekar S, Raymond J, Blankenship RE (2006) Conservation of Distantly Related Membrane Proteins: Photosynthetic Reaction Centers Share a Common Structural Core. *Molecular Biology and Evolution* 23: 2001-2007.
76. Kiyota H, Hirai MY, Ikeuchi M (2014) NblA1/A2-Dependent Homeostasis of Amino Acid Pools during Nitrogen Starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metabolites* 4: 517-531.
77. Six C, Thomas J-C, Garczarek L, Ostrowski M, Dufresne A, et al. (2007) Diversity and evolution of phycobilisomes in marine *Synechococcus* spp.: a comparative genomics study. *Genome Biology* 8: R259.
78. Krieger-Liszka A (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 56: 337-346.
79. Brettel K (1997) Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1318: 322-373.

80. Jallet D, Thurotte A, Leverenz RL, Perreau F, Kerfeld CA, et al. (2014) Specificity of the cyanobacterial orange carotenoid protein: influences of orange carotenoid protein and phycobilisome structures. *Plant Physiol* 164: 790-804.
81. Wilson A, Ajlani G, Verbavatz JM, Vass I, Kerfeld CA, et al. (2006) A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria. *Plant Cell* 18: 992-1007.
82. Chukhutsina V, Bersanini L, Aro E-M, van Amerongen H (2015) Cyanobacterial Light-Harvesting Phycobilisomes Uncouple From Photosystem I During Dark-To-Light Transitions. *Scientific Reports* 5: 14193.
83. Kusama Y, Inoue S, Jimbo H, Takaichi S, Sonoike K, et al. (2015) Zeaxanthin and Echinone Protect the Repair of Photosystem II from Inhibition by Singlet Oxygen in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 56: 906-916.
84. Sacharz J, Bryan SJ, Yu J, Burroughs NJ, Spence EM, et al. (2015) Sub-cellular location of FtsH proteases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 suggests localised PSII repair zones in the thylakoid membranes. *Molecular Microbiology* 96: 448-462.
85. Bersanini L, Battchikova N, Jokel M, Rehman A, Vass I, et al. (2014) Flavodiiron protein Flv2/Flv4-related photoprotective mechanism dissipates excitation pressure of PSII in cooperation with phycobilisomes in Cyanobacteria. *Plant Physiol* 164: 805-818.
86. Zhang P, Allahverdiyeva Y, Eisenhut M, Aro EM (2009) Flavodiiron proteins in oxygenic photosynthetic organisms: photoprotection of photosystem II by Flv2 and Flv4 in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* 4: e5331.
87. Shimakawa G, Shaku K, Nishi A, Hayashi R, Yamamoto H, et al. (2015) FLAVODIIRON2 and FLAVODIIRON4 proteins mediate an oxygen-dependent alternative electron flow in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under CO₂-limited conditions. *Plant Physiol* 167: 472-480.
88. Allahverdiyeva Y, Mustila H, Ermakova M, Bersanini L, Richaud P, et al. (2013) Flavodiiron proteins Flv1 and Flv3 enable cyanobacterial growth and photosynthesis under fluctuating light. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 4111-4116.
89. Helman Y, Tchernov D, Reinhold L, Shibata M, Ogawa T, et al. (2003) Genes encoding A-type flavoproteins are essential for photoreduction of O₂ in cyanobacteria. *Curr Biol* 13: 230-235.
90. Havaux M, Guedeney G, Hagemann M, Yeremenko N, Matthijs HC, et al. (2005) The chlorophyll-binding protein IsiA is inducible by high light and protects the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 from photooxidative stress. *FEBS Lett* 579: 2289-2293.
91. Boekema EJ, Hifney A, Yakushevskaya AE, Piotrowski M, Keegstra W, et al. (2001) A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria. *Nature* 412: 745-748.
92. Ma F, Zhang X, Zhu X, Li T, Zhan J, et al. Dynamic Changes of IsiA-Containing Complexes during Long-Term Iron Deficiency in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Plant* 10: 143-154.
93. Lea-Smith DJ, Ross N, Zori M, Bendall DS, Dennis JS, et al. (2013) Thylakoid terminal oxidases are essential for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to survive rapidly changing light intensities. *Plant Physiol* 162: 484-495.
94. Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, Tomizawa K, Endo T, et al. (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429: 579-582.

95. Ooyabu J, Ohtsuka M, Kashino Y, Koike H, Satoh K (2008) The Expression Pattern of NAD(P)H Oxidases and the Cyclic Electron Transport Pathway around Photosystem I of *Synechocystis* sp. PCC6803 Depend on Growth Conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72: 3180-3188.
96. Yeremenko N, Jeanjean R, Prommeenate P, Krasikov V, Nixon PJ, et al. (2005) Open reading frame *ssr2016* is required for antimycin A-sensitive photosystem I-driven cyclic electron flow in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 46: 1433-1436.
97. Appel J, Phunpruch S, Steinmüller K, Schulz R (2000) The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Archives of Microbiology* 173: 333-338.
98. Cameron JC, Pakrasi HB (2010) Essential role of glutathione in acclimation to environmental and redox perturbations in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol* 154: 1672-1685.
99. Chardonnet S, Sakr S, Cassier-Chauvat C, Le Marechal P, Chauvat F, et al. (2015) First proteomic study of S-glutathionylation in cyanobacteria. *J Proteome Res* 14: 59-71.
100. Narainsamy K, Cassier-Chauvat C, Junot C, Chauvat F (2011) High performance analysis of the cyanobacterial metabolism via liquid chromatography coupled to a LTQ-Orbitrap mass spectrometer: evidence that glucose reprograms the whole carbon metabolism and triggers oxidative stress. *Metabolomics* 9: 21-32.
101. Cassier-Chauvat C, Chauvat F (2014) Responses to oxidative and heavy metal stresses in cyanobacteria: recent advances. *Int J Mol Sci* 16: 871-886.
102. Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews* 35: 171-205.
103. Jittawuttipoka T, Planchon M, Spalla O, Benzerara K, Guyot F, et al. (2013) Multidisciplinary evidences that *Synechocystis* PCC6803 exopolysaccharides operate in cell sedimentation and protection against salt and metal stresses. *PLoS One* 8: e55564.
104. Pade N, Hagemann M (2015) Salt Acclimation of Cyanobacteria and Their Application in Biotechnology. *Life* 5: 25-49.
105. Reed RH, Warr SRC, Richardson DL, Moore DJ, Stewart WDP (1985) Multiphasic osmotic adjustment in a euryhaline cyanobacterium. *FEMS Microbiology Letters* 28: 225-229.
106. Kaneko T, Tabata S (1997) Complete genome structure of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol* 38: 1171-1176.
107. Labarre J, Chauvat F, Thuriaux P (1989) Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J Bacteriol* 171: 3449-3457.
108. Shestakov SV, Khyen NT (1970) Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Mol Gen Genet* 107: 372-375.
109. Williams JGK (1988) [85] Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods in Enzymology*: Academic Press. pp. 766-778.
110. Poncellet M, Cassier-Chauvat C, Leschelle X, Bottin H, Chauvat F (1998) Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in *Synechocystis* PCC6803 by plasmid shuffling. *Mol Microbiol* 28: 813-821.

111. Marraccini P, Bulteau S, Cassier-Chauvat C, Mermet-Bouvier P, Chauvat F (1993) A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Mol Biol* 23: 905-909.
112. Mermet-Bouvier P, Chauvat F (1994) A conditional expression vector for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942 and PCC6301. *Curr Microbiol* 28: 145-148.
113. Mazouni K, Domain F, Chauvat F, Cassier-Chauvat C (2003) Expression and regulation of the crucial plant-like ferredoxin of cyanobacteria. *Mol Microbiol* 49: 1019-1029.
114. Shen JR, Burnap RL, Inoue Y (1995) An independent role of cytochrome c-550 in cyanobacterial photosystem II as revealed by double-deletion mutagenesis of the *psbO* and *psbV* genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 34: 12661-12668.
115. Debus RJ, Barry BA, Babcock GT, McIntosh L (1988) Site-directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 427-430.
116. Dzelzkalns VA, Bogorad L (1988) Molecular analysis of a mutant defective in photosynthetic oxygen evolution and isolation of a complementing clone by a novel screening procedure. *Embo j* 7: 333-338.
117. Narainsamy K, Farci S, Braun E, Junot C, Cassier-Chauvat C, et al. (2016) Oxidative-stress detoxification and signalling in cyanobacteria: the crucial glutathione synthesis pathway supports the production of ergothioneine and ophthalmate. *Mol Microbiol* 100: 15-24.
118. Cassier-Chauvat C, Dive V, Chauvat F (2017) Cyanobacteria: photosynthetic factories combining biodiversity, radiation resistance, and genetics to facilitate drug discovery. *Appl Microbiol Biotechnol* 101: 1359-1364.
119. Xiong S, Fan J, Kitazato K (2010) The antiviral protein cyanovirin-N: the current state of its production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 805-812.
120. Cassier-Chauvat C, Chauvat F (2014) Function and Regulation of Ferredoxins in the Cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803: Recent Advances. *Life (Basel)* 4: 666-680.
121. Miziorko HM (2006) Phosphoribulokinase: Current Perspectives on the Structure/Function Basis for Regulation and Catalysis. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*: John Wiley & Sons, Inc. pp. 95-127.
122. Serra JL, Llama MJ, Rowell P, Stewart WDP (1989) Purification and characterization of phosphoribulokinase from the N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Plant Science* 59: 1-9.
123. Wadano A, Kamata Y, Iwaki T, Nishikawa K, Hirahashi T (1995) Purification and characterization of phosphoribulokinase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Plant Cell Physiol* 36: 1381-1385.
124. Su X, Bogorad L (1991) A residue substitution in phosphoribulokinase of *Synechocystis* PCC 6803 renders the mutant light-sensitive. *J Biol Chem* 266: 23698-23705.
125. Agarwal R, Ortleb S, Sainis JK, Melzer M (2009) Immunoelectron microscopy for locating calvin cycle enzymes in the thylakoids of *synechocystis* 6803. *Mol Plant* 2: 32-42.
126. Runquist JA, Narasimhan C, Wolff CE, Koteiche HA, Miziorko HM (1996) *Rhodobacter sphaeroides* Phosphoribulokinase: Binary and Ternary Complexes with Nucleotide Substrate Analogs and Effectors. *Biochemistry* 35: 15049-15056.

127. Porter MA, Hartman FC (1988) Catalytic nonessentiality of an active-site cysteinyl residue of phosphoribulokinase. *J Biol Chem* 263: 14846-14849.
128. Wolosiuk RA, Buchanan BB (1978) Regulation of chloroplast phosphoribulokinase by the ferredoxin/thioredoxin system. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 189: 97-101.
129. Porter MA, Stringer CD, Hartman FC (1988) Characterization of the regulatory thioredoxin site of phosphoribulokinase. *Journal of Biological Chemistry* 263: 123-129.
130. Rault M, Gontero B, Ricard J (1991) Thioredoxin activation of phosphoribulokinase in a chloroplast multi-enzyme complex. *European Journal of Biochemistry* 197: 791-797.
131. Porter MA, Stringer CD, Hartman FC (1988) Characterization of the regulatory thioredoxin site of phosphoribulokinase. *J Biol Chem* 263: 123-129.
132. Tamoi M, Murakami A, Takeda T, Shigeoka S (1998) Lack of Light/Dark Regulation of Enzymes Involved in the Photosynthetic Carbon Reduction Cycle in Cyanobacteria, *Synechococcus* PCC 7942 and *Synechocystis* PCC 6803. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 374-376.
133. Kobayashi D, Tamoi M, Iwaki T, Shigeoka S, Wadano A (2003) Molecular Characterization and Redox Regulation of Phosphoribulokinase from the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant and Cell Physiology* 44: 269-276.
134. Michelet L, Zaffagnini M, Morisse S, Sparla F, Pérez-Pérez ME, et al. (2013) Redox regulation of the Calvin–Benson cycle: something old, something new. *Frontiers in Plant Science* 4: 470.
135. Hauser T, Popilka L, Hartl FU, Hayer-Hartl M (2015) Role of auxiliary proteins in Rubisco biogenesis and function. *Nature Plants* 1: 15065.
136. Dhingra A, Portis AR, Jr., Daniell H (2004) Enhanced translation of a chloroplast-expressed RbcS gene restores small subunit levels and photosynthesis in nuclear RbcS antisense plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6315-6320.
137. Anderson LE (1971) Chloroplast and cytoplasmic enzymes. II. Pea leaf triose phosphate isomerases. *Biochim Biophys Acta* 235: 237-244.
138. Kelly GJ, Latzko E (1976) Inhibition of spinach-leaf phosphofructokinase by 2-phosphoglycollate. *FEBS Lett* 68: 55-58.
139. Yeates TO, Kerfeld CA, Heinhorst S, Cannon GC, Shively JM (2008) Protein-based organelles in bacteria: carboxysomes and related microcompartments. *Nat Rev Microbiol* 6: 681-691.
140. Rae BD, Long BM, Whitehead LF, Forster B, Badger MR, et al. (2013) Cyanobacterial carboxysomes: microcompartments that facilitate CO₂ fixation. *J Mol Microbiol Biotechnol* 23: 300-307.
141. Shively JM, Ball FL, Kline BW (1973) Electron microscopy of the carboxysomes (polyhedral bodies) of *Thiobacillus neapolitanus*. *J Bacteriol* 116: 1405-1411.
142. Peterhansel C, Horst I, Niessen M, Blume C, Kebeish R, et al. (2010) Photorespiration. *Arabidopsis Book* 8: e0130.
143. Eisenhut M, Ruth W, Haimovich M, Bauwe H, Kaplan A, et al. (2008) The photorespiratory glycolate metabolism is essential for cyanobacteria and might have been conveyed endosymbiotically to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17199-17204.
144. Valverde F, Losada M, Serrano A (1997) Functional complementation of an *Escherichia coli* gap mutant supports an amphibolic role for NAD(P)-dependent

- glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* 179: 4513-4522.
145. Figge RM, Cassier-Chauvat C, Chauvat F, Cerff R (2000) The carbon metabolism-controlled *Synechocystis* gap2 gene harbours a conserved enhancer element and a Gram-positive-like -16 promoter box retained in some chloroplast genes. *Mol Microbiol* 36: 44-54.
 146. Petersen J, Teich R, Becker B, Cerff R, Brinkmann H (2006) The GapA/B gene duplication marks the origin of Streptophyta (charophytes and land plants). *Mol Biol Evol* 23: 1109-1118.
 147. Koksharova O, Schubert M, Shestakov S, Cerff R (1998) Genetic and biochemical evidence for distinct key functions of two highly divergent GAPDH genes in catabolic and anabolic carbon flow of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* 36: 183-194.
 148. Shen W, Wen J-F, Sun G-L, Lu Y (2005) Identification of triosephosphate isomerase (TIM) genes from *Microcystis* (Cyanobacteria: Chroococcales) and theoretical analyses of the potential of cyanobacterial TIM as a target for designing specific inhibitors. *Phycologia* 44: 447-452.
 149. Nakahara K, Yamamoto H, Miyake C, Yokota A (2003) Purification and Characterization of Class-I and Class-II Fructose-1,6-bisphosphate Aldolases from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant and Cell Physiology* 44: 326-333.
 150. Tamoi M, Takeda T, Shigeoka S (1999) Functional Analysis of Fructose-1,6-Bisphosphatase Isozymes (fbp-I and fbp-II Gene Products) in Cyanobacteria. *Plant and Cell Physiology* 40: 257-261.
 151. Feng L, Sun Y, Deng H, Li D, Wan J, et al. (2014) Structural and biochemical characterization of fructose-1,6/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase from the cyanobacterium *Synechocystis* strain 6803. *FEBS Journal* 281: 916-926.
 152. Tamoi M, Murakami A, Takeda T, Shigeoka S (1998) Acquisition of a new type of fructose-1,6-bisphosphatase with resistance to hydrogen peroxide in cyanobacteria: molecular characterization of the enzyme from *Synechocystis* PCC 68031. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1383: 232-244.
 153. Kohler U, Cerff R, Brinkmann H (1996) Transaldolase genes from the cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Synechocystis* sp. PCC 6803: comparison with other eubacterial and eukaryotic homologues. *Plant Mol Biol* 30: 213-218.
 154. Thompson LR, Zeng Q, Kelly L, Huang KH, Singer AU, et al. (2011) Phage auxiliary metabolic genes and the redirection of cyanobacterial host carbon metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: E757-764.
 155. Mrázek J, Bhaya D, Grossman AR, Karlin S (2001) Highly expressed and alien genes of the *Synechocystis* genome. *Nucleic Acids Research* 29: 1590-1601.
 156. Jung C-H, Hartman FC, Lu T-YS, Larimer FW (2000) d-Ribose-5-Phosphate Isomerase from Spinach: Heterologous Overexpression, Purification, Characterization, and Site-Directed Mutagenesis of the Recombinant Enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373: 409-417.
 157. Wise EL, Akana J, Gerlt JA, Rayment I (2004) Structure of d-ribulose 5-phosphate 3-epimerase from *Synechocystis* to 1.6 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D* 60: 1687-1690.
 158. Burnap RL, Hagemann M, Kaplan A (2015) Regulation of CO₂ Concentrating Mechanism in Cyanobacteria. *Life (Basel)* 5: 348-371.

159. Omata T, Price GD, Badger MR, Okamura M, Gohta S, et al. (1999) Identification of an ATP-binding cassette transporter involved in bicarbonate uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13571-13576.
160. Nishimura T, Takahashi Y, Yamaguchi O, Suzuki H, Maeda S-i, et al. (2008) Mechanism of low CO₂-induced activation of the *cmp* bicarbonate transporter operon by a LysR family protein in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *Molecular Microbiology* 68: 98-109.
161. Figge RM, Cassier-Chauvat C, Chauvat F, Cerff R (2001) Characterization and analysis of an NAD(P)H dehydrogenase transcriptional regulator critical for the survival of cyanobacteria facing inorganic carbon starvation and osmotic stress. *Mol Microbiol* 39: 455-468.
162. Zhang P, Battchikova N, Jansen T, Appel J, Ogawa T, et al. (2004) Expression and functional roles of the two distinct NDH-1 complexes and the carbon acquisition complex NdhD3/NdhF3/CupA/Sll1735 in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell* 16: 3326-3340.
163. Daley SM, Kappell AD, Carrick MJ, Burnap RL (2012) Regulation of the cyanobacterial CO₂-concentrating mechanism involves internal sensing of NADP⁺ and alpha-ketogutarate levels by transcription factor CcmR. *PLoS One* 7: e41286.
164. Minoda A, Weber AP, Tanaka K, Miyagishima SY (2010) Nucleus-independent control of the rubisco operon by the plastid-encoded transcription factor Ycf30 in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Physiol* 154: 1532-1540.
165. Orf I, Schwarz D, Kaplan A, Kopka J, Hess WR, et al. (2016) CyAbrB2 Contributes to the Transcriptional Regulation of Low CO₂ Acclimation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 57: 2232-2243.
166. Domain F, Houot L, Chauvat F, Cassier-Chauvat C (2004) Function and regulation of the cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation. *Mol Microbiol* 53: 65-80.
167. Orf I, Klähn S, Schwarz D, Frank M, Hess WR, et al. (2015) Integrated Analysis of Engineered Carbon Limitation in a Quadruple CO₂/HCO₃⁻ Uptake Mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiology* 169: 1787-1806.
168. Jablonsky J, Papacek S, Hagemann M (2016) Different strategies of metabolic regulation in cyanobacteria: from transcriptional to biochemical control. *Scientific Reports* 6: 33024.
169. Guo J, Nguyen AY, Dai Z, Su D, Gaffrey MJ, et al. (2014) Proteome-wide light/dark modulation of thiol oxidation in cyanobacteria revealed by quantitative site-specific redox proteomics. *Mol Cell Proteomics* 13: 3270-3285.
170. Clasper S, Easterby JS, Powls R (1991) Properties of two high-molecular-mass forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach leaf, one of which also possesses latent phosphoribulokinase activity. *Eur J Biochem* 202: 1239-1246.
171. Wedel N, Soll J, Paap BK (1997) CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10479-10484.
172. Wedel N, Soll J (1998) Evolutionary conserved light regulation of Calvin cycle activity by NADPH-mediated reversible phosphoribulokinase/CP12/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complex dissociation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9699-9704.

173. Stanley DN, Raines CA, Kerfeld CA (2013) Comparative analysis of 126 cyanobacterial genomes reveals evidence of functional diversity among homologs of the redox-regulated CP12 protein. *Plant Physiol* 161: 824-835.
174. Hagino K, Onuma R, Kawachi M, Horiguchi T (2013) Discovery of an endosymbiotic nitrogen-fixing cyanobacterium UCYN-A in *Braarudosphaera bigelowii* (Prymnesiophyceae). *PLoS One* 8: e81749.
175. Groben R, Kaloudas D, Raines CA, Offmann B, Maberly SC, et al. (2010) Comparative sequence analysis of CP12, a small protein involved in the formation of a Calvin cycle complex in photosynthetic organisms. *Photosynth Res* 103: 183-194.
176. Gontero B, Maberly SC (2012) An intrinsically disordered protein, CP12: jack of all trades and master of the Calvin cycle. *Biochem Soc Trans* 40: 995-999.
177. Oldfield CJ, Dunker AK (2014) Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions. *Annu Rev Biochem* 83: 553-584.
178. Dyson HJ, Wright PE (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 197-208.
179. Tompa P, Szasz C, Buday L (2005) Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends Biochem Sci* 30: 484-489.
180. Moparthi SB, Thieulin-Pardo G, de Torres J, Ghenuche P, Gontero B, et al. (2015) FRET analysis of CP12 structural interplay by GAPDH and PRK. *Biochem Biophys Res Commun* 458: 488-493.
181. Erales J, Lorenzi M, Lebrun R, Fournel A, Etienne E, et al. (2009) A new function of GAPDH from *Chlamydomonas reinhardtii*: a thiol-disulfide exchange reaction with CP12. *Biochemistry* 48: 6034-6040.
182. Graciet E, Mulliert G, Lebreton S, Gontero B (2004) Involvement of two positively charged residues of *Chlamydomonas reinhardtii* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the assembly process of a bi-enzyme complex involved in CO₂ assimilation. *European Journal of Biochemistry* 271: 4737-4744.
183. Gardebien F, Thangudu RR, Gontero B, Offmann B (2006) Construction of a 3D model of CP12, a protein linker. *J Mol Graph Model* 25: 186-195.
184. Lebreton S, Graciet E, Gontero B (2003) Modulation, via protein-protein interactions, of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity through redox phosphoribulokinase regulation. *J Biol Chem* 278: 12078-12084.
185. Graciet E, Lebreton S, Camadro JM, Gontero B (2003) Characterization of native and recombinant A4 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Kinetic evidence for conformation changes upon association with the small protein CP12. *Eur J Biochem* 270: 129-136.
186. Marri L, Thieulin-Pardo G, Lebrun R, Puppo R, Zaffagnini M, et al. (2014) CP12-mediated protection of Calvin-Benson cycle enzymes from oxidative stress. *Biochimie* 97: 228-237.
187. Matsumura H, Kai A, Maeda T, Tamoi M, Satoh A, et al. (2011) Structure basis for the regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity via the intrinsically disordered protein CP12. *Structure* 19: 1846-1854.
188. Graciet E, Gans P, Wedel N, Lebreton S, Camadro JM, et al. (2003) The small protein CP12: a protein linker for supramolecular complex assembly. *Biochemistry* 42: 8163-8170.
189. Tamoi M, Miyazaki T, Fukamizo T, Shigeoka S (2005) The Calvin cycle in cyanobacteria is regulated by CP12 via the NAD(H)/NADP(H) ratio under light/dark conditions. *Plant J* 42: 504-513.

190. Avilan L, Lebreton S, Gontero B (2000) Thioredoxin Activation of Phosphoribulokinase in a Bi-enzyme Complex from *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry* 275: 9447-9451.
191. Lebreton S, Andreescu S, Graciet E, Gontero B (2006) Mapping of the interaction site of CP12 with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Functional consequences for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Febs j* 273: 3358-3369.
192. Marri L, Trost P, Pupillo P, Sparla F (2005) Reconstitution and Properties of the Recombinant Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase/CP12/Phosphoribulokinase Supramolecular Complex of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 1433-1443.
193. Lopez-Calcagno PE, Howard TP, Raines CA (2014) The CP12 protein family: a thioredoxin-mediated metabolic switch? *Front Plant Sci* 5: 9.
194. Bateman A (1997) The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem Sci* 22: 12-13.
195. Jeong B-C, Park SH, Yoo KS, Shin JS, Song HK (2013) Change in single cystathionine β -synthase domain-containing protein from a bent to flat conformation upon adenosine monophosphate binding. *Journal of Structural Biology* 183: 40-46.
196. Baykov AA, Tuominen HK, Lahti R (2011) The CBS Domain: A Protein Module with an Emerging Prominent Role in Regulation. *ACS Chemical Biology* 6: 1156-1163.
197. Yoo KS, Ok SH, Jeong B-C, Jung KW, Cui MH, et al. (2011) Single Cystathionine β -Synthase Domain-Containing Proteins Modulate Development by Regulating the Thioredoxin System in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 23: 3577-3594.
198. Pohlmeier K, Paap BK, Soll J, Wedel N (1996) CP12: a small nuclear-encoded chloroplast protein provides novel insights into higher-plant GAPDH evolution. *Plant Mol Biol* 32: 969-978.
199. Singh P, Kaloudas D, Raines CA (2008) Expression analysis of the *Arabidopsis* CP12 gene family suggests novel roles for these proteins in roots and floral tissues. *Journal of Experimental Botany* 59: 3975-3985.
200. Eralles J, Avilan L, Lebreton S, Gontero B (2008) Exploring CP12 binding proteins revealed aldolase as a new partner for the phosphoribulokinase/glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase/CP12 complex--purification and kinetic characterization of this enzyme from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Febs j* 275: 1248-1259.
201. Angermayr SA, Hellingwerf KJ, Lindblad P, de Mattos MJ (2009) Energy biotechnology with cyanobacteria. *Curr Opin Biotechnol* 20: 257-263.
202. Smith AJ (1983) Modes of cyanobacterial carbon metabolism. *Ann Microbiol (Paris)* 134b: 93-113.
203. Chen X, Schreiber K, Appel J, Makowka A, Fahnrich B, et al. (2016) The Entner-Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 5441-5446.
204. Fabris M, Matthijs M, Rombauts S, Vyverman W, Goossens A, et al. (2012) The metabolic blueprint of *Phaeodactylum tricornutum* reveals a eukaryotic Entner-Doudoroff glycolytic pathway. *The Plant Journal* 70: 1004-1014.
205. Zhang S, Bryant DA (2011) The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science* 334: 1551-1553.
206. Zhang S, Bryant DA (2015) Biochemical Validation of the Glyoxylate Cycle in the Cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* Strain PCC 9212. *The Journal of Biological Chemistry* 290: 14019-14030.

207. Zhang S, Qian X, Chang S, Dismukes GC, Bryant DA (2016) Natural and Synthetic Variants of the Tricarboxylic Acid Cycle in Cyanobacteria: Introduction of the GABA Shunt into *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Frontiers in Microbiology* 7: 1972.
208. Lea-Smith DJ, Bombelli P, Vasudevan R, Howe CJ (2016) Photosynthetic, respiratory and extracellular electron transport pathways in cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857: 247-255.
209. Beck C, Knoop H, Axmann IM, Steuer R (2012) The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. *BMC Genomics* 13: 56-56.
210. Lindahl M, Florencio FJ (2003) Thioredoxin-linked processes in cyanobacteria are as numerous as in chloroplasts, but targets are different. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 16107-16112.
211. Taroncher-Oldenburg G, Nishina K, Stephanopoulos G (2000) Identification and Analysis of the Polyhydroxyalkanoate-Specific β -Ketothiolase and Acetoacetyl Coenzyme A Reductase Genes in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4440-4448.
212. Hein S, Tran H, Steinbuchel A (1998) *Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a two-component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria. *Arch Microbiol* 170: 162-170.
213. Hauf W, Schlebusch M, Hüge J, Kopka J, Hagemann M, et al. (2013) Metabolic Changes in *Synechocystis* PCC6803 upon Nitrogen-Starvation: Excess NADPH Sustains Polyhydroxybutyrate Accumulation. *Metabolites* 3: 101-118.
214. Hauf W, Watzer B, Roos N, Klotz A, Forchhammer K (2015) Photoautotrophic Polyhydroxybutyrate Granule Formation Is Regulated by Cyanobacterial Phasin PhaP in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Applied and Environmental Microbiology* 81: 4411-4422.
215. Gründel M, Scheunemann R, Lockau W, Zilliges Y (2012) Impaired glycogen synthesis causes metabolic overflow reactions and affects stress responses in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* 158: 3032-3043.
216. Damrow R, Maldener I, Zilliges Y (2016) The Multiple Functions of Common Microbial Carbon Polymers, Glycogen and PHB, during Stress Responses in the Non-Diazotrophic Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Frontiers in Microbiology* 7.
217. Asada Y, Miyake M, Miyake J, Kurane R, Tokiwa Y (1999) Photosynthetic accumulation of poly-(hydroxybutyrate) by cyanobacteria--the metabolism and potential for CO₂ recycling. *Int J Biol Macromol* 25: 37-42.
218. Ohashi Y, Shi W, Takatani N, Aichi M, Maeda S-i, et al. (2011) Regulation of nitrate assimilation in cyanobacteria. *Journal of Experimental Botany* 62: 1411-1424.
219. Labarre J, Thuriaux P, Chauvat F (1987) Genetic analysis of amino acid transport in the facultatively heterotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain 6803. *J Bacteriol* 169: 4668-4673.
220. Neilson AH, Larsson T (1980) The utilization of organic nitrogen for growth of algae: physiological aspects. *Physiologia Plantarum* 48: 542-553.
221. Wegener KM, Singh AK, Jacobs JM, Elvitigala T, Welsh EA, et al. (2010) Global proteomics reveal an atypical strategy for carbon/nitrogen assimilation by a cyanobacterium under diverse environmental perturbations. *Mol Cell Proteomics* 9: 2678-2689.

222. Quintero MJ, Muro-Pastor AM, Herrero A, Flores E (2000) Arginine catabolism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 involves the urea cycle and arginase pathway. *J Bacteriol* 182: 1008-1015.
223. Valladares A, Montesinos ML, Herrero A, Flores E (2002) An ABC-type, high-affinity urea permease identified in cyanobacteria. *Mol Microbiol* 43: 703-715.
224. Muro-Pastor MI, Reyes JC, Florencio FJ (2005) Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynth Res* 83: 135-150.
225. Florencio FJ, Marqués S, Candau P (1987) Identification and characterization of a glutamate dehydrogenase in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Letters* 223: 37-41.
226. Chavez S, Lucena JM, Reyes JC, Florencio FJ, Candau P (1999) The presence of glutamate dehydrogenase is a selective advantage for the *Cyanobacterium* *synechocystis* sp. strain PCC 6803 under nonexponential growth conditions. *J Bacteriol* 181: 808-813.
227. Kasahara M, Obmori M (1997) Carbamoyl Phosphate Synthetase of the *Cyanobacterium* *Anabaena cylindrica*. *Plant and Cell Physiology* 38: 734-739.
228. Allen MM, Weathers PJ (1980) Structure and composition of cyanophycin granules in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. *J Bacteriol* 141: 959-962.
229. Simon RD (1971) Cyanophycin Granules from the Blue-Green Alga *Anabaena cylindrica*: A Reserve Material Consisting of Copolymers of Aspartic Acid and Arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 265-267.
230. Richter R, Hejazi M, Kraft R, Ziegler K, Lockau W (1999) Cyanophycinase, a peptidase degrading the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin). *European Journal of Biochemistry* 263: 163-169.
231. Ziegler K, Diener A, Herpin C, Richter R, Deutzmann R, et al. (1998) Molecular characterization of cyanophycin synthetase, the enzyme catalyzing the biosynthesis of the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartate (cyanophycin). *European Journal of Biochemistry* 254: 154-159.
232. Solomon CM, Collier JL, Berg GM, Glibert PM (2010) Role of urea in microbial metabolism in aquatic systems: a biochemical and molecular review. *Aquatic Microbial Ecology* 59: 67-88.
233. Glibert PM, Harrison J, Heil C, Seitzinger S (2006) Escalating Worldwide use of Urea – A Global Change Contributing to Coastal Eutrophication. *Biogeochemistry* 77: 441-463.
234. Dittmann E, Fewer DP, Neilan BA (2013) Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiol Rev* 37: 23-43.
235. Sanseverino I, Conduto Antonio D.S, Pozzoli L, Dobricic S, T L (2016) Algal bloom and its economic impact. Publications Office of the European Union.
236. Carter EL, Boer JL, Farrugia MA, Flugga N, Towns CL, et al. (2011) Function of UreB in *Klebsiella aerogenes* urease. *Biochemistry* 50: 9296-9308.
237. Witte CP (2011) Urea metabolism in plants. *Plant Sci* 180: 431-438.
238. Mitschke J, Georg J, Scholz I, Sharma CM, Dienst D, et al. (2011) An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2124-2129.
239. Farrugia MA, Macomber L, Hausinger RP (2013) Biosynthesis of the urease metallocenter. *J Biol Chem* 288: 13178-13185.

240. Zambelli B, Stola M, Musiani F, De Vriendt K, Samyn B, et al. (2005) UreG, a chaperone in the urease assembly process, is an intrinsically unstructured GTPase that specifically binds Zn²⁺. *J Biol Chem* 280: 4684-4695.
241. Fong YH, Wong HC, Yuen MH, Lau PH, Chen YW, et al. (2013) Structure of UreG/UreF/UreH complex reveals how urease accessory proteins facilitate maturation of *Helicobacter pylori* urease. *PLoS Biol* 11: e1001678.
242. Farrugia MA, Wang B, Feig M, Hausinger RP (2015) Mutational and Computational Evidence That a Nickel-Transfer Tunnel in UreD Is Used for Activation of *Klebsiella aerogenes* Urease. *Biochemistry* 54: 6392-6401.
243. Ludwig M, Bryant DA (2012) Acclimation of the Global Transcriptome of the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002 to Nutrient Limitations and Different Nitrogen Sources. *Front Microbiol* 3: 145.
244. Panda B, Jain P, Sharma L, Mallick N (2006) Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioresour Technol* 97: 1296-1301.
245. Joseph A, Aikawa S, Sasaki K, Teramura H, Hasunuma T, et al. (2014) Rre37 stimulates accumulation of 2-oxoglutarate and glycogen under nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett* 588: 466-471.
246. Forchhammer K, Luddecke J (2016) Sensory properties of the PII signalling protein family. *FEBS J* 283: 425-437.
247. Llacer JL, Espinosa J, Castells MA, Contreras A, Forchhammer K, et al. (2010) Structural basis for the regulation of NtcA-dependent transcription by proteins PipX and PII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15397-15402.
248. Picossi S, Flores E, Herrero A (2014) ChIP analysis unravels an exceptionally wide distribution of DNA binding sites for the NtcA transcription factor in a heterocyst-forming cyanobacterium. *BMC Genomics* 15: 22-22.
249. Luque I, Flores E, Herrero A (1994) Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *The EMBO Journal* 13: 2862-2869.
250. Garcia-Dominguez M, Reyes JC, Florencio FJ (2000) NtcA represses transcription of gifA and gifB, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* 35: 1192-1201.
251. Klähn S, Schaal C, Georg J, Baumgartner D, Knippen G, et al. (2015) The sRNA NsiR4 is involved in nitrogen assimilation control in cyanobacteria by targeting glutamine synthetase inactivating factor IF7. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: E6243-E6252.
252. Su Z, Olman V, Mao F, Xu Y (2005) Comparative genomics analysis of NtcA regulons in cyanobacteria: regulation of nitrogen assimilation and its coupling to photosynthesis. *Nucleic Acids Research* 33: 5156-5171.
253. Baier K, Nicklisch S, Grundner C, Reinecke J, Lockau W (2001) Expression of two nblA-homologous genes is required for phycobilisome degradation in nitrogen-starved *Synechocystis* sp. PCC6803. *FEMS Microbiology Letters* 195: 35-39.
254. Jendrossek D, Pfeiffer D (2014) New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environ Microbiol* 16: 2357-2373.
255. Klotz A, Georg J, Bucinska L, Watanabe S, Reimann V, et al. (2016) Awakening of a Dormant Cyanobacterium from Nitrogen Chlorosis Reveals a Genetically Determined Program. *Curr Biol* 26: 2862-2872.
256. Azuma M, Osanai T, Hirai MY, Tanaka K (2011) A Response Regulator Rre37 and an RNA Polymerase Sigma Factor SigE Represent Two Parallel Pathways to Activate

- Sugar Catabolism in a Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant and Cell Physiology* 52: 404-412.
257. Liu D, Yang C (2014) The Nitrogen-regulated Response Regulator NrrA Controls Cyanophycin Synthesis and Glycogen Catabolism in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *The Journal of Biological Chemistry* 289: 2055-2071.
 258. Muro-Pastor AM, Herrero A, Flores E (2001) Nitrogen-Regulated Group 2 Sigma Factor from *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Involved in Survival under Nitrogen Stress. *Journal of Bacteriology* 183: 1090-1095.
 259. Osanai T, Imamura S, Asayama M, Shirai M, Suzuki I, et al. (2006) Nitrogen Induction of Sugar Catabolic Gene Expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Research* 13: 185-195.
 260. Hydrogen Analysis Resource Center. <http://hydrogen.pnl.gov/>
 261. Krishna RH (2013) Review of Research on Production Methods of Hydrogen : Future Fuel. *Eur J Biotechnol Biosci* 1: 84-93.
 262. Ghirardi ML, Dubini A, Yu J, Maness P-C (2009) Photobiological hydrogen-producing systems. *Chemical Society Reviews* 38: 52-61.
 263. Oey M, Sawyer AL, Ross IL, Hankamer B (2016) Challenges and opportunities for hydrogen production from microalgae. *Plant Biotechnol J* 14: 1487-1499.
 264. Peters JW, Schut GJ, Boyd ES, Mulder DW, Shepard EM, et al. (2015) [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853: 1350-1369.
 265. McIntosh CL, Germer F, Schulz R, Appel J, Jones AK (2011) The [NiFe]-hydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 works bidirectionally with a bias to H₂ production. *J Am Chem Soc* 133: 11308-11319.
 266. Gutekunst K, Chen X, Schreiber K, Kaspar U, Makam S, et al. (2014) The bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is reduced by flavodoxin and ferredoxin and is essential under mixotrophic, nitrate-limiting conditions. *J Biol Chem* 289: 1930-1937.
 267. Ortega-Ramos M, Jittawuttipoka T, Saenkham P, Czarnecka-Kwasiborski A, Bottin H, et al. (2014) Engineering *Synechocystis* PCC6803 for hydrogen production: influence on the tolerance to oxidative and sugar stresses. *PLoS One* 9: e89372.
 268. Vignais PM, Billoud B (2007) Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem Rev* 107: 4206-4272.
 269. Hrdy I, Hirt RP, Dolezal P, Bardonova L, Foster PG, et al. (2004) *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* 432: 618-622.
 270. Maier RJ (2005) Use of molecular hydrogen as an energy substrate by human pathogenic bacteria. *Biochem Soc Trans* 33: 83-85.
 271. Ughy B, Ajlani G (2004) Phycobilisome rod mutants in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Microbiology* 150: 4147-4156.
 272. Wu Q, Vermaas WF (1995) Light-dependent chlorophyll a biosynthesis upon chlL deletion in wild-type and photosystem I-less strains of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* 29: 933-945.
 273. Babykin MM, Sidoruk KV, Zinchenko VV, Nefedova LN, Cerff R, et al. (2003) On the Involvement of the Regulatory Gene *prqR* in the Development of Resistance to Methyl Viologen in Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Russian Journal of Genetics* 39: 18-24.

274. Galmozzi CV, Florencio FJ, Muro-Pastor MI (2016) The Cyanobacterial Ribosomal-Associated Protein LrtA Is Involved in Post-Stress Survival in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS ONE* 11: e0159346.
275. Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
276. Allahverdiyeva Y, Isojärvi J, Zhang P, Aro E-M (2015) Cyanobacterial Oxygenic Photosynthesis is Protected by Flavodiiron Proteins. *Life* 5: 716-743.
277. Kauny J, Setif P (2014) NADPH fluorescence in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: a versatile probe for in vivo measurements of rates, yields and pools. *Biochim Biophys Acta* 1837: 792-801.
278. Galmozzi CV, Fernández-Avila MJ, Reyes JC, Florencio FJ, Muro-Pastor MI (2007) The ammonium-inactivated cyanobacterial glutamine synthetase I is reactivated in vivo by a mechanism involving proteolytic removal of its inactivating factors. *Molecular Microbiology* 65: 166-179.
279. Wu GF, Wu QY, Shen ZY (2001) Accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Bioresour Technol* 76: 85-90.
280. Chellamuthu VR, Alva V, Forchhammer K (2013) From cyanobacteria to plants: conservation of PII functions during plastid evolution. *Planta* 237: 451-462.
281. Berthelot M (1859) *Repertoire de Chemie Appliquée*.
282. van Vliet AH, Kuipers EJ, Waidner B, Davies BJ, de Vries N, et al. (2001) Nickel-responsive induction of urease expression in *Helicobacter pylori* is mediated at the transcriptional level. *Infect Immun* 69: 4891-4897.
283. Hoffmann D, Gutekunst K, Klissenbauer M, Schulz-Friedrich R, Appel J (2006) Mutagenesis of hydrogenase accessory genes of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Additional homologues of *hypA* and *hypB* are not active in hydrogenase maturation. *FEBS J* 273: 4516-4527.
284. Tsang TK, Roberson RW, Vermaas WF (2013) Polyhydroxybutyrate particles in *Synechocystis* sp. PCC 6803: facts and fiction. *Photosynth Res* 118: 37-49.
285. Delobel A, Graciet E, Andreescu S, Gontero B, Halgand F, et al. (2005) Mass spectrometric analysis of the interactions between CP12, a chloroplast protein, and metal ions: a possible regulatory role within a PRK/GAPDH/CP12 complex. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19: 3379-3388.
286. Ochoa De Alda JA, Ajlani G, Houmard J (2000) *Synechocystis* strain PCC 6803 *cya2*, a prokaryotic gene that encodes a guanylyl cyclase. *J Bacteriol* 182: 3839-3842.
287. Siguier P, Goubeyre E, Chandler M (2014) Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev* 38: 865-891.
288. Rezsöházy R, Hallet B, Delcour J, Mahillon J (1993) The IS4 family of insertion sequences: evidence for a conserved transposase motif. *Molecular Microbiology* 9: 1283-1295.
289. Cassier-Chauvat C, Poncelet M, Chauvat F (1997) Three insertion sequences from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 support the occurrence of horizontal DNA transfer among bacteria. *Gene* 195: 257-266.
290. Vigil-Stenman T, Larsson J, Nylander JAA, Bergman B (2015) Local hopping mobile DNA implicated in pseudogene formation and reductive evolution in an obligate cyanobacteria-plant symbiosis. *BMC Genomics* 16: 193.
291. Christiansen G, Molitor C, Philmus B, Kurmayer R (2008) Nontoxic Strains of Cyanobacteria Are the Result of Major Gene Deletion Events Induced by a Transposable Element. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1695-1704.

292. Cassier-Chauvat C, Veaudor T, Chauvat F (2016) Comparative Genomics of DNA Recombination and Repair in Cyanobacteria: Biotechnological Implications. *Front Microbiol* 7: 1809.
293. Tichy M, Beckova M, Kopečna J, Noda J, Sobotka R, et al. (2016) Strain of *Synechocystis* PCC 6803 with Aberrant Assembly of Photosystem II Contains Tandem Duplication of a Large Chromosomal Region. *Front Plant Sci* 7: 648.
294. Ding Q, Chen G, Wang Y, Wei D (2015) Identification of Specific Variations in a Non-Motile Strain of Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 Originated from ATCC 27184 by Whole Genome Resequencing. *Int J Mol Sci* 16: 24081-24093.
295. Trautmann D, Voß B, Wilde A, Al-Babili S, Hess WR (2012) Microevolution in Cyanobacteria: Re-sequencing a Motile Substrain of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes* 19: 435-448.
296. Cassier-Chauvat C, Veaudor T, Chauvat F (2014) Advances in the function and regulation of hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Int J Mol Sci* 15: 19938-19951.
297. Dutheil J, Saenkham P, Sakr S, Leplat C, Ortega-Ramos M, et al. (2012) The AbrB2 autorepressor, expressed from an atypical promoter, represses the hydrogenase operon to regulate hydrogen production in *Synechocystis* strain PCC6803. *J Bacteriol* 194: 5423-5433.
298. Gutekunst K, Phunpruch S, Schwarz C, Schuchardt S, Schulz-Friedrich R, et al. (2005) LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a transcription activator. *Mol Microbiol* 58: 810-823.
299. Jager D, Sharma CM, Thomsen J, Ehlers C, Vogel J, et al. (2009) Deep sequencing analysis of the *Methanosarcina mazei* Go1 transcriptome in response to nitrogen availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21878-21882.
300. Hewson I, Poretsky RS, Beinart RA, White AE, Shi T, et al. (2009) In situ transcriptomic analysis of the globally important keystone N₂-fixing taxon *Crocospaera watsonii*. *Isme j* 3: 618-631.
301. Steffen MM, Dearth SP, Dill BD, Li Z, Larsen KM, et al. (2014) Nutrients drive transcriptional changes that maintain metabolic homeostasis but alter genome architecture in *Microcystis*. *The ISME Journal* 8: 2080-2092.
302. Leplat C, Champeimont R, Saenkham P, Cassier-Chauvat C, Jean-Christophe A, et al. (2013) Genome-wide transcriptome analysis of hydrogen production in the cyanobacterium *Synechocystis*: Towards the identification of new players. *International Journal of Hydrogen Energy* 38: 1866-1872.
303. Sakr S, Dutheil J, Saenkham P, Bottin H, Leplat C, et al. (2013) The activity of the *Synechocystis* PCC6803 AbrB2 regulator of hydrogen production can be post-translationally controlled through glutathionylation. *International Journal of Hydrogen Energy* 38: 13547-13555.
304. Sakamoto T, Delgaizo VB, Bryant DA (1998) Growth on urea can trigger death and peroxidation of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Appl Environ Microbiol* 64: 2361-2366.
305. Drath M, Kloft N, Batschauer A, Marin K, Novak J, et al. (2008) Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol* 147: 206-215.
306. Cournac L, Guedeney G, Peltier G, Vignais PM (2004) Sustained Photoevolution of Molecular Hydrogen in a Mutant of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Deficient in

- the Type I NADPH-Dehydrogenase Complex. *Journal of Bacteriology* 186: 1737-1746.
307. Boison G, Bothe H, Hansel A, Lindblad P (1999) Evidence against a common use of the diaphorase subunits by the bidirectional hydrogenase and by the respiratory complex I in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 174: 159-165.
308. Boison G, Schmitz O, Schmitz B, Bothe H (1998) Unusual Gene Arrangement of the Bidirectional Hydrogenase and Functional Analysis of Its Diaphorase Subunit HoxU in Respiration of the Unicellular Cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Current Microbiology* 36: 253-258.
309. Kaufer NF, Simanis V, Nurse P (1985) Fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* correctly excises a mammalian RNA transcript intervening sequence. *Nature* 318: 78-80.
310. Porter RD (1986) Transformation in cyanobacteria. *Crit Rev Microbiol* 13: 111-132.
311. Gontero B, Mulliert G, Rault M, Giudici-Orticoni MT, Ricard J (1993) Structural and functional properties of a multi-enzyme complex from spinach chloroplasts. 2. Modulation of the kinetic properties of enzymes in the aggregated state. *Eur J Biochem* 217: 1075-1082.
312. Mekhalfi M, Avilan L, Lebrun R, Botebol H, Gontero B (2012) Consequences of the presence of 24-epibrassinolide, on cultures of a diatom, *Asterionella formosa*. *Biochimie* 94: 1213-1220.
313. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
314. Workflow4metabolomics Server. <http://workflow4metabolomics.org/>.
315. Greenspan P, Fowler SD (1985) Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J Lipid Res* 26: 781-789.
316. Spat P, Macek B, Forchhammer K (2015) Phosphoproteome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its dynamics during nitrogen starvation. *Front Microbiol* 6: 248.

Annexe I :

Etude comparative des systèmes de réparation et de recombinaison de l'ADN chez les cyanobactéries.



Comparative Genomics of DNA Recombination and Repair in Cyanobacteria: Biotechnological Implications

Corinne Cassier-Chauvat, Théo Veaudor and Franck Chauvat*

Institute for Integrative Biology of the Cell, CEA, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette Cedex, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Weiwen Zhang,
Tianjin University, China

Reviewed by:

Rajesh P. Rastogi,
Ministry of Environment, Forests and
Climate Change, India
Dmitry A. Los,
Institute of Plant Physiology, Russia

*Correspondence:

Franck Chauvat
franck.chauvat@cea.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Physiology and Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 12 August 2016

Accepted: 27 October 2016

Published: 09 November 2016

Citation:

Cassier-Chauvat C, Veaudor T and
Chauvat F (2016) Comparative
Genomics of DNA Recombination and
Repair in Cyanobacteria:
Biotechnological Implications.
Front. Microbiol. 7:1809.
doi: 10.3389/fmicb.2016.01809

Cyanobacteria are fascinating photosynthetic prokaryotes that are regarded as the ancestors of the plant chloroplast; the purveyors of oxygen and biomass for the food chain; and promising cell factories for an environmentally friendly production of chemicals. In colonizing most waters and soils of our planet, cyanobacteria are inevitably challenged by environmental stresses that generate DNA damages. Furthermore, many strains engineered for biotechnological purposes can use DNA recombination to stop synthesizing the biotechnological product. Hence, it is important to study DNA recombination and repair in cyanobacteria for both basic and applied research. This review reports what is known in a few widely studied model cyanobacteria and what can be inferred by mining the sequenced genomes of morphologically and physiologically diverse strains. We show that cyanobacteria possess many *E. coli*-like DNA recombination and repair genes, and possibly other genes not yet identified. *E. coli*-homolog genes are unevenly distributed in cyanobacteria, in agreement with their wide genome diversity. Many genes are extremely well conserved in cyanobacteria (*mutMS*, *radA*, *recA*, *recFO*, *recG*, *recN*, *ruvABC*, *ssb*, and *uvrABCD*), even in small genomes, suggesting that they encode the core DNA repair process. In addition to these core genes, the marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus* strains harbor *recBCD* (DNA recombination), *umuCD* (mutational DNA replication), as well as the key SOS genes *lexA* (regulation of the SOS system) and *sulA* (postponing of cell division until completion of DNA repair). Hence, these strains could possess an *E. coli*-type SOS system. In contrast, several cyanobacteria endowed with larger genomes lack typical SOS genes. For examples, the two studied *Gloeobacter* strains lack *alkB*, *lexA*, and *sulA*; and *Synechococcus* PCC7942 has neither *lexA* nor *recCD*. Furthermore, the *Synechocystis* PCC6803 *lexA* product does not regulate DNA repair genes. Collectively, these findings indicate that not all cyanobacteria have an *E. coli*-type SOS system. Also interestingly, several cyanobacteria possess multiple copies of *E. coli*-like DNA repair genes, such as *Acaryochloris marina* MBIC11017 (2 *alkB*, 3 *ogt*, 7 *recA*, 3 *recD*, 2 *ssb*, 3 *umuC*, 4 *umuD*, and 8 *xerC*), *Cyanothece* ATCC51142 (2 *lexA* and 4 *ruvC*), and *Nostoc* PCC7120 (2 *ssb* and 3 *xerC*).

Keywords: cyanobacteria, photoproduction, DNA recombination, DNA repair, genetic instability, insertion sequences, natural transformation, radiation resistance

INTRODUCTION

Cyanobacteria, the oldest and most diverse Gram-negative bacteria (Shih et al., 2013) are the only prokaryotes capable of oxygen-evolving photosynthesis (Hamilton et al., 2016). They are viewed as the ancestors of plant chloroplasts (Archibald, 2009), and as major producers of (i) the Earth's oxygenic atmosphere (Schopf, 2011) and (ii) the carbonates sedimentary deposits (Bosak et al., 2013; Benzerara et al., 2014).

Contemporary cyanobacteria produce a tremendous quantity of oxygen, and fix CO₂ (Jansson and Northen, 2010), NO₃ and N₂ (Zehr, 2011) into an enormous biomass that supports a large part of the food chain. N₂-fixing cyanobacteria can be used to fertilize soils (Singh et al., 2016), in place of industrial N-fertilizers whose production consumes large amounts of fossil fuels (Grizeau et al., 2015). In colonizing a wealth of wastewater ecosystems that contain high levels of nitrate and phosphate (Abed et al., 2014) and/or heavy metals, cyanobacteria could be used for wastewater treatment (Abed et al., 2014; Singh et al., 2016).

Cyanobacteria produce a wealth of natural products that can influence human health (antioxidants, vitamins, antibacterial, toxins (Williams, 2009; Dittmann et al., 2015; Kleigrewe et al., 2016; Narainsamy et al., 2016). Hence, *Arthrospira* has served as a human food since time immemorial (Gao, 1998).

Cyanobacteria are also regarded as promising microbial factories for the production of chemicals from nature's most plentiful resources: solar light, water, CO₂ (Lai and Lan, 2015; Savakis and Hellingwerf, 2015; Zhou et al., 2016). To reach this objective, it is necessary to (i) introduce and express in cyanobacteria the (heterologous) chemicals-producing genes they lack; (ii) redirect the photosynthetically-fixed carbon toward the production of the intended chemicals; (iii) increase the tolerance of the engineered cyanobacteria to the intended products and (iv) maintain, or increase, the genomic stability of the producer strains. These biotechnological works are mainly performed with the unicellular models *Synechocystis* sp. strain PCC6803, *Synechococcus* sp. strain PCC7942 (formerly *Anacystis nidulans* R2) and *Synechococcus* sp. strain PCC7002 (formerly *Agmenellum quadruplicatum* PR6) that possess a small sequenced and manipulable genome (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>). These cyanobacteria can take up and incorporate extracellular DNA into their chromosome to create insertion, deletion, or replacement mutations (Orkwiszewski and Kaney, 1974; Stevens and Porter, 1980; Grigorieva and Shestakov, 1982). They can also be manipulated with replicative shuttle vectors derived from (i) their endogenous plasmids (Kuhlemeier et al., 1981; Buzby et al., 1983; Chauvat et al., 1986), or (ii) the non-cyanobacterial plasmid RSF1010 (Mermet-Bouvier et al., 1993). Interestingly, this promiscuous plasmid replicates also in *Thermosynechococcus elongatus* (Mühlenhoff and Chauvat, 1996), *Prochlorococcus marinus* sp. strain MIT9313 (Tolonen et al., 2006), *Leptolyngbya* sp. strain BL0902 and *Nostoc punctiforme* sp. strain ATCC29133 (also registered as PCC73102) (Huang et al., 2010; Taton et al., 2014). Such RSF1010-derived plasmids proved useful tools for *in vivo* studies of (i) gene expression (Marraccini et al., 1993; Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994; Mazouni et al., 1998;

Figge et al., 2000; Mazouni et al., 2003; Huang et al., 2010; Dutheil et al., 2012); (ii) cell division (Mazouni et al., 2004; Marbouty et al., 2009), DNA repair (Domain et al., 2004); (iii) hydrogen production (Dutheil et al., 2012; Sakr et al., 2013; Ortega-Ramos et al., 2014); (iv) insertion sequence (Cassier-Chauvat et al., 1997); and (v) redox metabolism and responses to heavy metals (Poncelet et al., 1998; Marteyn et al., 2009, 2013).

Because of their photoautotrophic lifestyle, cyanobacteria are strongly challenged by DNA damages generated by solar UV rays and photosynthesis (for review see Cassier-Chauvat and Chauvat, 2015), likely explaining their resistance to radiations. Furthermore, many cyanobacteria engineered for biotechnological purposes appeared to be genetically unstable in using DNA recombination to inactivate/eliminate the newly introduced genes of industrial interest. Hence, a better understanding of DNA recombination and repair in cyanobacteria could help increasing their robustness and the genetic stability of the engineered strains. This would represent an important contribution toward the development of an economically viable photo-biotechnology. In this perspective, we used a comparative genomic approach (**Table 1** and **Supplemental Table 1**), to show that cyanobacteria possess a large number of genes homolog to *Escherichia coli* DNA recombination and repair genes, including the key SOS players *lexA* and *sulA*. The presence/absence of these genes and information concerning their function and/or regulation indicate that some cyanobacteria may possess an *E. coli*-like SOS-type DNA repair system. These findings do not exclude the possible existence in cyanobacteria of other DNA repair genes, not yet identified.

RESULTS AND DISCUSSION

Genomic Diversity of Cyanobacteria

In colonizing most waters (fresh, brackish and marine) and soils, where they face various challenges (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2015), cyanobacteria have developed as widely diverse organisms (Narainsamy et al., 2013). Their genomes differ in size (from 1.44 to 12.07 Mb), ploidy (from two to more than 20 chromosome copies per cell) or GC content (30–60%), probably as a result from gains and losses of genes transferred by plasmids, insertion sequences (Alam et al., 1991; Cassier-Chauvat et al., 1997) and/or cyanophages (Hess, 2011; Shih et al., 2013). Most cyanobacteria possess a single circular chromosome, ranging from 1.44 Mb in size (the marine symbiotic strain UCYN-A) to 12.07 Mb (*Scytonema hofmanni* PCC7110) (Dagan et al., 2013). The well-studied strain *Synechocystis* PCC6803 has a 3.57 Mb chromosome, with a 48% GC content (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>) and a copy number of 10–50 (Labarre et al., 1989; Griese et al., 2011). For the other models the values are 2.69 Mb, 55% and 2–5 for *Synechococcus* PCC7942 (Mann and Carr, 1974; Griese et al., 2011; Watanabe et al., 2015); and 3.00 Mb, 50%, and likely 2–5 for *Synechococcus* PCC7002 (Griese et al., 2011; Watanabe et al., 2015). *Synechocystis* PCC6803 also has seven plasmids, ranging from 2.3 Kb (Chauvat et al., 1986) to 119vKb

TABLE 1 | Reference of the genes from *Synechocystis* PCC6803 (slr or slr), *E. coli* (eco) or *B. subtilis* (BSU) in the MGD data base (<http://mbgd.genome.ad.jp/>) used for searching their homologs in the studied cyanobacteria.

Name	Protein function	Gene id
<i>uvrA</i>	UvrA, excinuclease ABC subunit A	slr1844
<i>uvrB</i>	UvrB, excinuclease ABC subunit B	slr0459
<i>uvrC</i>	UvrC, excinuclease ABC subunit C	slr0865
<i>uvrD</i>	UvrD, excinuclease ABC subunit C/helicase	slr1143
<i>recA</i>	RecA, recombinase A	slr0569
<i>recBec</i>	RecB exonuclease V (RecBCD complex), beta subunit	eco:B2820
<i>recBcy</i>	Contains hhh domain and of nuclease of recB family	slr1686
<i>recC</i>	recC exonuclease V (RecBCD complex), gamma chain	eco:B2822
<i>recD</i>	recD exodeoxyribonuclease V, subunit alpha/ TraA family helicase	eco:B2819
<i>recF</i>	Recombination protein F RecF	slr1277
<i>recG</i>	ATP-dependent DNA helicase RecG	slr0020
<i>recJec</i>	recJ ssDNA exonuclease, 5' → 3'-specific	eco:B2892
<i>recJcya</i>	single-stranded-DNA-specific exonuclease RecJ	slr1354
<i>recN</i>	DNA repair protein RecN	slr1520
<i>recQec</i>	ATP-dependent DNA helicase RecQ	eco:B3822
<i>recQcy</i>	ATP-dependent DNA helicase RecQ	slr1536
<i>recR</i>	Recombination protein F RecF	slr1426
<i>recO</i>	DNA gap repair protein	slr/eco:B2565
<i>ruvA</i>	Holliday junction DNA helicase RuvA	slr0876
<i>ruvB</i>	Holliday junction DNA helicase RuvB	slr0613
<i>ruvC</i>	Holliday junction resolvase RuvC	slr0896
<i>mutH</i>	mutH methyl-directed mismatch repair protein	eco:B2831
<i>mutL</i>	mutL DNA mismatch repair protein	slr1199
<i>mutM</i>	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	slr1689
<i>mutS1</i>	DNA mismatch repair protein MutS	slr1165
<i>mutS2</i>	recombination and DNA strand exchange inhibitor protein	slr1772
<i>mutT</i>	DNA mismatch repair protein Mutator Mut_like protein	slr1134
<i>mutY1</i>	A/G specific adenine glycosylase yfhQ	eco:B2961
<i>umuC</i>	umuC translesion error-prone DNA polymerase V subunit;	eco:B1184
<i>umuD</i>	SOS response UmuD protein	slr5123
<i>lexA</i>	lexA SOS function regulatory protein	slr1626
<i>ssb</i>	ssb single-stranded DNA-binding protein	slr0925
<i>dinB</i>	DNA polymerase IV	eco:B0231
<i>comA</i>	competence protein comEA, comA	slr0197
<i>comE</i>	competence protein comEC, comEA comE	slr1929
<i>comFA</i>	Competence protein ComF operon protein1	BSU35470

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Name	Protein function	Gene id
<i>comFB</i>	Competence protein ComFB protein2	BSU35760
<i>comFC</i>	Competence protein ComFC protein 3	BSU35450
<i>phr</i>	phr deoxyribopyrimidine photolyase	slr0854
<i>alkB</i>	alkB oxidative demethylase of N1 or N3 methylcytosine DNA lesions	eco:B2212
<i>xerC</i>	integrase recombinase	slr0733
<i>ogt/ada</i>	O6 methylguanine transferase/ fused DNA binding transcriptional regulator	eco:B1335 and BSU13540
<i>sulA</i>	sulA cell division inhibitor	slr1223
<i>radA</i>	sms DNA repair protein RadA	slr0448

(<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>); *Synechococcus* PCC7942 has one plasmid (46 Kb); and *Synechococcus* PCC7002 has seven plasmids (4.8–186 Kb). Interestingly, *Cyanothece* ATCC51142 possesses two chromosomes (one circular, 4.39 Mb; and one linear, 0.4 Mb) and four plasmids (10–39 Kb), whereas the marine strains *Prochlorococcus* and *Synechococcus* have a small chromosome (1.6–2.7 Mb), and no plasmids (Scanlan et al., 2009).

As a consequence of their genomic diversity, cyanobacteria produce a wealth of metabolites (Dittmann et al., 2015; Kleigrewe et al., 2016), display different cell morphologies (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014) and can differentiate cells, akinetes and/or heterocysts, respectively dedicated to cell survival in adverse conditions (Chauvat et al., 1982) or the fixation of atmospheric nitrogen (Flores and Herrero, 2010).

Cyanobacteria can be Resistant to Radiations

Because of their photoautotrophic lifestyle, cyanobacteria are strongly challenged by solar UV rays and reactive oxygen species generated by photosynthesis (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2015). Consequently, *Synechocystis* PCC6803 and *Synechococcus* PCC7942 are found to be more resistant to UV than the (non-photosynthetic) bacterium *E. coli* where DNA repair is best known (Baharoglu and Mazel, 2014). *Synechocystis* PCC6803 is also more resistant to gamma rays than *Synechococcus* PCC7942 and *E. coli* in that order (the doses yielding 10% survival are 660, 230, and 130 Gy, respectively (Domain et al., 2004). Other cyanobacteria are even more radioresistant, almost as the champion bacterium *Deinococcus radiodurans* [100% survival at 5kGy (Moseley and Mattingly, 1971; Ito et al., 1983)]. These radiation-resistant cyanobacteria are *Chroococcidiopsis* [10% survival to 4–5 kGy of gamma rays (Billi et al., 2000)], three *Anabaena* strains [they can grow at 5 kGy (Singh et al., 2010)] and *Arthrospira* PCC8005 [it grows at 800 Gy (Badri et al., 2015)]. Thus, cyanobacteria might be used in the future for leaching (and/or sequestration) of radionuclides (Acharya and Apte, 2013).

Cyanobacteria can be Naturally Competent for Genetic Transformation Mediated by DNA Recombinations

The naturally transformable cyanobacteria *Synechococcus* PCC7942, *Synechococcus* PCC7002, and *Synechocystis* PCC6803 can take up extracellular DNA and to recombine it into their own genome (Orkwiszewski and Kaney, 1974; Stevens and Porter, 1980; Grigorieva and Shestakov, 1982). This capability served to create a wealth of insertions, deletions or replacement mutations (Lai and Lan, 2015; Savakis and Hellingwerf, 2015; Zhou et al., 2016).

Natural transformation is best studied in *Bacillus subtilis* and *Helicobacter pylori* (Dorer et al., 2011). DNA transported into the cytosol by the Com proteins (com for competence) is integrated into the recipient genome by the RecA, RecG, and RuvABC recombination proteins.

The *com* genes (Table 1) are widely distributed in cyanobacteria (Supplemental Table 1). *Synechocystis* PCC6803, *Synechococcus* PCC7942, and *Synechococcus* PCC7002 harbor the *comAEF* genes (Supplemental Table 1). The *Synechocystis* PCC6803 genes *comA* and *comF* truly operate in transformation (Yoshihara et al., 2001), and *comF* is also involved in phototactic motility (Nakasugi et al., 2006). The role of *comE* could not be verified because the *comE*-depleted mutant dies rapidly (Yoshihara et al., 2001). By contrast, the *Prochlorococcus* cyanobacteria endowed with small genomes have no *comAEF* genes, excepted *P. marinus* MIT9303, and *P. marinus* MIT9313 that possess *comA*, *come*, and *ComF* (Supplemental Table 1). These strains also have the *recA*, *recG*, and *ruvABC* genes (Supplemental Table 1). We have verified in *Synechocystis* PCC6803 that *ruvB* operates in genetic transformation (Domain et al., 2004). These finding suggest that *P. marinus* MIT9313 may be transformable in appropriate conditions.

Recently, the CRISPR/Cas9 genome editing system, which enhances the recombination efficiency and accelerates the process for chromosome segregation, was used for efficient genome editing in cyanobacteria (Li et al., 2016; Wendt et al., 2016).

Cyanobacteria Genetically Engineered for Biotechnological Purposes can be Genetically Instable

Microbial organisms can genetically adapt themselves to their “laboratory” environment. This phenomenon explains the phenotypic differences observed between various sub-strains of the same organism cultivated in diverse laboratories. Hence, the four laboratory sub-strains of *Synechocystis* PCC6803 with different cell motility and/or ability to feed from glucose, harbor mutations, insertion or deletion, as compared to each others (Okamoto et al., 1999; Kanesaki et al., 2012; Trautmann et al., 2012).

Genetic instability can also be observed in strains genetically engineered for the synthesis of chemicals, where it can decrease the amplitude and/or durability of production. Genetic instability correlates with the toxicity of the products, and homologous recombination between repeated DNA motifs (Gellert and Nash,

1987; Holder et al., 2015), which are frequent in cyanobacteria (Elhai, 2015).

In the 61 articles reporting the genetic engineering of a model cyanobacterium for the synthesis of a biotechnological product, the level of production were analyzed only during short periods of times (usually not more than 30 days after the generation of the producer strains; Lai and Lan, 2015). Consequently, we know very little regarding genome (in)stability in engineered cyanobacteria growing under laboratory conditions. This genome (in)stability is an important issue in large industrial cultures that require many cell divisions of the engineered cyanobacteria. The longer the cultivation, the higher the probability of selecting spontaneous mutations decreasing the synthesis of the product to increase cell fitness.

A few studies reported the genetic instability of engineered cyanobacteria. We observed this phenomenon while attempting to use *Synechocystis* PCC6803 for the production of a uniformly ¹⁴C-labeled mouse urokinase (a serine protease). The urokinase producing plasmid, which replicated stably in the *recA*⁻ mutant of *E. coli*, invariably lost part of the urokinase gene upon propagation in *Synechocystis* PCC6803 (Chauvat et al., 1988). Another *Synechocystis* PCC6803 strain harboring *Pseudomonas aeruginosa* genes cloned its chromosome (at the *shr0168* neutral docking site) for lactic acid production, happened to rescue its growth by introducing a duplication (~160 bp) that generated premature stop codons into the *Pseudomonas* (NADPH/NADH) transhydrogenase gene (Angermayr et al., 2012).

Similarly, the *Synechococcus* PCC7942 strain harboring the *Pseudomonas syringae* gene (*efe*) encoding the ethylene-forming enzyme (Fukuda et al., 1992; Sakai et al., 1997), managed to introduce short nucleotide insertions in *efe* to stop ethylene production and recover a healthy growth (Takahama et al., 2003). Another recombinant *Synechococcus* PCC7942 strain could introduce a missense mutation in the *E. coli* *atoD* gene (acetoacetyl-CoA transferase) to decrease isopropanol production (Kusakabe et al., 2013).

In *Synechococcus* PCC7002, a recombinant strain managed to loose mannitol synthesis and recover healthy growth, in introducing a single-base deletion generating a stop codon in its *E. coli* mannitol-1-phosphate dehydrogenase *mtlD* gene (Jacobsen and Frigaard, 2014).

The *Synechocystis* PCC6803 and *Synechococcus* PCC7002 recombinant strains producing the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase enzyme (PDC) for ethanol production, could introduce mutations, insertions, deletions or mobile genetic elements (insertion sequences) into the *pdg* gene to stop ethanol production (Schulze et al., 2015).

Insertion sequences (ISs) are approximately 1 kbp long DNA segments found in the genome of most living organisms, where they can interrupt genes (Bennett, 2004). Generally, an IS comprises an inverted repeat DNA sequence flanking one or two genes encoding the mobilization protein (transposase), which drives the excision and reinsertion of IS in genomes.

Many cyanobacterial chromosomes and/or plasmids harbor a few or numerous copies of ISs, as the widely distributed IS families IS4, IS5, IS630 and IS200-605, which are regarded as ancestral (Lin et al., 2011). Though several *P. marinus* strains

harboring a small genome have no IS, the frequencies of IS do not systematically increase with the genome size. Indeed, IS represent 10% of the 5.8 Mb genome of *Microcystis aeruginosa* NIES843, 1.5% of the 3.95 Mb genome of *Synechocystis* PCC6803, and 1% of the 7.2 Mb genome of *Nostoc (Anabaena)* PCC7120 (Lin et al., 2011). Consistent with the findings that transposase genes can be induced by stresses (Hernández-Prieto et al., 2016), several studies employing a positive selection procedure showed that ISs can be truly mobile in cyanobacteria. First, a recombinant *Nostoc (Anabaena)* PCC7120 strain harboring a plasmid encoding the *B. subtilis* SacB enzyme (levan sucrose), which kills cells incubated in the presence of sucrose, generated sucrose resistant mutants resulting from the disruption of the *sacB* gene by a mobile IS895 element (Alam et al., 1991).

Similarly, an IS5 element of *Synechocystis* PCC6803 was shown to be mobile in rescuing the growth of a conditionally lethal mutant by disrupting the repressor gene that normally blocks the transcription of an essential ferredoxin-encoding gene (Cassier-Chauvat et al., 1997; Poncelet et al., 1998). Other recently transposed IS4 elements were identified through Southern blotting and DNA sequencing analysis of three *Synechocystis* PCC6803 sub-strains (Okamoto et al., 1999).

In addition, the presence of multiple copies of an IS in a genome can promote homologous recombination, leading to genome rearrangements (inversions or deletions; Gellert and Nash, 1987) that can modify cell fitness. Moreover, ISs can be transferred between genomes by horizontal gene transfer mechanisms. Thus, ISs are an important force in genome evolution (Bennett, 2004).

So far very few studies attempted to decrease or eliminate the negative influence of IS on biotechnological production. In *Corynebacterium glutamicum*, the deletion of two major IS elements generated a cell chassis with an increased ability to stably produce recombinant proteins (Choi et al., 2015). A similar strategy could be tested in the genetically manipulable cyanobacteria *Synechococcus* PCC7942 and *Synechococcus* PCC7002 because they possess only one and ten transposase genes, respectively (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>). In contrast, an IS-deletion strategy is not an appealing for *Synechocystis* PCC6803 that possesses 128 transposase genes.

In *E. coli*, the stable propagation of recombinant DNA (usually cloned in plasmids) is achieved in strains where *recA*, the key DNA-recombination gene (Baharoglu and Mazel, 2014), has been inactivated to prevent unexpected DNA rearrangements. All cyanobacteria possess a *recA* gene (*Acaryochoris marima* MBIC11017 has 7 *recA* genes, **Supplemental Table 1**). The *recA* gene appeared to be indispensable to cell life in *Synechococcus* PCC7002 (Murphy et al., 1990), whereas it could be deleted from all chromosome copies in *Synechocystis* PCC6803 (Minda et al., 2005). The *Synechocystis* PCC6803 *recA* null mutant is bound to be of limited biotechnological interest because it is not only sensitive to UV-C, but also to standard fluence of white light required for cell growth. Furthermore, in being defective in DNA recombination a *recA*⁻ mutant is not appropriate for genetic manipulation of the cyanobacterial chromosome (cloning of heterologous genes encoding the synthesis of biotechnological

products and/or deletion of endogenous genes limiting the intended production).

An interesting way to limit genetic instability of engineered bacteria is to clone the product-synthesizing genes under the control of regulatable expression signals to afford a user-controlled synthesis of the potentially harmful product. Using such regulatory signals, one can grow the engineered strain up to a large biomass, before triggering the synthesis of the intended product, which, otherwise, could have impaired the fitness and/or the genetic stability of the producer.

In cyanobacteria gene expression can be regulated by (i) light (*psbA2* promoter), (ii) the IPTG metabolite (*lac* promoter/repressor system), (iii) metals [cyanobacterial promoters *coaT*, *ziaA*, etc (Berla et al., 2013; Zhou et al., 2016)], or (iv) the growth temperature [λ phage *pR* promoter controlled by the λ 857 temperature-sensitive repressor (Ferino and Chauvat, 1989; Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994)]. As put forward by other workers (Berla et al., 2013) an ideal system should combine the following properties.

- “It should be inactive in absence of inducer”;
- “It should produce a predictable response to a given concentration of a regulator”;
- “The inducer should have no harmful effect on the host organism”;
- “The inducer should be cheap and stable under the growth conditions of the host”;
- “The inducible system should act orthogonally to the host cell’s transcriptional program (ideal transcriptional repressors should not bind to native promoters.)”

In our laboratory, we often used the temperature-controlled system that appeared to combine most of these advantageous properties (Dutheil et al., 2012; Marteyn et al., 2013; Ortega-Ramos et al., 2014) and references therein. This system tightly controls gene expression proportionally to growth temperatures i.e., absence of expression at temperature $\leq 30^\circ\text{C}$ (the standard growth temperature of our favorite cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803); intermediary expression at intermediate temperature $34\text{--}37^\circ\text{C}$; and strong expression at 39°C (where *Synechocystis* PCC6803 keep growing well). For instance, when this system was used to control the production of the heterologous enzymes chloramphenicol-acetyl-transferase and beta-galactosidase, which possess an easily quantified activity, the values were respectively ≤ 3 units (30°C); 700–1000 units ($34\text{--}37^\circ\text{C}$) and 2000–4000 units (39°C) (Ferino and Chauvat, 1989; Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994). Hence this system can be also used for basic research that requires the construction of conditionally-lethal mutants (Poncelet et al., 1998; Sakr et al., 2013).

Distribution of Direct DNA-Damages Reversal Genes in Cyanobacteria

From bacteria to higher eukaryotes, cells are continuously exposed to DNA damages generated by their own metabolism (Imlay, 2013) and/or exogenous sources (radiations, chemicals, etc). DNA lesions are repaired by conserved pathways that

have been extensively studied in *E. coli* (Baharoglu and Mazel, 2014). The simplest system, the direct damage reversal pathway, removes only the base-modifying agent in one single step (Resende et al., 2011) catalyzed by the AlkB demethylase, the Ogt alkyltransferase, and the Phr (photorepairs of pyrimidine) photolyase.

Using a comparative genomic approach, we found that the 76 cyanobacterial genome sequences in the MGD data base (<http://mbgd.genome.ad.jp/>) possess many genes orthologous to *E. coli* DNA recombination and repair genes. The *phr*, *alkB* and *ogt* orthologs (Table 1) are distributed unevenly in cyanobacteria (Supplemental Table 1). The *phr* gene is present in almost all cyanobacteria including some, but not all, *P. marinus* strains endowed with a small genome (1.6–2.7 Mb). In agreement with the light fluence they receive in their oceanic biotopes (Biller et al., 2015), the high-light-adapted strains *P. marinus* MIT9515 and *P. marinus* MED4 possess *phr*, whereas the low-light-adapted strains *P. marinus* MIT9303 and *P. marinus* MIT9313 lack *phr* (Supplemental Table 1), and are light sensitive (Biller et al., 2015). The *alkB* and *ogt* genes are less frequent than *phr*. All three genes *alkB*, *ogt*, and *phr* are simultaneously present in several (twelve) studied cyanobacteria, such as *Nostoc (Anabaena)* PCC7120 (filamentous), and *Cyanothece* PCC7425 (unicellular) where *ogt* is duplicated. The other (evolutionary distant) unicellular models *Synechocystis* PCC6803, *Synechococcus* PCC7942, and *Synechococcus* PCC7002 possess *phr* (Supplemental Table 1). *Synechocystis* PCC6803 has *alkB* but not *ogt*, *Synechococcus* PCC7942 has *ogt* (duplicated) but not *alkB*, and *Synechococcus* PCC7002 has neither *alkB* nor *ogt*. Interestingly, the symbiotic (marine) cyanobacterium UCYN-A has no *phr*, *alkB*, and *ogt*, in agreement with the fact that it possesses the smallest genome (1.44 Mb). The other symbiotic strain *Acyrochloris marina* MBIC11017 endowed with a larger genome (8.36 Mb) has two *alkB*, three *ogt* (including one on a plasmid) but no *phr* (Supplemental Table 1).

Distribution of Nucleotide Excision DNA Repair Genes in Cyanobacteria

This pathway removes distortions of the double helix of DNA (pyrimidine dimers or DNA intra-strand cross-links), by excising a small group of bases (Baharoglu and Mazel, 2014). In *E. coli* the two-proteins complex UvrAB recognizes the DNA lesion; UvrC generates a double incision on both sides of the lesion and the UvrD helicase removes the single-strand DNA carrying the lesion. The missing DNA is re-synthesized by the DNA polymerase I (Pol I), and subsequently sealed by a ligase.

All tested cyanobacterial genomes possess the *uvrABCD* single-copy genes (Supplemental Table 1), where *uvrA* and *uvrB* are not organized in operon (Supplemental Figure 1), unlike what occurs in *E. coli*. In some cyanobacterial genomes *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, and/or *uvrD* are clustered with another DNA repair gene, such as *phr* or *recN* (gene clusters a and c in Supplemental Table 1 and Supplemental Figure 1). In the radiation-resistant cyanobacterium *Arthrospira* PCC8005, *uvrBCD* were found to be upregulated by gamma rays (no information is provided for *uvrA*) (Badri et al., 2015).

Distribution of Methyl-Directed DNA Mismatch Repair Genes in Cyanobacteria

This pathway corrects the mispaired DNA bases generated by replication errors (Putnam, 2016). In *E. coli*, MutS recognizes mispaired DNA bases and coordinates with MutH and MutL (nucleases), MutM, MutT and MutY (DNA glycosylases) and UvrD (helicase) to direct excision of the newly synthesized DNA strand (not yet methylated at GATC sites by the Dam methylase) up to the mismatch. The resulting gap is filled up by a DNA polymerase (likely PolIII) and a ligase (Putnam, 2016).

All tested cyanobacteria have *mutM* (Supplemental Table 1), which was shown in *Synechococcus* PCC7942 to operate in resistance to high light (Mühlenhoff, 2000). All cyanobacteria possess *mutS*, which occurs in two copies, excepted in *Crinalium epipsammum* PCC 9333 (Supplemental Table 1). By contrast, *mutH* is absent in all cyanobacteria. The genetic diversity of cyanobacteria is well illustrated with the presence/absence of *mutL*, *mutt*, and *mutY* (Supplemental Table 1), which lies in front of *recR* in a few cyanobacterial genomes (Table 1 and Supplemental Figure 1). Several *P. marinus* strains lack *mutL*, *mutt*, and *mutY* (Supplemental Table 1). In *Arthrospira* PCC8005 (radiation-resistant) *mutST* were upregulated by gamma rays (Badri et al., 2015).

The model strains *Synechocystis* PCC6803, *Synechococcus* PCC7942, *Synechococcus* PCC7002 and *Nostoc (Anabaena)* PCC7120 possess *mutL*, *mutM*, *mutS* (duplicated), *mutT* (excepted *Synechococcus* PCC7002), *mutY* (excepted *Synechococcus* PCC6803 and *Nostoc* PCC7120) (Supplemental Table 1). Thus, *Synechococcus* PCC7942 is best suited to study all these genes through deletion/over-expression in the otherwise same genetic context.

Distribution of Recombinational DNA Repair Genes in Cyanobacteria

This pathway repairs double-stranded breaks and cross-links. In *E. coli*, single-strand DNA nicks are enlarged by the RecQ helicase and RecJ exonuclease, into gaps that are recognized by the proteins RecFOR. The double-strand DNA breaks (DSB) are recognized by the RecBCD proteins that form an exonuclease/helicase complex. Subsequently, the RecFOR/RecBCD complexes (and RecN) load RecA to initiate homologous recombination and DNA repair. RecA mediates synapsis, forming a Holliday junction. Replication fills gaps. RecG, Ssb (single-stranded DNA binding protein) and RuvAB mediate branch migration (stimulated by Rada), and RuvC resolves the junctions (Baharoglu and Mazel, 2014).

DNA recombination also involves the XerC-XerD complex. It converts dimers of the chromosome into monomers to permit their segregation during cell division, and it contributes to the segregational stability of plasmids (Resende et al., 2011; Buljubašić et al., 2013).

In many bacteria, such as *H. pylori* and *B. subtilis* the AddA and AddB proteins replace RecB and RecC, respectively (Dorer et al., 2011; Wigley, 2013).

All cyanobacteria contain *recA*, which occurs as seven copies in the large genome (8.36 Mb) of *A. marina* MBIC11017.

Four of these *recA* genes, possibly originating from gene duplication (Swingley et al., 2008), are located on four separate plasmids, while the other *recA* belong to the chromosome (**Supplemental Table 1**).

Like *recA*, *radA* and *recG* are present in all cyanobacteria, and *radA* is duplicated in *Cyanotheca* PCC7425, *M. aeruginosa* NIES-843 and UCYNA (**Supplemental Table 1**). It is the only duplicated gene in the very small UCYNA genome (1.44 Mb).

Many cyanobacteria have two copies of *recJ* and *recQ* genes. They are noted as *recJ_{ec}* or *recJ_{cy}*, or *recQ_{ec}* or *recQ_{cy}* (ec for *E. coli*, cy for cyanobacteria), according to their high (*recJ_{ec}*, *recQ_{ec}*) or low (*recJ_{cy}*, *recQ_{cy}*) sequence similarity with their *E. coli* counterparts (**Table 1** and **Supplemental Table 1**). This is true for *Synechococcus* PCC7002 and *Nostoc* PCC7120, where these duplicated genes can be studied and compared through deletion/over-expression. In *Arthrospira* PCC8005 (radiation-resistant), *recGJQ* were found to be upregulated by gamma rays (Badri et al., 2015). In contrast a few cyanobacteria has neither *recJ* nor *recQ*, as *P. marinus* MIT9515 (**Supplemental Table 1**). Also interestingly, the low-light-adapted *P. marinus* MIT9313 and *P. marinus* MIT9303 possess the *recQ* genes (and *ogt* and the competence genes *comE* and *comFC*), which are not present in other *Prochlorococcus* (**Supplemental Table 1**). In addition, both *P. marinus* MIT9313 and *P. marinus* MIT9303 lack the *phr* gene, which occurs in other *Prochlorococcus* (**Supplemental Table 1**), in agreement with their light-sensitivity (Biller et al., 2015). Collectively, these findings support the proposal that *P. marinus* MIT9303 and *P. marinus* MIT9313 belong to the same clade, which diverged early from the other *Prochlorococcus* clades (Sun and Blanchard, 2014; Biller et al., 2015).

Almost all cyanobacteria have the single-copy genes *recF*, *recO* and *recR*, excepted *Cyanobacterium aponinum* PCC10605, *C. epipsammum* PCC9333 and *Cylindrospermum stagnale* PCC7417 which lack *recR* (**Supplemental Table 1**).

The *recBCD* genes are less conserved in cyanobacteria. For instance, the strain UCYN-A that possesses *recFOR* has no *recBCD* genes (**Supplemental Table 1**). Most *P. marinus* strains and several marine *Synechococcus* strains possess *recBCD*. Most of these strains possess two *recB* copies, noted *recB_{ec}* (good similarity with *E. coli recB*) or *recB_{cy}* (cy for cyanobacteria, low similarity with *E. coli recB*). In these strains, *recB_{ec}* belongs to the same genomic region than *recC* and *recD* (cluster f in **Supplemental Table 1** and **Supplemental Figure 1**). In a few other cyanobacteria *recD* is duplicated (*Microcoleus* PCC7113) or triplicated (*A. marina* MBIC11017 and *N. punctiforme* PCC73102), irrespectively of the presence /absence of *recB_{ec}* and *recB_{cy}* (**Supplemental Table 1**). The well-studied model cyanobacteria lack *recB*, *recC*, or *recD*. Both *Synechocystis* PCC6803 and *Nostoc (Anabaena)* PCC7120 lack *recB_{ec}* and *recC*, while both *Synechococcus* strains PCC7942 and *Synechococcus* PCC7002 lack *recCD*.

The *recN* gene is present in all cyanobacteria to the noticeable exception of *Chamaesiphon minutus* PCC6605. Interestingly the RecN protein was absent in mature heterocysts of *Anabaena* PCC7120, the differentiated nitrogen-fixing cells that have lost the ability to divide (Hu et al., 2015).

In some cyanobacteria a few *rec* genes are clustered together (*recBCD* see cluster f in **Supplemental Table 1** and **Supplemental Figure 1**), or with other DNA repair genes, including *uvrA* (cluster a) or *mutY* (cluster n; **Supplemental Table 1** and **Supplemental Figure 1**).

All cyanobacteria have a *ssb* gene, which is repeated in a few strains. For instance, *ssb* is duplicated in *Nostoc (Anabaena)* PCC7120 and *A. marina* MBIC11017), while it is triplicated in *Chroococidiopsis thermalis* PCC7203 and quadruplicated in *Cyanotheca* PCC7822 (**Supplemental Table 1**). In these cyanobacteria (excepted *Nostoc (Anabaena)* PCC7120) one *ssb* copy is propagated on a plasmid. One of the two *Nostoc* PCC7120 *ssb* genes, (*alr0088*, but not *alr7579*) was shown to be involved in the tolerance to UV and mitomycin C which causes formation of DNA adducts (Kirti et al., 2013).

The *ruvABC* genes are present in all cyanobacteria, to the noticeable exception of *G. kilauensis* JS1 which lacks *ruvC* (**Supplemental Table 1**). The *ruvA* and *ruvB* genes are not adjacent unlike their operonic *E. coli* counterparts. Furthermore, *ruvA* is duplicated in *Trichodesmium erythraeum* ISM101, while *ruvC* is quadruplicated in *Cyanotheca* ATCC51142 and quadruplicated in *Cyanotheca* PCC7822 (**Supplemental Table 1**). In *Synechocystis* PCC6803 *ruvB* was shown to be dispensable to cell growth in standard laboratory conditions, and to operate in the resistance to UV and H₂O₂ (Domain et al., 2004).

Unlike *recAN* and *ruvABC*, *xerC* is a rare gene in cyanobacteria (**Supplemental Table 1**). It occurs in a single copy in a few strains, as UCYN-A, *Synechococcus* PCC7942, *Synechococcus* PCC7002 and *Synechocystis* PCC6803, or in several copies in *Cyanotheca* PCC7424, *Cyanotheca* PCC7822 (two copies), *Nostoc (Anabaena)* PCC7120 (three copies), *A. marina* MBIC11017 (eight copies).

In bacteria, homologous recombination preferentially initiates at highly repeated, oligomeric DNA sequences designated as Chi (crossover hotspot instigator) sites. In *E. coli*, the Chi site used by RecBCD is 8 bases (GCTGGTGG), whereas in *B. subtilis* Chi used by AddAB is just 5 bases (AGCGG) (Wigley, 2013). Similarly, the GCGATCGC sequence is overrepresented in many cyanobacteria where one or more methylases recognize some portion of the sequence (Elhai, 2015). In *Synechocystis* PCC6803 the repeated sequence HIP1 (Highly Iterated Palindrome) is associated to a CGATCG-specific methylase (*M.Ssp6803I*) that is required for rapid growth (Elhai, 2015).

Distribution of Mutagenic DNA Repair Genes in Cyanobacteria

The above-mentioned repair systems usually remove the initial DNA lesions and restore the genetic material back to its original state. When facing many DNA injuries cells start synthesizing several proteins (endonucleases, polymerases and ligases) to accelerate DNA repair, even though there may be some incorporated errors. In this case, the replicative DNA polymerase PolIII, which cannot replicate damaged DNA, is replaced by other polymerases PolIV (encoded by *dinB*) and PolV (encoded by *umuCD*), which replicate damaged DNA in a mutagenic manner (Baharoglu and Mazel, 2014).

The *umuCD* genes (Table 1) are unevenly distributed in cyanobacteria (Supplemental Table 1). Many strains have no *umuCD*, like UCYN-A (small genome) and *Synechococcus* PCC7002. Others possess *umuCD*, such as *Nostoc* (*Anabaena*) PCC7120, *Synechococcus* PCC7942, *Synechocystis* PCC6803, and the *Prochlorococcus* strains. A few strains harbor a duplication of *umuC* (*Synechococcus* PCC6312) and/or *umuD* (*Cyanobium gracile* PCC6307 and *Synechococcus* PCC6312). *A. marina* MBIC11017 possesses three *umuC* and four *umuD* (Swingley et al., 2008). In some cyanobacteria *umuDC* are clustered together, nearby *ruvA* (cluster z in Supplemental Table 1 and Supplemental Figure 1).

The gene *dinB* (Table 1) is present in a very few cyanobacteria, such as *A. marina* MBIC11017, *Anabaena* PCC7120 and *G. kilaueensis* JS1 (Supplemental Table 1).

Distribution of the Key *E. coli*-Type SOS Genes *LexA* and *SulA* in Cyanobacteria

In many bacteria, the so-called “SOS” regulatory system is the main transcriptional circuit that detects DNA damages and regulates the repair systems according to cells needs (Baharoglu and Mazel, 2014). The SOS response is activated when RecA binds single-stranded DNA and generates a nucleofilament triggering the auto-proteolysis of the LexA regulator. In *E. coli*, LexA normally represses about 40 SOS genes (*recABCD*, *ruvABC*, etc.) by binding to its cognate LexA-box sequence on their promoters (5'-taCTGTatatatACAGta-3'; the upper cases indicate the conserved nucleotides), thereby precluding their transcription (Baharoglu and Mazel, 2014). One of the SOS-controlled gene codes for the key SulA protein that delays cell division until DNA damages are repaired.

The *lexA* gene (Table 1) is unevenly distributed in cyanobacteria. It is absent in both *Arthrospira* PCC8005 (Badri et al., 2015) and NIES39, and in several strains of the genus *Gloeobacter*, *Oscillatoria* and *Synechococcus* (including *Synechococcus* PCC7942, Supplemental Table 1), similarly to what found in other bacteria as *H. pylori* (Dorer et al., 2011) and *Streptococcus pneumoniae* (Baharoglu and Mazel, 2014). By contrast, *lexA* is present in the other tested cyanobacteria (it is duplicated in *Cyanotheca* ATCC51142). The marine cyanobacteria of the genus *Prochlorococcus* and *Synechococcus* share a very similar *lexA* (clade C), while other strains possess a slightly different *lexA* (clade B), such as *A. marina* MBIC11017, and both *Nostoc* PCC7120 and *Synechocystis* PCC6803 (Li et al., 2010). Interestingly, the *Synechocystis* PCC6803 *lexA* gene appeared to regulate carbon assimilation (Domain et al., 2004) and cell motility (Kizawa et al., 2016), but not DNA recombination and repair (Domain et al., 2004). Furthermore, the *Nostoc* PCC7120 LexA protein has a RecA-independent autoproteolytic cleavage (Kumar et al., 2015).

The *sulA* homolog is present in almost all cyanobacteria, to the noticeable exception of *Gloeobacter violaceus* PCC7421, *G. kilaueensis* JS1, *Anabaena* sp. 90 and UCYN-A (Supplemental Table 1). In *Synechocystis* PCC6803, *sulA* appeared to be indispensable to cell life and division (Raynaud et al., 2004).

The DNA Repair Genes Present in all Cyanobacteria Likely Encode the Core Process

Many genes are present in the 76 studied cyanobacteria (*mutM*, *radA*, *recA*, *recFO*, *recG*, *recN*, *ruvABC*, *ssb*, and *uvrABCD*; Table 1 and Supplemental Table 1), including the marine strain UCYN-A that possesses the smallest genome (1.44 Mb), and numerous marine strains *Prochlorococcus* and *Synechococcus* also endowed with a small genome (1.65–Mb). Similarly, *mutS*, *recN*, and *ruvC* are present in almost all cyanobacteria (Supplemental Table 1), namely *Thermosynechococcus* NK55a (absence of *mutS1*), *Cyanotheca* PCC51142 (absence of *recN*) and (*G. kilaueensis* JS1 absence of *ruvC*). Consequently, we propose that the genes *mutMS*, *radA*, *recA*, *recFO*, *recG*, *recN*, *ruvABC*, *ssb*, and *uvrABCD* encode the core DNA repair system of cyanobacteria.

A few other genes are also very well conserved (Supplemental Table 1), such as *recR* (absent in *C. stagnale* PCC7417, *Cyanobacterium aponinum* PCC10605 and *C. epipsammum* PCC9333), *phr* (absent in *A. marina* MBIC11017, and four *Prochlorococcus* strains: SS120, MIT9211, MIT9303 and MIT9313), and *sulA* (absent in UCYN-A, *Anabaena* sp. 90, and the two *Gloeobacter* strains *G. violaceus* PCC7421 and *G. kilaueensis* JS1).

By contrast, *mutH* is absent in all cyanobacteria (Supplemental Table 1) while *dinB* occurs in only five cyanobacteria (*G. kilaueensis* JS1, *Nostoc* (*Anabaena*) PCC7120, *N. punctiforme* PCC73102, *Rivularia* PCC7116 and *A. marina* MBIC11017), and *recC* occurs mostly in the marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus* strains.

Acaryochloris marina MBIC11017 Possesses the Largest Panel of DNA Repair Genes Some of which Occurring in Multiple Copies in the Chromosome and/or Plasmids

The cyanobacteria *A. marina* are unique in that they use chlorophyll d to absorb far-red light for photosynthesis. *A. marina* MBIC11017 possesses a large genome (836 Mb) comprising a circular chromosome (6.5 Mb) and nine plasmids [2.13–374 Kb, (Swingley et al., 2008)]. Consistent with its large genome size, *A. marina* MBIC11017 possesses almost all DNA repair genes observed in cyanobacteria, to the noticeable exception of *recC*. In addition to the core genes (*mutMS*, *radA*, *recA*, *recFO*, *recG*, *recN*, *ruvABC*, *ssb*, and *uvrABCD*) *A. marina* MBIC11017 has the following genes *alkB*, *dinB* (rare in cyanobacteria), *lexA*, *mutLTY*, *phr*, *ogt*, *mutLTY*, *recJQR*, *sulA*, *ssb*, *umuCD*, and *xerC* (Supplemental Table 1). Several of these genes occur in multiple copies (some located on plasmids): *alkB* (two copies), *mutS* (two copies), *ogt* (three copies), *recA* (seven copies, four of them located on four distinct plasmids), *recD* (three copies, two of them propagated on plasmid), *recJ* (two copies), *recQ* (two copies), *ssb* (two copies), *umuC* (three copies including two plasmid copies), *umuD* (four copies including

two plasmid copies), and *xerC* (eight copies, including six on plasmids).

The role of the DNA repair genes of *A. marina* MBIC11017 cannot be studied in this host because it has no genetic system yet. However, these genes can be studied in the genetic models *Synechocystis* PCC6803, *Synechococcus* PCC7942, *Synechococcus* PCC7002 or *Nostoc (Anabaena)* PCC7120, and their future DNA repair mutants. Hence, it would be interesting to study (and compare) the capability of each of the seven *A. marina* MBIC11017 *recA* genes to complement the detrimental absence of the endogenous *recA* gene of *Synechococcus* PCC7002 (Murphy et al., 1990). If so, the responses of the resulting mutants to DNA damaging agents could be further studied and compared to those of the *Synechococcus* PCC7002 wild-type strain.

Together, the Evolutionary-Distant Genetic Models *Synechocystis* PCC6803, *Synechococcus* PCC7942, *Synechococcus* PCC7002 and *Nostoc (Anabaena)* PCC7120 Possess almost all DNA Repair Genes

The cyanobacterial core DNA repair genes (*mutMS*, *radA*, *recA*, *recFO*, *recG*, *recN*, *ruvABC*, *ssb*, and *uvrABCD*) can be investigated in any genetic models *Synechocystis* PCC6803, *Synechococcus* PCC7942, *Synechococcus* PCC7002 and/or *Nostoc (Anabaena)* PCC7120, through deletion and/or over-expression, and phenotypic analysis of the resulting mutants (resistance to DNA damaging agents, etc).

Besides the core DNA repair genes, *Synechocystis* PCC6803, the best-studied model, can be used to investigate *alkB*, *lexA*, *mutL*, *mutS* (a second copy), *mutT*, *phr*, *recBcy*, *recD*, *recQcy*, *sulA*, *umuC* (two copies), and *umuD* (Supplemental Table 1). The genes missing in *Synechocystis* PCC6803 (*dinB*, *ogt*, *mutY*, *recBec*, *recC*, *recJcy*, *recJec*, and *recQec*) can be studied in the other models (Supplemental Table 1): *Synechococcus* PCC7942 (*mutY*, *recBec*, and the two copies of *ogt* and *recJ*), *Synechococcus* PCC7002 (*mutY*, *recBec*, the two copies of *recJ* and *recQec*) and *Nostoc* PCC7120 (*dinB*, *ogt*, the two copies of *recJ*, and *recQec*). By contrast, *recC* in occurring only in the marine cyanobacteria *Synechococcus* and *Prochlorococcus*, with no genetics, cannot be studied in its truly natural genetic context. Nevertheless, *recC* can be investigated in any model cyanobacteria mentioned above.

So far only the *ruvB* and *lexA* genes of *Synechocystis* PCC6803 have been studied *in vivo*. While *ruvB* was found to operate in DNA-recombination, *lexA* appeared to regulate carbon assimilation (Domain et al., 2004) and cell motility (Kizawa et al., 2016) but not DNA repair (Domain et al., 2004).

The *E.coli*-Like SOS Model for DNA Repair is Possibly Valid for the Marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus* Cyanobacteria, but not for *Gloeobacter*, *Synechocystis* PCC6803, and *Synechococcus* PCC7942

In addition to the core DNA repair genes (*mutMS*, *radA*, *recA*, *recFO*, *recG*, *recN*, *ruvABC*, *ssb*, and *uvrABCD*) the

small genomes (1.6–2.7 Mb) of the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus* possess several genes frequently absent in larger cyanobacterial genomes (*recBCD* and *umuCD*; Supplemental Table 1). *Prochlorococcus* and *Synechococcus* also have homologs of *lexA* and *sulA*, which encode the key *E. coli* SOS proteins LexA (regulation of the SOS system) and SulA (postponing of cell division until completion of DNA reparation) (Baharoglu and Mazel, 2014). Furthermore, *recA* and *uvrA* are induced by UV in *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (no information is provided for the other genes), as occurs in *E. coli* (Mella-Flores et al., 2012). The distribution of DNA repair genes in *Prochlorococcus* and *Synechococcus* marine strains suggest that they may possess an *E.coli*-like SOS system. This hypothesis is consistent with the fact that the mutation rate of *Prochlorococcus* is similar to that of *E. coli* (Biller et al., 2015).

By contrast, several findings indicate that the *E.coli*-like SOS model for DNA repair is not valid for all cyanobacteria. The strongest evidence is that two cyanobacteria *G. violaceus* PCC7421 and *G. kilaueensis* JS1 have none of the two key SOS genes *lexA* and *sulA*, and they also lack *alkB*, *recBC* and *xerC* (Supplemental Table 1). Similarly, *Synechococcus* PCC7942 (and its sister strain PCC6301) has no *lexA*, *alkB*, *dinB*, and *recCD*, while *Anabaena* sp. 90 lacks *sulA*, *dinB*, *ogt*, *recBCD* and *umuCD*. *Synechocystis* PCC6803 possesses *lexA*, but it does not regulate DNA repair genes; it controls carbon assimilation (Domain et al., 2004) and cell motility (Kizawa et al., 2016). Furthermore, the *Synechocystis* PCC6803 *lexA* and *recA* genes are not induced by UV-C (Domain et al., 2004) [*lexA* is also negatively regulated by UV-B (Huang et al., 2002)]. In addition, the *Synechocystis* PCC6803 *lexA* and *recA* promoters have neither *E. coli*-like nor *B. subtilis*-like SOS boxes (Domain et al., 2004). Similarly, no SOS box was found in the promoter region of the *Synechococcus* PCC7002 *recA* gene (Murphy et al., 1990). Furthermore, the *lexA* gene of *Anabaena* PCC7120 was neither induced by UV-B nor mitomycin C. In addition, the *Synechocystis* PCC6803 LexA protein has a RecA-independent autoproteolytic cleavage (Kumar et al., 2015).

In *Synechococcus* PCC7942, the Weigle-reactivation of irradiated phage (As-1) was neither induced by mitomycin-C nor nalidixic acid, unlike what was found in *E.coli* (Lanham and Houghton, 1988).

CONCLUSION

From bacteria to higher eukaryotes, cells are equipped with various conserved systems to repair DNA damages generated by their own metabolism (Imlay, 2013) or exogenous sources (solar UV, gamma radiations, chemicals, etc.). Inevitably, some DNA lesions are not correctly repaired leading to mutations that can influence cell fitness (Baharoglu and Mazel, 2014).

For historical reasons, DNA recombination and repair in prokaryotes have been mostly studied in the (non-photosynthetic) bacterium *E. coli* (Baharoglu and Mazel, 2014). Unlike *E.coli*, cyanobacteria are continuously exposed to DNA damages generated by solar UV rays and their own

photosynthetic metabolism (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2015). As a likely consequence, all tested cyanobacteria were found to be more radiation resistant than *E. coli*. It is also important to study DNA recombination and repair in cyanobacteria for biotechnological purposes, since many recombinant strains appeared to be genetically unstable. They somehow managed to inactivate the (newly-introduced) heterologous genes of industrial interest. Thus, a better understanding of DNA recombination and repair in cyanobacteria may lead to increasing the genetic stability of biotechnologically important strains, an important industrial goal.

Using a comparative genomic approach, we found that cyanobacteria possess many genes orthologous to *E. coli* DNA recombination and repair genes, notwithstanding the possibility that cyanobacteria have other, as yet unidentified, such genes.

These *E. coli*-like genes are unevenly distributed in cyanobacteria, in agreement with their wide genome diversity, in a way consistent with the size of their genomes, i.e., large genomes tend to possess more DNA repair genes than small genomes. Most of these *E. coli*-like genes are scattered throughout cyanobacterial genomes, suggesting that there is a mechanism for their coordinate regulation or that they are mostly expressed constitutively. Many DNA repair genes (*mutMS*, *radA*, *recA*, *recFO*, *recG*, *recN*, *ruvABC*, *ssb*, and *uvrABCD*) are extremely well conserved in cyanobacteria, including in the *Prochlorococcus* and *Synechococcus* marine strains which possess very small genomes (1.44–2.7 Mb). Consequently, we propose that these genes encode the core DNA repair system of cyanobacteria.

These marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus* cyanobacteria also have the genes *recBCD* (DNA recombination), *umuCD* (mutational DNA replication), and the key SOS genes *lexA* (regulation of the SOS system) and *sulA* (postponing of cell division until completion of DNA repair). These findings suggest that the marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus* cyanobacteria may possess an *E. coli*-type SOS system.

In contrast, other cyanobacteria endowed with larger genomes lack some of the SOS key genes (*lexA*, *sulA*, *recBCD*, or *umuCD*). For instance, *G. violaceus* PCC7421 and *G. kilauensis* JS1 lack *lexA*, *recBC*, and *sulA* (they also lack *alkB* and *xerC*). *Synechococcus* PCC7942 has neither *lexA* nor *recCD*. Furthermore, the *lexA* gene of *Synechocystis* PCC6803 is not involved in the regulation of DNA repair genes (Domain et al., 2004). Collectively, these findings suggest that the *E. coli*-like SOS model for DNA repair is likely not valid for all cyanobacteria.

The cyanobacterium *A. marina* MBIC11017 possesses the most complete, and complex, set of DNA repair genes: *alkB* (two copies), *dinB* (rare in cyanobacteria), *lexA*, *mutL*, *mutM*, *mutS* (two copies), *mutT*, *mutY*, *ogt* (three copies), *phr*, *radA*, *recA* (seven copies, four of them located on plasmids), *recD* (three copies, including two plasmidic copies), *recF*, *recG*, *recJ* (two copies), *recN*, *recO*, *recQ* (two copies), *recR*, *ruvABC*, *ssb* (two copies), *sulA*, *umuC* (three copies including two plasmid copies), *umuD* (four copies including two plasmid copies), *uvrABCD* and *xerC* (eight copies, including six on plasmids). However,

A. marina MBIC11017 has not all DNA repair genes, since it lacks *recC*. All cyanobacterial DNA repair genes naturally present (or not) in the few (evolutionary distant) genetic models *Synechocystis* PCC6803, *Synechococcus* PCC7002, *Synechococcus* PCC7942 and *Nostoc (Anabaena)* PCC7120, can be studied through deletion and/or over-expression, and analysis of the corresponding mutants (e.g., resistance to DNA damaging agents). Such works would be most welcome since little is known about DNA recombination and repair in cyanobacteria. So far, only the *recA*, *ruvB*, and *lexA* genes have been studied *in vivo*. The *recA* gene appeared to be indispensable in *Synechococcus* PCC7002 (Murphy et al., 1990), and dispensable in *Synechocystis* PCC6803 (Minda et al., 2005). The *Synechocystis* PCC6803 *recA*-null mutant was sensitive to UV-C and white light. The *Synechocystis* PCC6803 *ruvB* gene was found to operate in DNA-recombination, while *lexA* appeared to regulate carbon assimilation (Domain et al., 2004) and cell motility (Kizawa et al., 2016), but not DNA repair (Domain et al., 2004). We hope that this review will stimulate future studies of DNA recombination and repair in cyanobacteria so as to answer the following questions, among others. Do cyanobacteria possess DNA recombination and repair genes with no counterpart in a non-photosynthetic and radiation-sensitive bacterium such as *E. coli*? What is the specificity/redundancy of the various copies of the repeated genes of cyanobacteria (for example of the seven *recA* genes of *A. marina* MBIC11017)? What are the molecular mechanisms responsible for the high radiation-resistance of some cyanobacteria (for instance *Chroococcidiopsis*). How to improve the genetic stability of cyanobacterial strains engineered for biotechnological purposes?

AUTHOR CONTRIBUTION

CC and FC conceived the study. CC, TV, and FC carried out the literature search and analyzed the data. CC, TV, and FC wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

TV was a recipient of PhD thesis fellowship from the CEA-Saclay France.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01809/full#supplementary-material>

Supplemental Table 1 | Distribution of DNA repair genes in cyanobacteria.

The presence (indicated by the number of copies) or absence (0) of the gene is indicated along with the letters referring to the conserved gene clusters depicted in Supplemental Figure 1.

Supplemental Figure 1 | Conserved genomic organization around the DNA repair genes in cyanobacterial genomes.

Genes are represented by boxes pointing in the direction of their transcription. DNA repair genes are colored in red. Genes encoding hypothetical proteins are indicated as "ho."

REFERENCES

- Abed, R. M., Al-Kharusi, S., Prigent, S., and Headley, T. (2014). Diversity, distribution and hydrocarbon biodegradation capabilities of microbial communities in oil-contaminated cyanobacterial mats from a constructed wetland. *PLoS ONE* 9:e114570. doi: 10.1371/journal.pone.0114570
- Acharya, C., and Apte, S. K. (2013). Insights into the interactions of cyanobacteria with uranium. *Photosyn. Res.* 118, 83–94. doi: 10.1007/s11120-013-9928-9
- Alam, J., Vrba, J. M., Cai, Y. P., Martin, J. A., Weislo, L. J., and Curtis, S. E. (1991). Characterization of the Is895 family of insertion sequences from the cyanobacterium *Anabaena* Sp strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 173, 5778–5783.
- Angermayr, S. A., Paszota, M., and Hellingwerf, K. J. (2012). Engineering a cyanobacterial cell factory for production of lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7098–7106. doi: 10.1128/AEM.01587-12
- Archibald, J. M. (2009). The puzzle of plastid evolution. *Curr. Biol.* 19, R81–R88. doi: 10.1016/j.cub.2008.11.067
- Badri, H., Monsieus, P., Coninx, I., Wattiez, R., and Leys, N. (2015). Molecular investigation of the radiation resistance of edible cyanobacterium *Arthrospira* sp PCC 8005. *Microbiol. Open* 4, 187–207. doi: 10.1002/mbo3.229
- Baharoglu, Z., and Mazel, D. (2014). SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 1126–1145. doi: 10.1111/1574-6976.12077
- Bennett, P. M. (2004). Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. *Methods Mol. Biol.* 266, 71–113. doi: 10.1385/1-59259-763-7:071
- Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Li, J. H., Féraud, C., Gugger, M., Laurent, T., et al. (2014). Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 10933–10938. doi: 10.1073/pnas.1403510111
- Berla, B. M., Saha, R., Immethun, C. M., Maranas, C. D., Moon, T. S., and Pakrasi, H. B. (2013). Synthetic biology of cyanobacteria: unique challenges and opportunities. *Front. Microbiol.* 4:246. doi: 10.3389/fmicb.2013.00246
- Biller, S. J., Berube, P. M., Lindell, D., and Chisholm, S. W. (2015). *Prochlorococcus*: the structure and function of collective diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 13–27. doi: 10.1038/nrmicro337.8
- Billi, D., Friedmann, E. I., Hofer, K. G., Caiola, M. G., and Ocampo-Friedmann, R. (2000). Ionizing-radiation resistance in the desiccation-tolerant cyanobacterium *Chroococcidiopsis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1489–1492. doi: 10.1128/AEM.66.4.1489-1492.2000
- Bosak, T., Liang, B., Wu, T. D., Templer, S. P., Evans, A., Vali, H., et al. (2013). Cyanobacterial diversity and activity in modern conical microbialites. *Geobiology* 11, 100–100. doi: 10.1111/j.1472-4669.2012.00334.x
- Buljubašić, M., Zahradka, D., and Zahradka, K. (2013). RecQ helicase acts before RuvABC, RecG and XerC proteins during recombination in recBCD sbcBC mutants of *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 164, 987–997. doi: 10.1016/j.resmic.2013.08.008
- Buzby, J. S., Porter, R. D., and Stevens, S. E. (1983). Plasmid transformation in *Agmenellum-Quadruplicatum* Pr-6 - construction of biphasic plasmids and characterization of their transformation properties. *J. Bacteriol.* 154, 1446–1450.
- Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2014). “Cell division in cyanobacteria,” in *The Cell Biology of Cyanobacteria*, eds E. Flores and A. Herrero (Norfolk, UK: Caister Academic Press), 7–27.
- Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2015). Responses to oxidative and heavy metal stresses in cyanobacteria: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 871–886. doi: 10.3390/ijms16010871
- Cassier-Chauvat, C., Poncelet, M., and Chauvat, F. (1997). Three insertion sequences from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 support the occurrence of horizontal DNA transfer among bacteria. *Gene* 195, 257–266. doi: 10.1016/S0378-1119(97)00165-0
- Chauvat, F., Corre, B., Herdman, M., and Josetespardellier, F. (1982). Energetic and metabolic requirements for the germination of akinetes of the cyanobacterium *Nostoc* PCC7524. *Arch. Microbiol.* 133, 44–49. doi: 10.1007/BF00943768
- Chauvat, F., Devries, L., Vanderende, A., and Vanarkel, G. A. (1986). A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *synechocystis* Pcc 6803. *Mol. Gen. Genet.* 204, 185–191. doi: 10.1007/BF00330208
- Chauvat, F., Labarre, J., Ferino, F., Thuriaux, P., and Fromageot, P. (1988). “Gene transfer to the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803,” in *Algal Biotechnology*, eds T. Stadler, J. Mollion, M.-C. Verdu, Y. Karamanos, H. Morvan, and D. Christiaen (London: Elsevier Applied Science), 89–99.
- Choi, J. W., Yim, S. S., Kim, M. J., and Jeong, K. J. (2015). Enhanced production of recombinant proteins with *Corynebacterium glutamicum* by deletion of insertion sequences (IS elements). *Microb. Cell Fact.* 14, 207. doi: 10.1186/s12934-015-0401-7
- Dagan, T., Roettger, M., Stucken, K., Landan, G., Koch, R., Major, P., et al. (2013). Genomes of Stigonematalean cyanobacteria (subsection V) and the evolution of oxygenic photosynthesis from prokaryotes to plastids. *Genome Biol. Evol.* 5, 31–44. doi: 10.1093/gbe/evs117
- Dittmann, E., Gugger, M., Sivonen, K., and Fewer, D. P. (2015). Natural product biosynthetic diversity and comparative genomics of the cyanobacteria. *Trends Microbiol.* 23, 642–652. doi: 10.1016/j.tim.2015.07.008
- Domain, F., Houot, L., Chauvat, F., and Cassier-Chauvat, C. (2004). Function and regulation of the cyanobacterial genes *lexA*, *recA* and *ruvB*: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation. *Mol. Microbiol.* 53, 65–80. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04100.x
- Dorer, M. S., Sessler, T. H., and Salama, N. R. (2011). Recombination and DNA repair in *Helicobacter pylori*. *Ann. Rev. Microbiol.* 65, 329–348. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102931
- Dutheil, J., Saenkham, P., Sakr, S., Leplat, C., Ortega-Ramos, M., Bottin, H., et al. (2012). The AbrB2 autorepressor, expressed from an atypical promoter, represses the hydrogenase operon to regulate hydrogen production in *Synechocystis* strain PCC6803. *J. Bacteriol.* 194, 5423–5433. doi: 10.1128/JB.00543-12
- Elhai, J. (2015). Highly iterated palindromic sequences (HIPs) and their relationship to DNA methyltransferases. *Life* 5, 921–948. doi: 10.3390/life5010921
- Ferino, F., and Chauvat, F. (1989). A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Gene* 84, 257–266. doi: 10.1016/0378-1119(89)90499-X
- Figge, R. M., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., and Cerff, R. (2000). The carbon metabolism-controlled *Synechocystis* *gap2* gene harbours a conserved enhancer element and a Gram-positive-like -16 promoter box retained in some chloroplast genes. *Mol. Microbiol.* 36, 44–54. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01806.x
- Flores, E., and Herrero, A. (2010). Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 39–50. doi: 10.1038/nrmicro2242
- Fukuda, H., Ogawa, T., Tazaki, M., Nagahama, K., Fujii, T., Tanase, S., et al. (1992). Two reactions are simultaneously catalyzed by a single enzyme: the arginine-dependent simultaneous formation of two products, ethylene and succinate, from 2-oxoglutarate by an enzyme from *Pseudomonas syringae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 483–489. doi: 10.1016/0006-291X(92)91081-Z
- Gao, K. S. (1998). Chinese studies on the edible blue-green alga, *Nostoc* flagelliforme: a review. *J. Appl. Phycol.* 10, 37–49. doi: 10.1023/A:1008014424247
- Gellert, M., and Nash, H. (1987). Communication between Segments of DNA during Site-Specific Recombination. *Nature* 325, 401–411. doi: 10.1038/325401a0
- Griese, M., Lange, C., and Soppa, J. (2011). Ploidy in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 323, 124–131. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02368.x
- Grigorieva, G., and Shestakov, S. (1982). Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 13, 367–370. doi: 10.1111/j.1574-6968.1982.tb08289.x
- Grizeau, D., Bui, L. A., Dupré, C., and Legrand, J. (2015). Ammonium photoproduction by heterocytous cyanobacteria: potentials and constraints. *Crit Rev Biotechnol.* 1–12. doi: 10.3109/07388551.2014.1002380
- Hamilton, T. L., Bryant, D. A., and Macalady, J. L. (2016). The role of biology in planetary evolution: cyanobacterial primary production in low-oxygen Proterozoic oceans. *Environ. Microbiol.* 18, 325–340. doi: 10.1111/1462-2920.13118
- Hernández-Prieto, M. A., Semeniuk, T. A., Giner-Lamia, J., and Futschik, M. E. (2016). The transcriptional landscape of the photosynthetic model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Sci. Rep.* 6:22168. doi: 10.1038/srep22168
- Hess, W. R. (2011). Cyanobacterial genomics for ecology and biotechnology. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 608–614. doi: 10.1016/j.mib.2011.07.024

- Holder, I. T., Wagner, S., Xiong, P., Sinn, M., Frickey, T., Meyer, A., et al. (2015). Intrastrand triplex DNA repeats in bacteria: a source of genomic instability. *Nucleic Acids Res.* 43, 10126–10142. doi: 10.1093/nar/gkv1017
- Hu, S., Wang, J., Wang, L., Zhang, C. C., and Chen, W. L. (2015). Dynamics and cell-type specificity of the DNA double-strand break repair Protein RecN in the developmental cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *PLoS ONE* 10:e0139362. doi: 10.1371/journal.pone.0139362
- Huang, H. H., Camsund, D., Lindblad, P., and Heidorn, T. (2010). Design and characterization of molecular tools for a synthetic biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucl. Acid Res.* 38, 2577–2593. doi: 10.1093/nar/gkq164
- Huang, L., McCluskey, M. P., Ni, H., and LaRossa, R. A. (2002). Global gene expression profiles of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 in response to irradiation with UV-B and white light. *J. Bacteriol.* 184, 6845–6858. doi: 10.1128/JB.184.24.6845-6858.2002
- Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 443–454. doi: 10.1038/nrmicro3032
- Ito, H., Watanabe, H., Takehisa, M., and Iizuka, H. (1983). Isolation and identification of radiation-resistant cocci belonging to the Genus *Deinococcus* from sewage sludges and animal feeds. *Agric. Biol. Chem.* 47, 1239–1247. doi: 10.1271/bbb1961.47.1239
- Jacobsen, J. H., and Frigaard, N. U. (2014). Engineering of photosynthetic mannitol biosynthesis from CO₂ in a cyanobacterium. *Metab. Eng.* 21, 60–70. doi: 10.1016/j.ymben.2013.11.004
- Jansson, C., and Northen, T. (2010). Calcifying cyanobacteria—the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 365–371. doi: 10.1016/j.copbio.2010.03.017
- Kanesaki, Y., Shiwa, Y., Tajima, N., Suzuki, M., Watanabe, S., Sato, N., et al. (2012). Identification of substrain-specific mutations by massively parallel whole-genome resequencing of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* 19, 67–79. doi: 10.1093/dnares/dsr042
- Kirti, A., Rajaram, H., and Apte, S. K. (2013). Characterization of two naturally truncated, Ssb-like proteins from the nitrogen-fixing cyanobacterium, *Anabaena* sp. PCC7120. *Photosynth. Res.* 118, 147–154. doi: 10.1007/s11120-013-9904-4
- Kizawa, A., Kawahara, A., Takimura, Y., Nishiyama, Y., and Hihara, Y. (2016). RNA-seq profiling reveals novel target genes of *lexA* in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front. Microbiol.* 7:193. doi: 10.3389/fmicb.2016.00193
- Kleigrew, K., Gerwick, L., Sherman, D. H., and Gerwick, W. H. (2016). Unique marine derived cyanobacterial biosynthetic genes for chemical diversity. *Nat. Prod. Rep.* 33, 348–364. doi: 10.1039/C5NP00097A
- Kuhlemeier, C. J., Borrias, W. E., van den Hondel, C. A., and van Arkel, G. A. (1981). Vectors for cloning in cyanobacteria: construction and characterization of two recombinant plasmids capable of transformation of *Escherichia coli* K12 and *Anacystis nidulans* R2. *Mol. Gen. Genet.* 184, 249–254. doi: 10.1007/BF00272912
- Kumar, A., Kirti, A., and Rajaram, H. (2015). *LexA* protein of cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120 exhibits *in vitro* pH-dependent and RecA-independent autoproteolytic activity. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 59, 84–93. doi: 10.1016/j.biocel.2014.12.003
- Kusakabe, T., Tatsuke, T., Tsuruno, K., Hirokawa, Y., Atsumi, S., Liao, J. C., et al. (2013). Engineering a synthetic pathway in cyanobacteria for isopropanol production directly from carbon dioxide and light. *Metab. Eng.* 20, 101–108. doi: 10.1016/j.ymben.2013.09.007
- Labarre, J., Chauvat, F., and Thuriaux, P. (1989). Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic-resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* Strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 171, 3449–3457.
- Lai, M. C., and Lan, E. I. (2015). Advances in metabolic engineering of cyanobacteria for photosynthetic biochemical production. *Metabolites* 5, 636–658. doi: 10.3390/metabo5040636
- Lanham, P. G., and Houghton, J. A. (1988). Weigle-reactivation in a cyanobacterium (*Synechococcus* PCC7934) is induced by Uv but not by Mitomycin-C or Nalidixic-Acid. *Photochem. Photobiol.* 48, 473–475. doi: 10.1111/j.1751-1097.1988.tb02848.x
- Li, H., Shen, C. R., Huang, C. H., Sung, L. Y., Wu, M. Y., and Hu, Y. C. (2016). CRISPR-Cas9 for the genome engineering of cyanobacteria and succinate production. *Metab. Eng.* 38, 293–302. doi: 10.1016/j.ymben.2016.09.006
- Li, S., Xu, M. L., and Su, Z. C. (2010). Computational analysis of *LexA* regulons in Cyanobacteria. *Bmc Gen* 11:527. doi: 10.1186/1471-2164-11-527
- Lin, S., Haas, S., Zemojtel, T., Xiao, P., Vingron, M., and Li, R. (2011). Genome-wide comparison of cyanobacterial transposable elements, potential genetic diversity indicators. *Gene* 473, 139–149. doi: 10.1016/j.gene.2010.11.011
- Mann, N., and Carr, N. G. (1974). Control of macromolecular-composition and cell-division in blue-green-alga *Anacystis-Nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 83, 399–405. doi: 10.1099/00221287-83-2-399
- Marbouty, M., Saguez, C., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2009). ZipN, an FtsA-like orchestrator of divisome assembly in the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Mol. Microbiol.* 74, 409–420. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06873.x
- Marraccini, P., Bulteau, S., Cassier-Chauvat, C., Mermet-Bouvier, P., and Chauvat, F. (1993). A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Mol. Biol.* 23, 905–909. doi: 10.1007/BF00021546
- Marteyn, B., Domain, F., Legrain, P., Chauvat, F., and Cassier-Chauvat, C. (2009). The thioredoxin reductase-glutaredoxins-ferredoxin crossroad pathway for selenate tolerance in *Synechocystis* PCC6803. *Mol. Microbiol.* 71, 520–532. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06550.x
- Marteyn, B., Sakr, S., Farci, S., Bedhomme, M., Chardonnet, S., Decottignies, P., et al. (2013). The *Synechocystis* PCC6803 MerA-Like enzyme operates in the reduction of both mercury and uranium under the control of the Glutaredoxin 1 Enzyme. *J. Bacteriol.* 195, 4138–4145. doi: 10.1128/JB.00272-13
- Mazouni, K., Bulteau, S., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (1998). Promoter element spacing controls basal expression and light inducibility of the cyanobacterial *secA* gene. *Mol. Microbiol.* 30, 1113–1122. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01145.x
- Mazouni, K., Domain, F., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2004). Molecular analysis of the key cytokinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE. *Mol. Microbiol.* 52, 1145–1158. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04042.x
- Mazouni, K., Domain, F., Chauvat, F., and Cassier-Chauvat, C. (2003). Expression and regulation of the crucial plant-like ferredoxin of cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* 49, 1019–1029. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03609.x
- Mella-Flores, D., Six, C., Ratin, M., Partensky, F., Boutte, C., Le Corguille, G., et al. (2012). *Prochlorococcus* and *Synechococcus* have Evolved Different Adaptive Mechanisms to Cope with Light and UV Stress. *Front. Microbiol.* 3:285. doi: 10.3389/fmicb.2012.00285
- Mermet-Bouvier, P., Cassier-Chauvat, C., Marraccini, P., and Chauvat, F. (1993). Transfer and replication of Rsf1010-derived plasmids in several cyanobacteria of the general *Synechocystis* and *Synechococcus*. *Curr. Microbiol.* 27, 323–327. doi: 10.1007/BF01568955
- Mermet-Bouvier, P., and Chauvat, F. (1994). A conditional expression vector for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942 and PCC6301. *Curr. Microbiol.* 28, 145–148. doi: 10.1007/BF01571055
- Minda, R., Ramchandani, J., Joshi, V. P., and Bhattacharjee, S. K. (2005). A homozygous *recA* mutant of *Synechocystis* PCC6803: construction strategy and characteristics eliciting a novel RecA independent UVC resistance in dark. *Mol. Genet. Genomics* 274, 616–624. doi: 10.1007/s00438-005-0054-z
- Moseley, B. E. B., and Mattingly, A. (1971). Repair of irradiated transforming deoxyribonucleic acid in wild type and a radiation-sensitive mutant of *Micrococcus-Radiodurans*. *J. Bacteriol.* 105, 976–+.
- Mühlenhoff, U. (2000). The FAPY-DNA glycosylase (Fpg) is required for survival of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* under high light irradiance. *FEMS Microbiol. Lett.* 187, 127–132. doi: 10.1016/S0378-1097(00)00189-0
- Mühlenhoff, U., and Chauvat, F. (1996). Gene transfer and manipulation in the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Mol. Gen. Genet.* 252, 93–100. doi: 10.1007/BF02173209
- Murphy, R. C., Gasparich, G. E., Bryant, D. A., and Porter, R. D. (1990). Nucleotide-sequence and further characterization of the *Synechococcus* Sp Strain PCC 7002 *recA* Gene - complementation of a cyanobacterial RecA mutation by the *Escherichia-coli recA* Gene. *J. Bacteriol.* 172, 967–976.

- Nakasugi, K., Svenson, C. J., and Neilan, B. A. (2006). The competence gene, *comF*, from *Synechocystis* sp strain PCC 6803 is involved in natural transformation, phototactic motility and piliation. *Microbiology* 152, 3623–3631. doi: 10.1099/mic.0.29189-0
- Narainsamy, K., Farci, S., Braun, E., Junot, C., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2016). Oxidative-stress detoxification and signalling in cyanobacteria: the crucial glutathione synthesis pathway supports the production of ergothioneine and ophthalmate. *Mol. Microbiol.* 100, 15–24. doi: 10.1111/mmi.13296
- Narainsamy, K., Marteyn, B., Sakr, S., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2013). “Genomics of the pleiotropic glutathione system in cyanobacteria,” in *Genomics of Cyanobacteria*, eds F. Chauvat and C. Cassier-Chauvat (Amsterdam: Academic Press, Elsevier), 157–188.
- Okamoto, S., Ikeuchi, M., and Ohmori, M. (1999). Experimental analysis of recently transposed insertion sequences in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* 6, 265–273. doi: 10.1093/dnares/6.5.265
- Orkiszewski, K. G., and Kaney, A. R. (1974). Genetic transformation of the blue-green bacterium, *Anacystis nidulans*. *Arch. Mikrobiol.* 98, 31–37. doi: 10.1007/BF00425265
- Ortega-Ramos, M., Jittawuttipoka, T., Saenkham, P., Czarnecka-Kwasiborski, A., Bottin, H., Cassier-Chauvat, C., et al. (2014). Engineering *Synechocystis* PCC6803 for hydrogen production: influence on the tolerance to oxidative and sugar stresses. *PLoS ONE* 9:e89372. doi: 10.1371/journal.pone.0089372
- Poncelet, M., Cassier-Chauvat, C., Leschelle, X., Bottin, H., and Chauvat, F. (1998). Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in *Synechocystis* PCC6803 by plasmid shuffling. *Mol. Microbiol.* 28, 813–821. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00844.x
- Putnam, C. D. (2016). Evolution of the methyl directed mismatch repair system in *Escherichia coli*. *DNA Rep.* 38, 32–41. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.11.016
- Raynaud, C., Cassier-Chauvat, C., Perennes, C., and Bergounioux, C. (2004). An *Arabidopsis* homolog of the bacterial cell division inhibitor SulA is involved in plastid division. *Plant Cell* 16, 1801–1811. doi: 10.1105/tpc.022335
- Resende, B. C., Rebelato, A. B., D’Afonseca, V., Santos, A. R., Stutzman, T., Azevedo, V. A., et al. (2011). DNA repair in *Corynebacterium* model. *Gene* 482, 1–7. doi: 10.1016/j.gene.2011.03.008
- Sakai, M., Ogawa, T., Matsuoka, M., and Fukuda, H. (1997). Photosynthetic conversion of carbon dioxide to ethylene by the recombinant cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC 7942, which harbors a gene for the ethylene-forming enzyme of *Pseudomonas syringae*. *J. Ferment. Bioeng.* 84, 434–443. doi: 10.1016/S0922-338X(97)82004-1
- Sakr, S., Duthel, J., Saenkham, P., Bottin, H., Leplat, C., Ortega-Ramos, M., et al. (2013). The activity of the *Synechocystis* PCC6803 AbrB2 regulator of hydrogen production can be post-translationally controlled through glutathionylation. *Int. J. Hydrogen Energ.* 38, 13547–13555. doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.07.124
- Savakis, P., and Hellingwerf, K. J. (2015). Engineering cyanobacteria for direct biofuel production from CO₂. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 8–14. doi: 10.1016/j.copbio.2014.09.007
- Scanlan, D. J., Ostrowski, M., Mazard, S., Dufresne, A., Garczarek, L., Hess, W. R., et al. (2009). Ecological genomics of marine picocyanobacteria. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 73, 249–+. doi: 10.1128/MMBR.00035-08
- Schopf, J. W. (2011). The paleobiological record of photosynthesis. *Photosyn. Res.* 107, 87–101. doi: 10.1007/s11120-010-9577-1
- Schulze, K., Lang, I., Enke, H., Grohme, D., and Frohme, M. (2015). The use of fluorescence microscopy and image analysis for rapid detection of non-producing revertant cells of *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Synechococcus* sp. PCC7002. *BMC Res Notes* 8:160. doi: 10.1186/s13104-015-1112-1
- Shih, P. M., Wu, D. Y., Latifi, A., Axen, S. D., Fewer, D. P., Talla, E., et al. (2013). Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 1053–1058. doi: 10.1073/pnas.1217107110
- Singh, H., Fernandes, T., and Apte, S. K. (2010). Unusual radioresistance of nitrogen-fixing cultures of *Anabaena* strains. *J. Biosci.* 35, 427–434. doi: 10.1007/s12038-010-0048-9
- Singh, J. S., Kumar, A., Rai, A. N., and Singh, D. P. (2016). Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Front. Microbiol.* 7:529. doi: 10.3389/fmicb.2016.00529
- Stevens, S. E., and Porter, R. D. (1980). Transformation in *Agmenellum quadruplicatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 6052–6056. doi: 10.1073/pnas.77.10.6052
- Sun, Z., and Blanchard, J. L. (2014). Strong genome-wide selection early in the evolution of *Prochlorococcus* resulted in a reduced genome through the loss of a large number of small effect genes. *PLoS ONE* 9:e88837. doi: 10.1371/journal.pone.0088837
- Swingle, W. D., Chen, M., Cheung, P. C., Conrad, A. L., Dejesa, L. C., Hao, J., et al. (2008). Niche adaptation and genome expansion in the chlorophyll d-producing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2005–2010. doi: 10.1073/pnas.0709772105
- Takahama, K., Matsuoka, M., Nagahama, K., and Ogawa, T. (2003). Construction and analysis of a recombinant cyanobacterium expressing a chromosomally inserted gene for an ethylene-forming enzyme at the *psbAI* locus. *J. Biosci. Bioeng.* 95, 302–305. doi: 10.1016/S1389-1723(03)80034-8
- Taton, A., Unglaub, F., Wright, N. E., Zeng, W. Y., Paz-Yepes, J., Brahmsha, B., et al. (2014). Broad-host-range vector system for synthetic biology and biotechnology in cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* 42, e136. doi: 10.1093/nar/gku673
- Tolonen, A. C., Liszt, G. B., and Hess, W. R. (2006). Genetic manipulation of *Prochlorococcus* strain MIT9313: green fluorescent protein expression from an RSF1010 plasmid and Tn5 transposition. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7607–7613. doi: 10.1128/AEM.02034-06
- Trautmann, D., Voss, B., Wilde, A., Al-Babili, S., and Hess, W. R. (2012). Microevolution in cyanobacteria: re-sequencing a motile strain of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* 19, 435–448. doi: 10.1093/dnares/dss024
- Watanabe, S., Ohbayashi, R., Kanesaki, Y., Saito, N., Chibazakura, T., Soga, T., et al. (2015). Intensive DNA Replication and Metabolism during the Lag Phase in Cyanobacteria. *PLoS ONE* 10:e0136800. doi: 10.1371/journal.pone.0136800
- Wendt, K. E., Ungerer, J., Cobb, R. E., Zhao, H., and Pakrasi, H. B. (2016). CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of the fast growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Microb. Cell Fact.* 15, 115. doi: 10.1186/s12934-016-0514-7
- Wigley, D. B. (2013). Bacterial DNA repair: recent insights into the mechanism of RecBCD, AddAB and AdnAB. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 9–13. doi: 10.1038/nrmicro2917
- Williams, P. G. (2009). Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends Biotechnol.* 27, 45–52. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.10.005
- Yoshihara, S., Geng, X. X., Okamoto, S., Yura, K., Murata, T., Go, M., et al. (2001). Mutational analysis of genes involved in pilus structure, motility and transformation competency in the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 42, 63–73. doi: 10.1093/pcp/pce007
- Zehr, J. P. (2011). Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. *Trends Microbiol.* 19, 162–173. doi: 10.1016/j.tim.2010.12.004
- Zhou, J., Zhu, T., Cai, Z., and Li, Y. (2016). From cyanochemicals to cyanofactories: a review and perspective. *Microb. Cell Fact.* 15, 2. doi: 10.1186/s12934-015-0405-3

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Cassier-Chauvat, Veaudor and Chauvat. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Title : Towards the metabolic reprogramming of the cyanobacterium *Synechocystis* for sustainable biofuels production : Structuration of carbon fluxes by CP12 and implications on the bioenergetic balance, hydrogenase and genomic integrity.

Keywords : Biotechnology, biofuels, metabolic engineering, integrative biology, *Synechocystis sp.* PCC6803, genetic engineering, carbon metabolism, Calvin cycle, redox regulation, hydrogenase, urease, genetic instability

Abstract : Biotechnology is a powerful tool allowing exploitation of biological circuits to produce compounds with multiple uses (medicine, nutrition, industrial...). Cyanobacteria have valuable genetic and trophic properties which could reduce the costs and the environmental footprint of these processes (photosynthesis, CO₂ fixation, assimilation of diverse nitrogen sources...). They also naturally produce energetic molecules such as H₂ from which new and sustainable biofuels sectors may rise. However, a global and fine understanding of their physiology is required in order to design an efficient biological chassis with these organisms. They are genetically manipulable but also exhibit a strong versatility favoring fixation of mutations that can be either beneficial or harmful to their large-scale cultivation.

Over the course of my PhD, I constructed and studied mutants of a CO₂ fixation regulator whose activation is linked to photosynthesis. I showed that the Calvin cycle activity synchronizes carbon fluxes and redox status in

Synechocystis and that its deregulation affects the metabolism in a pleiotropic manner. I was specifically interested into the carbon/nitrogen balance in this species and its urea metabolism which is of prime interest in biotechnology.

I demonstrated that the latter was in competition with the hydrogenase for the insertion of nickel into their respective catalytic centers. Scarcity of this metal leads to selection of mutants thriving upon prolonged exposure to urea that retained a high capacity of H₂ production in presence of this nitrogenic substrate.

This work shows that the metabolism of *Synechocystis* can be altered in favor of other cellular processes. Omics approaches allow global identification of the physiological responses induced as well as the biological compensation mechanisms. These observations are discussed with regards to biotechnological implications of genetic instability and the need to strengthen our understanding of metabolic and genetic plasticity in cyanobacteria.



Titre : Vers la reprogrammation métabolique de la cyanobactérie modèle *Synechocystis* pour la production durable de biocarburants : Structuration des flux du carbone par CP12 et implications sur l'équilibre bioénergétique, l'hydrogénase et l'intégrité génomique

Mots clés : Biotechnologie, biocarburants, ingénierie métabolique, biologie intégrative, *Synechocystis sp.* PCC6803, génie génétique, métabolisme du carbone, cycle de Calvin, régulation rédox, hydrogénase, uréase, instabilité génétique.

Résumé : Les biotechnologies sont un outil puissant permettant d'emprunter les circuits biologiques pour produire des composés aux applications multiples (médecine, alimentation, industries...). Les cyanobactéries possèdent des propriétés génétiques et trophiques précieuses pour réduire les coûts et l'empreinte environnementale de ces procédés (photosynthèse, fixation du CO₂, sources d'azote assimilables...). Elles produisent aussi naturellement certaines molécules énergétiques comme le H₂ dont pourraient émerger de nouvelles filières propres de biocarburants. Cependant, une compréhension globale et approfondie de leur physiologie est nécessaire pour concevoir un châssis biologique performant à partir de ces organismes. Elles sont aisément manipulables génétiquement mais présentent une versatilité favorisant la fixation de mutations bénéfiques mais aussi délétères pour leur exploitation à grande échelle.

Au cours de ma thèse, j'ai construit et étudié des mutants d'un régulateur de l'assimilation du CO₂ dont l'activation est liée à la photosynthèse. J'ai montré que l'activité du cycle de Calvin synchronise les flux du carbone et le statut rédox de *Synechocystis* et que sa

dérégulation se répercute de manière pléiotropique sur son métabolisme. Plus spécifiquement, je me suis intéressé au déséquilibre carbone/azote dans cette espèce et à son métabolisme de l'urée qui présente un intérêt biotechnologique considérable.

J'ai démontré que ce dernier était en compétition avec l'hydrogénase pour l'insertion du nickel dans leurs centres catalytiques respectifs. L'insuffisance de ce métal a permis de sélectionner des mutants de l'uréase tolérant une exposition prolongée à l'urée et conservant une forte capacité de production de H₂ en présence de ce substrat azoté.

L'ensemble de ces résultats montre que le métabolisme de *Synechocystis* peut être détourné au profit de certains processus cellulaires. Les approches « omiques » permettent d'identifier globalement les réponses physiologiques induites ainsi que les leviers biologiques de compensation. Ces travaux sont discutés au regard des implications biotechnologiques de l'instabilité génétique et de la nécessité de renforcer notre compréhension de la plasticité métabolique et génomique des cyanobactéries.

