

Étude du mécanisme de photoprotection lié à l'Orange Carotenoid Protein et ses homologues chez les cyanobactéries

Flore Adjélé Wilson

▶ To cite this version:

Flore Adjélé Wilson. Étude du mécanisme de photoprotection lié à l'Orange Carotenoid Protein et ses homologues chez les cyanobactéries. Biologie végétale. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT: 2016SACLS503. tel-01469037

HAL Id: tel-01469037 https://theses.hal.science/tel-01469037

Submitted on 16 Feb 2017 $\,$

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.





NNT: 2016SACLS503

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY préparée à l'UNIVERSITE PARIS-SUD

au sein du laboratoire des Mécanismes Régulateurs chez les Organismes Photosynthétiques (MROP) UMR 9198, I2BC (B3S) / CEA (SB2SM) / CNRS / Université Paris-Sud

> ECOLE DOCTORALE N°567 Sciences du végétal : du gène à l'écosystème

> > Spécialité de doctorat : Biologie

Par

Mme Flore Adjélé WILSON

Etude du mécanisme de photoprotection lié à l'Orange Carotenoid Protein

et ses homologues chez les cyanobactéries

Thèse présentée et soutenue à l'Institut des Sciences des Plantes de Paris-Saclay (Gif-sur-Yvette), le 02 Décembre 2016 :

Composition du Jury :

M. Michel Dron, Professeur, Université Paris-Sud, M. Michel Havaux, Directeur de Recherche, CEA, M. Giovanni Finazzi, Directeur de Recherche, CNRS, Mme Cécile Bernard, Professeure, Muséum National d'Histoire Naturelle, M. Soufian Ouchane, Directeur de Recherche, CNRS, Mme Diana Kirilovsky, Directrice de Recherche, CNRS,

Président du jury Rapporteur Rapporteur Examinatrice Examinateur Directrice de thèse



Remerciements

«Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries» Marcel Proust

Avec ces quelques mots, je tiens à remercier Dieu et toutes les personnes qui ont, à différentes étapes de mon parcours, contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

En premier lieu, je remercie très chaleureusement Diana Kirilovsky, qui, après une douzaine d'années de travail sur l'OCP à mes côtés, a accepté de prendre la direction de cette thèse malgré ses nombreuses charges. Je lui suis également reconnaissante d'avoir cru en moi et de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Tout au long de ces années, Diana Kirilovsky a toujours dirigé mes travaux en faisant preuve de qualités humaines (tact et intérêt) et scientifiques ainsi que d'une grande disponibilité. Ses compétences, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Elle a toujours généreusement pris le temps nécessaire pour partager avec moi ses idées et sa grande expérience, tout en me laissant la liberté d'explorer des réflexions personnelles. De même, tout au long de ce travail doctoral, elle n'a ménagé ni ses commentaires et conseils judicieux, ni ses encouragements. Je lui exprime ici ma profonde gratitude.

J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté de siéger au jury de cette thèse : M. Michel Havaux, Directeur de Recherche CEA à Cadarache et M. Giovanni Finazzi, Directeur de Recherche CNRS au CEA-Grenoble, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse ; Mme Cécile Bernard, Professeure, Muséum National d'Histoire Naturelle, M. Soufian Ouchane, Directeur de Recherche CNRS à Gif et M. Michel Dron, Professeur à l'Université Pais-Sud, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je suis grandement reconnaissante aux personnes de notre service SB²SM (ex SBE) pour le soutien qu'elles m'ont apporté. Tout d'abord, je remercie le Pr. Marc Lemaire, grâce à qui je suis arrivée dans le laboratoire dirigé par Diana Kirilovsky pour un stage de M2 recherche. Mes remerciements vont également à Alain Boussac pour ce début dans la recherche, en codirigeant mon stage de M2, à Bill Rutherford et Pierre Sétif qui m'ont permis d'intégrer l'unité. J'adresse toute ma gratitude à tous les membres et ex-membres (thésards, post-doc et

stagiaires) de l'équipe de Diana Kirilovsky, qui ont contribué grandement à ces travaux et pour le climat sympathique dans lequel ils m'ont permis de travailler. Les nombreuses discussions, aussi bien d'ordre professionnelles que privées, que j'ai pu avoir avec chacun m'ont beaucoup apporté. Merci donc à Sandrine Cot, Clémence Boulay, Leyla Abasova, Fernando Guerrero, Claire Punginelli, Mohea Couturier, Arezki Sedoud, Sabah El Alaoui, Sandrine D'haene, Michal Gwizdala, Denis Jallet, Adrien Thurotte, Rocío López-Igual, Céline Bourcier de Carbon, Léa Comelet, Vinosa Yogarajah, Guillaume Sarrailhe et Léa Talbot. Je dois particulièrement rendre un grand merci, pour les expériences que nous avons partagées à l'extérieur du labo, à Clémence (Week-end en Normandie avec ma grande famille), à Fernando (visite de Séville avec mon mari) et à Claire (trip entre filles au Japon). Merci aussi aux anciens et actuels thésards du service pour l'ambiance et les «after de labo», je cite Julie, Amin, Tiona, Naoko, Anja, Catherine, Kathleen et Qian.

Je voudrais particulièrement exprimer toute mon amitié et toute ma reconnaissance à Sandrine, Céline, Thanh-Lan et Rocío pour leur sensibilité envers les autres, leur générosité et leurs multiples encouragements répétés. Vous êtes devenues des amies importantes. Je vous remercie pour votre soutien, votre compréhension et pour tout le côté social, de même que votre humour qui me rendent la vie tellement plus légère au quotidien! J'ai apprécié toutes nos discussions, majoritairement féminines, autour d'un verre de champagne dont je ne citerai pas le nom (pas de publicité!).

J'adresse mes sincères remerciements à Bruno Robert et son équipe (Andrew Gall, Andy Pascal, Maxime Alexandre, Alberto Mezzetti, Amin Nasser et Ghada Ajlani) qui ont collaboré à ces travaux. Ma vive reconnaissance va aussi à Jérôme Santolini et son équipe, avec qui j'ai travaillé pendant six ans sur une thématique complètement différente ; cela m'a permis de développer de nouvelles compétences et une ouverture d'esprit sur mon métier d'«apprentichercheur». Un grand merci à Ghada Ajlani, Bernard Lagoutte, Gwenaëlle Moal, Leandro Tabares, Cédric Montigny, Anja Krieger-Liezkay, Pierre Sétif, Alain Boussac, Véronique Mary, Hervé Bottin, Jean-Baptiste Charbonnier, Claire Lemaire, Francis Haraux, pour les discussions scientifiques ou pas, et les conseils sur les techniques de laboratoire (biologie moléculaire, biochimie....), ainsi qu'aux autres membres du service (bâtiment 532 et 528) et de l'institut (iBITECS) pour leur disponibilité de même que leur soutien. Merci à Francis Haraux pour cette belle affiche d'annonce de soutenance de thèse. Je ne saurais terminer sans remercier toutes ces personnes qui nous facilitent le travail au quotidien avec beaucoup de

patience et de gentillesse, en particulier, Dominique, Sandra, Isabelle, Pascale, Karine, Jocelyne, Céline ainsi que le personnel de la DOC au bâtiment 530 et du SAFID.

J'exprime toute ma gratitude à nos collaborateurs qui nous ont permis de répondre à des questions cruciales et en même temps d'avancer dans nos travaux : Ryan L. Leverenz, Marcus Sutter, Matthew R. Melnicki, Dr. Cheryl A. Kerfeld, Jean-Marc Routaboul et Francois Perreau (pour avoir passé mes TRES nombreux échantillons au spectro), Noam Adir et son équipe et beaucoup d'autres.

Je remercie l'école doctorale Sciences du végétal, en particulier Dr. Jacqui Shykoff et Martine Fournier qui se rendent disponibles et nous guident dans les démarches administratives.

Merci à tous mes amis (Leyli, Géraldine, Julie.....) et aux ex-membres de l'activité Spectacles et Loisirs (Raphael, Sylvain, Sophie, Isabelle,.....) pour ces moments de partage.

Toute ma gratitude à l'équipe du service des maladies génétiques du globule rouge de l'hôpital Henri Mondor (en particulier au Dr Dora Bachir).

Enfin, j'adresse toute mon affection à ma famille, en particulier à mon père Mathieu, qui m'a élevé avec un grand goût pour le dépassement de soi, à ma mère Thérèse, pour son courage et sa force de caractère et les sacrifices concédés. Je n'oublie pas mes frères et sœurs avec une mention spéciale à ma sœur Fionia en particulier pour les grosses corrections du manuscrit. Je tiens également à remercier les autres membres de ma famille élargie (togolaise, française, mes chers oncles, tantes, cousines et cousins, nièces, neveux, etc. à Paris et ailleurs dans le monde) pour leur soutien, en particulier à ma cousine Maïna. Je n'oublie évidemment pas les deux personnes qui forment mon "cocon" familial : ma fille Lucia pour l'amour qu'elle me témoigne et pour tous les massages d'épaules prodigués, tout en m'assaillant de questions : *«Ça te fait du bien maman? Est-ce que tu vas travailler encore longtemps maman? Est-ce que je peux travailler avec toi?»* et mon mari, Maxwell pour sa patience, son soutien moral, ses encouragements indispensables pour la réalisation de ce projet et pour m'avoir supportée pendant la rédaction de ce manuscrit.

A Lucia, Maxwell et à ma famille pour leur indéfectible soutien.

La meilleure façon de prédire l'avenir, c'est de le créer. (Peter Drucker)

Résumé

La lumière est essentielle pour les organismes photosynthétiques qui convertissent l'énergie solaire en énergie chimique. Cependant, la lumière devient dangereuse lorsque l'énergie qui arrive aux centres réactionnels de l'appareil photosynthétique, est en excès par rapport à l'énergie consommée. Dans ce cas, la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques se réduit et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont accumulées, notamment au niveau des deux photosystèmes, PSI et PSII. Les cyanobactéries ont développé des mécanismes photoprotecteurs qui diminuent l'énergie transférée au PSII atténuant ainsi l'accumulation de ROS et les dommages cellulaires, comme l'extinction non-photochimique (NPQcya) induite par la lumière bleue-verte. La soluble Orange Carotenoid Protein (OCPo) est essentielle pour ce mécanisme de photoprotection. L'OCP agit comme un senseur de l'intensité lumineuse et un inducteur de la dissipation d'énergie des phycobilisomes (PBS), l'antenne extra-membranaire des cyanobactéries. L'OCP est la première protéine photo-active à caroténoïde connue comme senseur. Une forte lumière bleue-verte déclenche des changements structurels dans l'OCPo qui induisent une forme active, rouge (OCPr). Le domaine N-terminal de l'OCPr, en s'intercalant entre les trimères externes d'un des cylindres basaux du cœur du PBS, augmente la dissipation thermique de l'énergie au niveau de l'antenne. L'OCP possède aussi une autre fonction : l'extinction de l'oxygène singulet, qui protège les cellules du stress oxydatif. Pour récupérer pleinement la capacité de l'antenne en faible lumière, une deuxième protéine est nécessaire, la "Fluorescence Recovery Protein" (FRP), dont le rôle est de détacher l'OCPr des PBS et d'accélérer sa reconversion en OCPo inactive. Ce manuscrit est un état des lieux des connaissances et des dernières avancées sur le mécanisme de NPQ associé à l'OCP dans les cyanobactéries.

Mots-clés : Orange Carotenoid Protein, Fluorescence Recovery Protein, Phycobilisome, Cyanobactérie, Photoprotection, Synechocystis, Quenching non photochimique, Photosynthèse.

Abstract

Photosynthetic organisms use light energy from the sun in order to perform photosynthesis and to convert solar energy into chemical energy. Absorbance of excess light energy beyond what can be consumed in photosynthesis is dangerous for these organisms. Reactive oxygen species (ROS) are formed at the reaction centers and collecting light antennas inducing photooxidative damage which can lead to cell death. In cyanobacteria, one of these photoprotective mechanisms consists to reduce the amount of energy arriving to the reaction centers by thermal dissipation of the excess absorbed energy. Energy dissipation is accompanied by a decrease of Photosystem II-related fluorescence emission called nonphotochemical quenching (NPQ). The soluble Orange Carotenoid Protein (OCPo) is essential for this photoprotective mechanism. The OCP is the first photo-active protein with a carotenoid known as light intensity sensor and acts as energy quencher of the phycobilisome (PB), the extra-membrane antenna of cyanobacteria. Structural changes occur when the OCPo absorbs a strong blue-green light leading to a red active form (OCPr). The N-terminal domain of OCPr burrows into the two external trimers of the core basal APC cylinders of the PB and increases thermal energy dissipation at the level of antenna. The OCP has an additional function in photoprotection as oxygen singlet quencher protecting cells from oxidative stress. Under low light conditions, to recover the full antenna capacity, a second protein is needed, the "Fluorescence Recovery Protein" (FRP), whose role is to detach the OCPr from the PB and accelerate its conversion into an inactive OCPo. In this manuscript, I will review the knowledge about the OCP, since the discovery of the mechanism and its characterization to the latest advances on the OCP-related-NPQ mechanism in cyanobacteria.

Keywords: Orange Carotenoid Protein, Fluorescence Recovery Protein, Phycobilisome, Cyanobacteria, Photoprotective, Synechocystis, Non photochemical quenching, Photosynthesis.

Table des matières

REMERCIEMENTS	I
RESUME	IV
ABSTRACT	V
ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES	2
INTRODUCTION	5
1. Les cyanobacteries	5
1.1. Aperçu et intérêts fondamentaux des cyanobactéries	
1.2. Génomes et caractéristiques des cyanobactéries	
2. LA PHOTOSYNTHESE OXYGENIQUE DANS LES CYANOBACTERIES	
2.1. Flux d'électrons photosynthétiques induits par la lumière	
2.2. Photoinhibition	
2.3. Phycobilisomes : complexes externes collecteurs de lumière des	cyanobactéries19
2.3.1. Structure du PBS	
2.3.2. Transfert d'énergie des PBS aux centres réactionnels	
3. MECANISMES DE PHOTOPROTECTION CHEZ LES CYANOBACTERIES : UN A	aperçu 26
3.1. Adaptation à long terme des cyanobactéries aux différents stress	
3.2. Adaptation physiologique rapide des cyanobactéries à l'environ	nement lumineux
3.2.1. Mesures de déclin de fluorescence dans les cyanobactéries	
3.2.2. Les transitions d'état	
3.2.3. L'extinction non-photochimique (NPQ) de l'énergie lumineuse abso	rbée en excès
3.2.3.1. Les premiers indices de l'existence du mécanisme NPQ chez	les cyanobactéries 36
3.2.3.2. Découverte et Description de l'OCP chez les cyanobactéries.	
OBJECTIF DE MA THESE	
LISTE DES ARTICLES	
RÉSULTATS	
1. ROLE DE L'OCP DANS UN MECANISME DE PHOTOPROTECTION CHEZ LES	CYANOBACTERIES 44
1.1. Induction du mécanisme NPQcya par l'OCP chez la cyanobacté	rie Synechocystis PCC 6803 44
1.2. Dissipation d'énergie induite par la lumière sous carence en fer	: étude des rôles des protéines
OCP et IsiA	
1.3. Mécanisme de NPQcya associé à l'OCP chez différents cyanoba	uctéries 52
2. STRUCTURE ET PHOTO-ACTIVITE DE L'OCP	
2.1. Structure de l'OCP	
2.2. Photo-activité de l'OCP	

	2.2.1.	L'OCP, est une protéine photoactive	59
	2.2.2.	Modifications structurelles du caroténoïde et de la protéine, essentielles à la photo-activation de l'	OCP 61
	2.3.	La forme rouge (OCPr) est la forme active de l'OCP	63
	2.3.1.	Rôle du caroténoïde dans la photo-activation	64
	2.3.2.	Rôle des tyrosines et des tryptophanes dans la photo-activité de l'OCP	68
			70
3.	Etur	DE DES INTERACTIONS OCP-PHYCOBILISOMES CHEZ LES CYANOBACTERIES	72
	3.1.	Système de reconstitution in vitro : interaction de l'OCPr avec les phycobilisomes	72
			75
	3.2.	Cœur des phycobilisomes : site du déclin d'énergie et de la fluorescence	76
	3.3.	Rôles essentiels de l'arginine 155 et du domaine N-terminal de l'OCP dans la liaison avec	les
	phycobi	lisomes	77
	3.3.1.	Importance de la charge positive de l'arginine 155 (Arg155) dans l'interaction entre l'OCPr et les	3
	phyco	bilisomes	77
	3.3.2.	Rôles des domaines N- et C- terminaux de l'OCP dans le mécanisme de photoprotection	81
	3.4.	Site de fixation de l'OCP dans le cœur du phycobilisome	84
4.	RECU	JPERATION DE LA FLUORESCENCE DE L'ANTENNE : ROLE DE LA FLUORESENCE RECOVERY PRO	JTEIN
(F	FRP)		87
	4.1.	Mécanisme de la FRP	87
	4.2.	Régulation de l'expression de la FRP	88
	4.3.	Structure de la FRP	92
5.	Сна	NGEMENTS STRUCTURELS SOUS-JACENTS A LA PHOTO-ACTIVATION DE L'OCP	95
	5.1.	Production d'Holo-OCPs in E. coli	95
	5.2.	Position du caroténoïde et du bras N-terminal dans la forme rouge de l'OCP	96
	5.2.1.	Structure du domaine N-terminal (RCP) de l'OCP	96
	5.2.2.	Rôle du bras N-terminal dans la photo-activation de l'OCP	101
6.	Etui	DE DES HOMOLOGUES DU DOMAINE N-TERMINAL DE L'OCP CHEZ LES CYANOBACTERIES	105
	6.1.	Distribution et Analyse phylogénétique des gènes hcp dans les cyanobactéries	105
	6.2.	Régulation, Localisation et Fonction des HCPs dans Anabaena sp. PCC 7120	106
	6.2.1.	Expression et Détection des HCPs dans Anabaena sp. PCC 7120	108
	6.2.2.	Caractérisation et Activités de déclin d'énergie et d'oxygène singulet des différents HCPs d'Anab	aena
	sp. PC	CC 7120	111
	6.2.3.	Caractéristiques structurales des HCPs	114
DIS	CUSSIO	N ET PERSPECTIVES	118
BIB	LIOGRA	PHIE	131
ART	TICLES.		154

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique APC : Allophycocyanine ApcD, ApcF, ApcE : Emetteurs terminaux des PBs ARN : Acide RiboNucléique

ATCC : American Type Culture Collection **ATP** : Adenosine triphosphate **BLUF** : sensor of Blue Light Using FAD **bp** : base pair chl : chlorophylle **CrtO** : β -carotene ketolase **CrtR** : β-carotene hydroxylase **CTD:** Domaine C-terminal domain Cytb6f : Cytochrome b6f DCMU: 3-(3,4-DiChlorophenyl)-1,1- diMethylUrea **DO** : Densité Optique **ECN**: Echinenone Fd: Ferredoxine Flv: Proteine Flavodiiron

FRP : Fluorescence Recovery Protein

HCl : Acide chlorhydrique

HCP : Helical Carotenoïd Protein **hECN** : hydroxy-echinenone

HisTag : Tag avec 6 acides aminés histidines **IPTG**: IsoPropyl-β-D-Thio Galactopyranoside

LHC : Light Harvesting Complex LOV : domaine photo-actif Light Oxygen Voltage MES : 2-MorpholinoEthaneSulfonic Acid M : Molaire Mb : Mega-base MB : Membrane MP : Membrane-Phycobilisome NADP : Nicotinamide Adénosine Di- Phosphate NPQ : Non Photochemical Quenching NTD : Domaine N-terminal **OCP** : Orange Carotenoid Protein **ORF** : Open Reading Frame P680 : Donneur primaire du PSII **P700** : Donneur primaire du PSI PAM : Pulse Amplified Modulated fluorimètre **PBS** : Phycobilisome (s) PC: Phycocyanine PCB : Phycocyanobiline PCC: Pasteur Culture Collection **PCR** : Polymerisation Chain Reaction **PDB** : Protein Data Bank **PE** : Phycoérythrine **PEB** : Phycoérythrobiline **PEC** : Phycoérythrocyanine PQ/PQH2: Plastoquinone/plastoquinol psbA2: Photosystem II D1 protein **PSI** : Photosystème I **PSII** : Photosystème II **PUB** : Phycourobiline **PXB** : Phycobilivioline **QA** : Quinone accepteur primaire d'électrons du PSII QB : Quinone accepteur secondaire d'électrons du PSII NPQcya : Mécanisme de photo-protection avec un quenching de fluorescence rapide chez les cyanobactéries **RCC** : Roscoff Culture Collection **RCP** : Red Carotenoid Protein **ROS** : Reactice Oxygen Species **RT-PCR**: Reverse Transcription Polymerisation Chain Reaction **SDS** : Sodium DodecylSulphate **SDS-PAGE**: Gel d'électrophorèse polyacrylamide en présence de SDS Tris : Tris hydroxyméthyl methylamine **u.a:** unités arbitraires **WT** : Wild Type (souche sauvage)

Liste des figures

Figure 1: Exemples d'habitats des cyanobactéries7
Figure 2: Observation de diverses cyanobactéries en microscopie optique. 9
Figure 3 : Aperçu des membranes et des compartiments dans une cellule de
cyanobactérie11
Figure 4 : Représentation schématique de la chaîne photosynthétique de
transport d'électrons dans la membrane thylacoïdienne13
Figure 5: Structures des photosystèmes et disposition des cofacteurs
impliqués dans la chaîne de transfert d'électrons 15
Figure 6 : Structure et assemblage du phycobilisome de Synechocystis PCC
6803
Figure 7 : Transfert d'énergie au sein du phycobilisome vers les centres
réactionnels
Figure 8 : Principe de montage du PAM et exemple de mesures du déclin de
fluorescence dans les cellules de Synechocystis WT
Figure 9 : Transitions d'état
Figure 10 : Mécanisme de NPQcya induit par une forte lumière bleue-verte
dans les cellules de <i>Synechocystis</i>
Figure 11 : Description de l'OCP
Figure 12 : Implication de l'OCP dans un mécanisme de NPQcya induit par
de fortes intensités de lumière bleue-verte dans les cellules de
Synechocystis
Figure 13 : Le mécanisme de NPQcya induit par la lumière bleue-verte est
lié aux phycobilisomes47
Figure 14 : Localisation cellulaire de l'OCP
Figure 15 : La lumière bleue-verte induit un mécanisme de NPQcya dans
les cellules carencées

Figure 16 : Répartition de l'OCP, de la FRP et des domaines N- et C-		
terminaux de l'OCP parmi les cyanobactéries d'après Kirilovsky et		
Kerfeld (2013)		
Figure 17 : Expression de l'OCP et mécanisme de NPQcya associé dans les		
cyanobactéries55		
Figure 18 : Structure de l'OCP de Synechocystis d'après Wilson et al. (2010)		
Figure 19 : L'OCP est une protéine photoactive		
Figure 20 : Changements structurels dans le caroténoïde et la protéine sous		
illumination		
Figure 21 : Influence du caroténoïde sur l'activité de l'OCP		
Figure 22 : Rôle des résidus Y201 et W288 du domaine C-terminal dans la		
photo-activité de l'OCP et la photoprotection67		
Figure 23 : Rôle des résidus Y44 et W110 du domaine N-terminal dans la		
photo-activité de l'OCP et la photoprotection		
Figure 24 : Système de reconstitution in <i>vitro</i> : complexe OCP-PB71		
Figure 25 : Déclin de fluorescence induite par l'illumination des PBS en		
présence d'un excès d'OCP :		
Figure 26 : Cœur du PBS : site du déclin d'énergie et de la fluorescence 75		
Figure 27 : Importance du pont salin entre l'Arg155 et la Glu244 dans la		
photoactivation et la stabilité de l'OCP79		
Figure 28 : Effets de l'absence du pont salin entre Arg155 et Glu244 sur le		
déclin de fluorescence et l'interaction de l'OCPr aux PBS80		
Figure 29 : L'OCP est une protéine modulaire avec des domaines ayant des		
rôles fonctionnels spécifiques82		
Figure 30 : Modèle schématique du mécanisme de NPQcya et le rôle de		
l'OCP		
Figure 31 : Site de fixation de l'OCP dans le cœur du phycobilisome		

Figure 32 : Récupération de la fluorescence de l'antenne : Rôle de la
Fluoresence Recovery Protein (FRP)
Figure 33 : Régulation de l'expression de la FRP
Figure 34 : Structure de la FRP
Figure 35 : Production d'Holo-OCPs dans E. coli
Figure 36 : Position du caroténoïde dans la forme rouge de l'OCP
Figure 37 : Importance du bras N-terminal dans la photoactivation et la
stabilité de l'OCP
Figure 38 : Effets de l'absence du bras N-terminal sur le déclin de
fluorescence et l'interaction de l'OCPr avec le PBS et la FRP
Figure 39 : Mécanisme proposé pour la photochimie de l'OCP
Figure 40 : Arbre phylogénétique de l'OCP et de ses homologues N-
terminaux (HCPs)
Figure 41 : Expression et Détection des HCPs dans Anabaena (Nostoc) sp.
PCC 7120
Figure 42 : Analyse de l'expression des protéines de fusion All1123-GFP et
All3221-GFP 110
Figure 43 · Caractérisation des HCPs isolées d' <i>E_coli</i> 112
Figure 44 · Complexes HCP-PRS (reconstitution <i>in vitro</i>) 113
Figure 45 : Activité de désectivation de l'avygène singulat $({}^{1}\Omega)$ de l'OCP et
Figure 45 : Activite de desactivation de l'oxygene singulet (O_2) de l'OCF et
$\mathbf{des} \mathbf{HUPs} = 117$
Figure 46 : Caracteristiques structurales des HCPs
Figure 47 : Modèle schématique du mécanisme de NPQcya : rôle de l'OCP
et de la FRP120

Introduction

Introduction

1. Les cyanobactéries

1.1. Aperçu et intérêts fondamentaux des cyanobactéries

Les cyanobactéries, anciennement appelées algues bleue-vertes, sont les seuls organismes procaryotes capables de réaliser la photosynthèse oxygénique. Elles utilisent l'énergie solaire comme source d'énergie chimique pour décomposer les molécules d'eau et fixer le dioxyde de carbone (CO_2), pour produire du dioxyde d'oxygène (O_2), de l'ATP et des glucides (C_nH_{2n}O_n) comme les algues et les plantes supérieures. Ces micro-organismes primitifs (~ 3×10^9 ans) sont considérés comme les acteurs de l'enrichissement en oxygène de l'atmosphère de notre planète (Schopf, 2011) qui a permis l'apparition de la voie vitale de la respiration (Archibald, 2009). Les cyanobactéries ont divergé depuis leur apparition, colonisant un large éventail d'habitats à travers toutes les latitudes, se répandant dans les eaux douces, marines et les écosystèmes terrestres. Elles sont ainsi devenues l'un des groupes de bactéries les plus importantes et les plus diversifiées (Shi et Falkowski, 2008). Elles survivent au sein de niches extrêmes telles que les glaces polaires, les sources d'eau chaude (les geysers), les baies hypersalines, les déserts, les lacs très chauds (Thermosynechococcus elongatus: Yamaoka et al, 1978) et/ou acides des cratères volcaniques (Figure 1). Elles vont de formes unicellulaires à des formes filamenteuses et jouent le rôle de symbiotes pour d'autres organismes (Champignons comme les lichens, bryophytes, gymnospermes, angiospermes, et fougère aquatique, l'Azolla filiculoides). Il est suggéré que les chloroplastes présents chez les eucaryotes (les algues et les plantes) ont évolué à partir de cyanobactéries via l'endosymbiose (revue: McFadden, 2001). Par conséquent, les cyanobactéries sont de bons modèles pour étudier l'impact des changements de conditions sur la physiologie (Battchikova et al, 2010; Hagemann, 2011; Kirilovsky, 2010; Singh et al, 2009), la morphologie (Vermaas et al, 2008), la division (Marbouty et al, 2009; Miyagishima et al, 2005) et la différenciation (Mariscal et Flores, 2010) de cellules microbiennes. En plus d'être les organismes photosynthétiques les plus abondants sur la Terre (Scanlan et al, 2009), les cyanobactéries participent à une grande partie de la biosphère. Elles utilisent l'énergie solaire pour (1) renouveler l'oxygène atmosphérique (Partensky et al, 1999),

(2) jouer un rôle important dans les cycles biogéochimiques globaux (assimilation et fixation du carbone et de l'azote) et (3) former des aggrégats organiques essentiels dans la chaîne alimentaire. Les cyanobactéries convertissent l'énergie solaire capturée en biomasse (3-9%), plus efficacement que les plantes terrestres (0,25-3%), et elles tolèrent davantage une forte teneur en dioxyde de carbone (CO₂) dans les flux gazeux que les plantes (Ducat et al, 2011). À l'échelle mondiale, ces organismes fixent environ 25 Gt de carbone à partir du CO₂ par an dans la biomasse. Par conséquent, les cyanobactéries sont considérées comme de prometteuses usines microbiennes «peu-couteuses» pour la capture et le stockage du CO2 industriel (Jansson et Northen, 2010), et la production écologiquement responsable des biocarburants (Ducat et al, 2011; Zhou et Li, 2010). En outre, les cyanobactéries ont également des potentiels dans la production biotechnologique de produits naturels et métabolites secondaires (Pearson et al 2010; Wang et al, 2011) comme les aliments riches en vitamines et thérapeutiques (Williams, 2009), les molécules marquées par des isotopes et les bioplastiques (Abed et al, 2009); et la biorestauration des sols et eaux polluées (De Philippis et al, 2011). Tous ces avantages proviennent de la capacité des cyanobactéries à croître dans divers habitats, permettant ainsi de réaliser des productions industrielles près des sites d'utilisation.

1.2. Génomes et caractéristiques des cyanobactéries

Le génome des cyanobactéries est diversifié et résulte probablement du gain et/ou de la perte de gènes, transférés par les plasmides cyanobactériens et par l'insertion de séquences de cyanophages. La plupart des cyanobactéries possèdent un chromosome circulaire avec une taille allant d'environ 1,44 Mb (par exemple dans la souche marine UCYN-A) à environ 9,05 Mb (par exemple dans la souche Nostoc *punctiforme* ATCC29133) (Hess, 2011; Wang et al, 2011). En général, les espèces marines ont les plus petits chromosomes. Un grand nombre de cyanobactéries comportent un petit nombre de plasmides (allant de quelques à plusieurs centaines de kilobases). Par exemple, *Synechocystis PCC 6803* contient sept plasmides, allant de 2,3 kb à 119 kb (Chauvat et al, 1986) (voir Cyanobase). En revanche, les cyanobactéries marines *Prochlorococcus* et *Synechococcus* n'ont pas de plasmide (Hess, 2011). Bien que les plasmides cyanobactériens propagent des gènes éventuellement importants (Cyanobase), leur rôle dans la biologie et la physiologie des cyanobactéries reste inconnu, jusqu'à présent.



Figure 1: Exemples d'habitats des cyanobactéries.

A. Banquise antarctique avec une couche brune d'algues vivant à plusieurs dizaines de centimètres sous la glace en mer (www.bioenv.gu.se).

B. Formation de stromatolites construits par les bactéries situées à l'ouest de l'Australie dans le parc de Yalgroup (http://www2.ggl.ulaval.ca/personnel/bourque/s4/stromatolites.html).

C. Importante prolifération de cyanobactéries du genre *Lyngbya* dans le lac Atitlán au Guatemala (www.research.gov).

D. Croûte de Cyanobactéries dans le Grand Bassin Salt Flats dans l'Utah, où l'on peut observer des tapis «noirs» de cyanobactéries sur la surface de la boue séchée (www.botany.utexas.edu).

Le nombre de génomes entièrement séquencés a augmenté rapidement. Actuellement, 130 séquences de génomes cyanobactériens (détails sur les génomes dans Shih et al, 2013) sont accessibles dans les bases de données publiques telles Cyanobase que : (http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/), DOE institut de génome commun (Http://genome.jgi.doe.gov/genome-projects), et la base de données Microbial Genome pour l'analyse comparative (http://mbgd.genome.ad.jp/).

Les cyanobactéries ont des formes différentes, allant de morphologies unicellulaires (sphérique et cylindrique) à des formes complexes pluricellulaires (filamenteuses) (Figure 2). Dans les cyanobactéries filamenteuses telles que Anabaena et Nostoc, certaines cellules montrent la capacité à se différencier en cellules spécialisées avec des fonctions différentes (Flores et Herrero, 2010). Les cellules végétatives, cellules photosynthétiques, sont formées dans des conditions de croissances favorables. Les akinètes permettent la survie dans des conditions de sécheresse extrêmes. Les hétérocystes, cellules spécialisées, fixent l'azote atmosphérique (N₂) et ne réalisent pas la photosynthèse oxygénique. Les cyanobactéries représentent un unique phylum bactérien avec des caractéristiques communes et des différences par rapport aux bactéries à Gram-négatif classiques telle qu'Escherichia coli (Gupta et Griffiths, 2002). Comme dans la plupart des bactéries à Gram-négatif, les cyanobactéries sont entourées par deux membranes : une paroi cellulaire formée par une couche de peptidoglycanes et une membrane externe qui délimite l'espace périplasmique et une membrane cytoplasmique. À l'intérieur du cytoplasme, une troisième membrane constitue les thylacoïdes (Vermass, 2001). La membrane thylacoïdienne (contenant des complexes photosynthétiques et la chaîne respiratoire de transport d'électrons) est le site où la photosynthèse et la respiration ont lieu (Figure 3A). Les thylacoïdes se présentent par paires; l'espace entre une paire est appelé le lumen et l'espace entre deux paires est contigu au cytoplasme. L'une des principales différences entre les cyanobactéries et les cellules eucaryotes photosynthétiques est que les complexes protéiques redox-actifs photosynthétiques et respiratoires des cyanobactéries se partagent une membrane thylacoïdienne commune (Vermass, 2001), à l'exception de la cyanobactérie Gloeobacter violaceus (dépourvue de thylacoïdes), où ces complexes sont associés à la membrane cytoplasmique (Rippka et al, 1974). Dans les cyanobactéries, la membrane des thylacoïdes ne forme pas de grana comme chez les plantes et les algues, où la membrane est située dans un organite spécifique, le chloroplaste.



Arthrospira (Spirulina) platensis

Anabaena sp PCC 7120

Figure 2: Observation de diverses cyanobactéries en microscopie optique.

A et B. Cyanobactérie unicellulaire: (A) *Synechocystis sp.* (B) *Dermocarpa violacea*, contenant des pigments rouges (phycoerythrine) (http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Cyanobacteria). C. Souche filamenteuse *Arthrospira (Spirulina) platensis* (photographie de J. Simon). D. Souche filamenteuse formant des hétérocystes spécialisés pour la fixation de l'azote moléculaire (indiqués par des flèches) (http://2011.igem.org/File:Brown-Stanford_Heterocysts.JPG). Des micro-compartiments, appelés carboxysomes, comportant des enzymes impliquées dans la fixation du carbone, permettent de concentrer le CO2 autour de la Rubisco afin d'optimiser l'activité carboxylase de cette enzyme dans le cycle de Calvin-Benson. Les glucides issus de la photosynthèse sont stockés sous forme de glycogène (Figure 3B). Les cyanobactéries sont des micro-organismes modèles pour l'étude de la photosynthèse, de l'assimilation du carbone et de l'azote, de l'évolution des plastes des plantes et de l'adaptabilité aux stress environnementaux. Synechocystis sp. PCC 6803 (Synechocystis ci-après) est une cyanobactérie unicellulaire, la plus étudiée. Elle peut croître à la fois de manière photoautotrophe dans les milieux de culture (Figure 3C) (Stanier et al, 1971), ou hétérotrophe en l'absence de lumière dans les milieux enrichis en glucose (Rippka et al, 1979). Elle a été isolée à partir d'un lac d'eau douce et se développe entre 32 et 38 degrés Celsius (Stanier et al, 1971). Synechocystis est parfaitement adaptée aux manipulations génétiques car elle a la capacité d'absorber de l'ADN exogène et d'effectuer une double recombinaison homologue (Grigorieva et Shestakov, 1982). Synechocystis était le troisième procaryote et le premier organisme photosynthétique dont le génome a été entièrement séquencé (3,5 Mb, Kaneko et al, 1996). Des données transcriptomiques sont également disponibles (Hihara et al, 2001) et, récemment, une analyse globale des transcrits a été réalisée (Mitschke et al, 2011).

2. La Photosynthèse oxygénique dans les cyanobactéries

Les cyanobactéries sont des organismes photo-autotrophes qui réalisent la photosynthèse oxygénique au niveau des thylacoïdes en utilisant l'énergie lumineuse. Le mécanisme de la photosynthèse oxygénique dans ces organismes ressemble remarquablement à celui des algues et des plantes. Cela permet d'utiliser les cyanobactéries comme un modèle approprié pour étudier les différents aspects de la photosynthèse oxygénique et sa régulation, qui sont souvent difficiles à étudier chez les plantes supérieures ou les algues. En dépit de différences mineures dans la composition des complexes redox-actifs, la chaîne photosynthétique de transport d'électrons des cyanobactéries est très similaire à celle des plantes et des algues. Elle contient quatre complexes multi-protéiques majeurs : photosystème II (PSI), cytochrome b_6f (Cyt b_6f), photosystème I (PSI), l'ATP synthase et plusieurs éléments mobiles (plastoquinone (PQ), plastocyanin (PC), ferrédoxine (Fd)), qui œuvrent en série, ainsi que des antennes collectrices de lumière.



Figure 3 : Aperçu des membranes et des compartiments dans une cellule de cyanobactérie.

A. Représentation schématique d'une cyanobactérie : la membrane cytoplasmique sépare le cytoplasme du périplasme; les membranes thylacoïdiennes (contenant des complexes photosynthétiques et la chaîne respiratoire de transport d'électrons); l'espace entre une paire de membranes thylacoïdiennes est le lumen (Adapté de Vermaas 2001).

B.Vue par microscopie électronique de la cyanobactérie *Synechocystis PCC 6803* révélant les différentes structures intracellulaires: des granules de glycogène (g), carboxysomes (C) et les membranes thylacoïdiennes (T) (Adapté de Wilson et al, 2006).

C. Culture de la cyanobactérie *Synechocystis PCC 6803* en laboratoire dans un milieu minimum en présence de lumière et de dioxyde de carbone (CO_2) .

2.1. Flux d'électrons photosynthétiques induits par la lumière

La conversion de l'énergie solaire en énergie chimique est le résultat des deux centres réactionnels (RCs, acronyme en anglais), PSI et PSII, qui agissent en tandem. Comme tous les autres organismes photosynthétiques, les photosystèmes des cyanobactéries contiennent de la chlorophylle a (Chl a). Il y a quelques cyanobactéries, par exemple, les prochlorophytes, qui contiennent de la Chl b en plus de Chl a (Matthijs et al, 1994), alors que la Chl d est connue pour être abondante dans les organismes de la même famille que les Acaryochloris (Miyashita et al 1996; Larkum and Kuhl, 2005; Miller et al, 2005; Murakami et al, 2004). L'étape initiale de la photosynthèse débute par l'absorption de la lumière (des photons) par des antennes qui collectent la lumière. Les antennes acheminent l'énergie d'excitation aux Chl a des centres réactionnels (RC-Chl a), désignées P680 (complexe-Chl a du PSII) et P700 (complexe "hétérodimérique" Chl a/a' du PSI), amorçant ainsi le processus de conversion de l'énergie (Shevela et al, 2013). En raison des cofacteurs intégrés aux deux PS, les réactions photochimiques au sein des RCs impliquent des transferts d'électrons rapides et séquentiels. Ces transferts se traduisent par des séparations de charges stabilisées, allant pas à pas de l'«extraction» des électrons de l'eau à leur transfert vers le NADP⁺ (la forme oxydée de Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate). La figure 4A illustre cette voie linéaire (non cyclique) de transfert d'électrons connue sous le nom schéma-Z proposé par Hill et Bendall en 1960 (Hill et Bendall, 1960).

Le PSII est un grand complexe multimérique pigment-protéine, dimérique de ~ 700 kDa. La figure 5A montre la disposition générale d'un dimère de PSII cyanobactérien basée sur la structure cristalline du PSII de *Thermosynechococcus elongatus* résolue à 1,9 Å (PDB ID : 3ARC; Umena et al, 2011). Chaque monomère du PSII cyanobactérien comprend 17 protéines transmembranaires, 3 protéines périphériques situées du côté lumen du complexe et près de 90 cofacteurs (Figure 5A) (revues : Nelson et Yocum, 2006; Cardona et al 2012). Tous les cofacteurs d'oxydo-réduction requis pour la séparation photochimique de charges et pour le fractionnement de l'eau sont situés sur les protéines D1 (*psbA*) et D2 (*psbD*) qui forment l'hétérodimère D1/D2. L'hétérodimère D1/D2 intègre un cytochrome b₅₅₉ et est étroitement associé à deux sous-unités d'antennes internes, les protéines CP47 (*psbB*) et CP43 (*psbC*) (Figure 5A), qui attachent 16 et 13 molécules de Chl a respectivement (Guskov et al, 2010) ainsi que des caroténoïdes (revue Bricker et Frankel, 2002).





Figure 4 : Représentation schématique de la chaîne photosynthétique de transport d'électrons dans la membrane thylacoïdienne.

A. Voie linéaire (non cyclique) de transfert d'électrons connue sous le nom schéma-Z (développé par Wilbert Veit et Govindjee, 2010)

B. Schéma de l'architecture des complexes multi-protéiques et des éléments mobiles impliqués dans la photosynthèse oxygénique: photosystème II (PSII), cytochrome b_6f (Cyt b_6f), photosystème I (PSI), l'ATP synthase reliés par des transporteurs d'électrons mobiles (plastoquinone (PQ), plastocyanin (PC), ferrédoxine (Fd)). La voie linéaire de transfert d'électrons génère l'accumulation du NADPH et la formation d'un gradient de protons qui est utilisé pour la synthèse de l'ATP. Sous certaines conditions, en absence de NADP⁺, un flux cyclique d'électrons se met en place conduisant à la création d'un gradient de protons, augmentant ainsi la synthèse de l'ATP (Adapté de Nevo et al, 2012).

Le transfert de l'énergie d'excitation par les molécules des antennes initie une séparation de charge de P680 (associé à D1). Il en résulte l'apparition d'une charge positive sur P680 qui va donner un électron à une molécule de phéophytine (Phéo : associé à D1) à proximité, entraînant ainsi la formation d'une paire de radicaux P680^{•+}Phéo^{•-} (Raszewski et al, 2008). Cet électron est rapidement transféré de la Phéo⁻ à une quinone A (Q_A : associé à D2 de façon permanente) pour générer une paire d'ion radical stabilisé, P680°+PhéoQA°, avant d'arriver finalement à la plastoquinone B (QB ou PQ) faiblement liée à D1 formant QB. Le transfert d'un second électron réduit Q_B^- en Q_B^{2-} , capable de capter deux protons du côté cytoplasmique pour produire ainsi du plastoquinol (PQH₂) (Petrouleas et Crofts, 2005). Le PQH₂ quitte le PSII et migre dans la membrane vers le cytochrome b₆f (Cyt b₆f) (Figure 4B). Ensuite, une autre molécule PQ du pool de PQ remplit immédiatement la poche de QB vide au sein du PSII. La réduction du cation radical P680⁺⁺ par la Tyrozine Z (Tyr_Z, associé à D1) va servir de force motrice pour l'oxydation séquentielle de deux molécules d'H₂O en O₂ et la libération de quatre protons dans le lumen des thylacoïdes via le cluster Mn₄CaO₅ (complexe d'oxydation de l'eau, OEC acronyme en anglais). Les électrons de l'eau sont ainsi récupérés pour réduire la Tyr_Z (Govindjee, 2010) (Figure 4B et 5B). Ainsi, le PSII fonctionne comme une oxydoréductase de l'eau et du plastoquinone. Il utilise l'énergie lumineuse pour réaliser les quatre séparations de charge successives du P680°+, qui vont induire l'élimination de quatre électrons de l'eau (oxydation de l'eau) pour former de l'oxygène moléculaire et l'ajout de ces électrons sous forme de quatre protons au PQ (réduction du pool de PQ). Le rôle du complexe d'oxydation de l'eau (OEC) dans ce processus est indispensable : les 4 protons enlevés du cytoplasme sont ainsi accumulés dans le lumen des thylacoïdes (Renger, 2008 ; Wydrzynski et Satoh, 2005).

Le cytochrome b_6f (Cyt b_6f) joue un rôle clé en connectant le transfert d'électrons photo-induit entre les deux PS et en transférant des protons, à travers la membrane, au lumen (Figure 4B). Il existe une grande similitude structurale et fonctionnelle entre les cytochromes b_6f des cyanobactéries et des plantes. Le Cyt b_6f est un grand complexe entièrement membranaire constitué de multiples sous-unités protéiques se présentant sous forme de dimère de ~ 217 kDa. Chaque monomère comprend huit sous-unités dont quatre grandes sous-unités : le cytochrome f (cyt_f), le cytochrome b_6 (cyt b_6), une protéine Rieske comportant un centre fer-soufre (2Fe-2S), et une sous-unité IV de 17 kDa; ainsi que quatre petites sous-unités (3-4 kDa).



Figure 5 : Structures des photosystèmes et disposition des cofacteurs impliqués dans la chaîne de transfert d'électrons.

A. Structure du PSII de *Thermosynechococcus elongatus* résolue à 1,9 Å (PDB ID : 3ARC ; Umena et al, 2011). **B**. Arrangement des cofacteurs dans le PSII (Adapté de Grotjoham et al 2004): sous excitation, la paire de Chl P680 va donner un électron à une molécule de phéophytine (Pheo). Cet électron est ensuite transféré à une quinone A (Q_A) puis à la plastoquinone B (Q_B). Le transfert d'un second électron sur Q_B lui permettra de capter deux protons produisant ainsi du plastoquinol (PQH₂) qui peut diffuser dans la membrane vers le cytochrome b₆f. Le complexe d'oxydation de l'eau (OEC) va ensuite oxyder séquentiellement deux molécules d'H₂O et libérer des électrons qui vont servir à la réduction du cation radical P680⁺⁺ par l'intermédiaire de la Tyrozine Z.

C. Structure du PSI de T. elongatus résolue à 2,5 Å (PDB ID: 1JB0 ; Jordan et al, 2001).

D. Arrangement des cofacteurs dans le PSI (Adapté de Grotjoham et al 2004): sous excitation, une paire de radicaux $A^{+}A_{0}^{-}$ est générée puis est réduite par P700 pour former une paire d'ion radical, P700⁺A₀⁺. Le P700⁺ oxydé est ensuite réduit par un électron fourni par la PC. L'électron disponible sur A₀⁺ est transféré par des cofacteurs intermédiaires (phylloquinone A₁ et 3 centres [4Fe-4S] (FX, FA, FB) à travers la membrane pour ainsi réduire une ferrédoxine soluble (Fd).

Le Cyt $b_{6}f$ catalyse le transfert d'électrons du plastoquinol (PQH₂) au cytochrome c_6 (Cyt c_6 , également connu comme Cyt c_{553}) ou plastocyanine (PC). Dans des conditions d'abondance en cuivre, de nombreuses cyanobactéries remplacent le Cyt c_6 comportant du fer par la plastocyanine (PC) comportant du cuivre (Zhang et al, 1992). Le PQH₂, lié au côté lumen du Cyt b_6f est oxydé en semiquinone (SQ) par le centre fer-soufre et deux protons sont alors libérés dans le lumen des thylacoïdes. Le centre fer-souffre réduit va ainsi transférer son électron par l'intermédiaire du cyt_f à la plastocyanine (PC). L'autre électron de la SQ est transféré par une voie différente à travers deux hème-b du cyt b_6 à une quinone (située du côté cytoplasmique) pour former une semiquinone qui va, à son tour, capter un proton du cytoplasme pour former une semiquinol (revue : Osyczka et al, 2005). Ainsi le cyt b_6f en oxydant une molécule de PQH₂ accumule 2 protons dans le lumen des thylacoïdes et pompe 1 proton du cytoplasme (réduction de SQ).

Le PSI, malgré quelques similitudes avec le PSII, a une composition peptidique et des co-facteurs associés diffèrents du PSII. Le PSI cyanobactérien est le plus grand complexe de protéines photosynthétiques lié à la membrane et existe principalement sous la forme d'un trimère de ~ 1100 kDa (Revues : Fromme et Grotjohann, 2011 et Nelson et Yocum, 2006). La structure de la cyanobactérie thermophile T. elongatus a été déterminée avec une résolution de 2,5 Å (PDB ID: 1JB0; Jordan et al, 2001) (Figure 5C). Dans certaines conditions environnementales, en particulier sous des intensités lumineuses élevées, le PSI dans les cyanobactéries est sous forme monomérique (comme dans les plantes supérieures) (Rögner et al 1990; Kruip et al, 1994). Chaque monomère du PSI est constitué de 12 sous-unités protéiques et 127 cofacteurs liés de manière non covalente (revues sur PSI : Brettel et Leibl, 2001; Grotjohann et Fromme, 2006). L'hétérodimère PsaA/PsaB forme le cœur du PSI. La chaîne de transfert d'électrons du PSI est disposée en deux branches quasi-symétriques (A et B) qui contiennent 2 x 3 Chls (P700, A et A₀) et 2 phylloquinones A₁, (PhQ_A et PhQ_B). Des données récentes suggèrent que la séparation de charge primaire du PSI n'a pas lieu au niveau de P700, comme on le pensait initialement, mais au niveau de la paire de Chl A/A₀ (Figure 5D). Cette séparation de charge est suivie par la formation d'une paire de radicaux $A^{++}A_0^{--}$ qui est rapidement réduite par P700 pour former une paire d'ion radical, P700^{•+}A₀^{•-} (Müller et al, 2010). Le P700⁺⁺ oxydé est ensuite réduit par un électron fourni par la PC. L'électron disponible sur A_0^{-} est transféré par des cofacteurs intermédiaires (phylloquinone A_1 et 3 centres [4Fe-4S] (FX, FA, FB) à travers la membrane pour ainsi réduire une ferrédoxine soluble (Fd).

Par son importante fonction d'acheminement du transfert d'électrons transmembranaires d'un donneur d'électrons externe (la PC) situé dans le lumen à un accepteur d'électrons (la Fd) situé dans le cytoplasme, le PSI peut être nommé plastocyanine-férredoxine oxydoréductase. Enfin, l'enzyme flavoprotein ferrédoxine-NADP⁺ réductase (FNR) catalyse la production du NADPH à partir de la NADP⁺ en utilisant la Fd réduite comme substrat (voir la figure 4B et les revues : Aliverti et al, 2008 ; Medina, 2009). Deux séparations de charge successives au sein du PSI induisent la formation d'une molécule de NADPH en consommant un proton du cytoplasme.

Le transfert d'électrons photosynthétiques, alimenté par les deux PS, implique également la formation d'un gradient de protons induit par la lumière (Figure 4B), qui va établir une différence de potentiel électrochimique de protons ($\Delta \psi$) à travers la membrane des thylacoïdes. Ce gradient de protons, et plus précisément la force proton-motrice (proton motive force, PMF) est utilisée par l'ATP synthase pour coupler l'acheminement des protons du lumen vers le cytoplasme à la phosphorylation de l'ADP (Adénosine Di-Phosphate) en ATP (Adénosine Tri-Phosphate) (Bald, 2011). Sous certaines conditions, lorsque le NADP⁺ n'est pas disponible pour recevoir les électrons de la Fd réduite, un flux cyclique d'électrons se met en place du côté accepteur du PSI, par le biais du pool de PQ et/ou Cyt b₆f (accepteur d'électrons ou photophosphorylation cyclique induit la formation d'un gradient de protons (augmentation du pompage de protons vers le lumen), qui accroît la synthèse de l'ATP. Il a également été démontré que ce cycle est essentiel pour la photosynthèse (Munekage et al, 2004), car il permet de maintenir un bon ratio de production ATP/NADPH approprié pour la fixation du carbone (Bendall et Manasse, 1995; Joliot and Johnson, 2006).

Comme pour tous les organismes eucaryotes photosynthétiques, les cyanobactéries partagent l'usage d'uniques centres réactionnels, PSI et PSII, pour amener le flux d'électrons induit par la lumière, de l'oxydation de l'eau (H₂O) couplée au dégagement de l'O₂ à la réduction du NADP⁺ en NADPH et à la synthèse de l'ATP. L'ATP et le NADPH ainsi produits sont nécessaires pour la fixation du carbone et la synthèse des glucides par le cycle de Calvin-Benson (revues : Martin et al, 2000; Tabita, 1994; Fukuzawa et al, 2012). Sous forte illumination, toute l'énergie absorbée ne peut être utilisée pour l'assimilation photosynthétique du CO₂ et l'excès de l'énergie d'excitation devient la principale source de stress de la photosynthèse qui va diminuer l'activité des PS.
2.2. Photoinhibition

L'exposition des organismes photosynthétiques aux fortes intensités lumineuses déclenche une baisse de l'activité photosynthétique (S.B. Powles, 1984). Ce phénomène est connu sous le nom de photoinhibition. Dans l'appareil photosynthétique, le site majeur de la photoinhibition est le PSII. Au sein du PSII, le transport d'électrons est inhibé et la structure des protéines endommagée sous forte illumination (Aro et al, 1993). Le PSI est souvent considéré plus stable que le PSII. Cependant, bien que le PSI soit assez résistant à un stress lumineux, il peut également être endommagé par la lumière, en particulier dans les conditions où le transport d'électrons à partir du PSII devient limité (Revues : Scheller et Haldrup, 2005 ; Sonoike, 2011). Les organismes photosynthétiques sont capables de surmonter les effets toxiques de la lumière par la réparation rapide et efficace du PSII (Revues : Vass et Aro 2007; Tyystjärvi 2008 ; Vass, 2012). Par conséquent, la mesure de la photoinhibition dépend de l'équilibre entre la photo-destruction du PSII et la réparation de ces dommages. Bien que des efforts importants aient été consacrés à la clarification des mécanismes moléculaires de la photoinhibition, aucun consensus n'a encore été atteint. Néanmoins, il a été démontré que sous de fortes inténsités, la production de l'oxygène singulet $({}^{1}O_{2})$ (au niveau du centre reactionel du PSII et des antennes) ainsi que d'autres types de ROS, espèces réactives de l'oxygène (O_2^{\bullet} , OH⁻, H₂O₂) sont les principales causes de l'endomagement du PSII et PSI (Revues: Krieger-Liszkay, 2005 ; Vass, 2012). Deux groupes (Revues : Esa Tyystjärvi et al, 2008 et Norio Murata et al, 2007) ont proposé qu'une inactivation directe, par une forte lumière du cluster Mn₄CaO₅ (OEC), se produit au cours de la photoinhibition.

Le schéma du mécanisme moléculaire de la photoinhibition est interprété comme suit. Une forte illumination ou certains stress environnementaux (stress salin, basse température et limitation des émissions de CO₂), induisent une réduction excessive de Q_A, le premier accepteur d'électrons du PSII. L'étape de transfert d'électrons de Q_A à Q_B devient limitant et la recombinaison de charges entre le côté accepteur et le côté donneur du PSII augmente (I. Vass et al, 1992 ; N. Keren et al, 1997). Des triplets de chlorophylle (³P680) sont alors formés et réagissent rapidement avec l'O₂ pour générer l'oxygène singulet (¹O₂). L'¹O₂ extrêmement réactif va directement endommager la protéine D1 et inactiver le centre réactionnel du PSII (Krieger-Liszkay, 2005). L'anion superoxyde (O₂[•]) peut également se former du côté accepteur du PSII sous illumination. L'O₂[•] peut alors servir de précurseur à la formation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et du radical hydroxyle (OH[•]) qui pourraient également participer à la dégradation du PSII. Du côté donneur du PSII, l'inactivation du cluster Mn_4CaO_5 (OEC) va entraîner la formation de radicaux oxydatifs (Tyr-Z^{+•}, P680^{+•}) stables qui peuvent détruire leurs environnements protéiques. Ces dommages sont réparés par la synthèse de la protéine D1 de *novo*. D'après Murata et al (2007), les ROS vont inhiber la réparation du PSII endommagé, en supprimant principalement la synthèse des protéines de *novo*, mais n'ont aucun effet sur la photodestruction du PSII.

2.3. Phycobilisomes : complexes externes collecteurs de lumière des cyanobactéries

L'événement initial dans les réactions photosynthétiques commence par l'absorption de la lumière (des photons) par des antennes collectrices de lumière. En plus des antennes membranaires collectrices de lumière associées aux deux PS et constituées de Chl a et de caroténoïdes, les cyanobactéries possèdent de géants complexes multiprotéiques extramembranaires collecteurs de lumière appelés phycobilisomes (PBS) (Gant et Conti, 1966a, b). Ils sont attachés à la surface cytoplasmique de la membrane thylacoïdienne et donnent une couleur bleue-verte ou marron aux cyanobactéries (revues sur PBS, voir Collins et Blankeship, 2011 ; Sidler, 1994). Les PBS ne sont pas présents dans les plantes. Cependant, les cyanobactéries ne sont pas les seuls organismes photosynthétiques qui en possèdent. Les algues rouges emploient également des PBS pour collecter la lumière (voir, par ex : Tandeau de Marsac, 2003 ; Arteni et al, 2008). L'ultrastructure des PBS peut varier entre les cyanobactéries et dépend des conditions de croissance.

2.3.1. Structure du PBS

Composition protéique du PBS

Le phycobilisome (PBS) est constitué de bras rayonnants à partir d'un cœur associé à la membrane thylacoïdale. Le cœur et les bras se composent de protéines solubles, les phycobiliprotéines, qui lient de manière covalente (via des liaisons thioester) plusieurs types de phycobilines (chaînes tétrapyrroles ouvertes) et des peptides de liaison nécessaires pour son organisation structurelle et sa fonction (Revues : Glazer, 1984; Grossman et al, 1993; MacColl, 1998; Tandeau de Marsac, 2003; Adir, 2005). Les phycobiliprotéines constituent 50% des protéines solubles de la cellule et absorbent la lumière visible dans la gamme de 450 à 660 nm.

Dans la plupart des cyanobactéries, la protéine majeure du cœur est l'allophycocyanine (APC, bleue-verte) avec un maximum d'absorption à 650 nm ($A_{max} = 650$ nm). Dans les cyanobactéries d'eau douce, les bras sont formés de phycocyanines (PC, bleues) qui absorbent entre 615-640 nm. Dans les cyanobactéries marines, en plus de la phycocyanine et de l'allophycocyanine, des phycoérythrines (PE, rouges, absorption à 495 et /ou à 565-575 nm) ou phycoerythrocyanines (PEC, violètes, $A_{max} = 567$ nm) composent les disques les plus périphériques des bras (voir, par exemple : Wilbanks et al, 1991 ; Bryant, 1982). Chacune des phycobiliprotéines se compose de deux sous-unités différentes, α et β . En général, la sousunité α a une masse moléculaire comprise entre 15 et 20 kDa et la sous-unité β a une masse moléculaire comprise entre 17 et 22 kDa. Les différentes sous-unités sont désignées par le type de sous-unité (α ou β) et un exposant qui indique la classe de phycobiliprotéine (APC, PC ou PE) par exemple α^{PC} . Les phycobilines attachés aux résidus cystéines des sous-unités phycobiliprotéines sont phycocyanobiline (PCB), phycoérythrobiline des (PEB), phycourobline (PUB) et phycobilivioline (PXB) (Figure 6A). Le maximum d'absorption exacte pour chacune des phycobilines est fortement influencé par la conformation et les interactions avec les acides aminés des sous-unités des phycobiliprotéines. Les sous-unités a et β des PC et APC sont liés aux phycocyanobilines. Quelques exceptions à cette généralité ont été notées dans les cyanobactéries marines, dans les quelles la sous-unité α^{PC} peut être associée au chromophore, phycourobline ou phycoérythrobiline (Swanson et al 1991). La sous-unité α des PC et les sous-unités α et β des APC lient un chromophore alors que la sousunité β des PC fixe deux chromophores. Dans de nombreuses cyanobactéries, la phycoérythrobiline est liée exclusivement à α^{PE} et β^{PE} (Figure 6A). Dans les cyanobactéries marines, les PBS contiennent deux différents types de PE, et certains sites de fixation des sous-unités de PE peuvent être occupés par des phycouroblines plutôt que des phycoérythrobilines. Puisque la transmission maximale de la lumière dans l'eau de mer est proche de 500 nm et que la phycourobiline a son pic d'absorbance à 498 nm, le remplacement de la phycoérythrobiline par la phycourobiline dans α^{PE} provoque un décalage vers le bleu du maximum d'absorption des PBS et pourrait augmenter efficacement la récolte de la lumière dans un environnement marin. En plus, des phycobiliprotéines, le PBS contient des polypeptides de liaison (L_R) sans pigments (Tandeau de Marsac, 1977) qui représentent environ 15% des protéines totales du PBS et qui sont fortement associés à des trimères ou hexamères de phycobiliprotéines.

Α				
Proteins	Type of bilin per (αβ) monomer	Assembly state	Absorption maxima A _{max} (nm)	Fluorescence Emission λ _{max} (nm)
Allophycocyanin (APC)	α : 1 PCB β : 1 PCB	$(\alpha\beta)_3$	650	660
Phycocyanin (PC)	α : 1 PCB β : 2 PCB	$(\alpha\beta)_6$	620	640 to 650
Phycoerythrin (PE)	α : 2 PEB β : 3 PEB	$(\alpha\beta)_{6\gamma}$	565	575
Phycoerythrocyanin (PEC)	α : 1 PXB β : 2 PCB	$(\alpha\beta)_6$	567 to 590	625
ApcD	1 PCB		670	680
ApcE	1 PCB		670	680



Figure 6 : Structure et assemblage du phycobilisome de Synechocystis PCC 6803.

A. Composition en biline et propriétés des principales phycobiliprotéines cyanobactériennes. Tableau adapté et mis à jour de Bryant (Sidler 1994).

B.Vue de face de phycobilisomes entiers de *Synechocystis* au microscope électronique à simples particules d'après Arteni *et al.* 2009.

C. Représentation schématique du même phycobilisome hémi-discoïdale présentant un cœur (core) tri-cylindrique (projection orthogonale) à partir duquel 6 bras (rod) rayonnent. PCB: phycocyanobiline; PEB: phycoérythrobiline; PXB: phycobilivioline

21

Assemblage des PBS

Dans de nombreuses des cyanobactéries, le PBS est constitué de deux domaines morphologiquement distincts : un cœur organisé en deux (Synechoccocus PCC 7942), trois (Arthrospira maxima) ou cinq cylindres (Anabeana variabilis) à partir desquels émanent des bras au nombre de 6 (parfois 8 ou 10) qui sont des empilements de disques (3 voir plus). Seul le PBS de Synechocystis, l'organisme modèle couramment utilisé dans cette étude est décrit ici. Le cœur du PBS hémi-discoïdale de *Synechocystis* se compose de trois cylindres arrangés en triangle (deux à la base et un au dessus) (Figure 6B). Chaque cylindre du cœur est formé par quatre trimères d'APC (revues : Glazer, 1984; Bryant, 1991; Grossman et al, 1993; MacColl, 1998; Adir, 2005). Les trimères d'APC sont principalement assemblés à partir d'un hétérodimère α^{APC} - β^{APC} liant deux phycocyanobilines (ou bilines), un pour chaque sous-unité. Sur les 12 trimères d'APC du cœur du PBS, huit sont des trimères α^{APC} - β^{APC} qui absorbent la lumière à 650 nm et émettent à 660 nm (APC₆₆₀). Le cylindre supérieur ne contient que des trimères d'APC₆₆₀. En revanche, chaque cylindre basal ne contient que deux trimères d'APC₆₆₀ ainsi que les éléments suivants: (1) un trimère dans lequel une sous-unité α^{APC} est remplacée par une sous-unité spéciale α^{APC} -like appelée ApcD, et (2) un trimère dans lequel une sous-unité β est remplacée par ApcF, une sous-unité β^{APC} -like et une sous-unité α est remplacée par le domaine N-terminal de l'ApcE, un domaine α^{APC} -like (Figure 6C). Chacune de ces sous-unités spéciales APC-like attache un seul phycocyanobiline. Les trimères contenants une ou deux de ces sous-unités spéciales présentent un décalage de l'absorbance vers le rouge, absorbant la lumière autour de 670 nm puis émettant à 680 nm (APC₆₈₀) (Figure 6A). Il a été proposé que ces différences spectrales soient dues à des environnements plus hydrophobes autour des bilines (McGregor et al, 2008). Elles sont les phycobiliprotéines les plus bas énergétiquement et jouent le rôle d'émetteurs terminaux (TE, acronyme en anglais) du PBS (Gindt et al, 1994), qui transfèrent l'énergie lumineuse absorbée par les PBS à l'antenne chlorophyllienne et aux photosystèmes (Mullineaux 1992; Rakhimberdieva et al, 2001). Dans chaque cylindre, les deux trimères externes sont stabilisés par une protéine de liaison de 8,7 kD (ApcC ou L⁸_c) (Figure 6C et revue Glazer, 1984). La partie C-terminale d'ApcE de Synechocystis contient 3 domaines répétés d'environ 120 résidus (Rep) analogues aux domaines conservés des peptides de liaison des bras qui sont impliqués dans l'interaction entre les trimères d'APC (Bryant, 1991; Capuano et al, 1991, 1993). Les PBS ne sont pas assemblés dans les mutants dépourvus d'ApcE (Ajlani et Vernotte, 1998).

Chaque domaine Rep interagit avec un trimère d'APC situé dans différents cylindres stabilisant ainsi le cœur du PBS (Zhao et al, 1992; Shen et al, 1993; Ajlani et al, 1995; Ajlani and Vernotte, 1998). Enfin, la sous-unité ApcE précédemment nommée polypeptide d'ancrage ou phycobilisome core-membrane linker (Lcm), en plus de transférer l'énergie aux PS, est principalement impliquée dans l'interaction entre le PBS et les thylacoïdes (Glazer and Bryant, 1975; Redlinger and Gantt, 1982; Capuano et al, 1991, 1993; MacColl, 1998). Il a été proposé qu'ApcE dispose d'une région flexible permettant l'interaction avec plusieurs composants de la membrane tels que PSII et PSI (Mullineaux 2008), éventuellement située entre Rep 2 et 3, désigné bras 2 (Ajlani et Vernotte, 1998). La sous-unité ApcE détermine également le nombre de cylindres APC qui forment le cœur du PBS (Capuano et al, 1991, 1993). En effet, il existe des PBS contenant seulement deux cylindres basaux, comme dans Synechococcus elongatus PCC 7942 et Synechococcus PCC 6301. Dans ces souches, ApcE (approximativement 72 kD) ne possède que deux domaines Rep. Il y a également des cœurs pentacylindriques dans lesquels, en plus des trois cylindres présents dans les PBS de Synechocystis, deux autres cylindres, formés chacun par deux trimères d'APC₆₆₀, sont observés par exemple dans Anabaena (variabilis ou PCC 7120) et Mastigocladus laminosus (Glauser et al, 1992; Ducret et al, 1998). Dans le PBS pentacylindrique, ApcE (environ 125 kD) comporte quatre domaines Rep (Capuano et al, 1993).

Dans *Synechocystis*, le cœur est entouré par six bras formés généralement par 3 hexamères de phycocyanine (PC) (Figure 6B et 6C et Arteni et al, 2009). La PC, un hétérodimère α^{PC} - β^{PC} , lie 3 phycocyanobilines, 2 à la sous-unité β et un à la sous-unité α et présente à l'état hexamère, un maximum d'absorption à 620 nm et d'émission de fluorescence à 645 nm. Dans les cyanobactéries marines, deux hexamères de PC et un hexamère plus périphérique contenant la phycoérythrine (PE) ou la phycoerythrocyanine (PEC) composent les bras. Les bras et les hexamères sont stabilisés par des protéines de liaison sans pigments (L_R^{10} , L_R^{30} , L_R^{33} et L_R^{C}). L_R^{C} stabilise également la liaison des bras au cœur. Un PBS pentacylindrique peut contenir jusqu'à huit bras. La quantité, la longueur des bras et la présence de phycoérythrine ou phycoerythrocyanine à la périphérie des bras dépendent des conditions environnementales telles que l'intensité ou la qualité de la lumière (Kipe-Nolt et al, 1982; Glauser et al, 1992).

2.3.2. Transfert d'énergie des PBS aux centres réactionnels

Les PBS ont des spectres d'absorption différents de ceux des Chl et des caroténoïdes présents dans les complexes des centres réactionnels. Ces PBS peuvent être spécifiquement excités par une lumière dans une gamme de longueurs d'onde de 495-655 nm donnant un avantage aux cyanobactéries dans les profondeurs de l'océan, où une lumière principalement bleue-verte est disponible. L'arrangement spécial des différentes phycobiliprotéines dans le PBS facilite un transfert efficace en cascade de l'énergie d'excitation qui commence au niveau des bras (disques externes) et descend vers les phycobilines du cœur du PB [Sidler, 1994], à savoir, de la PE à la PC puis à l'APC. Le transfert de l'énergie lumineuse absorbée par les PBS aux antennes chlorophylliennes internes du PSII (CP47 et CP43) se produit via les émetteurs terminaux ApcD, ApcF et ApcE localisés au niveau des cylindres basaux du cœur du PBS. (Figure 7 et Mullineaux, 1992; Rakhimberdieva et al, 2001).



Figure 7 : Transfert d'énergie au sein du phycobilisome vers les centres réactionnels.

Représentation schématique du transfert en cascade de l'énergie d'excitation dans les phycobilisomes de *Synechocystis*.

Les PBS ont souvent été considérés comme les antennes collectrices de lumière du PSII uniquement. ApcE étant composé principalement d'acides aminés basiques, il a été suggéré que des interactions électrostatiques interviennent entre les surfaces du PBS et PSII (Arteni et a, 2009). Le PSII est chargé négativement par les phospholipides et les sulfolipides (Loll et al, 2007) contrairement au trimère de PSI qui contient moins de lipides chargés négativement enfouis entre les monomères ou sous-unités périphériques (Fromme et al, 2001). Cependant, de nombreuses études de transfert d'énergie et de mutants ont clairement démontré que les PBS peuvent transférer directement l'énergie d'excitation aussi bien au PSI qu'au PSII (Glazer et al, 1994; Mullineaux, 1992, 1994; Rakhimberdieva et al, 2001). Dans Synechococcus 7002, la délétion d'ApcD affecte le transfert d'énergie au PSI (McConnell et al, 2002; Dong et al, 2009), alors que la délétion d'ApcF affecte le transfert d'énergie au PSII (Zhao et al, 1992; Dong et al, 2009). Cependant, dans Synechocystis, la délétion d'ApcF a un effet majeur sur le transfert d'énergie aux deux photosystèmes (Ashby et Mullineaux, 1999). Ces résultats démontrent l'implication du cœur du PBS dans le transfert d'énergie au PSI et PSII. Toutefois, d'autres études de mutagenèse suggèrent d'autres possibles voies de transfert d'énergie. Les mutants de Synechocystis dépourvus de cœur sembleraient transférer préférentiellement l'énergie au PSI (Su et al, 1992). En outre, il existe une autre forme de PBS constitué d'un unique bras de PC couplé à une sous-unité CpcG2 (qui ne lie pas le cœur) produit lorsque CpcG (protéine de liaison bras-cœur) est mutée dans Synechocystis (Kondo et al, 2007). Ce PBS transfère aussi préférentiellement l'énergie au PSI.

Les PBS sont très importants pour la croissance photoautotrophe et reflètent directement les paramètres physiques de l'environnement, en particulier la lumière. La taille des PBS peut varier en fonction des conditions lumineuses : à faible lumière, les PBS augmentent en taille tandis qu'ils diminuent à forte lumière. La taille, la composition, le nombre et l'emplacement des PBS sont optimisés pour maximiser le rendement de l'énergie lumineuse physiologiquement utilisable, tout en minimisant les dommages au niveau de l'appareil photosynthétique et de la cellule (Gutu and Kehoe, 2012). Durant les transitions d'états (également nommé État 1 - État 2 (Inversement, État 2 - État 1) de transition), les cyanobactéries équilibrent la lumière d'excitation entre les deux centres réactionnels (PSI et PSII) en quelques secondes ou minutes (voir 3.2.2). Un certain nombre de mécanismes photoprotecteurs ont également été développés par les cyanobactéries pour faire face à un excès d'énergie lumineuse (Bailey and Grossman, 2008).

3. Mécanismes de photoprotection chez les cyanobactéries : un aperçu

La protection de l'appareil photosynthétique contre l'excès d'excitation est un processus complexe. L'organisation des appareils photosynthétiques des plantes supérieures et des cyanobactéries permet de multiples voies de protection contre l'effet destructeur d'une intense lumière sur les différents niveaux de transfert d'énergie et le transport des électrons. Le degré de photo-destruction dépend de la durée et des conditions d'exposition à la lumière. Le déséquilibre entre l'énergie absorbée et l'énergie consommée peut se produire à forte ou faible luminosité et également dans des conditions de carence en nutriments ou de faible CO₂. Ce déséquilibre induit l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui vont endommager l'appareil photosynthétique en détruisant la machinerie d'expression des gènes, entraînant la mort cellulaire (photoinhibition). Des mécanismes d'adaptation à court terme, de l'ordre de secondes ou minutes, superposés à des changements à long terme, qui peuvent se produire sur des heures voir des jours ont été développés par les cyanobactéries pour contrer les stress environnementaux. L'adaptation à long terme aux conditions de stress est accompagnée par des modifications importantes dans l'appareil photosynthétique résultant des changements dans les niveaux d'expression de nombreux gènes (Hihara et al, 2001). Les réponses à court terme à des fluctuations rapides des niveaux de lumière impliquent généralement des réarrangements et des modifications brèves et réversibles des composants photosynthétiques existants.

3.1. Adaptation à long terme des cyanobactéries aux différents stress

Les cyanobactéries ont développé des mécanismes d'acclimatation qui impliquent la synthèse et la dégradation de protéines pour maintenir l'équilibre entre l'énergie absorbée et l'énergie utilisée, afin de réduire l'accumulation de ROS ou de les détruire. Sous forte lumière et dans des conditions de carence en nutriments, les cyanobactéries, en réprimant ou régulant à la hausse des gènes spécifiques, diminuent la quantité de photosystèmes et de PBS, et augmentent la fixation du CO_2 ainsi que le métabolisme cellulaire. Cela comprend une régulation de l'expression de la famille des gènes *psbA* codant la protéine D1 du PSII qui est un élément indispensable de la photosynthèse oxygénique et spécialement ciblée lors de la photoinhibition.

La synthèse d'homologues de la protéine D1 ayant un Q_A avec un potentiel redox modifié et moins enclins à effectuer des recombinaisons de charges, garantit une meilleure adaptation des cyanobactéries aux stress environnementaux (revue de Mulo et al, 2009). Les gènes codant les enzymes luttant contre les ROS (la superoxyde dismutase, la catalase et la peroxydase) sont également régulés à la hausse, permettant ainsi de contrôler la concentration d'anion superoxide (O2⁻⁻) et du H₂O₂ *in vivo* (revue : Latifi et al, 2009). Les ROS peuvent aussi être détoxifiées par divers métabolites (l'ascorbate, le glutathion, les vitamines, etc.) ou antioxydants non enzymatiques (tels que les caroténoïdes capables d'atténuer l'¹O₂) synthétisés par les cyanobactéries (Imlay, 2008; Masip et al, 2006). Des mécanismes spéciaux communs ou spécifiques aux différents stress et impliquant de nouvelles synthèses protéiques sont induits ou intensifiés. Je mentionnerai ici, à titre d'exemple, seulement trois types de protéines "photoprotecteurs".

Les High Light Inducible Proteins (HLIPs)

HLIPs (Hight Light Induced Proteins), font partie de la famille **des Lhc (light-harvesting-like-proteins)** et attachent la Chl a, éventuellement des caroténoïdes, mais ne sont pas impliquées dans la collecte de la lumière. Elles s'accumulent sous de fortes intensités lumineuses et jouent un rôle important dans la survie des cellules dans ces conditions (He et al, 2001; Bhaya et al, 2002; Havaux et al, 2003). Des mutants de *Synechocystis* dépourvus de HLIPs poussent normalement sous un faible éclairage, mais modifient leur teneur en pigments sous fort éclairage, accumulant plus de myxoxanthophylles et moins de Chl que les cellules de *Synechocystis* sauvages (Havaux et al, 2003; Xu et al, 2004). Ces protéines semblent être aussi bien importantes pour la synthèse et le stockage de la chlorophylle que pour l'assemblage et la réparation du PSII sous stress lumineux (Havaux et al, 2003; Xu et al, 2004; Vavilin et al, 2007; Hernandez-Prieto et al, 2011; Komenda et al, 2012).

Les protéines CP43-like (IsiA)

IsiA (Iron Stress-induced A), une autre protéine de la famille des **Lhc** est induite par la carence en fer (Laudenbach et Straus, 1988; Burnap et al, 1993), mais aussi par d'autres conditions de stress (Jeanjean et al, 2003; Yousef et al, 2003; Havaux et al, 2005). Sous carence en fer, 18 molécules d'IsiA encerclent des complexes constitués de trimères de PSI et fonctionnent comme une antenne accessoire (Bibby et al, 2001; Boekema et al, 2001).

Lors d'une carence en fer prolongée, des agrégats IsiA s'accumulent formant de grands anneaux multimériques vides (sans PSI) qui sont dans un état fortement «quenché», suggérant qu'ils peuvent être responsables de la dissipation thermique de l'énergie lumineuse qu'ils recueillent et jouer un rôle dans la photoprotection (Yeremenko et al, 2004 ; Ihalainen et al, 2005).

Les flavodiirons

Dans des conditions de faible CO_2 , quatre gènes codant pour des protéines flavodiirons dans les cellules de *Synechocystis* sont régulés à la hausse (Vicente et al, 2002; Zhang et al, 2009; Allahverdiyeva et al, 2011). Flv1 et Flv3 interviennent dans la réaction de Mehler-like (Vicente et al, 2002; Allahverdiyeva et al, 2011). Elles prennent des électrons au PSI afin de réduire l'oxygène en eau sans produire de ROS. Sous de faibles émissions de CO_2 , 60% des électrons issus de la décomposition de l'eau au niveau du PSII arrivent à l'oxygène moléculaire via Flv1 et Flv3 (Allahverdiyeva et al, 2011), ce qui diminue l'état réduit de la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques généré par un faible taux de CO_2 . Flv2 et Flv4 en acceptant des électrons de PSII ou du pool de plastoquinone (PQ) sont impliquées dans la photoprotection du PSII (Zhang et al, 2009 et 2012).

3.2. Adaptation physiologique rapide des cyanobactéries à l'environnement lumineux

Pour gérer efficacement les changements brusques et les fluctuations de la qualité et de la quantité de la lumière, les cyanobactéries ont également développé des mécanismes photoprotecteurs impliquant des changements rapides dans l'appareil photosynthétique comme : les transitions d'état et l'extinction non-photochimique induite par la lumière bleueverte. Ces mécanismes, en diminuant l'énergie arrivant au niveau des deux centres réactionnels ou en modifiant relativement l'énergie à destination du PSII, réduisent l'accumulation de ROS et les dommages cellulaires. La caractéristique commune à ces mécanismes est la participation du PBS et le fait qu'il soit associé aux changements du rendement de la fluorescence du PSII. Ainsi, le déclenchement et l'évolution de ces mécanismes photoprotecteurs peuvent être aisément suivis par des mesures de cinétiques de fluorescence.

3.2.1. Mesures de déclin de fluorescence dans les cyanobactéries

Les PBS présentent des spectres d'absorption qui sont clairement distincts de ceux des chlorophylles et des caroténoïdes des centres réactionnels. Les PBS peuvent être excités spécifiquement par une lumière dans une gamme de longueurs d'onde de 550-650 nm en fonction de la composition en phycobiliprotéines. Des mesures de fluorescence peuvent ensuite être utilisées pour étudier le transfert d'énergie du PBS vers les centres réactionnels. La diminution du rendement de fluorescence peut être suivie à température ambiante en utilisant des fluorimètres modulés (par exemple fluorimètre PAM ou fluorimètre P.S.I. ; Schreiber et al, 1986; Trtilek et al, 1997) qui enregistrent seulement la fluorescence induite par des impulsions non actiniques (Schreiber et al. 1995). Étant donné que la fluorescence induite par d'autres sources de lumière est ignorée par le système de détection, les mesures peuvent être effectuées en utilisant différentes intensités et qualités de lumière actinique ou en changeant la lumière actinique pendant la mesure. Trois niveaux de fluorescence du PSII sont définis et mesurés dans ce type de fluorimètre. Un niveau de fluorescence minimale (Fo) est déterminé en utilisant une lumière de mesure modulée de faible intensité (non-actinique) pour éclairer les cellules adaptées à l'obscurité. Dans ces conditions, tous les centres du PSII sont ouverts (le premier accepteur primaire QA est oxydé). Le niveau de fluorescence maximale (Fm (à l'obscurité) et Fm' (à la lumière)) est mesuré en appliquant des impulsions de lumière intense qui ferment transitoirement tous les centres du PSII (QA réduit). Sous une illumination continue, le niveau de fluorescence à l'état stable (Fs), qui dépend de l'état réduit de QA, est mesuré. En fonction de la longueur d'onde utilisée pour la lumière de mesure modulée de faible intensité, on peut soit exciter les Chl ou les PBS ou les deux. La fluorescence (Fo, Fs et Fm') détectée par le fluorimètre en utilisant une lumière d'excitation à 650 nm est émise à la fois par la Chl et le PBS (Campbell et al, 1998). Ainsi, une diminution du rendement de fluorescence peut être le résultat d'une diminution de l'émission, soit du PBS, soit des Chls des antennes, ou provoquée par une diminution du transfert d'énergie du PBS au PSII (voir Figure 8 et aussi El Bissati et al, 2000).



Figure 8 : Principe de montage du PAM et exemple de mesures du déclin de fluorescence dans les cellules de *Synechocystis* WT.

Les pics représentent les flashs de lumière saturante. L'éclairement en lumière actinique est indiqué par les bandes de couleur (gris pour l'obscurité, bleue claire pour une lumière bleue-verte et orange pour une lumière orange-rouge (selon les expériences). Variations des niveaux de fluorescence induites par différentes sources de lumière (470 µmol photon. $m^{-2}.s^{-1}$) : bleue-verte (400 à 550 nm) et orange-rouge (600 à 650 nm) dans des cellules de *Synechocystis* WT. Des pulses saturants (30 s, 2000 µmol photon. $m^{-2}.s^{-1}$) ont été appliqués pour évaluer le niveau maximum de fluorescence à l'obscurité (Fm_d) et à forte intensité (Fm_b ou Fm_o). Fo_d (niveau minimal de fluorescence) et Fs (niveau de fluorescence à l'état stable) sont également indiqués (El Bissati *el al*, 2000).

Afin de distinguer les différentes sources contribuant aux variations du rendement de fluorescence du PSII observées au fluorimètre PAM (extinction de l'émission de fluorescence du PBS par rapport à l'extinction de l'émission de fluorescence de la Chl), les mesures des spectres d'émission de la fluorescence à température ambiante ou basse (77K) sont un moyen adéquat. A température ambiante, l'émission à 660 nm est liée au PBS (émission de l'APC), alors que l'émission à 680 nm résulte principalement de la chlorophylle associée au PSII. À 77K, des pics distincts et caractéristiques proviennent de l'émission de fluorescence du PSII (à 685 et 695 nm) et du PSI (entre 715-730 nm en fonction de l'espèce). Le pic à 685 nm correspond principalement à l'émission des émetteurs terminaux du PBS, mais l'émission de l'antenne interne du PSII (CP43) contribue également à ce pic. Le pic à 695 nm dérive de la deuxième antenne interne du PSII (CP47) et du centre réactionnel (RCII) alors que les pics à 650 et 660 nm sont respectivement associés à l'émission de la PC et l'APC. Lorsque les cellules sont excitées à 430 nm, seule la fluorescence émise par la Chl est observée. Dans ce cas, le niveau de fluorescence dépend du transfert d'énergie au sein des antennes Chl du PSII et PSI. Lorsque les cellules sont excitées à 600 nm (lumière principalement absorbée par la PC), des émissions de phycobiliprotéines et de la chlorophylle sont détectées. Dans ce cas, le niveau de fluorescence dépend du processus qui se produit au niveau du PBS et / ou du transfert d'énergie à partir du PBS au PSII (antennes Chl (CP43 et CP47) et RCII).

3.2.2. Les transitions d'état

Les transitions d'état sont un mécanisme physiologique d'adaptation rapide qui régit la distribution de l'énergie lumineuse absorbée entre les PSI et PSII (revues : van Thor et al, 1998; Allen et Forsberg, 2001) afin d'optimiser le rendement de la photosynthèse dans des conditions de lumières fluctuantes (Mullineaux et Emlyn-Jones, 2005). Les transitions d'état ont d'abord été décrites chez des algues rouges contenant des PBS (Murata, 1969), puis les algues vertes (Bonavent.C et Myers, 1969) et plus tard chez les cyanobactéries et les plantes supérieures (voir par exemple : Mullineaux et Emlyn-Jones, 2005; Ruban et Johnson, 2009; Minagawa, 2011 pour des revues récentes). L'exposition des organismes photosynthétiques à une lumière (bleue ou rouge lointain pour les cyanobactéries) induit un excès d'excitation du PSI par rapport au PSII et une transition vers l'Etat 1 où plus d'énergie est transférée au PSII par les PBS (augmentation relative du rendement de fluorescence de la Chl du PSII).



Figure 9 : Transitions d'état.

Variations des niveaux Α. de fluorescence induits par différentes sources de lumière (470 µmol photon. $m^{-2} \cdot s^{-1}$) : bleue-verte (400 à 550 nm) et orange-rouge (600 à 650 nm) mesurées avec un fluorimètre PAM dans cellules des de *Synechocystis* WT. Des pulses saturants (30 s, 2000 µmol photon. $m^{-2}.s^{-1}$) ont été appliqués pour évaluer le niveau maximum de fluorescence à l'obscurité (F_d) et à forte intensité (Fm'bou Fm'o). Fo (niveau minimal de fluorescence) est également indiqué. (El Bissati el al, 2000). La lumière rouge-orange à cette intensité ferme 95% des centres du PSII, alors que la lumière bleueverte et verte ferme seulement 20 et 10% des centres, respectivement.

Représentation de В. différents modèles de transitions d'état d'après Kirilovsky 2015. Dans l'État I, la plupart (ou tous) des PBS sont attachés au PSII et il n'y a pas de spillover entre le PSII et le PSI. Lorsque des cellules pré-adaptées à l'État I sont éclairées par une lumière préférentiellement (orange-rouge) absorbée PBS. par les trois réorganisations différentes de l'appareil photosynthétique ont été proposées : (1) modèle du Spillover (mouvement des PS menant à l'interaction entre les Chl du PSI et du PSII et transfert d'énergie du PSII au PSI). (2) modèle phycobilisome (déplacement du PBS du PSII au PSI l'énergie augmentant transférée directement au PSI et diminuant l'énergie transférée au PSII. (3) les deux modèle mixte où mouvements se produisent.

À l'inverse, une lumière (orange ou verte pour les cyanobactéries) préférentiellement absorbée par le PSII induit une transition vers l'Etat 2 où l'énergie est déroutée vers le PSI par les PBS, et une diminution relative du rendement de fluorescence de la Chl du PSII (Figure 9A et revues : Williams et Allen, 1987; van Thor et al, 1998; Wollman, 2001). Comme dans les plantes, les transitions d'état dans les cyanobactéries sont déclenchées par les changements de l'état redox des transporteurs d'électrons entre le PSII et le PSI, notamment du pool de PQ (Mullineaux and Allen, 1990). Dans ces organismes, les changements de l'état redox du pool de PQ sont non seulement causés par une activité du PSII dépendante de la lumière (transport d'électrons linéaire) ou du PSI (transport d'électrons cyclique autour PSI (Satoh et Fork, 1983)), mais sont également influencés par les voies de la respiration (Mullineaux et Allen, 1986; Dominy et Williams, 1987a). Mao et al. (2002) et Huang et al. (2003) ont clairement démontré que l'état redox du pool de PQ régule les transitions d'état via le cytb₆f : la liaison de PQH_2 sur le site Q_0 du cytb₆f induit la transition d'Etat 2 (où le pool de PQ est oxydé). Dans les plantes et les algues, la réduction du pool de PQ déclenche l'activation spécifique d'une kinase qui va phosphoryler l'antenne collectrice de lumière externe du PSII (LHCII : lightharversting complex of PSII). Cette phosphorylation entraîne la dissociation et la migration du PQH₂vers le PSI (Revues : Wollman, 2001 et Lemeille et Rochaix, 2010).

Dans les cyanobactéries, les transitions d'état nécessitent le mouvement des PBS (ou des PS) pour réguler selon les conditions d'éclairage, l'interaction et le transfert direct d'énergie des PBS aux PSII et PSI (Figure 9B et Joshua et Mullineaux, 2004). Des études utilisant la Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) avaient montré que les PBS seraient mobiles sur la surface de la membrane thylacoïdienne alors que le PSII serait presque immobile *in vivo* (Mullineaux et al, 1997; Sarcina et al, 2001; Yang et al. 2007; et aussi Kana 2013 pour revues sur les mouvements des complexes photosynthétiques et des mesures de FRAP). L'incubation des cellules de cyanobactéries dans des tampons à forte molarité (phosphate, sucrose, glutaraldéhyde, ou bétaïne) inhibe fortement la mobilité des PBS. Par ailleurs, dans ces conditions, les cellules sont piégées dans un Etat 1 ou État 2, en fonction du traitement subi avant l'addition du tampon indiquant que la migration des PBS entre les photosystèmes est nécessaire et indispensable pour les transitions d'état (Joshua et Mullineaux, 2004 ; Li et al 2004, 2006). Cependant la voie de transduction du signal qui lie le changement de l'état redox du pool de PQ et la modification des propriétés de liaison des PBS au PSII ou au PSI demeure inconnue.

Lors des transitions d'état, la modulation du couplage des PBS au PSII ou au PSI se produit principalement via les émetteurs terminaux du cœur du PBS (Mullineaux, 1994). Les mutants de PBS ne contenant que le cœur peuvent induire la transition d'Etat 2 à l'Etat 1 avec une cinétique similaire à celle des cellules de type sauvage (Zhao et al, 2001), alors que des mutants ne contenant que les bras en sont incapables. Les transitions d'état sont affectées dans les mutants de délétion des émetteurs terminaux ApcD et/ou ApcF du cœur car les PBS sont dans l'incapacité de transférer l'énergie au PSI (Δ ApcD) ou au PSII (Δ ApcF), ou interagissent fortement avec l'un des photosystèmes bloquant les cellules dans un état (Zhao et al, 1992; Ashby et Mullineaux, 1999; Dong et al, 2009; Dong et Zhao, 2008, Gindt et al 1992). D'autres mécanismes et facteurs modulent l'association des PBS au PSII et au PSI. Par exemple, une petite protéine membranaire de 9 kDa, RpaC, a été identifiée comme une protéine cruciale dans la stabilité de l'interaction PBS-PSII (Joshua et Mullineaux, 2005). Dans les mutants de *Synechocystis* dépourvus du gène *rpaC* (gène cyanobactérien conservé), les transitions d'état sont complètement inhibées et les PBS sont liés de façon permanente au PSII dans l'Etat 1 (Emlyn-Jones et al, 1999; Mullineaux et Emlyn-Jones, 2005).

La mobilité des PBS ne suffit pas pour expliquer les transitions d'état qui sont également observées dans des mutants de Synechocystis dépourvus de PBS (Olive et al, 1997; El Bissati et al, 2000). La réorganisation des photosystèmes et les variations de transfert d'énergie entre le PSII et le PSI (mécanisme nommé spillover) pourraient être impliquées dans les transitions d'état (Figure 9B). Le mécanisme de spillover qui régule principalement le flux d'énergie d'excitation entre les Chl a des PSII et PSI et qui ne nécessite pas de PBS a été proposé comme un autre mécanisme de transitions d'état (Biggins et Bruce, 1989; Bruce et al, 1989). Ce mécanisme a besoin d'un fort couplage entre le PBS et le PSII et un couplage aléatoire entre les Chl a des PSII et PSI lors de transitions d'état: faible couplage PSII-PSI dans l'Etat 1 et un fort couplage dans l'État 2. Les domaines du PSII sont alignés en rangées dans l'Etat 1 et sont distribués de façon aléatoire dans l'Etat 2 (Olive et al, 1997; Folea et al, 2008). L'organisation en rangées empêche probablement le spillover du PSII au PSI et augmente les transitions d'état. Le PSI est organisé en trimère ou monomère chez les cyanobactéries (Kruip et al, 1994). Les trimères de PSI sont plus abondants dans l'État 2 que dans l'État 1 et se lient plus fortement aux PBS que les monomères de PSI. Il est suggéré qu'une monomérisation / trimérisation rapide et réversible du PSI pourrait également être impliquée dans les transitions d'état (Aspinwall et al. 2004).

Le modèle proposé par McConnell et ses collaborateurs (McConnell et al, 2002) suggère que les transitions d'état sont en réalité un mécanisme combiné impliquant le transfert d'énergie du PBS aux deux photosystèmes avec un spillover d'énergie d'excitation entre les Chl a des PSII et PSI (Figure 9B).

3.2.3. L'extinction non-photochimique (NPQ) de l'énergie lumineuse absorbée en excès

L'extinction non-photochimique (Non-photochemical quenching, NPQ) est une adaptation moléculaire qui représente la réponse la plus rapide de la membrane photosynthétique à un excès de lumière (Demmig-Adams et al, 2014). Le NPQ est un processus qui induit la dissipation thermique de l'énergie lumineuse absorbée en excès. Le mécanisme de NPQ est directement ou indirectement lié au processus de collecte de la lumière par les complexes d'antennes photosynthétiques. Chez les plantes et les algues vertes, la lumière est principalement collectée par des complexes intramembranaires liant de manière non covalente des molécules de chlorophylle et de caroténoïdes connues sous le nom de lightharvesting-chlorophyll complexes (LHCII). Ces complexes sont structurellement et fonctionnellement mobiles, permettant ainsi aux plantes et aux algues de réguler l'état énergétique de l'appareil photosynthétique en réponse aux conditions environnementales. Les complexes LHCII sont impliqués dans la conversion en chaleur de l'excès d'énergie sous forte lumière protégeant l'appareil photosynthétique contre la destruction (Horton et al, 1996; Niyogi, 1999; Pascal et al 2005; Ruban et al, 2007). L'illumination des plantes supérieures par une lumière intense induit la formation d'un ApH à travers la membrane des thylacoïdes pendant le transport d'électrons. L'acidification du lumen (faible pH) des thylacoïdes provoque l'interconversion d'un caroténoïde du LHC par le cycle de la xanthophylle (deépoxydation de la violaxanthine en zéaxanthine). La zéaxanthine est un accepteur d'énergie efficace caractérisée par une grande quantité de liaisons-pi conjuguées et par un faible premier niveau de l'état singulet (S1) (Frank et al 2000; Holt et al 2004). Le faible pH du lumen favorise également la protonation d'une ou plusieurs protéines (Horton et Ruban 1992, Aspinal-O'Dea et al 2002). L'un des plus importants polypeptides est la protéine PsbS, membre de la superfamille des LHCs, qui ne participe qu'à la dissipation d'énergie. La protéine PsbS ne contient pas de chlorophylles et de xanthophylles, mais sous forme protonée, elle est capable de se lier à une zéaxanthine exogène (Niyogi et al, 2004; Niyogi, 1999; Aspinal-O'Dea et al, 2002; Li et al, 2000; Minagawa et Takahashi, 2004).

Il est suggéré que la protéine PsbS liant la zéaxanthine peut être le site du NPQ. Les changements de conformation dans le LHCII également induits par l'acidification du lumen, sont cruciaux pour ce mécanisme. Ces changements modifient les interactions entre les chlorophylles et les caroténoïdes, permettant un transfert des électrons de la chlorophylle à la zéaxanthine, indispensable au NPQ (Horton et al, 2000). La dissipation d'énergie est accompagnée d'une diminution de l'émission de fluorescence liée au PSII, connu sous le nom de Non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching (NPQf) ou qE. Ce processus de NPQf est rapidement réversible (en quelques minutes) à l'obscurité, en l'absence de synthèse de protéines. La diminution de l'émission de fluorescence sert généralement comme mesure du processus de dissipation.

3.2.3.1. Les premiers indices de l'existence du mécanisme NPQ chez les cyanobactéries

Les éléments clés impliqués dans le mécanisme qE des plantes tels que le LHC, les enzymes du cycle de xanthophylle et la protéine PsbS sont absents dans les cyanobactéries. Il a longtemps été supposé que les cyanobactéries n'utilisent pas un mécanisme de dissipation thermique de l'excès d'énergie au niveau des antennes pour réduire l'énergie à destination des centres réactionnels, afin de se protéger de fortes intensités lumineuses (Campbell et al. 1998). Plusieurs expériences réfutent ce point de vue. Les mécanismes opérés par le PBS (El Bissati et al, 2000; Rakhimberdieva et al, 2004; Scott et al, 2006), ou par la protéine IsiA (Iron Stress-induced A) (Yeremenko et al, 2004; Ihalainen et al, 2005), ou par les HLIPs (High-Light-Inducible Proteins) (He et al, 2001; Havaux et al, 2003) ont été décrits. Chacun de ces mécanismes semble être un processus de photoprotection impliquant une dissipation thermique de l'énergie d'excitation. Les premiers résultats révélant l'existence d'un mécanisme de photoprotection impliquant une dissipation thermique de l'énergie absorbée et de la fluorescence au niveau des PBS ont été publiés en 2000 (El Bissati et al, 2000). Jusqu'à l'année 2000, la photoinhibition et l'Etat de transition 2 ont été les deux seuls processus non photochimiques connus impliquant une diminution des niveaux de fluorescence du PSII. Sous des conditions de forte lumière, la diminution de la fluorescence est associée à l'inactivation du PSII et à la dégradation de la protéine D1 (photoinhibition). La récupération de l'activité du PSII et de la fluorescence nécessite le remplacement de la protéine D1 endommagée qui ne peut pas se produire en présence d'inhibiteurs de la synthèse des protéines.

Dans les transitions d'état, la diminution de la fluorescence (Etat de transition 2) est induite par la réduction du pool de PQ causée par une illumination préférentielle du PSII par la lumière orange (ou verte), principalement absorbée par les PBS. En revanche, la lumière bleue-verte, principalement absorbée par le PSI, induit l'oxydation du pool de PQ et une augmentation de la fluorescence associée à l'Etat de transition 1.

El Bissati et al. (2000) ont observé que l'exposition des cellules de Synechocystis à de fortes intensités de lumière bleue-verte induit une diminution de fluorescence du PSII dans des conditions où le pool de PQ était largement oxydé et l'activité de dégagement de l'oxygène n'était pas saturée. En outre, la récupération de la fluorescence se fait en présence d'inhibiteurs de la traduction (El Bissati et al, 2000 et Figure. 10A). Ces résultats ont démontré que le déclin induit par la lumière bleue-verte n'est pas lié à la photoinhibition, ni aux transitions d'états. El Bissati et al. (2000) ont proposé que de fortes intensités lumineuses blanches ou bleue-vertes induisent une diminution de la fluorescence des PBS, accompagnée par une diminution de l'énergie transférée des PBS vers les photosystèmes dans les cyanobactéries. Ce mécanisme sera nommé NPQcya dès à présent. Quatre ans plus tard, Rakhimberdieva et al. (2004) ont confirmé cette hypothèse. Ils ont montré, que dans des mutants de Synechocystis dépourvus de centre réactionnel II et/ou des antennes chlorophylliennes CP43 et CP47, la lumière bleue-verte est capable d'induire un déclin réversible de l'émission de fluorescence des PBS. De plus, le spectre d'action présentait des pics à 496, 470 et 430 nm suggérant qu'une molécule de caroténoïde pourrait être impliquée dans ce mécanisme (Figure 10B).

Juste avant mon arrivée au laboratoire en 2004, Diana Kirilovsky avait découvert qu'une protéine soluble liant un caroténoïde, l'Orange Carotenoid Protein (OCP) serait impliquée dans le mécanisme de photoprotection associé aux PBS induit par la lumière bleueverte chez la cyanobactérie *Synechocystis* décrit par El Bissati et al. (2000).



Figure 10 : Mécanisme de NPQcya induit par une forte lumière bleue-verte dans les cellules de *Synechocystis*.

A. Variations des niveaux de fluorescence induits par différentes intensités de lumière bleue-verte mesurées avec un fluorimètre PAM dans des cellules de *Synechocystis* WT préalablement adaptées à l'obscurité et illuminées successivement par une lumière bleue-verte de faible intensité (400 à 500 nm, 80 µmol photon. m⁻².s⁻¹), puis de forte intensité (740 µmol photon. m⁻².s⁻¹) et de nouveau ré-illuminées avec une lumière bleue-verte faible (80 µmol photon.m⁻².s⁻¹) en présence de chloramphénicol (34 µg ml⁻¹). Des pulses saturants (1 s, 2000 µmol photon. m⁻².s⁻¹) ont été appliqués pour évaluer le niveau maximum de fluorescence à l'obscurité (Fm) et à forte intensité (Fm').F0 (niveau minimal de fluorescence) et Fs (niveau de fluorescence à l'état stable) sont également indiqués (El Bissati *el al*, 2000).

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

3.2.3.2. Découverte et Description de l'OCP chez les cyanobactéries

David Krogmann et son équipe ont isolé pour la première fois l'Orange Carotenoid Protein (OCP) au cours de la purification des cytochromes de type c. Ils l'ont décrite comme une protéine soluble liant le céto-caroténoïde, 3'-hydroxyéchinénone (3'-hECN) (Holt et Krogmann, 1981) et ont démontré qu'elle était présente dans trois souches cyanobactériennes : *Arthrospira maxima, Microcystis aeruginosa* et *Aphanizomenonflos-Aqua*. Plus tard, le groupe de Krogmann a caractérisé l'OCP isolée chez les cyanobactéries *Arthrospira maxima* et *Synechocystis* PCC 6803 (Wu et Krogmann, 1997). En utilisant des méthodes de séquençage de protéines pour obtenir la structure primaire du domaine N-terminal de l'OCP, ils ont été en mesure de déduire que l'OCP est codée par le gène *slr1963* dans le génome alors nouvellement séquencé de *Synechocystis* PCC 6803 (Wu et Krogmann, 1997).

L'OCP est une protéine soluble de 35 kDa qui lie de manière non covalente un unique caroténoïde (Holt et Krogmann 1981; Wu et Krogmann 1997; Kerfeld et al, 2003, 2004 et revue : Kerfeld 2004). En 2003, avant que des études fonctionnelles n'aient été initiées sur l'OCP, Kerfeld et al. (2003) ont résolu à 2.1 Å la structure de l'OCP d'Arthrospira maxima isolée par Krogmann et al. (1997) (Figure 11B). L'OCP est composée de 2 domaines, Nterminal et C-terminal reliés par un linker. La structure des deux domaines est significativement différente : le domaine N-terminal est constitué uniquement d'hélices a tandis que le domaine C-terminal est constitué de feuillets β et d'hélices α . Le caroténoïde lié, le 3'-hECN présente une configuration trans et est en contact avec les deux domaines protéiques. Lors de la purification de l'OCP, un fragment liant un caroténoïde de 16.7 kDa ayant une masse et une structure primaire identique au domaine N-terminal de l'OCP moins les quize premiers résidus a été isolé (Figure 11A). Ce fragment nommé Red Carotenoid Protein (RCP) est issu de la protéolyse de l'OCP (Wu et Krogmann 1997; Kerfeld et al, 2004 et revue : Kerfeld 2004). Cette protéolyse ôte le domaine C-terminal qui, sans aucune intervention de changement de structure, exposerait près de la moitié du caroténoïde au solvant (Figure 11C).

A l'époque, Kerfeld et al. (2003) ont montré que l'OCP et la RCP étaient capables de réagir avec l'oxygène singulet et le désactiver. Plusieurs rôles de l'OCP ont été aussi proposés dans des conditions de stress, sur la base des activités connues des caroténoïdes et sur le fait que le niveau de transcription de l'OCP augmente de > 600% dans des conditions de forte lumière (Hihara et al, 2001) tels que: désactivateur d'oxygène singulet,

transporteur de caroténoïdes du site de synthèse situé dans la membrane thylacoïdale vers le cytoplasme, ou une barrière photo-protective au niveau la membrane externe de l'organisme (Kerfeld et al, 2004 et revue : Kerfeld, 2004).



Figure 11 : Description de l'OCP.

A. De gauche à droite: 3'-hydroxyechinénone (3'-hECN) dans un solvant organique $(A_{max} = 450 \text{ nm})$, l'OCP $(A_{max} = 495 \text{ nm})$ et la RCP $(A_{max} = 505 \text{ nm})$ isolées chez *A*. *maxima*.

B. Structure du monomère de l'OCP (PDB 1M98; Kerfeld *et al*, 2003) montrant le domaine N-terminal en jaune et bleu, le domaine C-terminal en rouge et le caroténoïde (3'-hECN) en orange. Les petites croix indiquent la position des molécules d'eau et l'ion chloride est la sphère verte.

C. Modélisation de la RCP (couleur comme dans A). Le caroténoïde est représenté dans la conformation qu'elle détient dans la forme OCP.

Figures adaptées de la revue: Kerfeld et al, 2004.

Objectif de ma thèse

Le but de mon travail au cours de ces dix dernières années (ma thèse) a été de caractériser le mécanisme moléculaire de la photoprotection chez les cyanobactéries et le rôle de l'Orange Carotenoid Protein (OCP) :

(1) caractériser le mécanisme de NPQcya dans les conditions de croissance normales et sous carence en fer,

(2) isoler l'OCP afin de réaliser des études spectroscopiques et structurales,

(3) déterminer les différents acteurs impliqués dans le mécanisme de photoprotection *in vivo* et *in vitro*,

(4) élucider les acides aminés impliqués dans l'attachement de l'OCP avec le caroténoïde ainsi qu'avec les différents acteurs grâce à l'étude de mutants de l'OCP et,

(5) étudier les différents gènes codant pour des homologues du gène de l'OCP chez les cyanobactéries.

Ma thèse présentée ci-après est un état des lieux des connaissances sur l'OCP, depuis la découverte du mécanisme et sa caractérisation, jusqu'aux dernières avancées sur le mécanisme de l'OCP obtenues au sein de notre laboratoire.

Je présenterai sous forme de revue mes principales publications (articles en premier auteur et deuxième auteur qui figurent dans l'annexe). Je mentionnerai également les résultats auxquels j'ai collaboré (articles en différente position). Les études réalisées par d'autres membres de notre équipe mais aussi par nos collaborateurs auxquelles je n'ai pas participé sont aussi décrites pour leur importance dans l'élucidation du mécanisme de NPQcya.

Les résultats présentés dans cette thèse ont donné lieu à 19 articles (en gras dans le texte) et un dépôt de brevet : 7 articles en premier auteur, 7 articles en deuxième auteur et 5 articles en différente position.

Liste des articles

[1]**Wilson A,** Ajlani G, Verbavatz J-M, Vass I, Kerfeld CA, Kirilovsky D (2006). A Soluble Carotenoid Protein Involved in Phycobilisome-Related EnergyDissipation in Cyanobacteria, Plant Cell 18: 992-1007.

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

[3] **Wilson A,** Punginelli C, Gall A, Bonetti C, Alexandre M, Routaboul JM, Kerfeld CA, van Grondelle R, Robert B, Kennis JT, Kirilovsky D (2008) A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 12075-12080.

[4] Punginelli C, **Wilson A**, Routaboul J-M, Kirilovsky D (2009). Influence of zeaxanthin and echinenone binding on the activity of the Orange Carotenoid Protein, Biochim.Biophys. Acta 1787: 280-288.

[5] **Wilson A,** Kinney JN, Zwart PH, Punginelli C, D'Haene S, Perreau F, Klein MG, Kirilovsky D, Kerfeld CA (2010). Structural Determinants underlying photoprotection in the photoactive orange carotenoid protein of cyanobacteria, J Biol Chem 285 18364-18375.

[6] Boulay C, **Wilson A**, D'Haene S, Kirilovsky D. (2010) Identification of a protein required for recovery of full antenna capacity in OCP-related photoprotective mechanism in cyanobacteria, Proc Natl Acad Sci U S A 107 11620-11625.

[7] **Wilson A**, Punginelli C, Couturier M, Perrau F, Kirilovsky D (2011) Essential role of two tyrosines and two tryptophans on photoprotection activity of the Orange Carotenoid Protein, Biochim Biophys Acta 1807: 293-301

[8] Gwizdala M, **Wilson A**, Kirilovsky D (2011) In vitro reconstitution of the cyanobacterial photoprotective mechanism mediated by the Orange Carotenoid Protein in Synechocystis PCC 6803, Plant Cell 23: 2631-2643

[9] **Wilson A**, Gwizdala M, Mezzetti A, Alexandre M, Kerfeld CA, Kirilovsky D (2012) The essential role of the N-terminal domain of the orange carotenoid protein in cyanobacterial photoprotection: importance of a positive charge for phycobilisome binding, Plant Cell 24: 1972-1983

[10] Berera R., van Stokkum I. H. M, Gwizdala M, Wilson A, Kirilovsky D, van GrondelleR. (2012) The Photophysics of the Orange Carotenoid Protein, a Light-Powered Molecular Switch, J.Phys. Chem.B, 116 (8), 2568–2574.

[11] Gwizdala M, Wilson A, Omairi-Nasser A, Kirilovsky D (2013) Characterization of the *Synechocystis* PCC 6803 Fluorescence Recovery Protein involved in photoprotection, Biochim Biophys Acta 1827(3):348–354.

[12] Sutter M, **Wilson A**, Leverenz RL, Lopez-Igual R, Thurotte A, Salmeen AE, Kirilovsky D, Kerfeld CA (2013) Crystal structure of the FRP and identification of the active site for modulation of OCP-mediated photoprotection in cyanobacteria, Proc Natl Acad Sci USA 110: 10022–10027

[13] Sedoud A, Lopez-Igual R, Ur Rehman A, **Wilson A**, Perreau F, Boulay C, Vass I, Krieger-Liszkay A, Kirilovsky D (2014) The Cyanobacterial Photoactive Orange Carotenoid Protein Is an Excellent Singlet Oxygen Quencher, Plant Cell 26: 1781-1791

[14] Bourcier de Carbon C, Thurotte A, **Wilson A**, Perreau F, Kirilovsky D (2015) Biosynthesis of soluble carotenoid holoproteins in Escherichia coli, Sci Rep 5: 9085

[15] Leverenz RL, Sutter M, **Wilson A**, Gupta S, Thurotte A, Bourcier de Carbon C, Petzold CJ, Ralston C, Perreau F, Kirilovsky D, Kerfeld CA (2015). A 12 Å carotenoid translocation in a photoswitch associated with cyanobacterial photoprotection, Science 348: 1463-1466

[16] Thurotte A, Igual RL, Wilson A, Comolet L, Bourcier de Carbon C, Xiao F, KirilovskyD (2015) Regulation of Orange Carotenoid Protein Activity in Cyanobacterial Photoprotection, PlantPhysiol 169: 737-747

[17] Harris D, Tala O, Jallet D, Wilson A, Kirilovsky D, Adir N (2016) Orange carotenoid protein burrows into the phycobilisome to provide photoprotection, Proc Natl Acad Sci USA 113 (12) E1655-E1662

[18] López-Igual R, **Wilson A**, Leverenz RL, Melnicki MR, Bourcier de Carbon C, Sutter M, Turmo A, Perreau F, Kerfeld CA, Kirilovsky D (2016) Different functions of the paralogs to the Nterminal domain of the Orange Carotenoid Protein in the cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120, Plant Physiology pp.00502

[19] Melnicki MR, Leverenz RL, Sutter M, López-Igual R, Wilson A, Pawlowski EG, Perreau
P, Kirilovsky D, Kerfeld CA (2016) Structure, Diversity, and Evolution of a New Family of Soluble
Carotenoid Binding Proteins in Cyanobacteria, Molecular Plant
http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2016.06.009

Résultats

Résultats

1. Rôle de l'OCP dans un mécanisme de photoprotection chez les cyanobactéries

1.1. Induction du mécanisme NPQcya par l'OCP chez la cyanobactérie Synechocystis PCC 6803

(Wilson et al, Plant Cell 2006)

En 2006, nous avons démontré que l'OCP était spécifiquement impliquée chez la cyanobactérie *Synechocystis* PCC 6803 (*Synechocystis* ci-après) dans un mécanisme de photoprotection, qui dissipe par la chaleur, l'énergie lumineuse absorbée en excès (**Wilson et al, 2006**). Pour démontrer cela, nous avons construit le mutant Δ OCP. Nous avons suivi les variations des niveaux de fluorescence de cellules du sauvage (WT) et du mutant Δ OCP illuminées par différentes intensités de lumière bleue-verte avec un fluorimètre PAM. Lorsque les cellules étaient exposées à une forte intensité lumineuse, une diminution rapide de tous les niveaux de fluorescence était observée chez le WT. Le déclin de fluorescence dépendait de l'intensité et de la qualité de la lumière. La dépendance du NPQcya à l'intensité lumineuse était liée à l'OCP. En l'absence de l'OCP, le NPQcya induit par une forte lumière bleue-verte dans la cyanobactérie *Synechocystis* était complètement inhibé (Figure 12A).

Lorsque des cellules de la souche WT et du mutant Δ OCP étaient illuminées par une forte lumière blanche, une diminution de la fluorescence maximale était observée dans les deux types de cellules. En présence du chloramphénicol, un inhibiteur de la synthèse des protéines, une récupération du niveau maximum de fluorescence était observée uniquement chez le WT, mais pas chez le mutant Δ OCP. Ce résultat avait révélé que chez le WT, la diminution du niveau de fluorescence observée n'était pas liée à la dégradation de la protéine D1, qui elle est associée à la photoinhibition. En revanche, dans le mutant Δ OCP, la diminution de la fluorescence maximale apparaissait être en corrélation avec la photoinhibition, et non pas avec le NPQcya. Nous avons cherché à savoir, chez la cyanobactérie *Synechocystis*, si le NPQcya induit par une forte lumière était lié au Δ pH, ou à l'activité du PSII.



Figure 12 : Implication de l'OCP dans un mécanisme de NPQcya induit par de fortes intensités de lumière bleue-verte dans les cellules de *Synechocystis*.

A. Mesures du rendement de fluorescence avec un fluorimètre PAM de cellules préalablement adaptées à l'obscurité du sauvage (WT) (ronds rouges) et du mutant ΔOCP (carrés verts) et illuminées successivement par une lumière bleue-verte de faible intensité (400 à 500 nm, 80 µmol photon.m⁻².s⁻¹), puis de forte intensité (740 µmol photon.m⁻².s⁻¹). Une forte intensité lumineuse induit une large diminution de la fluorescence maximale dans des cellules du WT mais pas dans le mutant ΔOCP . Plus de détails dans Wilson *et al.* (2006).

B. Mesures similaires dans des cellules du WT qui ont ensuite été ré-illuminées avec une lumière bleueverte faible (80 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) montrant la récupération du niveau maximum de fluorescence en présence de DCMU (trait vert), de nigéricine (carrés bleus) et sans ajout (ronds rouges).

Le mécanisme NPQcya n'est pas lié à l'état redox du pool de PQ ou au Δ pH mais à l'OCP. Plus de détails dans Wilson et al. (2006).

Nous avions donc réalisé des mesures en présence de nigéricine, un inhibiteur qui dissipe le gradient de protons (Δ pH), et en présence de la DCMU, un inhibiteur de transport d'électrons entre les quinones Q_A et Q_B, qui empêche la réduction du pool de PQ. En présence ou en absence de ces inhibiteurs, les cinétiques de déclin de la fluorescence étaient identiques. Par ailleurs, ces inhibiteurs n'avaient pas d'effet sur la cinétique de récupération du niveau maximum de fluorescence. Cela nous a permis de démontrer que le NPQcya n'était pas lié à l'état redox du pool de PQ ou au Δ pH (Figure 12B). Nous avions également observé, que l'activité de dégagement de l'oxygène diminuait plus vite dans le mutant que dans le sauvage sous de fortes intensités lumineuses, indiquant que le mutant Δ OCP était plus sensible au stress lumineux. Ces résultats avaient suggéré que l'OCP était liée à un mécanisme de dissipation thermique de l'excès d'énergie absorbée aux niveaux des PBS, qui diminue la quantité d'énergie transférée des PBS vers les centres réactionnels.

Dans le fluorimètre PAM où nous avions réalisé toutes nos mesures de déclin de la fluorescence, la lumière de mesure a un maximum à 650 nm et la fluorescence est détectée à des longueurs d'onde >700 nm. Chez les cyanobactéries dépourvues de la chlorophylle b, la plupart de la lumière de mesure est absorbée par les PBS. Ceci a été confirmé par le faible niveau de fluorescence émis par les mutants dépourvus de PBS (El Bissati et Kirilovsky, 2001). Ainsi, l'observation d'une baisse des niveaux de fluorescence dans le fluorimètre PAM pourrait être le résultat d'une faible émission des PBS, ou de l'antenne chlorophyllienne, ou encore d'une diminution du transfert d'énergie des PBS vers le PSII. La comparaison des spectres de fluorescence à température ambiante, des cellules du WT et du mutant $\triangle OCP$ (avant et après induction du NPQcya par une forte lumière bleue-verte) a montré que le déclin de fluorescence observé au PAM correspondait à une diminution de l'émission de fluorescence des PBS et non de la chlorophylle. De ce fait, il y avait moins de transfert d'énergie des PBS vers le PSII et le PSI. En outre, une forte lumière bleue-verte était capable d'induire un NPQcya chez les mutants de Synechocystis dépourvus de centres réactionnels ou des antennes chlorophylliennes CP43 et CP47 (Figure 13B). Dans ces mutants, une diminution spécifique de l'émission de fluorescence des PBS a été observée alors qu'il n'y avait aucune modification de l'émission de fluorescence liée à la chlorophylle (Wilson et al, 2006; Scott et al, 2006). En revanche, la lumière bleue-verte fut incapable d'induire un NPQcya chez le mutant dépourvu de PBS ou du cœur des PBS (Figure 13A) démontrant que le NPQcya induit par la lumière bleue-verte et inhibé par l'absence de l'OCP, est lié aux PBS.



Figure 13 : Le mécanisme de NPQcya induit par la lumière bleue-verte est lié aux phycobilisomes.

Mesures du rendement de fluorescence (avec un fluorimètre PAM) de cellules de *Synechocystis* pré-adaptées à l'obscurité (**A**) du mutant sans phycocyanine (Δ PC, ronds bleus), du mutant sans allophycocyanine (Δ APC, triangles rouges) et d'un mutant sans phycobilisomes (PAL, carrés verts) et (**B**) du mutant sans PSII (Δ RC, Δ CP47, Δ CP43) et illuminées successivement par une lumière bleue-verte de faible intensité (400 à 500 nm, 80 µmol photon.m⁻².s⁻¹, pour PAL, 300 µmol photon.m⁻².s⁻¹), puis de forte intensité (740 µmol photon.m⁻².s⁻¹, pour PAL, 1700 µmol photon.m⁻².s⁻¹) suivies par une incubation à l'obscurité pour la récupération de la fluorescence. **La diminution de la fluorescence maximale est dépendante du cœur des phycobilisomes mais pas de la chlorophylle**. Plus de détails dans Wilson *et al.* (2006)

Les PBS sont donc des composants essentiels au mécanisme de NPQcya induit par la lumière bleue-verte. La seule présence du cœur des PBS est suffisante pour induire le déclin de fluorescence (**Wilson et al, 2006**).

Pour déterminer la localisation cellulaire de l'OCP, nous avons construit un mutant de *Synechocystis*, où l'OCP a été fusionnée avec la GFP («Green Fluorescent Protein» en anglais). Les cellules mutées, refermant la protéine de fusion OCP-GFP, ont été marquées par immunogold et analysées par microscopie électronique. La visualisation des anticorps anti-GFP a montré que la majeure partie des protéines de fusion OCP-GFP était localisée dans la région cytoplasmique inter-thylacoïdienne, qui est le côté de la membrane où se trouvent les PBS (Figure 14A). L'interaction entre l'OCP et les PBS et/ou les thylacoïdes nécessaires pour le NPQcya a été corroborée par la co-isolation de la protéine de fusion OCP-GFP avec les membranes liées ou non aux PBS (Figure 14B et **Wilson et al, 2006**). Nos résultats étaient en corrélation avec la détection de l'OCP dans une préparation de thylacoïdes lors d'études protéomique sur les thylacoïdes de *Synechocystis* (Srivastava et al, 2005).

Nos données indiquaient que, nous étions en présence d'un nouveau mécanisme de photoprotection chez les cyanobactéries dans lequel l'OCP, qui a un rôle essentiel, interviendrait à la fois comme photorécepteur et inducteur de la dissipation de l'énergie lumineuse. Ce mécanisme d'action était complètement nouveau pour une protéine à caroténoïde soluble.

1.2. Dissipation d'énergie induite par la lumière sous carence en fer : étude des rôles des protéines OCP et IsiA

(Wilson et al, Plant Cell 2007)

Dans les conditions de carence en fer, un large déclin de fluorescence réversible est induit par une lumière bleue (Cadoret et al, 2004; Bailey et al, 2005; Joshua et al, 2005). Il avait été proposé que la protéine Iron Stress-induced A (IsiA), appartenant à la famille des complexes protéiques et liant la chlorophylle, soit impliquée dans ce processus de NPQ. L'expression de la protéine IsiA (codée par le gène *isiA*) est induite sous carence en fer (Laudenbach et Straus 1988; Burnap et al. 1993) et par d'autres stress (par exemple le stress salin, le stress oxydatif et le stress lumineux) (Jeanjean et al, 2003; Yousef et al, 2003; Havaux et al, 2005).





Figure 14 : Localisation cellulaire de l'OCP.

A. Analyse par microscopie électronique de cellules du WT et du mutant de *Synechocystis* où l'OCP a été fusionnée avec la GFP («Green Fluorescent Protein») marquées par immunogold (anticorps polyclonaux anti-GFP couplés avec des particules d'or de 10 nm).

B. Détection par immublot de la protéine de fusion OCP-GFP dans la fraction M (membrane, 1), MP (membrane-phycobilisome, 2) et les fractions solubles de cellules cassées dans du tampon Phosphate/Citrate (4) et MES (5); (3) marqueur de masse moléculaire reconnu par l'anticorps secondaire (IgG de souris). **L'OCP est liée à la membrane thylacoïdienne à côté des PBS**. Plus de détails dans Wilson *et al.* (2006)

La protéine IsiA se réarrange autour du centre réactionnel du PSI pour former des complexes constitués d'un PSI trimérique et de 18 molécules d'IsiA (Bibby et al. 2001; Boekema et al. 2001). IsiA augmente ainsi l'absorption du PSI en agissant comme un additionnel et puissant capteur d'énergie (Andrizhiyevskayaet al, 2002; Melkozernov et al. 2003). Lors d'une carence en fer prolongée, des agrégats IsiA, formés d'anneaux multimériques sans PSI, s'accumulent (Yeremenko et al, 2004). Ihalainen et al. (2005) ont montré qu'in vitro, les agrégats d'IsiA isolés sont dans un état «quenché». Cet état, indépendant de la qualité et de l'intensité de la lumière, suggère qu'IsiA pourrait être responsable d'une dissipation permanente de l'énergie sous forme de chaleur. Deux mécanismes impliquant IsiA avaient été proposés. (1) La lumière bleue convertit la protéine IsiA d'une forme (qui collecte la lumière nécessaire à la photosynthèse) à une autre, qui va dissiper l'excès d'énergie sous forme de chaleur (Cadoret et al, 2004). (2) L'exposition à une forte lumière augmente l'affinité d'IsiA aux PBS, ce qui permet une diminution de la fluorescence des PBS (Joshua et al, 2005). Nous avions démontré que le NPQcya était lié à l'OCP dans les conditions normales de croissance (Wilson et al, 2006). Nous avions recherché dans les conditions de carence en fer, si le NPQcya était associé à l'OCP ou à IsiA dans la cyanobactérie Synechocystis (Wilson et al, 2007).

En utilisant des mutants de *Synechocystis* dépourvus d'IsiA (mutant Δ IsiA), ou d'OCP (mutant Δ OCP), ou de PBS (mutant PAL), nous avions démontré que, dans les cellules de mutants carencées en fer (tout comme celles non carencées), le NPQcya induit par la lumière bleue-verte était associé aux PBS et à l'OCP et pas à IsiA (**Wilson et al., 2007**). Dans le mutant Δ IsiA, un large déclin de la fluorescence réversible était induit par une lumière bleueverte alors que, dans les mutants PAL, ou Δ OCP, aucun déclin n'a été observé, même après une très longue période de carence en fer (Figure 15A). Sous carence en fer, la dissipation d'énergie augmentait plus rapidement dans le mutant Δ IsiA que dans le WT (Figure 15B). Cette augmentation était liée d'une part à l'apparition d'une population importante de PBS, fonctionnellement déconnectés des photosystèmes et «dangereux» pour les cellules, qui pouvaient transférer l'excès d'énergie absorbée aux thylacoïdes. D'autre part, une concentration élevée d'OCP, observée dans les cellules de *Synechocystis* carencées en fer par rapport aux cellules non carencées, permet de dissiper sous forme de chaleur l'excès d'énergie provenant des PBS déconnectés (Figure 15C et **Wilson et al, 2007**).


Figure 15 : La lumière bleue-verte induit un mécanisme de NPQcya dans les cellules carencées ou non en fer de *Synechocystis*.

A. Mesures du rendement de fluorescence (avec un fluorimètre PAM) de cellules pré-adaptées à l'obscurité du WT (carrés bleus), du mutant Δ OCP (losanges oranges), du mutant Δ IsiA (triangles violets) et du mutant PAL (Δ PBS, losanges bleus) carencées en fer pendant 7 jours et illuminées successivement par une lumière bleue-verte de faible intensité (400 à 500 nm, 80 µmol photon.m⁻².s⁻¹, pour PAL, 300 µmol photon.m⁻².s⁻¹), puis de forte intensité (740 µmol photon.m⁻².s⁻¹, pour PAL, 1700 µmol photon.m⁻².s⁻¹). Des pulses saturants ont été appliqués pour évaluer le niveau maximum de fluorescence à faible (Fm) et forte intensité (Fm').

B. Augmentation de NPQcya [(Fm-Fm')/Fm'] pendant la carence en fer du WT (cercles et traits pleins) et de Δ IsiA (carrés et traits pointillés). Le graphique est une moyenne de 4 expériences indépendantes et l'écart type est représenté par les barres d'erreurs.

C. Mesures similaires dans des cellules du WT non carencées (+Fe) et carencées en fer pendant 12 jours (-Fe) ; Insertion de la détection par immublot de l'OCP dans les fractions MP isolées de ces cellules (chaque puits contient 1 μ g de Chl).

NPQcya induit par la lumière bleue-verte est associé aux PBS et à l'OCP et pas à IsiA. Plus de détails dans Wilson *et al.* (2007)

Les transitions d'états n'étaient pas affectées par la présence ou non de l'OCP mais semblaient être inhibées lors de la carence en fer. Nos résultats indiquaient que, la plupart des modifications observées au niveau de l'appareil photosynthétique et induites par la carence en fer, seraient indépendantes de la présence ou l'absence d'OCP. En effet, nous avions observé que l'accumulation d'agrégats d'IsiA (non associés au PSI), dans les cellules carencées en fer, pouvaient protéger le PSII en dissipant l'énergie provenant des PBS (Wilson et al, 2007). Cependant, ce mécanisme, qui implique IsiA, n'était pas modulé par la lumière. Dans nos conditions expérimentales, les cellules du mutant AIsiA étaient plus sensibles à la carence en fer que les cellules des mutants PAL ou $\triangle OCP$. Ceci indiquait qu'en carence en fer et dans les conditions de faible luminosité, IsiA assure une meilleure protection que le mécanisme NPQ associé à l'OCP et aux PBS (Wilson et al, 2007). L'absence d'IsiA, de HLIP («High Light Inducible Proteins» décrites par He et al. (2001) et Havaux et al. (2003)), comme celle d'OCP, rend les cellules plus sensibles aux fortes intensités lumineuses. Dans les cellules du WT, IsiA et les HLIPs sont présentes uniquement dans les conditions d'une illumination intense et prolongée. Alors que le mécanisme associé à l'OCP est toujours présent, les mécanismes impliquant IsiA et les HLIPs interviennent quand celui de l'OCP devient insuffisant pour protéger les cellules.

Notre travail a montré que le mécanisme de photoprotection associé à l'OCP devenait plus important en présence de stress combinés (carence en fer et stress lumineux), où un déséquilibre entre le nombre de PBS et de centres réactionnels a été induit.

1.3. Mécanisme de NPQcya associé à l'OCP chez différents cyanobactéries

(Je n'ai participé pas aux travaux décrits dans ce chapitre et réalisés par d'autres membres de notre équipe (Boulay et al, 2008).)

L'OCP est codée par le gène *slr1963* chez la cyanobactérie *Synechocystis* (Wu et Krogmann, 1997) et est exprimée de façon constitutive même dans les mutants sans phycobilisomes (PBS) (**Wilson et al, 2007**). Beaucoup de cyanobactéries, dont les génomes sont connus, possèdent des gènes hautement conservés codant des protéines homologues à l'OCP de *Synechocystis*, à l'exception de *Prochlorococcus*. Les souches *Prochlorococcus*, un phylum de cyanobactéries dépourvues de PBS, n'ont pas le gène *ocp*.



Figure 16 : Répartition de l'OCP, de la FRP et des domaines N- et C-terminaux de l'OCP parmi les cyanobactéries d'après Kirilovsky et Kerfeld (2013).

Distribution des gènes codant l'OCP, la FRP et les domaines N- et C-terminaux de l'OCP en compilant des données de 126 génomes séquencés de cyanobactéries (les détails sur les génomes et les souches utilisés dans cette analyse sont publiés dans Shih et al, 2013). Les organismes sont identifiés par section : section 1 (noir) sont unicellulaires et se divisent par fission binaire; section 2 (jaune) sont unicellulaires et subissent de multiples fissions pour produire des baeocytes; section 3 (vert) sont des souches filamenteuses; section 4 (violet) sont des souches filamenteuses qui forment des hétérocystes et section 5 (bleu) sont des souches de ramification qui forment des hétérocystes. Les branches et les sous-branches affectées sont indiquées par des lettres. Plus de détails dans Kirilovsky et Kerfeld. (2013).

Sur les 130 génomes de cyanobactéries connus, 97 contiennent des gènes hautement conservés, codant pour des protéines homologues à l'OCP de *Synechocystis* (Figure 16 et revue: Kirilovsky et Kerfeld 2013). La séquence en acides aminés est hautement conservée. L'identité (nombre d'acides aminés identiques) de ces protéines homologues par rapport à l'OCP de *Synechocystis* varie entre 50% (*Gloeobacter violaceus*) et 82% (*Arthrospira maxima*). Les séquences en acides aminés homologues de l'OCP des cyanobactéries d'eau douce présentent une forte similarité à l'OCP de *Synechocystis* (66% à 82%) par rapport aux cyanobactéries marines (62% à 64%). Les cyanobactéries marines *Synechococcus* sont très similaires entre elles (entre 77% -95%). Les séquences de l'OCP de *Gloeobacter violaceus* (50%) et *Nodularia spumigena* (56%) présentent une faible similitude par rapport à l'OCP de *Synechocystis*.

Après avoir étudié et caractérisé la fonction de l'OCP dans le mécanisme de photoprotection NPQcya chez la cyanobactérie Synechocystis, Clémence Boulay a cherché à savoir, si la présence du gène ocp est systématiquement associée à la capacité de réaliser un NPQcya induit par une lumière bleue-verte chez diverses cyanobactéries originaires de différents habitats (Boulay et al, 2008). L'expression de la protéine entière de l'OCP a été confirmée dans sept souches cyanobactériennes comportant un gène homologue au gène entier ocp (Figure 17A, 17B et Boulay et al, 2008). Ces souches sont capables de réaliser le mécanisme NPQcya induit par la lumière bleue-verte. Ces résultats suggèrent que la plupart des cyanobactéries, pour se protéger des fluctuations de lumière, utilisent le mécanisme de dissipation d'énergie associé à l'OCP, et aux PBS précédemment découvert chez la cyanobactérie Synechocystis. Le gène ocp joue un rôle important dans la physiologie de ces micro-organismes (Figure 17A, 17B et Boulay et al, 2008). En outre, dans Arthrospira maxima (A. maxima ci-après), comme dans Synechocystis, la carence en fer induit une augmentation de la concentration de l'OCP et une importante diminution de fluorescence (Figure 17C et Boulay et al, 2008) en accord avec de précédents travaux (Hihara et al, 2001 ; Fulda et al, 2006 ; Wilson et al, 2007). Cette quantité élevée d'OCP protège les cellules des «dangereux» PBS, fonctionnellement déconnectés, observés en grand nombre dans les conditions de carence en fer. Le transfert de l'excès d'énergie absorbée des PBS aux thylacoïdes peut induire des dommages oxydatifs (par exemple la peroxydation des lipides), s'il n'est pas dissipé sous forme de chaleur au niveau des PBS.



Figure 17 : Expression de l'OCP et mécanisme de NPQcya associé dans les cyanobactéries.

A. (haut) Mesures du rendement de fluorescence avec un fluorimètre PAM et (bas) détection de l'OCP par immublot dans les fractions MP (chaque puits contient 1 μ g de Chl) de cellules de **cyanobactéries d'eau douce:** WT (1) et mutant Δ OCP (1-) de *Synechocystis*, *A. variabilis* (rond, 2), *A. maxima* (carré, 3), *S. elongatus* (triangle, 4) et *T. elongatus* (losange, 5). Les cellules pré-adaptées à l'obscurité sont illuminées successivement par une lumière bleue-verte de faible intensité (400 à 550 nm, 80 µmol photon.m⁻².s⁻¹), puis de forte intensité (740 µmol photon.m⁻².s⁻¹). Des pulses saturants ont été appliqués pour mesurer les niveaux maximaux de fluorescence (Fm').

B. (haut) Mesures similaires et (bas) détection de l'OCP par immublot à partir des protéines totales (chaque puits contient 3 μg de protéines totales) dans des cellules de **cyanobactéries marines:** *Synechococcus WH8018* (triangle, 2), *Synechococcus WH8102* (losange, 4), *Synechococcus RS9917* (carré, 1) *et Synechococcus* RCC307 (rond, 3).

C. Mesures similaires dans des cellules d'*A. maxima* non carencées (+Fe) et carencées en fer pendant 12 jours (-Fe). Insertion de la détection par immublot de l'OCP dans les fractions MP isolées de ces cellules (chaque puits contient 1 μ g de Chl). **NPQcya est très répandu chez les cyanobactéries**. Plus de détails dans Boulay *et al.* (2008)

Parmi les cyanobactéries comportant des PBS, peu de souches sont dépourvues d'homologues de l'OCP entier, par exemple : les cyanobactéries d'eau douce (Synechococcus elongatus PCC 7942 (S. elongatus ci-après) et PCC 6301), les cyanobactéries thermophiles (Thermosynechococcus elongatus (T. elongatus ci-après), Synechococcus sp. A et Synechococcus sp. B'), et les cyanobactéries marines (Synechococcus sp. CC9605 et Crocosphaera watsoniiWH8501 (C. watsonii ci-après)). La question qui reste ouverte est de savoir pourquoi certaines cyanobactéries ne contiennent pas l'OCP et n'effectuent pas le mécanisme de photoprotection associé? L'absence de l'OCP dans les cyanobactéries thermophiles telle que T. elongatus pourrait s'expliquer par leur niche écologique particulière. Les cas des cyanobactéries d'eau douce S. elongatus PCC 7942, PCC 6301 et marines Synechococcus CC9605 et C. watsonii sont plus intriguants. Elles partagent leur habitat avec des souches possédant l'OCP. De ce fait, il n'existe aucune corrélation entre la présence ou l'absence de l'OCP et les divers habitats des cyanobactéries. La plupart des souches citées précédemment n'ont pas d'homologue entier du gène ocp. Cependant, T. elongatus et C. watsonii contiennent deux cadres de lecture codant chacune une partie N- et C-terminale, homologues de l'OCP (Figure 16). Dans T. elongatus, il s'agit de deux gènes distincts, mais adjacents, alors que dans C. watsonii, les deux gènes se situent dans différentes parties du génome. Dans S. elongatus PCC 7942 et T. elongatus (souches dépourvues du gène entier *ocp*), le mécanisme de photoprotection est inexistant, démontrant que le mécanisme NPQcya induit par la lumière bleue-verte est corrélé à la présence du gène entier ocp (Figure 17A et Boulay et al, 2008). En outre, les résultats indiquent que les fragments encodés par les homologues des parties N- et C-terminales du gène *ocp* dans *T. elongatus* ne participent pas au mécanisme de photoprotection induit par une lumière bleue-verte dans les conditions normales de croissance ou sous carence en fer. Les cyanobactéries dépourvues d'OCP sont plus sensibles aux épisodes de forte irradiation lumineuse comme le mutant $\triangle OCP$ de Synechocystis (Boulay et al, 2008). Les cyanobactéries S. elongatus et T. elongatus sans OCP se protègent en dégradant rapidement les phycobiliprotéines, afin d'éviter l'accumulation de PBS, fonctionnellement déconnectés et potentiellement nocifs sous carence en fer (Boulay et al, 2008).

2. Structure et Photo-activité de l'OCP

2.1. Structure de l'OCP

(Wilson et al, JBC 2010)

La structure de l'OCP, isolée par le groupe de Krogmann (Holt et Krogmann, 1981) à partir de la cyanobactérie A. maxima a été déterminée à 2.1 Å (code PDB : 1M98) par le groupe de Cheryl Kerfeld avant que son rôle dans la photoprotection ne soit connu (Kerfeld et al. 2003). En 2010, en collaboration avec le groupe de Kerfeld, nous avons résolu à 1.65 Å la structure de l'OCP isolée du WT (PDB ID: 3MG1) et deux mutants de Synechocystis, l'organisme modèle pour l'élucidation du mécanisme de photoprotection (Wilson et al, 2010). Ces structures sont essentiellement identiques et composées de deux domaines : un domaine N-terminal en hélices- α (résidus 15 à 165) et un domaine C-terminal en hélices- α /feuillets- β (résidus 190-317). Le repliement du domaine C-terminal fait partie de la superfamille des facteurs de transport nucléaire 2 (NTF-2) (Pfam 02136), alors que la structure primaire et tertiaire du domaine N-terminal de l'OCP est unique aux cyanobactéries (Pfam 09150). Les deux domaines sont reliés par un long (~ 25 acides aminés) linker flexible : seule cette région de la protéine est peu conservée. Les deux domaines interagissent par le biais de deux régions distinctes. Les 19 premiers acides aminés N-terminaux (formant une petite hélice α) se déploient loin du domaine N-terminal et interagissent avec la face exposée au solvant du domaine C-terminal (Figure 18A). De nombreux acides aminés, qui composent cette face, sont conservés. La seconde interface, plus centrale, est stabilisée par quatre liaisons hydrogènes, dont deux sont formées par la paire de résidus Asn104 et Trp277, et un pont salin entre Arg155 et Glu244 (Figure 18B). Les multiples structures maintenant disponibles suggèrent également la présence de molécules d'eau structurellement conservées entre les domaines et autour du caroténoïde. La fonction significative de ces dernières est inconnue, mais elles pourraient faciliter des changements conformationelles de la protéine.

Le céto-caroténoïde, 3'-hECN incorporé à l'intérieur de la protéine est en contact avec les deux domaines (figure 18A) : seulement 4% de la surface du caroténoïde est exposée aux solvants (Kerfeld et al, 2003; **Wilson et al, 2010**). Le 3'-hECN composé d'une conjugaison de chaînes de 11 doubles liaisons carbone-carbone se trouve dans une configuration trans dans les structures de l'OCP (Kerfeld et al, 2003; Polivka et al, 2005; **Wilson et al, 2010**).



Figure 18 : Structure de l'OCP de Synechocystis d'après Wilson et al. (2010).

A et B. Vue d'un monomère de l'OCP montrant le domaine N-terminal (résidus 1-165) en violet, le domaine C-terminal (résidus 186-317, NTF2-like) en turquoise, le linker flexible en bleu et le bras en rouge. Le caroténoïde (échinénone) est représenté avec des bâtonnets orange, son anneau hydroxyle se trouvant dans le domaine N-terminal et son groupement carbonyle dans le domaine C-terminal. B. Gros plan sur la position dans la protéine des résidus fonctionnels clés et absolument conservés: Arg155, Glu244, Tyr201, Trp288, Trp110, Tyr44 et Trp41. Les chaînes latérales des résidus sont représentées par des bâtonnets gris avec l'oxygène en rouge et l'azote en bleu. De potentielles liaisons hydrogènes sont indiquées par des lignes en pointillés vertes. Quelques molécules d'eau conservées sont présentées sous forme de sphères jaunes. La figure a été réalisée avec Pymol (<u>http://www.pymol.org/</u>) en utilisant le fichier PDB 3MG1.

Le groupement cétone (carbonyle) du 3'-hECN forme une liaison hydrogène avec les résidus conservés Tyr201 et Trp288 au sein de la «poche» hydrophobe du domaine C-terminal alors que, la partie hydroxyle est nichée au sein d'un groupe de résidus aromatiques conservées (Trp 41, Tyr 44 et Trp 110) dans le domaine N-terminal (Figure. 18B et Kerfeld et al, 2003; **Wilson et al, 2010**; **Wilson et al, 2011**). L'interaction du 3'-hECN avec la protéine change sa configuration et a un effet important sur ses propriétés spectroscopiques. Dans les solvants organiques, le 3'-hECN est jaune (λ max= 450 nm), mais dans l'OCP, il apparaît orange (λ max= 465 et 495 nm) (Kerfeld et al, 2003; Polivka et al, 2005). L'anneau portant le groupement cétone terminal du caroténoïde se trouve dans une configuration s-cis en solution mais adopte une configuration s-trans dans l'OCP. Pour le 3'-hECN, cet état caractéristique des caroténoïdes à groupement carbonyle dans un environnement polaire est observé exclusivement dans l'OCP.

2.2. Photo-activité de l'OCP

(Wilson et al., PNAS 2008)

2.2.1. L'OCP, est une protéine photoactive

Afin d'étudier les propriétés spectrales de l'OCP, nous avons construit un mutant exprimant l'OCP avec une étiquette 6xHis en position C-terminale dans la cyanobactérie *Synechocystis*. Le mécanisme de photoprotection est également induit par une lumière bleueverte dans ce mutant, indiquant que la présence de l'étiquette 6xHis n'affecte pas l'activité de l'OCP. Le spectre d'absorption de l'OCP isolée à partir de *Synechocystis* (Wilson et al, 2008) est identique à celui de l'OCP isolée chez *A. maxima* (Polivka et al, 2005). Comme dans cette dernière, l'OCP isolée lie le 3'-hECN. Nous avons ensuite démontré que l'OCP est une protéine photo-active. À l'obscurité ou à faible lumière, l'OCP est orange (OCPo). Son spectre d'absorption typique des caroténoïdes reflète les transitions S0-S2 avec trois bandes vibrationnelle 0-0 est localisée à 496 nm (Kerfeld et al, 2003; Polivka et al, 2005; Wilson et al, 2008). La position et la forme de cette transition correspondent au 3'-hECN bloqué dans une conformation trans par la protéine (Kerfeld et al, 2003; Polivka et al, 2005). Sous illumination avec une lumière bleue-verte, l'OCPo est complètement photo-convertie à une forme rouge (OCPr) (Wilson et al, 2008 et Figure 19A et 19B).

La forme rouge perd la résolution des bandes vibrationnelles et présente un spectre d'absorption avec un maximum d'absorbance à 510 nm. Le taux de photo-conversion dépend de l'intensité de la lumière et est peu assujetti à la température entre 18 et 30°C. *In vitro*, la forme rouge de l'OCP est spontanément reconvertie en une forme orange à l'obscurité (**Wilson et al, 2008**). Cette réaction, qui n'est pas accélérée par une illumination est dépendante de la température.





A et **B**. Photographie et spectre d'absorbance de la forme orange (OCP^o; noir) à l'obscurité et de la forme rouge illuminée (OCP^r; rouge) de l'OCP isolée. OCP^r a été obtenue après une illumination par une lumière bleue-verte de 740 μ mol photon.m⁻².s⁻¹ à 12°C pendant 2 min.

C. Accumulation de la forme rouge à 11°C sous différentes intensités lumineuses: 20 (cercles noirs), 50 (carrés rouges), 120 (triangles verts), 210 (carrés bleus), 350 (triangles roses), 740 (triangles oranges), et 1200 (cercles violets) μ mol photon.m⁻².s⁻¹ de lumière bleue-verte (400–550 nm).

D. Reconversion à l'obscurité de la forme rouge à la forme orange (diminution de l'absorbance à 580 nm) et **E**. Photo-conversion de la forme orange à la forme rouge (augmentation de l'absorbance à 580 nm) en utilisant une lumière bleue-verte de 350 μ mol photon.m⁻².s⁻¹ à différentes températures: 32°C (triangles violets), 28°C (cercles roses), 24°C (carrés bleus), 19°C (triangles verts), 15°C (carrés rouges) et 11°C (cercles noirs). La concentration de la protéine est de DO_{495nm}= 0.2 dans les expériences. **Sous forte lumière et faible température, la forme orange (OCP°) est complètement photo-convertie à une forme rouge (OCP°).** Plus de détails dans Wilson *et al. (2008).*

2.2.2. Modifications structurelles du caroténoïde et de la protéine, essentielles à la photo-activation de l'OCP

La comparaison des spectres des formes rouge et orange de l'OCP obtenus par spectroscopie de résonance Raman et par FTIR (« Fourier Transform InfraRed » en anglais) a démontré que l'absorption de la lumière par l'OCP n'induit pas seulement des changements structurels au niveau du caroténoïde, mais aussi au niveau de l'apo-protéine (Wilson et al, 2008). Les spectres Raman de l'OCP isolée chez A. maxima et Synechocystis sont presque identiques, indiquant que les interactions entre le caroténoïde et la protéine dans ces deux OCPs sont similaires. Ceci a été confirmé par la résolution de la structure de l'OCP de Synechocystis en 2010 (Wilson et al, 2010). Dans l'OCPr, le 3'-hECN garde une configuration trans, mais il est moins contraint par la conformation de la protéine. Le caroténoïde pourrait avoir une structure plus plane et moins distordue (Figure 20B). Ceci a récemment été démontré par la résolution de la structure du domaine N-terminal de l'OCP (Leverenz et al, 2015, décrite au 5.2.1). Ces changements sont en accord avec l'observation d'un décalage vers les longueurs d'onde rouges du spectre d'absorption. Les modifications observées par spectroscopie Raman, suggèrent qu'une isomérisation trans-cis de la chaîne polyène du 3'-hECN n'intervient pas dans la photo-activation. Les changements observés au sein du caroténoïde de l'OCP sont clairement différents de ceux qui interviennent dans le rétinal, un dérivé de caroténoïde, qui est le chromophore des protéines de la famille des rhodopsines (revue : Spudich et al, 2000). Dans les rhodopsines, le rétinal est lié de façon covalente à la protéine, via la liaison d'une base de Schiff protonée à un résidu Lys. La lumière induit une isomérisation du rétinal initiant le photocycle. Le photocycle implique un transfert de protons entre la base de Schiff et un résidu carboxylate. Dans l'OCP, non seulement aucune isomérisation de ce type n'est détectée, mais en plus, le 3'-hECN n'est pas lié de manière covalente à la protéine.

Ces changements de conformation induisent des modifications des états excités du caroténoïde (**Berera, … Wilson et al, J Phys Chem 2012**). La liaison de la protéine au 3'hECN est responsable du raccourcissement de la durée de vie de l'état S1 (de 6,5 ps dans une solution à 3,3 ps) dans l'OCP, de la modification de l'énergie de l'état S1 et de la stabilisation de l'état ICT («Intramolecular Charge Transfer» en anglais). Cela rend le 3'-hECN-OCP plus efficace pour dissiper l'énergie que le caroténoïde libre (**Berera et al, 2012**; Polivka al, 2013 ; Polivka et al, 2005).



Figure 20 : Changements structurels dans le caroténoïde et la protéine sous illumination.

A. Modèle proposé pour le quenching : le caroténoïde dans l'OCPr reçoit de l'énergie de la biline excitée de l'émetteur terminal par un processus médié par l'état ICT (Intramolecular Charge Transfer) du caroténoïde (Adapté de Berera, et al, 2012).

B. Spectre de Résonance Raman de l'OCP^r et de l'OCP^o de *Synechocystis*, ainsi que de l'OCP^o d'*A*. *maxima* dans une gamme de 1740 à 820 cm⁻¹.

C. Spectre « lumière moins obscurité » FTIR (Fourier Transform InfraRed) de l'OCP dans H₂O (noir), dans D₂O environ 5 sec (trait rouge) ou 50 sec (ligne bleue) après illumination avec une LED bleue dans la région du carbonyle entre 1700 et 1600 cm⁻¹ (région Amide I). Un shift vers le haut des vibrations Amide I correspond à un affaiblissement des liaisons hydrogènes des boucles et des hélices α indiquant une structure hélicoïdale moins rigide d'une partie significative de la forme OCP^r. Un shift vers le bas des vibrations Amide I correspond à un renforcement des liaisons hydrogènes des feuillets β indiquant un domaine en feuillets β plus compacte dans la forme OCP^r. Plus de détails dans Wilson *et al. (2008).*

L'état S1 du caroténoïde dans l'OCPr a une énergie inférieure à celle dans l'OCPo, indiquant que des changements interviennent autour du groupement carbonyle sous illumination (Polivka et al, 2013). Les liaisons hydrogènes présentes entre le groupement carbonyle du caroténoïde et le domaine C-terminal de l'OCP jouent un rôle crucial dans la modulation et la stabilisation de l'état ICT (Berera et al, 2012; Chàbera et al, 2010; Polivka et al, 2005). L'état ICT du caroténoïde agirait comme un intermédiaire dans le processus de transfert d'énergie. Il a été démontré qu'en général, l'efficacité de la dissipation d'énergie augmente avec la puissance de l'état ICT (Berera et al, 2006). Dans l'état excité de l'OCPr, la contribution de l'état ICT est plus importante que dans l'OCPo (Berera et al, 2012). Ainsi, le caroténoïde devient un meilleur médiateur dans le processus de dissipation de l'énergie. Nous avons proposé que l'OCPr accepte l'énergie d'une biline excitée des PBS via son état ICT (Berera et al, 2012). Les durées de vie des états ICT et S1 (0,6 et 3,2 ps) sont environ trois fois plus courtes que celle de la biline excitée, faisant du 3'-hECN un dissipateur extrêmement efficace (Figure 20A). Tian et al. (2011) ont énoncé un deuxième mécanisme suggérant que le déclin rapide de la fluorescence est probablement causée par un transfert de charge entre l'une des bilines émettant à 660 nm et le caroténoïde (3'-hECN) de l'OCPr.

Des modifications importantes ont également été observées par FTIR sous illumination notamment, un réarrangement majeur du squelette de la protéine. Les changements observés correspondent à une structure hélicoïdale moins rigide d'une partie significative de la protéine et à un domaine de feuillets β plus compacte lors de la conversion en forme rouge (Figure 20C et **Wilson et al, 2008**). Cependant, des résultats plus récents (**Leverenz et al, 2015**; Gupta et al, 2015) indiquent que les domaines N et C-terminaux conservent en grande partie leurs structures secondaires au cours du processus de photoactivation.

2.3. La forme rouge (OCPr) est la forme active de l'OCP

Après avoir démontré que l'OCP est une molécule photo-active, le lien entre l'OCPr et le mécanisme de NPQcya a été étudié. La différence de spectres d'absorption mesurés avec des cellules de *Synechocystis*, avant et après illumination avec une forte lumière bleue, montrait que l'OCPr s'accumule *in vivo*, dans les mêmes conditions que celles qui induisent une dissipation d'énergie et un déclin de la fluorescence (**Wilson et al, 2008**). D'une part, la forte dépendance à l'intensité lumineuse du NPQcya, induit par la lumière bleue-verte dans les cellules entières (**Wilson et al, 2006**) est en corrélation avec les cinétiques de formation de l'OCPr in vitro (Figure 19C et Wilson et al, 2008). D'autre part, aussi bien les cinétiques de reconversion (rouge à orange) de l'OCP isolée que les cinétiques de récupération du NPQcya in vivo montrent une large dépendance à la température. Cependant, les cinétiques de récupération du NPQcya sont plus lentes (El Bissati et al 2000; Wilson et al, 2006; Rakhimberdieva et al. 2007a, b) que la conversion de la forme rouge vers la forme orange à l'obscurité in vitro. Le temps de demi-vie de la conversion de l'OCPr en OCPo varie de 30 s (à 32°C) à environ 45 min (à 11°C) in vitro (Figure 19D et Wilson et al, 2008). Ceci suggère que l'OCPr est plus stable in vivo qu'in vitro, ou que le déclin de la fluorescence demeure plus longtemps que l'OCPr. En revanche, le taux initial de photoconversion (orange vers rouge) est indépendant de la température entre 18 et 30°C (Figure 19E). Ainsi, à une intensité lumineuse fixe, la concentration de l'OCPr à l'équilibre dépend de la température. Cela se traduit in vivo par un déclin de la fluorescence plus important à 7°C qu'à 33°C (Wilson et al, 2008). Ainsi, le ratio des deux formes de l'OCP sous illumination dépend de l'intensité de la lumière et de la température: accumulation de formes rouges à forte intensité et à basse température, conditions dans lesquelles la photoprotection est nécessaire. L'OCP apparaît alors comme un senseur des conditions de photoinhibition en induisant plus de photoprotection sous forte intensité et à basse température. Toutes ces observations suggèrent déjà fortement que la forme active de l'OCP est la forme rouge. Pour confirmer ceci, nous avons étudié le NPQcya dans des mutants de Synechocystis (Wilson et al, 2008 ; Punginelli et al, 2009; Wilson et al, 2011). Déjà en 2008, nous avons montré qu'un mutant de Synechocystis contenant une OCP photo-inactive ne présentait pas de mécanisme NPQcya (Wilson et al, 2008).

2.3.1. Rôle du caroténoïde dans la photo-activation

(Ce chapitre se réfère à l'article **Punginelli, Wilson et al, BBA 2009** dont je suis le deuxième auteur. Ma contribution à ce travail a été de construire la souche surexprimant l'OCP-WT et de la caractériser (gels, purification de l'OCP et mesures d'absorbance)).

Pour pouvoir isoler de grandes quantités d'OCP afin d'approfondir nos études sur sa photo-activité, nous avons construit une souche de *Synechocystis* dans laquelle, le gène *ocp* est sous la régulation d'un puissant promoteur *psbA2*. Dans cette souche surexprimant l'OCP, une grande quantité d'OCP est présente (8 à 10 fois plus que dans le WT) et un NPQcya important est observé confirmant la relation entre la concentration de l'OCP et le déclin de

fluorescence (Figure 21A et **Wilson et al, 2008**). Ces résultats sont en accord avec nos précédents travaux, où sous carence en fer, la concentration de l'OCP et la dissipation d'énergie augmentent (**Wilson et al, 2007**). La diminution de l'émission de fluorescence des phycobilisomes mesurée est de 25-30% dans le sauvage et de 60-70% dans la souche surexprimant l'OCP. La quantification de l'OCP et des PBS suggère qu'il y aurait dans les cellules de *Synechocystis*, une molécule d'OCP par 2-3 PBS contre 3-4 molécules d'OCP par PBS dans la souche surexprimant l'OCP (Revue: Kirilovsky 2012).

Dans la souche mutante surexprimant l'OCP, le 3'-hECN qui est un caroténoïde mineur dans *Synechocystis* n'est pas suffisamment abondant pour se lier à toute l'OCP produite. L'OCP est également capable de se lier à d'autres types de caroténoïdes. Dans cette souche, l'OCP se lie à l'échinénone (ECN) et à la zéaxanthine (ZEA) en plus du 3'-hECN (**Punginelli et al, 2009**). Quand l'OCP est surexprimée dans un mutant dépourvu du gène *crtO* codant la β -carotène monocétolase, qui catalyse la formation d'ECN et du 3'-hECN, l'OCP se lie principalement à la zéaxanthine (**Punginelli et al, 2009**). Dans une souche surexprimant l'OCP, où le gène *crtR* codant la β -carotène hydroxylase a été interrompu (conduisant à l'absence du 3'-hECN et de la ZEA), l'OCP se lie principalement à l'ECN avec des traces de cantaxanthine (CAN) (**Wilson et al, 2011**). Alors que la ZEA a deux groupements hydroxyles, un sur chaque anneau (sites 3 et 3'), l'ECN et le 3'-hECN possèdent un groupement carbonyle sur un des anneaux (site 4). Le 3'-hECN présente un groupement hydroxyle supplémentaire sur l'autre anneau (Figure 21C).

À l'obscurité, l'OCP liant l'ECN ou le 3'-hECN est orange contrairement à celle liant la ZEA qui apparaît jaune (**Punginelli et al, 2009**) (Figure 21B). L'illumination de l'ECN-OCP et du 3'-hECN-OCP avec une forte lumière bleue-verte génère une forme rouge avec des cinétiques similaires. De plus, l'ECN-OCP induit efficacement un NPQcya dans les cellules de *Synechocystis* (Figure 21A et 21B) indiquant que, le groupement hydroxyle du 3'-hECN n'est pas essentiel à l'activité de l'OCP (**Punginelli et al, 2009**). Récemment, nous avons démontré que le groupement hydroxyle du 3'-hECN est important pour stabiliser l'attachement du caroténoïde aux OCPs d'*A. maxima* et d'*Anabaena* (**Bourcier de Carbon et al, 2015**). La ZEA-OCP n'est pas photo-active (Figure 21B) et n'induit aucun déclin de fluorescence sous forte illumination, même quand elle est présente en grande quantité dans les cellules (Figure 21A) (**Punginelli et al, 2009**).

Ces résultats soulignent que la présence du groupement carbonyle qui distingue l'ECN et le 3'-hECN de la ZEA, est essentielle pour la formation de l'OCPr et la fonction de l'OCP.



Figure 21 : Influence du caroténoïde sur l'activité de l'OCP.

A. Diminution de la fluorescence maximale (Fm) induite par une forte lumière bleue-verte (850 μ mol photon.m⁻².s⁻¹, 400-550 nm) dans les cellules du WT (carrés rouges), du mutant Δ crtR surexprimant l'OCP (cercles bleus) contenant en majorité de l'échinénone (ECN-OCP) et du mutant Δ crtO surexprimant l'OCP (losanges violets) contenant uniquement de la zéaxanthine (ZEA-OCP); Insertion : immuno-détection de l'OCP dans les fractions MP (chaque puits contient 0.5 μ g de Chl) des cellules du mutant surexprimant l'OCP et du WT.

B. Spectres d'absorbance à l'obscurité (noir) et à la lumière (rouge) de l'ECN-OCP (isolée de la souche Δ crtR surexprimant l'OCP, trait plein) et de la ZEA-OCP (isolée du mutant Δ crtO surexprimant l'OCP, ligne en pointillée). Les protéines ont été illuminées pendant 5 min par une lumière bleue-verte (1200 µmol photon.m⁻².s⁻¹) à 12°C. L'ECN-OCP est orange à l'obscurité (1) et rouge sous forte illumination (3) alors que la ZEA-OCP demeure jaune (2).

C. Biosynthèse des caroténoïdes [zéaxanthine (ZEA), échinénone (ECN), 3'-hydroxyechinénone (3'hECN) et cantaxanthine (CAN)] chez *Synechocystis*. *CrtR*: β -carotène hydroxylase (flèche rouge), *CrtO*: β -carotène monocétolase (flèche bleue).

La forme rouge est la forme active de l'OCP : la zéaxanthine ne peut pas remplacer le 3'-hECN ou l'ECN pour l'activité. Plus de détails dans Punginelli *et al.* (2009) et Wilson *et al.* (2011).



Figure 22 : Rôle des résidus Y201 et W288 du domaine C-terminal dans la photo-activité de l'OCP et la photoprotection.

A. Structure de l'OCP de *Synechocystis* (PDB 3MG1): liaisons hydrogènes entre le groupement carbonyle du caroténoïde (en orange) et W288 et Y201 dans le domaine C-terminal (turquoise). Les résidus F217 et 290 et M202 (en vert) sont également indiqués. Les chaînes latérales des résidus sont représentées par des bâtonnets gris ou verts avec l'oxygène en rouge, l'azote en bleu et le soufre en jaune.

B. Accumulation de l'OCPr sous lumière blanche (5000 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) (cercles) et à l'obscurité (carrés) à pH 12 et à 19°C.

C. (haut) Diminution de la fluorescence maximale (Fm) induite par une forte lumière bleue-verte (850 μ mol photon.m⁻².s⁻¹, 400-550 nm) et (bas) immuno-détection de l'OCP à partir des protéines totales (0.5 μ g de Chl) dans les cellules du WT (triangles noirs, 1) et des mutants Δ crtR surexprimant l'OCP (cercles rouges, 3), Y201H (carrés bleus, 4) et W288H (losanges verts, 2).

D et E. Spectres d'absorbance à l'obscurité (noir) et sous lumière blanche (5 min, 5000 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) (rouge) à 19°C des OCP isolées des souches dépourvues de zéaxanthine (Δ crtR) surexprimant les mutants Y201H (D) et W288H (E).

Les résidus Tyr201 et Trp288 sont essentiels pour la formation d'une OCP active rouge nécessaire pour le NPQcya. Plus de détails dans Wilson *et al.* (2011).

2.3.2. Rôle des tyrosines et des tryptophanes dans la photo-activité de l'OCP (*Wilson et al. BBA 2011*)

Dans les structures de l'OCP d'A. maxima et de Synechocystis, le 3'-hECN forme une liaison hydrogène, via son groupement céto, avec les acides aminés aromatiques conservés Tyr201 et Trp288 (Numérotation suivant l'OCP de Synechocystis; Figure 18B) du brin central du feuillet β du domaine C-terminal (Kerfeld et al. 2003; Wilson et al, 2010). Les distances des liaisons hydrogènes sont respectivement de 2,6 et 2,9 Å; le premier est une liaison hydrogène relativement courte. L'orientation de la Tyr201 semble être stabilisée par des interactions aromatiques avec les chaînes latérales de deux Phe conservées (résidus 217 et 290). Alors que, l'orientation du Trp288 peut être stabilisée par l'interaction avec le soufre de la Met202 (Kerfeld et al. 2003; Wilson et al, 2010) (Figure 22A). Des mesures de cinétiques de photo-conversion de l'OCP à différents pH suggéraient que la liaison hydrogène entre la Tyr201 et le groupement carbonyle du caroténoïde serait impliquée dans la photo-activité de l'OCP. Nous avons observé que, la conversion de l'OCPo en OCPr est environ huit fois plus rapide à pH 12 qu'à pH 8 ou 7 (Figure 22B et Wilson et al, 2011). Or, le pK de la Tyr est autour de 10, indiquant que, la déprotonation de la Tyr201 favoriserait la conversion de l'OCPo en OCPr. À pH 12, l'OCPo est si instable que l'OCPr s'accumule, même en l'absence de lumière. Nous avont déduit que dans l'OCPr, la liaison hydrogène entre la Tyr201 (et le Trp288) et le groupement carbonyle du caroténoïde est fragilisée ou brisée (Wilson et al, **2011**). Pour confirmer le rôle de la Tyr201 et du Trp288, nous avons muté ces acides aminés par une Ser, une His ou une Phe. La lumière bleue-verte est incapable d'induire un déclin de fluorescence dans les mutants de Synecocystis produisant ces OCPs mutées (Figure 22C). Le remplacement de la Tyr201 ou du Trp288 par une Ser, ou une His diminue l'affinité et/ou la stabilité du caroténoïde lié (Wilson et al, 2011). La concentration de l'OCP dans ces mutants est basse et seule une petite fraction peut être isolée; 50% à 70% des protéines isolées sont dépourvues de caroténoïdes (Figure 22C). Par ailleurs, l'attachement du caroténoïde n'est pas assez spécifique; en plus des céto-caroténoïdes (3'-hECN, ECN et CAN (contenant deux groupements carbonyles)), les protéines mutées lient principalement la ZEA (ou le ß-carotène dans les souches dépourvues de ZEA). Les protéines mutées Trp288 et Tyr201-OCPs liant l'ECN-(CAN) sont plus rouges que l'OCP WT, suggérant que les deux liaisons hydrogènes sont essentielles pour maintenir et stabiliser l'attachement du caroténoïde dans la forme orange (Figure 22D et 22E).

Pourtant, ces protéines rouges sont incapables d'induire un NPQcya. De plus, ces protéines ne sont pas photo-actives. Ces données supposent que les changements de conformation essentiels à une bonne interaction entre l'OCP et les PBS et à l'induction d'un mécanisme NPQcya sont partiellement inhibés, ou n'ont pas été induits par l'illumination dans ces mutants (**Wilson et al, 2011**).

Dans le domaine N-terminal de l'OCP, le groupement hydroxyle sur l'autre anneau du 3'-hECN est entouré par une molécule d'eau structurellement conservée et par des résidus aromatiques conservés: Trp41, Tyr44 et Trp110 (Figure 23A) (Wilson et al, 2010). Bien que la présence du groupement hydroxyle ne soit pas nécessaire à la photo-activité, l'interaction de l'anneau terminal du caroténoïde avec ces acides aminés est essentielle pour la formation et/ou la stabilisation de l'OCPr. La nature aromatique des Tyr44 et Trp110 est cruciale. En modifiant ces acides aminés par une Phe, nous n'affectons pas la photo-activité de l'OCP ni la photoprotection, y compris dans le double mutant Tyr44Phe/Trp110Phe. Toutefois, lorsqu'ils sont remplacés par une Ser, la photo-activité et le déclin de fluorescence disparaissent (Figures 23B, 23C, 23D, 23E et Wilson et al. 2008, 2010, 2011). Cependant, les mutations affectent différemment la photo-activité de l'OCP. La protéine W110Ser-OCP est photoinactive à des températures inférieurs à 25°C ; par contre, à des températures supérieures à 30°C, une forte lumière est capable de convertir la protéine mutée orange en une forme rouge (Figure 23D et Wilson et al, 2011). Par ailleurs, à cette température l'OCPr est relativement stable. Ainsi, la substitution du Trp110 par une Ser semble affecter la quantité d'énergie nécessaire pour la convertir en une forme rouge. Malgré que Synechocystis croisse à 32°C, aucune induction du mécanisme de photoprotection par Trp110Ser-OCP n'a été observée à cette température (Figure 23B), démontrant que cette forme rouge est incapable d'interagir correctement avec les PBS. Récemment, nous avons confirmé ce résultat par des expériences in vitro (M. Gwizdala, communication personnelle). En revanche, bien qu'in vitro la protéine Tyr44Ser-OCP ne soit pas photo-active entre 8 à 35°C, in vivo, elle peut induire un certain déclin de fluorescence avec une cinétique lente (Figure 23B et 23E, Wilson et al, 2011). Ainsi, la substitution de la Tyr44 par une Ser paraît déstabiliser la forme rouge, même si, dans la cellule, elle est partiellement stabilisée, peut-être par l'interaction avec les PBS ou d'autres protéines.

Ces résultats démontrent que les acides aminés Tyr44, Trp110, Tyr201 et Trp288 sont essentiels pour induire des changements de conformation décrits précédemment dans l'OCP essentiels pour la photoprotection : une OCPr stabilisée est primordiale pour le NPQcya.



Figure 23 : Rôle des résidus Y44 et W110 du domaine N-terminal dans la photo-activité de l'OCP et la photoprotection.

A. Structure de l'OCP de *Synechocystis* (PDB 3MG1) : interaction de Y44 et W110 avec l'anneau hydroxyle du caroténoïde (en orange) dans le domaine N-terminal (en violet). Les chaînes latérales des résidus sont représentées par des bâtonnets gris avec l'oxygène en rouge et l'azote en bleu.

B. (haut) Diminution de la fluorescence maximale (Fm) induite par une forte lumière bleue-verte (850 μ mol photon.m⁻².s⁻¹, 400-550 nm) et (bas) immuno-détection de l'OCP à partir des protéines totales (0.5 μ g de Chl) dans les cellules du WT (triangles, 1) et des mutants Δ crtR surexprimant l'OCP (triangles pleins, 2), W110S (cercles pleins, 4) et Y44S (carrés pleins, 3).

C à **E**. Spectres d'absorbance à l'obscurité (noir) et sous lumière blanche (5 min, 5000 µmol photon.m⁻².s⁻¹) (rouge) à 19°C des OCP isolées des souches dépourvues de zéaxanthine (Δ crtR) surexprimant les mutants W110F (C), W110S (D) et Y44S (E).

Les résidus Tyr44, Trp110 sont essentiels pour la stabilisation de l'OCPr. Plus de détails dans Wilson *et al.* (2011).



Figure 24 : Système de reconstitution in vitro: complexe OCP-PBS.

A. Augmentation de l'absorbance à 550 nm lors de l'illumination de l'OCP (DO_{495nm}= 0,35) sous lumière blanche (5 min, 5000 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) à 23°C et **B.** Diminution de la fluorescence maximale (Fm) induite par une forte lumière bleue-verte (1200 μ mol photon.m⁻².s⁻¹, 400-550 nm) dans les cellules de *Synechocystis* WT à différentes concentrations de K-phosphate : 0,8 M (cercles pleins), 0,7 M (carrés pleins), 0,6 M (triangles pleins), 0,5 M (cercles vides), 0,4 M (triangles vides) et 0,08 M (carrés vides).

C. Mesures avec un fluorimètre PAM du déclin de fluorescence des PBS (0,013 μ M) illuminés pendant 5 min par différentes intensités d'une lumière bleue-verte (400-500 nm) en absence d'OCP (carrés noirs, à 1285 μ mol photon.m⁻².s⁻¹), en présence d'un excès d'OCPo (0,53 μ M ; 40 OCP par PBS) à l'obscurité (losanges violets) ou à 90 (cercles bleus) ou 1285 (triangles verts) μ mol photon.m⁻².s⁻¹ et en présence d'un excès d'OCPr (obtenue après une illumination par une lumière blanche de 5000 μ mol photon.m⁻².s⁻¹ à 10°C) à l'obscurité (carrés rouges) ou à 1285 (triangles rouges) μ mol photon.m⁻².s⁻¹ dans 0,8 M phosphate.

D. Isolation des complexes OCP-PBS dans un gradient de saccharose (à droite) et composition protéique de la fraction bleue (en haut à gauche) contenant les complexes OCP-PBS pré-illuminés (WTL), OCP-PBS à l'obscurité (WTD) et Y44S-OCP-PBS pré-illuminés (Y44SL). Détection de l'OCP par western-blot (en bas à gauche). Chaque puits contient 5 μ M PBS.

Seule l'OCPr (dont l'accumulation est dépendante de la lumière et de la concentration de phosphate) est capable de se lier aux PBS. Plus de détails dans Gwizdala *et al.* (2011).

3. Etude des interactions OCP-phycobilisomes chez les cyanobactéries

3.1. Système de reconstitution *in vitro* : interaction de l'OCPr avec les phycobilisomes

(Ce chapitre se réfère à l'article **Gwizdala**, **Wilson et al**, **Plant Cell 2011** dont je suis le deuxième auteur. J'ai contribué à cet article en purifiant l'OCP et les complexes OCP-PBS par chromatographie sur colonne et en réalisant les cinétiques de conversion de l'OCP en présence de tampon phosphate.)

En 2011, nous avons développé un système de reconstitution *in vitro* du mécanisme de photoprotection associé à l'OCP, qui nous a fourni de nouvelles approches pour étudier l'interaction OCP-phycobilisome (Gwizdala et al, 2011). Ce système nous a permis d'observer un large déclin de la fluorescence des PBS lorsque des PBS isolés sont éclairés par une forte lumière blanche ou bleue-verte en présence d'un excès d'OCPo (Figure 24C, 25A et Gwizdala et al, 2011). Dans le système de reconstitution in vitro, une concentration élevée de phosphate (0,8 M ou plus) est nécessaire pour maintenir l'intégrité des PBS purifiés. Or, cette forte concentration de phosphate gêne spécifiquement l'accumulation de l'OCPr et inhibe fortement le NPQcya induit par une forte lumière bleue-verte (Gwizdala et al, 2011 et Figure 24A et 24B), ainsi que la récupération de la fluorescence à faible lumière dans des cellules de Synechocystis (Joshua et al, 2005). De ce fait, un excès d'OCP est nécessaire dans le système expérimental. Néanmoins, une concentration élevée de phosphate stabilise les complexes OCP-phycobilisomes (OCP-PBS) rendant cette interaction irréversible à 0,8 M phosphate. Cette stabilisation permet de ré-isoler par centrifugation sous gradient de sucrose des complexes OCP-PBS pré-illuminés et «quenchés». Ces complexes ont servi dans un grand nombre de travaux sur l'interaction OCP-PBS réalisés par notre laboratoire mais aussi par nos collaborateurs (Tian et al, 2012) et également par nos compétiteurs (Stadnichuk et al, 2012, 2013 ; Zhang et al, 2013). Ce système de reconstitution nous a permis de montrer clairement que les OCPs mutées, incapables de se photo-activer, n'induisent pas le mécanisme NPQcya parce qu'elles ne s'attachent pas aux PBS. Lorsque les PBS sont incubés sous illumination en présence de Tyr44Ser-OCP (non photo-active) ou à l'obscurité avec WT-OCP, les complexes OCP-PBS ré-isolés sont pleinement fluorescents et n'attachent pas d'OCPo. Ces expériences démontrent que seule l'OCPr est capable de se lier aux PBS (Figure 24D et Gwizdala et al, 2011).

Lorsque les PBS sont illuminés en présence d'OCPo, le taux et l'amplitude du déclin dépendent de l'intensité lumineuse car l'accumulation de l'OCPr dépend elle-même de l'intensité lumineuse. En revanche, si l'OCP est pré-convertie en OCPr, le déclin de fluorescence induit ne dépend pas de l'intensité lumineuse, et se produit même à l'obscurité, indiquant que la liaison de l'OCPr aux PBS est indépendante de la lumière (Figure 24C et **Gwizdala et al, 2011**). Ceci a également été observé *in vivo*, dans des cellules de *Synechocystis*, où l'induction du déclin de la fluorescence par une lumière intense pendant une brève période demeure plusieurs minutes après leurs transferts à l'obscurité (Gorbunov et al, 2011; Rakhimberdieva et al, 2011). Récemment, nous avons démontré qu'une fois liée aux PBS, l'OCPr est capable d'induire le déclin de la fluorescence de tout type de PBS, même ceux isolés à partir de souches dépourvues d'OCP. Ces données indiquent que la liaison de l'OCPr aux PBS est une étape déterminante pour l'induction du mécanisme de photoprotection (Jallet et al, 2014).

Le phycobilisome (PBS) composé de phycobiliprotéines associées à des chromophores et des polypeptides de liaison est constitué d'un cœur et de bras qui rayonnent autour. Dans *Synechocystis*, les bras sont formés par trois hexamères de phycocyanine (PC). Des expériences *in vivo*, utilisant des mutants de PBS ont suggéré que l'OCP se lie au cœur du PBS (Wilson et al, 2006 et Figure 13A). Nous avons confirmé par des expériences *in vitro* cette hypothèse. L'OCPr est capable d'éteindre la fluorescence du mutant de PBS dépourvu de bras (CK-PBS, contenant que le cœur). En revanche, aucune extinction de la fluorescence n'est observée lorsque le cœur est absent (Figure 25B, 25D, 25E et Gwizdala et al, 2011). Cependant, les complexes OCPr-CKPBS sont moins stables que les complexes OCPr-PBS, indiquant que la présence des bras stabilise la liaison de l'OCPr aux PBS (Gwizdala et al, 2011). Ceci explique l'observation d'un faible déclin de la fluorescence induit par une lumière bleue-verte dans les cellules de CK (Wilson et al, 2006). En revanche, la présence d'un seul hexamère de PC dans le mutant CB-PBS (Cœur plus bras contenant un hexamère de PC) est suffisante pour stabiliser cette liaison (Figure 25C et Gwizdala et al, 2011).



Figure 25 : Déclin de fluorescence induite par l'illumination des PBS en présence d'un excès d'OCP.

A. Photographie des PBS quenchés (à gauche) ou non (à droite), illuminés par une lumière blanche montrant la fluorescence émise par les échantillons. La couleur des PBS non quenchés provient de la fluorescence rouge de la PC et de l'APC.

B à **E** Spectres de fluorescence à température ambiante de PBS (0,013 μ M) non quenchés (trait noir) et quenchés (trait rouge) isolés à partir des cellules de *Synechocystis* WT (A), CB (B), CK (C) et Δ AB (D) et illuminés par une lumière blanche (5 min, 5000 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) en l'absence (trait noir) et en présence de l'OCP (0,53 μ M ; 40 OCP par PB) (trait rouge).

L'OCPr se lie au cœur du PBS. Plus de détails dans Gwizdala et al. (2011).



Figure 26 : Cœur du PBS : site du déclin d'énergie et de la fluorescence.

A. Représentation schématique de la projection orthogonale du cœur tri-cylindrique du PBS de *Synechocystis*. Le schéma est basé sur le modèle présenté par Arteni *et al* (2009). Le cylindre supérieur (noté A) ne contient que des trimères α APC- β APC émettants à 660 nm. Chacun des cylindres basaux (noté B), adjacent à la membrane, contient deux trimères émettant à 660 nm (3 α APC 3 β APC) et deux trimères émettant à 683 nm : 2 α APC 3 β APC ApcD et 2 α APC 2 β APC ApcF ApcE. Dans chaque cylindre, les 2 trimères externes contiennent une protéine de liaison de 8,7 kDa (ApcC).

B. Diminution de la fluorescence maximale (Fm) induite par une forte lumière bleue-verte (1400 μ mol photon.m⁻².s⁻¹, 400-550 nm) dans les cellules de *Synechocystis* WT (noir) et mutants Δ ApcD (bleu), Δ ApcF (vert), Δ ApcDF (violet) et ApcE-C190S (rouge).

C. Mesures du déclin de fluorescence des PBS (0,012 μ M) illuminés pendant 5 min par une lumière bleue-verte (400-500 nm, 900 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) en présence d'un excès d'OCPo (0,24 μ M ; 20 OCP par PBS) et isolés à partir des cellules de *Synechocystis* WT (noir) et mutants Δ ApcD (bleu), Δ ApcF (vert), Δ ApcDF (violet) et ApcE-C190S (PBS pré-illuminés) (rouge) dans 0,5 M phosphate.

ApcD, ApcF et ApcE ne sont pas nécessaires pour le mécanisme NPQcya. Plus de détails dans Jallet *et al.* (2012).

3.2. Cœur des phycobilisomes : site du déclin d'énergie et de la fluorescence

(Je n'ai pas participé aux travaux décrits dans ce chapitre. Je mentionne ces résultats pour leur importance dans l'élucidation du mécanisme NPQcya. Ces travaux ont été réalisés par d'autres membres de notre équipe (Jallet et al, 2012), mais aussi par nos collaborateurs (Tian et al. 2011, 2012, 2013))

Dans *Synechocystis*, le constituant majeur du cœur est l'allophycocyanine (APC). Le cœur est composé de trois cylindres, dont deux sont en contact avec les thylacoïdes, formés par quatre trimères d'APC. Les trimères du cylindre supérieur sont formés par trois hétérodimères α APC- β APC et présentent une émission de fluorescence maximale à 660 nm (APC660). Les 2 cylindres basaux contiennent chacun deux trimères d'APC660, et deux trimères d'APC émettant à 680 nm (APC680). Dans un trimère APC680, un α APC est remplacé par ApcD et dans l'autre, un β APC est remplacé par ApcF et un α APC par le domaine N-terminal de l'ApcE (ou Lcm). Chaque sous-unité contient le chromophore phycocyanobiline (ou biline). Dans chaque cylindre, les deux trimères externes sont stabilisés par un petit polypeptide de liaison de 8.7 kDa (ApcC ou Lc8) (Figure 26A). L'ApcE, essentiel pour la stabilisation du cœur des PBS, est aussi impliqué dans l'interaction entre les PBS et les thylacoïdes. ApcE est un des accepteurs finaux (émetteur terminal d'énergie) des PBS, qui transfère l'énergie lumineuse absorbée par les PBS à l'antenne chlorophyllienne et aux PSII et PSI (Mullineaux, 1992; Rakhimberdieva et al, 2001).

Une OCPr par PBS est suffisante pour éteindre la quasi-totalité de la fluorescence du PBS, indiquant que le site de liaison de l'OCPr est spécifique dans le cœur du PBS (**Gwizdala et al, 2011**). En se basant sur des méthodes spectroscopiques et sur l'analyse de mutants, il a été proposé que le premier site du déclin de la fluorescence et d'énergie est une biline émettant à 660 nm (Jallet et al, 2012; Tian et al, 2011, 2012, 2013). Quatre différents groupes de recherche, y compris, notre laboratoire ont clairement démontré qu'ApcD et ApcF ne sont pas nécessaires pour le mécanisme de NPQcya associé à l'OCP. Une forte lumière bleue-verte est capable d'induire un déclin de la fluorescence dans des mutants sans ApcD et /ou ApcF de *Synechocystis* (Figure 26B et Jallet et al, 2012; Stadnichuk et al, 2012 ; Kuzminov et al, 2014) ainsi que dans les cellules d'Anabaena PCC 7120 (Dong et al, 2008). De plus, des expériences de reconstitution *in vitro*, utilisant des PBS isolés à partir de ces mutants et du WT en présence de différentes concentrations d'OCP et de phosphate, montrent des cinétiques de déclin et de récupération de la fluorescence similaires (Figure 26C et Jallet et al, 2012).

Des mesures de cinétiques rapides d'extinction de fluorescence (de l'ordre du picoseconde) sur des cellules de Synechocystis (WT et surexprimant l'OCP) non ou pré-illuminées (Tian et al, 2011, 2013) et sur des complexes OCP-PBS ré-isolés (Tian et al, 2012), montrent que le déclin a lieu au niveau d'une biline émettant à 660 nm. Cependant, Kuzminov et al (2012) en utilisant un fluorimètre doté d'un laser non linéaire, ont proposé que l'OCP induit simultanément le déclin de la fluorescence d'une biline émettant à 660 nm, et d'une autre émettant à 680 nm attachée à la protéine ApcE. De plus, Stadnichuk et al, (2012) ont proposé que l'OCP interagit avec ApcE et éteint sa fluorescence. Pour étudier l'implication d'ApcE dans le mécanisme de NPQcya, Denis Jallet a construit un mutant dépourvu du chromophore attaché à ApcE car la délétion d'ApcE conduit à l'absence des PBS dans les cellules (Jallet et al, 2012). En remplaçant la Cys 190 qui lie la phycocyanobiline en Ser, l'ApcE muté lie de manière non covalente le chromophore inhabituel, probablement 3(Z)-phycocyanobiline, qui émet à 710 nm (Gindt et al, 1994). Dans les PBS isolés, ce chromophore se détache facilement lors d'une forte illumination par une lumière blanche (Jallet et al, 2012). L'illumination des PBS isolés du mutant ApcE-Cys190Ser en présence d'OCP montre un large déclin de fluorescence. De plus, les déclins de fluorescence dans les cellules du mutant ApcE-Cys190Ser et du WT sont identiques (Figure 26B, 26C et Jallet et al, 2012). Ces travaux révèlent que le chromophore phycocyanobiline, attaché à ApcE, n'est pas directement impliqué dans le mécanisme de NPQcya ou au moins qu'il n'est pas primordial. Ces résultats suggèrent qu'ApcE n'est également pas nécessaire pour le NPQcya.

3.3. Rôles essentiels de l'arginine 155 et du domaine N-terminal de l'OCP dans la liaison avec les phycobilisomes

3.3.1. Importance de la charge positive de l'arginine 155 (Arg155) dans l'interaction entre l'OCPr et les phycobilisomes

(Wilson et al, Plant Cell 2012)

Dans la structure de l'OCPo, la Glu244 et l'Arg155 qui sont à l'interface entre les domaines N- et C-terminaux, forment un pont salin qui stabilise l'interaction entre les deux domaines (Figure 27A; **Wilson et al, 2010**). L'Arg155 et la Glu244 forment aussi une liaison hydrogène avec une molécule d'eau conservée, cadenassant ainsi une petite région de la structure au sein de laquelle le caroténoïde est exposée au solvant. Les deux domaines de l'OCPo sont réunis par un long linker souple.

La rupture du pont salin, causée par la mutation de l'Arg155 ou de la Glu244, pourrait déstabiliser l'interaction entre les deux domaines, et éventuellement entraîner un mouvement relatif de l'un par rapport à l'autre. Huit molécules d'eau, structurellement conservées, peuvent également faciliter la rupture de cette interface. Nous avons étudié des mutants de *Synechocystis* où l'Arg155 de l'OCP a été mutée par une Leu (R155L), une Lys (R155K) ou une Glu (R155E) et la Glu244 par une Leu (E244L).

Les OCPs mutées R155L, R155K, R155E et E244L sont photo-actives et leurs spectres d'absorption de la forme active sont similaires à celle de l'OCPr-WT (Figure 27B et 27C). Des mesures de FTIR de l'OCPr du WT et des mutants montrent des similitudes dans les changements de conformation de la protéine, induits par une forte lumière bleue-verte. Ces données indiquent que des changements structurels identiques ont été induits dans le caroténoïde (et la protéine) de l'OCP WT et des mutants. Cependant, une forte lumière bleueverte est incapable d'induire un déclin de la fluorescence dans les mutants R155L et R155E de Synechocystis (Figure 28A et Wilson et al, 2012). In vitro, les formes rouges des mutants R155L, R155E et E244L s'accumulent plus rapidement et sont plus stables que l'OCPr-WT, démontrant l'importance de l'interaction électrostatique entre les deux domaines dans la stabilisation de l'OCPo (Figure 27C et 27D). Nous pouvons aussi déduire de ces résultats que l'OCPr a une une structure plus ouverte causée par la fragilisation ou l'absence d'interaction entre les deux domaines (Wilson et al, 2012). Dans la structure de la forme orange du mutant R155L-OCP résolue à 1,7 Å (PDB ID: 3MG3), nous n'avons observé aucune différence dans la disposition des deux domaines par rapport à la structure du WT. Une molécule de glycérol occupe l'espace laissé vacant par la chaîne latérale de l'Arg et forme une liaison hydrogène avec la Glu244 (Wilson et al, 2010).

Nous avons utilisé le système de reconstitution *in vitro* pour déterminer quel domaine de l'OCP interagit avec le PBS. Lorsque la Glu244 (dans le domaine C-terminal) est mutée par une Leu, la liaison de l'E244L-OCP aux PBS est similaire à celle du WT-OCP, indiquant que cet acide aminé n'est pas directement impliqué dans l'interaction (Figure 28B et **Wilson et al, 2012**). En revanche, les mutations de l'Arg155 affectent de manière significative l'interaction avec les PBS (**Wilson et al, 2010**, **Wilson et al, 2012**). Le remplacement de la charge positive de l'Arg par un acide aminé neutre (R155L-OCP) diminue la stabilité de la liaison de l'OCPr aux PBS. Alors que le remplacement par une charge négative (R155E-OCP) abolit presque complètement l'interaction avec les PBS (Figure 28B).



Figure 27 : Importance du pont salin entre l'Arg155 et la Glu244 dans la photoactivation et la stabilité de l'OCP.

A. Structure de l'OCP de *Synechocystis* (PDB 3MG1) : gros plan sur l'interface centrale entre les 2 domaines de l'OCP et le pont salin entre R155 dans le domaine N-terminal (en violet) et E244 dans le domaine C-terminal (en turquoise). Le caroténoïde est représenté avec des bâtonnets orange. Les chaînes latérales des résidus sont représentées par des bâtonnets gris avec l'oxygène en rouge et l'azote en bleu. Des molécules d'eau conservées sont indiquées sous forme de sphères jaunes.

B et C. Spectres d'absorbance à l'obscurité (noir) et sous lumière blanche (5 min, 5000 µmol photon.m⁻².s⁻¹) (rouge) à 19°C des OCPs isolées des souches dépourvues de zéaxanthine (Δ crtR) surexprimant les mutants R155L/K/E (B) et E244L (C).

D et E. (D) Photo-conversion sous lumière blanche (5 min, 5000 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) et Reconversion à l'obscurité (E) à 19°C des OCPs isolées du WT (noir) et des mutants E244L (losanges violets), R155L (carrés rouges), R155K (ronds bleus) et R155E (carrés verts) dans 40 mM Tris-HCl pH 8.0.

L'absence d'une liaison hydrogène entre l'Arg 155 et la Glu244 déstabilise l'OCPo et favorise l'accumulation et la stabilisation de l'OCPr. Plus de détails dans Wilson *et al.* (2012).

Lorsque nous conservons la charge positive de l'Arg155, en le mutant par une Lys (R155K-OCP), un effet relativement faible sur le déclin de la fluorescence est observé. Ceci suggère que la charge positive de l'Arg 155 est importante pour la liaison de l'OCPr aux PBS (**Wilson et al, 2012**). Globalement, ces résultats montrent que la charge positive de l'Arg155 est indispensable pour l'attachement de l'OCP aux PBS et, que le domaine N-terminal, comprenant l'Arg 155 est directement impliqué dans la liaison de l'OCPr au cœur du PBS.



Figure 28 : Effets de l'absence du pont salin entre Arg155 et Glu244 sur le déclin de la fluorescence et l'interaction de l'OCPr aux PBS.

A. Diminution de la fluorescence maximale (Fm) induite par une forte lumière bleue-verte (1950 μ mol photon.m⁻².s⁻¹, 400-550 nm) et immuno-détection de l'OCP à partir de fractions MP (0.5 μ g de Chl) dans les cellules du WT (1) et des mutants Δ crtR surexprimant l'OCP (triangles noirs, 2), E244L (losanges violets, 3), R155L (carrés rouges, 4), R155K (ronds bleus, 5) et R155E (carrés verts, 6).

B. (haut) Mesures du déclin de fluorescence des PBS (0,013 μ M) illuminés pendant 5 min par une lumière bleue-verte (400-500 nm, 900 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) et (bas) Composition protéique de la fraction bleue obtenue dans un gradient de saccharose après illumination des PBS en présence d'un excès d'OCPr (0,53 μ M ; 40 OCP par PBS) isolées du WT (noir) et des mutants E244L (losanges violets), R155L (carrés rouges), R155K (ronds bleus) et R155E (carrés verts) dans 0,5 M phosphate. L'OCPr est obtenue après une illumination par une lumière blanche de 5000 μ mol photon.m⁻².s⁻¹ à 10°C.

La charge positive de l'Arg155 est essentielle pour l'attachement de l'OCPr aux PBS. Plus de détails dans Wilson *et al* (2012).

3.3.2. Rôles des domaines N- et C- terminaux de l'OCP dans le mécanisme de photoprotection

(Je n'ai pas participé aux travaux décrits dans ce chapitre. Ils sont mentionnés pour leur importance dans l'élucidation du mécanisme de NPQcya.)

L'implication du domaine N-terminal dans l'interaction, entre l'OCPr et les PBS a été confirmée par les travaux de nos collaborateurs avec une contribution minime de notre laboratoire (Leverenz, Jallet et al, 2014). Pour ces expériences, l'OCP isolée à partir de la cyanobactérie A. maxima a été traitée par la trypsine et les fragments obtenus, liant ou non un caroténoïde ont été caractérisés. La protéolyse de l'OCPr par la trypsine a donné deux fragments de 18 et 14 kDa qui correspondent respectivement au domaine N-terminal et au domaine C-terminal. Les fragments ont en grande partie conservé leurs structures secondaires, et le caroténoïde reste fixé au fragment de 18 kDa qui apparaît rouge (nommé Red Carotenoid Protein, RCP). Le spectre d'absorption visible de la RCP isolée est presque identique à celle de l'OCPr photo-produite (Figure 29A) (avec une absorbance maximale à 510 nm pour l'OCPr et 507 nm pour la RCP). Nous avons suggéré que la position du caroténoïde et son interaction avec la protéine peuvent être la même dans la RCP et l'OCPr (Leverenz et al, 2014). La structure moléculaire du caroténoïde (3'-hECN) de la RCP a aussi été caractérisée par spectroscopie Raman (Figure 29B). Les spectres Raman de la RCP et de l'OCPr sont presque identiques. Même en l'absence du domaine C-terminal, le 3'-hECN de la RCP se trouve dans une configuration relativement plane et trans (Leverenz et al, 2014).

Lorsque les PBS isolés sont incubés en présence de la RCP, un large déclin de la fluorescence des PBS est observé à l'obscurité et sous illumination. Cette observation montre que le domaine N-terminal (NTD) de l'OCP est suffisant pour induire le mécanisme de photoprotection. Le NTD ou RCP est constitutivement actif (Figure 29C et Leverenz et al, 2014). Le domaine C-terminal (CTD) de l'OCP n'est absolument pas nécessaire pour la liaison de l'OCPr aux PBS ou pour le mécanisme de NPQcya. En revanche, le rôle principal du CTD de l'OCP est de réguler l'activité du NTD. Dans l'OCPo, le CTD protège la face du NTD comprenant l'Arg155 et empêche le NTD d'interagir avec les PBS. Sous illumination, des changements structurels impliquant le domaine C-terminal vont contribuer à l'ouverture de l'OCPr.



Figure 29 : L'OCP est une protéine modulaire avec des domaines ayant des rôles fonctionnels spécifiques.

A. Spectres d'absorbance de l'OCPo (noir), l'OCPr (rouge), la fraction 17.5 kD RCP (ligne en pointillée violet) et de la fraction 14 kD CTD (bleue) *d'Arthrospira platensis*. Dans l'insert: photographie de l'OCPo, l'OCPr et de la RCP.

B. Spectre de Résonance Raman de l'OCP^o (noir), l'OCP^r (rouge) et de la RCP (violet) dans une gamme de 1740 à 820 cm⁻¹.

C. Mesures du déclin de fluorescence des PBS (0,012 μ M) illuminés pendant 5 min par une lumière bleue-verte (400-500 nm, 900 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) en présence d'un excès d'OCPr (0,48 μ M ; 40 OCP par PBS) (rouge) et de la RCP (0,24 μ M ; 20 RCP par PBS) (bleue) dans 0,8 M phosphate. L'OCPr est obtenue après une illumination par une lumière blanche de 5000 μ mol photon.m⁻².s⁻¹ à 10°C.

Le domaine N-terminal de l'OCP est suffisant pour induire le mécanisme de NPQcya. Plus de détails dans Leverenz *et al.* (2014) Un modèle sur la façon dont une intense lumière pourrait déclencher le processus de photoprotection a émergé. Il apparaît que dans l'OCPo, la présence du pont salin entre l'Arg155 et la Glu244 stabilise une conformation «fermée» et empêche la liaison de l'OCPo aux PBS (Figure 30). Les fortes intensités lumineuses induisent des changements de conformation dans le caroténoïde (et la protéine), qui provoqueraient la rupture du pont salin R155-E244. Cette rupture permettrait ainsi de séparer les deux domaines, et d'exposer la surface du NTD, y compris l'Arg155, afin que le NTD puisse interagir avec les bilines du cœur du PBS.



Figure 30 : Modèle schématique du mécanisme de NPQcya et le rôle de l'OCP.

À l'obscurité et sous faible lumière, l'OCP est principalement sous la forme orange (OCPo) et elle n'est pas (ou faiblement) attachée au PBS (1). L'absorption d'une forte lumière bleue-verte induit des changements conformationnels dans le caroténoïde et la protéine convertissant l'OCPo en une forme active rouge (OCPr) (2). L'OCPr se lie à l'un des cylindres basaux du cœur du PBS par l'intermédiaire de son domaine N-terminal, induisant un déclin de la fluorescence et de l'énergie transférée aux centres réactionnels et une augmentation de la dissipation de l'excès d'énergie sous forme de chaleur (3). Plus de détails dans Kirilovsky (2015).

3.4. Site de fixation de l'OCP dans le cœur du phycobilisome

Des membres de notre équipe ont démontré que le cylindre supérieur n'est pas indispensable pour la liaison de l'OCPr aux PBS. L'OCPr est capable d'éteindre la fluorescence des PBS de la cyanobactérie Synechococcus PCC 7942, qui ne contient que deux cylindres basaux (Jallet et al, 2014). Ceci indique que l'OCPr se lie uniquement au cœur du PBS, au niveau d'un des cylindres basaux. Plusieurs modèles d'interaction OCP-PBS ont été présentés. Des expériences de cross-linking, réalisées sur des complexes OCP-PBS préilluminés et ré-isolés par Zhang et al (2014), suggèrent que le NTD se fixe sur un des cylindres basaux, entre une biline émettant à 660 nm et une autre émettant à 680 nm (attachée à ApcE). De ce fait, le caroténoïde (3'-hECN) se retrouve à proximité (26 Å) d'une biline émettant à 660 nm. Cependant, Stadnichuk et al (2012, 2015) ont proposé que l'OCP interagit directement avec ApcE. Or, Jallet et al (2012) en utilisant un mutant d'ApcE ont établi que l'absence du chromophore d'ApcE n'affecte pas le déclin de la fluorescence. Par ailleurs, Jallet et al (2012) et Kuzminov et al (2014) ont démontré que les simples et doubles mutants sans ApcD et /ou ApcF présentent un mécanisme de NPQcya. Ces résultats ont amené à la conclusion que le site d'interaction de l'OCPr se trouve au niveau d'une biline émettant à 660 nm.

Des travaux de nos collaborateurs avec une contribution de notre laboratoire (Harris,... Wilson et al, PNAS 2016) ont montré que seuls les résidus (Lys167 et 170, Arg171 et 185) situés dans le linker (reliant les domaines N- et C-terminaux) et un unique résidu du CTD (Lys249) de l'OCP forment des «cross-links» avec des protéines du PBS. Trois de ces résidus ont également été identifiés par Zhang et al (2014). Dans cette précédente étude, les résidus de l'OCP interagissaient uniquement avec ApcB (deux résidus) et ApcE (un résidu). Dans notre étude, l'OCP interagit fortement avec ApcB (cinq résidus), ApcC (trois résidus), ainsi qu'avec les composants du bras du PBS, CpcG (quatre résidus) et CpcB (un résidu). Ces données confirment que la présence du bras stabilise la liaison de l'OCPr aux PBS (Figure 26 et Gwizdala et al, 2011). Un modèle du site de fixation de l'OCP, différent des précédents, a été proposé (Figure 31A). Le NTD de l'OCPr est complètement enfoui dans le PBS entre le trimère terminal (comprenant ApcD) et le second trimère (incluant le monomère ApcEF) d'un des cylindres basaux, alors que le CTD reste à l'extérieur du complexe (Harris et al, 2016). Cette intercalation induit une séparation du trimère terminal du second, et un déplacement du petit polypeptide de liaison, ApcC, dans la cavité du cylindre, stabilisant ainsi l'interaction entre l'OCPr et le PBS.

Ceci est confirmé par un mutant \triangle ApcC, où la diminution de la fluorescence est lente et faible, en l'absence d'ApcC, suggérant un faible attachement de l'OCP au PBS dans ce mutant (Figure 31B et 31C et **Harris et al, 2016**).

L'intercalation du NTD entre les deux trimères rapproche le caroténoïde (3'-hECN) de l'OCPr à moins de 5-10 Å des bilines. Par conséquent, l'interaction entre la charge positive de l'Arg155 du NTD et les charges négatives autour d'une des bilines (émettant à 660 nm) du cœur du PBS permettrait une étroite interaction entre le 3'-hECN et la biline. Cela dissiperait ainsi l'excès d'énergie absorbée par les PBS, soit par transfert de charge entre la biline et le 3'-hECN de l'OCPr (Tian et al 2011, 2012), ou via un transfert d'énergie de l'état excité de la biline aux états excités du 3'-hECN dans l'OCPr (**Bererra et al, 2012**). Mais ce point reste en discussion (voir discussion et perspectives).





A. Modèle schématique du complexe OCP-PBS montrant un seul cylindre basal composé de quatre trimères. Les deux derniers trimères ont été séparés par l'intercalation du domaine N-terminal de l'OCP (rouge), relié par un linker souple (ligne noire) au domaine C-terminal (orange foncé) qui est suspendu à l'extérieur du cylindre. En raison du changement dans la structure du cylindre, ApcC (orange clair) se retrouve hors du trimère terminal, dans l'espace à proximité du second trimère, interagissant ainsi avec le domaine N-terminal et éventuellement avec ApcF (bleu clair). Un disque unique du bras est représenté (CpcA et CpcB en rose et rouge, respectivement) avec une protéine de liaison CpcG (noir) faisant saillie vers le cylindre.

B et C. Mesures du déclin de fluorescence des PBS (B) et des CK (C) isolés des cellules du WT (rouge) et du mutant Δ ApcC (bleu) dans 0.5M (B) et 0.8M (C) phosphate. Les PBS (0,012 µM) sont illuminés pendant 5 min par une lumière bleue-verte (400-500 nm, 900 µmol photon.m⁻².s⁻¹) en présence d'un excès d'OCPo (0,48 µM ; 40 OCP par PBS).

Le domaine N-terminal s'intercale entre les deux trimères externes et induit le déplacement d'ApcC dont la délétion affaiblit l'interaction entre l'OCPr et le PBS in vitro. Plus de détails dans Harris *et al.* (2016)
4. Récupération de la fluorescence de l'antenne : Rôle de la Fluoresence Recovery Protein (FRP)

4.1. Mécanisme de la FRP

(Ce chapitre se réfère à l'article **Boulay**, **Wilson et al**, **PNAS 2010** dont je suis le deuxième auteur. Ma contribution à ce travail a été de construire la souche de délétion de la FRP dans *Synechocystis*, et d'exprimer dans *E. coli* la FRP "courte" et de réaliser les cinétiques de reconversion de l'OCPr en OCPo en présence de la FRP.)

In vitro, l'OCPr forme un complexe stable avec le PBS, et cette liaison est quasiment irréversible (**Gwizdala et al, 2011**). Cependant, *in vivo*, lorsque des cellules illuminées sont transférées à l'obscurité ou dans la pénombre, elles récupèrent la totalité de leurs fluorescences (et la capacité complète de l'antenne) dans les minutes suivantes (El Bissati et al, 2000; **Wilson et al, 2006**; Rakhimberdieva et al, 2007a, b). Ceci suggère le détachement de l'OCPr du phycobilisome ainsi que sa reconversion en OCPo. Nous avons montré que la récupération de la fluorescence *in vivo* requiert une autre protéine. Lorsque la souche de *Synechocystis* délétée du gène *slr1964* est exposée à une forte lumière puis transférée à l'obscurité (ou à une faible intensité lumineuse), une récupération partielle de la fluorescence (seulement 20 à 30% de la perte de fluorescence est récupérée) est observée (Figure 32A et **Boulay et al, 2010**). Le gène *slr1964* code une protéine de 13 kDa soluble dans l'eau et qui ne renferme aucun chromophore. Nous l'avons nommée la Fluorescence Recovery Protein (FRP) (**Boulay et al, 2010**).

Dans la cellule, la FRP est localisée comme l'OCP au niveau des membranes thylacoïdiennes liant des PBS (dans la région cytoplasmique inter-thylacoïdienne) (Figure 32B et **Boulay et al, 2010**). Pour élucider une possible interaction entre l'OCP et la FRP, nous avons développé des expériences de co-immunoprécipitation. Nous avons observé que l'OCP ne co-précipite qu'avec la FRP lorsque l'expérience est réalisée sous forte illumination, mais presque pas à l'obscurité. (Figure 32C et **Boulay et al, 2010**). Cela démontre que la FRP interagit principalement avec l'OCPr.

In vitro, l'OCPr est spontanément reconvertie en OCPo à l'obscurité. Or, la présence de la FRP accélère considérablement la reconversion de l'OCPr en OCPo (**Boulay et al, 2010**). Les cinétiques de reconversion (OCPr en OCPo) montrent une grande dépendance à la température en absence de la FRP, avec un temps de demi-vie de plus d'une heure à 8°C et d'environ 120 secondes (s) à 18°C. En revanche, le temps de demi-vie est réduit en présence de la FRP : environ 110s à 8°C et autour de 5s à 18°C (pour un ratio d'une FRP par 2 OCPs) (Figure 32D et **Boulay et al, 2010**). *In vitro*, l'ajout de la FRP aux complexes OCP-PBS pré-illuminés et «quenchés» accélère la récupération de la fluorescence et le détachement de l'OCPr du PBS à l'obscurité (Figure 32E et **Gwizdala et al, 2011**). Nous avons ainsi confirmé que le rôle de la FRP est de contribuer au détachement de l'OCPr du PBS, et d'accélérer la reconversion de l'OCPr en OCPo. Le mécanisme de photoprotection est alors désactivé (**Boulay et al, 2010** ; **Gwizdala et al, 2011**).

4.2. Régulation de l'expression de la FRP

(Ce chapitre se réfère aux articles **Boulay**, **Wilson et al**, **PNAS 2010** et **Gwizdala**, **Wilson et al**, **BBA 2013** dont je suis le deuxième auteur. Dans ce dernier article, j'ai participé à la construction des mutants de la FRP dans *Synechocystis* et à la réalisation de gels de protéines.)

Dans *Synechocystis*, la FRP est codée par le gène *slr1964* adjacent au gène *slr1963* codant l'OCP. Les homologues de ce gène sont présents dans la plupart des souches contenant l'OCP (Figure 16), mais pas dans tous (par exemple *Anabaena cylindrica* PCC 7122). Le peu de génomes comportant plus de deux ou trois copies du gène *ocp* (*Pleurocapsa* PCC 7319, *Calothrix* PCC 6303) ne renferment qu'une copie de gène codant la FRP. Dans les cyanobactéries d'eau douce, le gène *frp* se trouve immédiatement en aval du gène *ocp*. En revanche, dans les cyanobactéries marines, un gène codant le β -carotène cétolase les sépare (Figure 33A et **Boulay et al, 2010**). Les homologues de la FRP se trouvent presque exclusivement dans les cyanobactéries. Cependant, des homologues (par exemple des protéines de taille similaire avec 35-40% d'identité de séquences avec la FRP) sont trouvés dans quelques génomes bactériens, tel que celui de *Mesorhizobium ciceri bv biserrulae* WSM1271. Ce gène (*Mesci_2682*) fait partie d'un groupe de gènes codant plusieurs transporteurs.



Figure 32 : Récupération de la fluorescence de l'antenne : Rôle de la Fluoresence Recovery Protein (FRP).

A. Diminution de la fluorescence maximale (Fm) induite par une forte lumière bleue-verte (740 μ mol photon.m⁻².s⁻¹, 400-550 nm) suivie par une incubation à faible intensité (80 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) pour la récupération du niveau maximum de fluorescence dans les cellules du WT (ronds noirs) et du mutant Δ slr1964 (carrés rouges).

B. Immuno-détection de la FRP à partir des protéines totales (cell), dans les fractions membranephycobilisome (MP), membrane (M) et soluble (sol) de cellules du mutant surexprimant la FRP.

C. Immuno-détection de l'OCP dans des expériences de co-immunoprécipitation où les protéines fixées à l'obscurité (dark) et sous forte illumination (light, 3000 µmol photon.m⁻².s⁻¹) sur des billes de Sepharose via les anticorps anti-FRP ont été éluées et séparées par gel SDS-PAGE. Un contrôle (sans anticorps anti-FRP) réalisé sous forte illumination est également montré.

D. Reconversion à l'obscurité de l'OCPr en OCPo (2.3 μ M) en absence (cercles rouges) et en présence de 2.3 μ M (carrés bleus) ou 1.15 μ M (triangles bleus) de FRP à 8°C.

E. Mesures de la récupération de fluorescence des PBS (0,013 μ M) illuminés pendant 5 min par une lumière bleue-verte (400-500 nm, 870 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) en présence d'OCP (0,53 μ M) suivie par une incubation à l'obscurité en absence et en présence de la FRP (16 mM) dans 0.5 M phosphate. Insertion: immuno-détection de l'OCP dans les complexes OCP-PBS pré-illuminés (qPB) et incubés ensuite à l'obscurité en absence (D) et en présence de la FRP (D+FRP).

La FRP contribue au détachement de l'OCPr du PBS et accélère la reconversion de l'OCPr en OCPo. Plus de détails dans Boulay *et al.* (2010) et Gwizdala *et al.* (2011).

Des expériences de transcription inverse (reverse transcription, RT en anglais), nous ont permis de démontrer que le gène slr1964 (frp) peut être exprimé indépendamment du gène slr1963 (ocp) grâce à la présence de deux promoteurs dictints. Cependant, un long ARNm a été détecté dans une souche, surexprimant les gènes slr1963 (ocp) et slr1964 (frp), sous la régulation d'un puissant promoteur psbA2, suggérant que les deux gènes peuvent aussi être co-transcrits (**Boulay et al, 2010**). Cependant, en modélisant de potentielles structures secondaires d'ARN présentes entre les phases ouvertes de lecture (Open Reading Frame ou ORF en anglais) des gènes ocp et frp, nous avons identifié la présence d'une forte terminaison de transcription entre ces deux gènes. Ces données sous-entendent qu'une possible co-transcription des deux gènes dans les cellules de *Synechocystis* WT est improbable. Nous avons destabilisé la structure secondaire en introduisant une étiquette 6xHis entre les deux gènes (sous le contrôle du promoteur psbA2), obtenant ainsi un long ARNm (**Gwizdala et al, 2013**).

La synthèse de l'OCP et de la FRP doit être strictement régulée afin d'obtenir un ratio OCP par FRP élevé dans des conditions où la photoprotection est nécessaire. Dans le mutant surexprimant la FRP, nous avons détecté une grande quantité de FRP et aucun déclin de fluorescence n'a été induit par une forte lumière bleue-verte (Figure 33C et Gwizdala et al, 2013). Une concentration élevée de FRP empêche l'accumulation de l'OCPr essentielle pour le mécanisme de NPQcya. In vitro, lorque les PBS sont illuminés en présence de l'OCP et de la FRP, le déclin de la fluorescence des PBS est en grande partie inhibé. Une FRP par OCPr est suffisante pour inhiber complètement le déclin de la fluorescence (Figure 33D et Gwizdala et al, 2011), démontrant que la quantité de FRP dans les cellules doit être inférieure à celle de l'OCP pour maintenir un bon niveau de photoprotection. L'ensemble des analyses de transcrits (Ludwig et al, 2011, 2012; Singh et al, 2009; Straub et al, 2011) confirment que l'expression des deux gènes est inversement corrélée. Dans les conditions où l'OCP est hautement exprimée (stress salin, CO₂, limitations en nutriments, transitions de faible à forte lumière, y compris les cycles diurnes), l'expression de la FRP est basse. Ainsi, l'amplitude du mécanisme de photoprotection serait non seulement régulée par la concentration de l'OCP, mais aussi par celle de la FRP.



Figure 33 : Régulation de l'expression de la FRP.

A. Arrangement des gènes *slr1963* (OCP) et *slr1964* (FRP) dans les cyanobactéries d'eau douce et marines.

B et C. Les gènes *ocp* et *frp* peuvent être exprimés indépendamment ou co-transcrits. (B) Dans le mutant $\triangle OCP$, l'ARNm *frp* (1) est présent tandis que l'ARNm *ocp* est absent (2); (C) Dans la souche surexprimant l'OCP/N-terHis FRP, les ARNm contenant le gène *ocp* et au moins les 30 premiers nucléotides du gène *frp* (6), ou la moitié du gène *frp* (7), ou la totalité (piste 8) du gène *frp* ont été détectés.

D. Diminution de la fluorescence maximale (Fm) induite par une forte lumière bleue-verte (870 μ mol photon.m⁻².s⁻¹, 400-550 nm) dans les cellules du WT (triangles) et du mutant surexprimant la FRP "longue" (OHL, carrés) ou la FRP "courte" (OSH, cercles).

E. Des PBS (0,013 μ M) sont illuminés pendant 5 min par une lumière bleue-verte (400-500 nm, 870 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) en présence d'OCP (0,53 μ M) et de différentes concentrations de FRP dans 0.5 M phosphate: 0,85 mM (cercles ouverts), 0.425 mM (carrés ouverts), 0,21 mM (cercles fermés), 0,085 mM (triangles) et 0,0425 mM (carrés pleins) ou en l'absence de FRP (trait plein). Le rapport FRP/OCP va de 1,6 à 0,08.

L'amplitude du mécanisme de photoprotection est non seulement régulée par la concentration de l'OCP, mais aussi par celle de la FRP. Plus de détails dans Boulay *et al.* (2010) et Gwizdala *et al.* (2011 et 2013).

4.3. Structure de la FRP

(Ce chapitre se réfère à l'article **Sutter, Wilson et al, PNAS 2013** dont je suis le deuxième auteur. Dans cet article, j'ai construit et exprimé dans *E. coli* des mutants de la FRP (W9L, W50L, H53L et R60L) et j'ai également réalisé des cinétiques de reconversion de l'OCPr en OCPo en présence des FRP mutées).

Dans Cyanobase, la FRP de Synechocystis renferme une extension N-terminale d'environ 22-25 acides aminés, comparée aux autres FRPs cyanobactériennes. Cette séquence supplémentaire contient quatre codons ATG ou GTG codant quatre méthionines (Met). Le premier codon GTG était considéré comme la première Met (numérotation suivant Cyanobase.org) de la FRP mais la quatrième Met (Met 26) coïncide avec la première Met de la plupart des homologues de la FRP. Nous avons construit un mutant de Synechocystis surexprimant la FRP à partir de la Met1 (nommée FRP "longue"). Cette souche produit une quantité relativement élevée de FRP "longue" active, mais toutes les tentatives pour l'isoler ont échoué (Boulay et al, 2010). La FRP "longue" reste fortement attachée à la membrane, et le détergent utilisé pour l'isoler affecte son activité. Lorsque la FRP "longue" est surexprimée dans E. coli, elle est isolée sous forme de corps d'inclusions. En revanche, la surexpression de la FRP "courte" à partir de la Met26 dans E. coli ou Synechocystis, nous a permis d'isoler une protéine soluble ayant une faible interaction avec les thylacoïdes, et plus active que la FRP "longue" (Boulay et al, 2010; Gwizdala et al, 2013). L'étude des différents mutants de la FRP, nous a permis de conclure qu'in vivo, la forme active est la FRP "courte". Lorsque le gène codant la FRP est sous son propre promoteur, la FRP commence à partir de la Met26 et non pas à la Met1 (identifiée dans Cyanobase) (Gwizdala et al, 2013).

Nous avons récemment déterminé la structure de la FRP "courte" à 2,7 Å en collaboration avec le groupe de Kerfeld (PDB ID: 4JDX, **Sutter et al, 2013**). Sa structure secondaire se compose uniquement d'hélices α organisés en un domaine N-terminal allongé (résidus 1-65), suivie par une partie C-terminale globulaire (résidus 66-109) (Figure 34A). Sa structure tertiaire semble être unique car il n'y a pas de structures homologues dans la base de données Protein Data Bank (PDB) (**Sutter et al, 2013**). La FRP est présente sous deux formes oligomériques différentes dans le cristal : une forme dimérique prédominante en solution lors de l'isolement de la FRP, et une forme tétramérique (**Sutter et al, 2013**).

Sur la base de dosages d'activité, nous avons proposé que le dimère est la forme active de la FRP, et que le tétramère pourrait être une forme inactive (Sutter et al, 2013). Nous avons identifié des acides aminés 100% conservés (Trp50, Asp54, His53 et Arg60), exposés sur une surface du dimère de la FRP. Ils forment un réseau complexe de liaisons hydrogènes entre les deux monomères et stabilisent le dimère (Figure 34B). La mutation de ces acides aminés affecte l'activité de la FRP indiquant que cette région pourrait être le site actif de la FRP. Nous avons observé un effet drastique en mutant l'Arg60. Une perte complète de la fonction de la FRP est induite même lorsque l'Arg60 est substituée par une lysine (ayant une charge positive). L'Arg60 jouerait un rôle central dans l'activité de la FRP (Figure 34C). L'orientation exacte de la charge positive de l'Arg60 par rapport à l'OCPr est fondamentale pour l'activité de la FRP, mais la distance intermoléculaire entre la FRP et l'OCPr est aussi critique. Les mutations de l'Asp54, du Trp50 et de l'His53 altèrent aussi la capacité de la FRP à accélérer la reconversion de l'OCPr en OCPo (Figure 34C et Sutter et al, 2013). Le Trp50 et l'Asp54 sont importants dans la stabilisation de la FRP, car elles interagissent avec l'Arg60 (cations- π avec le Trp50 et pont salin avec l'Asp54). Ces acides aminés essentiels pour l'activité de la FRP ne sont pas exposés dans le tétramère.

L'analyse des simulations d'interactions OCP-FRP et les expériences de coimmunoprécipitation nous ont permis de montrer que la FRP interagit spécifiquement avec le domaine C-terminal (mais pas avec le domaine N-terminal) de l'OCP (Figure 34D et **Sutter et al, 2013**). Le domaine C-terminal aurait un rôle dans la désactivation du mécanisme de photoprotection. La liaison de la FRP au domaine C-terminal de l'OCPr va restaurer la conformation fermée, et inactive de l'OCPo. Le changement de conformation qui en découle pourrait provoquer la dissociation de la FRP. Ces résultats soulignent également que les deux domaines de l'OCP ont différents rôles dans le mécanisme de photoprotection.



Figure 34 : Structure de la FRP.

A et B. (A) Vue du dimère de la FRP montrant un monomère en rouge et l'autre en vert. La partie N-terminale (résidus 1-65) est en couleur claire et la partie C-terminale (résidus 66-109) en couleur sombre. Des résidus fonctionnels clés et absolument conservés formant le site actif sont représentés par des bâtonnets. (B) Gros plan sur le site actif de la FRP (encadré dans la figure A). La figure a été réalisée avec Pymol (<u>http://www.pymol.org/</u>) en utilisant le fichier PDB 4JDX.

C. Reconversion à l'obscurité de l'OCPr en OCPo $(2.3 \ \mu\text{M})$ à 8°C en absence et en présence de la FRP WT et en présence des mutants de la FRP avec un ratio OCP par FRP 2:1; en absence (trait noir) et en présence de la FRP WT (trait rouge), FRP-W9L (carrés bleu ciel), FRP-H53L (losanges oranges), FRP-W50L (triangles violets), FRP-D54L (losanges bleus) et FRP-R60L (cercles verts).

D. Immuno-détection des domaines N- (N-ter) et C- (C-ter) terminaux de l'OCP dans des expériences de co-immunoprécipitation où chaque domaine de l'OCP fixé sur des billes de Sepharose via les anticorps anti-FRP a été élué puis chargé sur un gel SDS-PAGE. Des contrôles pour les domaines N- (1) et C- (2) terminaux (sans anticorps anti-FRP) sont également montrés. M: marqueur de masse moléculaire de 20 kDa.

La FRP est dimère (avec un site actif) et interagit spécifiquement avec le domaine C-terminal de l'OCP. Plus de détails dans Sutter *et al.* (2013).

5. Changements structurels sous-jacents à la photo-activation de l'OCP

5.1. Production d'Holo-OCPs in E. coli

Il n'y a pas si longtemps, nous isolions l'OCP à partir des cellules de *Synechocystis* qui surexpriment l'OCP WT ou mutée (**Wilson et al, 2008, 2010, 2011, 2012; Punginelli et al, 2009**). Le processus de purification qui nécessite trois semaines est fastidieux et le rendement est faible voir quasi-nul pour certains mutants. En effet, même lorsque l'OCP-WT est surexprimée, nous n'obtenons que 40 mg de protéines pour 30 litres de culture de *Synechocystis* (données non publiées). Pour accélérer l'élucidation du mécanisme de photoprotection lié à l'OCP, Céline Bourcier de Carbon a développé une méthode pour synthétiser des holo-OCPs (OCPs fixant une molécule de caroténoïde) dans *E. coli* et isoler de grandes quantités de caroténo-protéines (**Bourcier de Carbon, Wilson et al, Sci Rep 2015**). Pour réaliser cela, les gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse des caroténoïdes souhaités et le gène *ocp* doivent être exprimés dans la même cellule. Avant nos travaux, aucune étude dans la littérature ne mentionnait la possibilité d'insérer une molécule de caroténoïde étaient exprimées dans *E. coli* et isolées, puis le caroténoïde était lié aux protéines par une reconstitution *in vitro* (Bhosale et al, 2004, 2005; Giuffra et al, 1996; Paulsen et al, 1990).

Les principaux éléments de notre méthode de production sont le choix des promoteurs et l'induction en cascade des gènes. La souche d'*E. coli* utilisée pour la production d'holo OCPs contient trois plasmides (Figure 35A). Afin de maintenir les trois plasmides dans la souche d'*E. coli*, l'utilisation de trois différentes origines de réplication compatibles et trois différentes résistances aux antibiotiques sont nécessaires. Le premier plasmide, pAc-BETA (ou pACCAR16 Δ crtX) (Cunningham, F. X. et al, 1996; Misawa, N. et al, 1995) renferme l'opéron d'*Erwinia herbicola* (ou *Erwinia uredovora*) qui comportent quatre gènes (*crtB*, *crtE*, *crtI* et *crtY*) nécessaires à la synthèse du β -carotène. Cet opéron est sous le contrôle du promoteur constitutif du gène *crtE*. Dans le second plasmide a été introduit, le gène *crtO* de *Synechocystis*, codant la β -carotène monocétolase qui catalyse la formation de l'échinénone (ECN), ou le gène *crtW* d'*Anabaena* PCC 7210, codant une dicétolase qui catalyse la formation de la cantaxanthine (CAN). Ce gène est sous le contrôle d'un promoteur araBAD inductible avec l'arabinose. Le gène *ocp* est cloné dans un troisième plasmide (pCDFDuet-1) sous le contrôle d'un promoteur T7lac inductible avec IPTG (Figure 35A). Une induction en cascade des gènes est indispensable pour isoler des quantités élevées d'holo-OCPs. Une concentration relativement élevée de β -carotène doit être présente dans la membrane avant l'induction du gène *crtO* ou *crtW*, permettant ainsi la synthèse de l'ECN ou de la CAN. Ensuite, l'expression du gène *ocp* est induite dans une souche d'*E. coli* renfermant des concentrations élevées d'ECN ou de CAN dans leurs membranes (Figure 35B). Avec cette méthode, nous avons obtenu en seulement quatre jours plus de 30 mg d'holo-OCP à partir d'un litre de culture d'*E. coli* (**Bourcier de Carbon et al, 2015**).

La possibilité d'isoler l'holo-OCP à partir d'*E. coli* constitue une avancée majeure pour élucider le mécanisme moléculaire de l'OCP parce qu'il facilite l'isolement rapide de protéines mutées présentant de nouvelles caractéristiques. Cette méthode nous a permis de caractériser davantage l'OCP, notamment sur la spécificité du caroténoïde lié à ce dernier. Auparavant, il ne nous était pas possible d'étudier la CAN-OCP car, lorsque l'OCP est surexprimée dans des cellules de *Synechocystis*, elle ne renferme que des traces de CAN. Nous avons donc démontré que l'OCP est également capable de lier la CAN (ayant deux groupements carbonyles). La CAN-holo-OCP est aussi photoactive (Figure 35C) et capable d'induire le déclin de fluorescence des PBS, comme le 3'-hECN-OCP, confirmant que le groupement carbonyle est important dans la fonction de l'OCP (**Bourcier de Carbon et al, 2015**).

5.2. Position du caroténoïde et du bras N-terminal dans la forme rouge de l'OCP

5.2.1. Structure du domaine N-terminal (RCP) de l'OCP

(Ce chapitre se réfère à l'article **Leverenz, Wilson et al, Science 2015** dont je suis le deuxième auteur et Leverenz et Sutter, les co-premiers auteurs. Ma contribution dans ce travail a été de construire et d'exprimer dans *E. coli*, la RCP en présence d'ECN et de la CAN, et de réaliser des mesures de quenching de fluorescence des PBS en présence des RCP isolées.)

La dissociation des domaines N- et C-terminaux ou l'absence du CTD expose près de la moitié du caroténoïde au solvant. Cela soulève une question fondamentale sur la façon dont le caroténoïde hydrophobe est structurellement logé dans l'OCPr et la RCP avant d'interagir avec les PBS. Afin d'élucider les mécanismes moléculaires des interactions protéine-caroténoïde dans la RCP/OCPr, nous avons exprimé le domaine N-terminal de l'OCP en présence d'ECN ou de CAN dans une souche d'*E. coli* (Figure 35).



Figure 35 : Production d'Holo-OCPs dans E. coli.

A. Représentation schématique de la production de l'OCP dans *E. coli* basée sur trois plasmides: pAC-Beta (jaune) porte les gènes impliqués dans la synthèse du β -carotène (*crtB*, *crtE*, *crtl* et *crtY*) sous le contrôle du promoteur *crtE*; pBAD-crtO (orange) porte le gène *crtO* (ou *crtW*) qui convertit le β -carotène en échinénone (ECN) (ou en cantaxanthine) et sous le contrôle du promoteur ara (arabinose inductible); PCDF-OCP porte le gène *ocp* sous le contrôle d'un promoteur inductible par IPTG (rouge).

B. Observation de la photo-activité dans des culots cellulaires portant les trois plasmides requis pour la synthèse de l'OCP à l'obscurité ou sous lumière blanche (5 min, 5000 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) : culot cellulaire sans induction (1), après l'induction par arabinose produisant l'ECN (2) et après l'induction à la fois par arabinose et IPTG produisant l'holo-OCP (3).

C. Spectres d'absorbance à l'obscurité (noir) et à la lumière (rouge) de l'ECN-holo-OCP (trait plein) et de la CAN-holo-OCP (ligne en pointillée). La photo-conversion a été faite en utilisant une lumière blanche de 5000 μ mol photon.m⁻².s⁻¹ à 18°C pendant 5 min. Des photographies des holo-OCPs (orange à l'obscurité et rouge sous illumination) accompagnent les spectres d'absorbance.

Il est possible de produire une holo-OCP photoactive à partir d'*E. coli* et l'OCP est également capable de lier la CAN. Plus de détails dans Bourcier de Carbon *et al.* (2015).

Les holos RCP ont été isolées en utilisant le protocole récemment développé dans notre laboratoire et décrite au 5.1 (**Bourcier de Carbon et al, 2015**). La CAN-RCP (liant exclusivement la CAN) est plus active que l'ECN-RCP (liant majoritairement l'ECN). Elle induit également un déclin de fluorescence des PBS, comparable à celui de la RCP obtenue par protéolyse partielle de l'OCP. Les spectres d'absorption de la CAN-RCP et de la CAN-OCPr sont presque identiques. L'environnement caroténoïde-protéine est comparable dans les deux protéines tel que nous l'avons déjà rapporté pour la 3'-hECN-RCP obtenue par protéolyse partielle et la 3'-hECN-OCPr d'*Arthrospira* (Leverenz et al, 2014).

En collaboration avec le groupe de Kerfeld, nous avons donc déterminé respectivement, les structures de la CAN-RCP à 1.54 Å et de la CAN-OCPo à 1,90 Å (PDB ID : 4XB4 et PDB ID : 4XB5, Leverenz et al, 2015). La structure de la CAN-OCPo correspond étroitement à la structure de l'ECN-OCPo (Wilson et al, 2010). La structure de la CAN-RCP se superpose à celle du domaine N-terminal (NTD) de la CAN-OCPo. Ces données indiquent que d'importants changements conformationnels du NTD ne sont pas nécessaires pour la liaison de l'OCPr avec les PBS ; seule l'ouverture de l'OCP est requise (Leverenz et al, 2015). En revanche, nous avons noté une différence remarquable dans la position et la conformation du caroténoïde de la RCP par rapport à la CAN-OCPo. Dans la RCP isolée, en l'absence du CTD, le caroténoïde remonte d'environ 12 Å à l'intérieur du NTD pour se protéger du solvant (Figure 36A; seulement 8% du caroténoïde est exposé) (Leverenz et al, 2015). Le mouvement du caroténoïde a des conséquences profondes sur ses interactions avec la protéine. Plus précisément, deux configurations caroténoïde-protéine (cpcs) distincts sont formées par les acides aminés, présents dans les poches de liaison avec la CAN, observées dans les structures de l'OCPo et de la RCP. Dans la cpcO (correspondant à la configuration de la CAN dans l'OCPo), onze résidus du NTD sont étroitement proches (< 4 Å) du caroténoïde. Dans la cpcR (correspondant à la configuration de la CAN dans la RCP ou l'OCPr), neuf résidus supplémentaires du NTD interagissent avec le caroténoïde (Figure 36B et Leverenz et al, 2015). Nous avons donc muté plusieurs résidus conservés de l'OCP à moins de 4 Å de la CAN dans la cpcR (Leverenz et al, 2015). Les holo-OCPs mutées ont été exprimées en présence de CAN dans une souche d'E. coli et isolées en utilisant le protocole décrit au 5.1 (Bourcier de Carbon et al, 2015).



Figure 36 : Position du caroténoïde dans la forme rouge de l'OCP.

A et B. Structure de la RCP (domaine N-terminal) et de l'OCP de *Synechocystis* liant la cantaxanthine (CAN). La CAN est représentée avec des bâtonnets orange dans l'OCP et rouge dans la RCP. (A) Structure de la RCP (en violet) avec les résidus présents dans les poches de liaison avec la CAN (Tyr129, Glu34, Pro126 et Cys84) représentés par des bâtonnets jaunes. (B) Superposition des structures de la CAN-OCP (gris) et de la CAN-RCP (violet). Des configurations caroténoïde-protéine (cpcs) distinctes sont observées dans les 2 structures. Les figures ont été réalisées avec Pymol (<u>http://www.pymol.org/</u>) en utilisant les fichiers PDB: 4XB4 et 4XB5.

C. Photo-conversion sous lumière blanche (5 min, 5000 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) à 19°C des OCP WT (noir) et mutants P126/Y129 (violet), E34A (orange), Y129F (bleu), P126V (rose) et C84A (vert) dans 40 mM Tris-HCl pH 8.0.

Dans la RCP isolée, en l'absence du CTD, le caroténoïde remonte d'environ 12 Å à l'intérieur du NTD pour se protéger du solvant. Plus de détails dans Leverenz *et al.* (2015).



Figure 37 : Importance du bras N-terminal dans la photoactivation et la stabilité de l'OCP.

A. Structure de l'OCP de *Synechocystis* (PDB 3MG1) : gros plan sur l'interface mineure entre le domaine C-terminal (en turquoise) et le bras N-terminal (19 premiers résidus du domaine N-terminal (en rouge)). La liaison hydrogène entre l'Asp6 (D6) du bras N-terminal et l'Arg229 (R229) du domaine C-terminal ainsi que le résidu Pro22 (P22) du domaine N-terminal (en violet) sont indiqués. Le caroténoïde est représenté avec des bâtonnets orange. Les chaînes latérales des résidus sont représentées par des bâtonnets gris avec l'oxygène en rouge et l'azote en bleu.

B et C. Spectres d'absorbance à l'obscurité (noir) et sous lumière blanche (5 min, 5000 µmol photon.m⁻².s⁻¹) (rouge) à 19°C (B) du WT-OCP (trait plein) et Δ 2-20 OCP (ligne en pointillée), (C) du D6L-OCP (trait plein) et P22V-OCP (ligne en pointillée).

D et E. (D) Photo-conversion sous lumière blanche (5 min, 5000 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) et Reconversion à l'obscurité (E) à 19°C du WT-OCP (cercles violets), Δ 2-20 OCP (losanges verts), D6L-OCP (carrés rouges) et P22V-OCP (triangles bleus) dans 40 mM Tris-HCl pH 8.0.

L'absence du bras N-terminal déstabilise l'OCPo et favorise l'accumulation et la stabilisation de l'OCPr. Plus de détails dans Thurotte *et al.* (2015).

Les mutations Cys84 \rightarrow Ala, Tyr129 \rightarrow Phe, Pro126 \rightarrow Val, et Glu34 \rightarrow Ala réduisent la stabilité de l'OCPr, en affectant l'accumulation de l'OCPr sous illumination et en accélérant la reconversion OCPr en OCPo à l'obscurité (Figur. 36C). Ces holo-OCPs mutées induisent moins de 40% de déclin de la fluorescence des PBS. Le double mutant Pro126 \rightarrow Val/Tyr129 \rightarrow Phe demeure orange, même sous une illumination forte et prolongée (Figure 36C), suggérant que ces résidus relativement éloignés du caroténoïde dans la cpcO, jouent un rôle essentiel dans la photochimie de l'OCP (Leverenz et al, 2015). L'ensemble de ces résultats démontrent l'implication des résidus liant la CAN dans la cpcR (observés également dans la structure de la RCP) dans la stabilisation du caroténoïde dans l'OCPr.

5.2.2. Rôle du bras N-terminal dans la photo-activation de l'OCP

(Ce chapitre se réfère à l'article **Thurotte, Wilson et al, Plant Physiol 2015** dont je suis le deuxième auteur et Thurotte et López-Igual, les co-premiers auteurs. Dans cet article, j'ai purifié le mutant Δ 9-15 OCP, procédé à une caractérisation préliminaire *in vitro* (absorbance, activité, quenching de Fluorescence) et réalisé des gels de protéines).

De récents résultats obtenus avec nos collaborateurs (**Leverenz et al, 2015**) et par d'autres équipes suggèrent que la conformation ouverte de l'OCPr impliquerait également la rupture des interactions entre le domaine C-terminal (CTD) et les 19 premiers acides aminés N-terminal, formant une petite hélice α (nommée bras N-terminal ou hélice α A). En effet, l'analyse des empreintes structurales par spectrométrie de masse a montré que cette interface est plus exposée au solvant dans l'OCPr que dans l'OCPo (Liu et al, 2014). D'après la structure de l'OCPo, l'existence d'une liaison hydrogène entre l'Asp6 du bras N-terminal et l'Arg229 dans le CTD stabiliserait aussi la conformation fermée de l'OCPo (Figure 37A). Il a été également proposé que l'isomérisation cis-trans des prolines (Pro) pourrait être impliquée dans la photo-activation de l'OCP (Gorbunov et al, 2011). Or, une Pro22 est située à la jonction entre le bras N-terminal et le domaine N-terminal (Figure 37A). L'isomérisation de cette Pro pourrait éventuellement contribuer au mouvement du bras N-terminal, provoquant ainsi son détachement du CTD durant la photo-activation. Nous avons donc étudié l'effet de la délétion du bras N-terminal (Δ 2-20) et des mutations Asp6Leu (D6L) et Pro22Val (P22V) sur la photo-activité et l'interaction de l'OCP avec les PBS et la FRP (**Thurotte et al, 2015**). Les holo-OCPs mutées ont été produites dans une souche d'E. coli et purifiées en utilisant le protocole décrit au 5.1 (Bourcier de Carbon et al, 2015). À l'obscurité, le spectre d'absorption du mutant $\Delta 2-20$ OCP présente une faible population d'OCPr qui induit un déclin de la fluorescence des PBS (Figure 37B et Thurotte et al, 2015). In vitro, la forme rouge du mutant $\Delta 2-20$ s'accumule plus rapidement et est plus stable que l'OCPr-WT (Thurotte et al, 2015), indiquant que l'interaction entre le bras N-terminal et le CTD qui stabilise l'OCPo se rompt lors de la photo-activation (Figure 37D et 37E). En revanche, l'absence du bras N-terminal n'affecte pas l'interaction avec les PBS car un large déclin de la fluorescence comparable à celui de l'OCP-WT est observé en présence de $\Delta 2-20$ OCP. À l'obscurité, un détachement rapide de l'OCPr des PBS et, en conséquence, une récupération rapide de la fluorescence est favorisée par l'ajout de la FRP aux complexes $\Delta 2$ -20 OCP-PBS pré-illuminés et «quenchés». L'absence du bras N-terminal facilite l'accès de la FRP à l'OCPr liée aux PBS (Figure 38A, 38B et **Thurotte et al, 2015**). Le remplacement de l'Asp6 par une Leu n'a aucun effet sur la photo-activation et l'interaction de l'OCPr avec les PBS et la FRP. Cette liaison hydrogène n'est pas indispensable dans les changements de conformation de l'OCP durant la photo-activation (Figures 37C, 37D, 37E, 38A, 38C et Thurotte et al, 2015). En revanche, la mutation P22V accélère l'accumulation et diminue l'affinité de la forme rouge pour les PBS par rapport à l'OCP-WT. La fonction de la FRP n'est pas affectée par cette mutation (Figures 37C, 37D, 37E, 38A et 38C). D'une part, l'isomérisation de la Pro n'est pas essentielle à la photo-activation de l'OCP, car sa substitution par une Val facilite le détachement du bras N-terminal du CTD plutôt que de l'empêcher. D'autre part, l'observation d'un faible déclin de la fluorescence est la conséquence d'une faible interaction entre l'OCPr et les PBS dûe à un libre mouvement du bras et/ou une orientation incorrecte du bras Nterminal qui pourrait gêner l'interaction OCPr-PBS (Thurotte et al, 2015).

Nous avons conclu à partir de ces résultats que l'orientation exacte du bras N-terminal dans l'OCPo et l'OCPr est primordiale pour le mécanisme de photoprotection. Dans l'OCPo, l'interaction entre le bras N-terminal et le CTD évite la photo-activation de l'OCP à l'obscurité et à de faibles intensités. Dans l'OCPr, la position du bras N-terminal contrôle le niveau de récupération de la fluorescence, et sa présence ralentit l'action de la FRP, permettant un large NPQcya dans des conditions de stress lumineux.



Figure 38 : Effets de l'absence du bras N-terminal sur le déclin de fluorescence et l'interaction de l'OCPr avec le PBS et la FRP.

A. Mesures du déclin de fluorescence des PBS (0,012 μ M) illuminés pendant 5 min par une lumière bleue-verte (400-500 nm, 900 μ mol photon.m⁻².s⁻¹) en présence d'un excès d'OCPr (0,48 μ M ; 40 OCP par PB) : WT (cercles violets), Δ 2-20 (losanges verts), D6L (carrés rouges) et P22V (triangles bleus) dans 0,5 M phosphate. L'OCPr est obtenue après une illumination par une lumière blanche de 5000 μ mol photon.m⁻².s⁻¹ à 10°C.

B et C. Récupération de la fluorescence dans les complexes OCP-PB quenchés à l'obscurité en l'absence (symboles colorés) ou en présence de la FRP (symboles blancs) : (B) WT-OCP (cercles violets) et $\Delta 2$ -20 OCP (losanges verts) et (C) D6L-OCP (carrés rouges) et P22V-OCP (triangles bleus)

L'orientation exacte du bras N-terminal dans l'OCPo et l'OCPr est primordiale pour le mécanisme de photoprotection. Plus de détails dans Thurotte *et al.* (2015).

Les changements de la structure inhérents à l'activation de l'OCP sont cruciaux pour la photoprotection. Récemment, Gupta et al (2015) ont montré que des changements locaux et globaux de la structure, y compris, la séparation complète des domaines NTD et CTD se produisent lors de la photoactivation de l'OCP. Mais, seule la structure secondaire du bras N-terminal de l'OCP est modifiée. La séparation des domaines dans l'OCPr augure un mouvement de 12 Å du caroténoïde (**Leverenz et al, 2015**) ainsi que le dépliement du bras N-terminal et sa dissociation du CTD (**Thurotte et al, 2015** ; Gupta et al, 2015). Deux faces (β 1, Face 1; β 2, Face 2) constituées de résidus conservés à la surface du NTD sont alors exposées aux solvants : une Face 1 (dissimulée par l'interface "inter-domaine" dans l'OCPo) chargée positivement et une Face 2 relativement chargée négativement (Figure 39). La Face 1 du NTD proposée comme le motif de liaison aux PBS comprend l'Arg155, un résidu dont la charge positive est primordiale pour l'interaction de l'OCPr avec les PBS (**Leverenz et al, 2015**; **Wilson et al, 2012**).



Figure 39 : Mécanisme proposé pour la photochimie de l'OCP

Représentation schématique de l'assemblage modulaire de l'OCP (Adapté de Melnicki et al, 2016): l'absorption de la lumière par l'OCPo induit des changements dans la structure localisés principalement au niveau du domaine C-terminal (CTD) (à savoir, la dissociation de bras N-terminal et la séparation des 2 domaines) et couplés à la translocation du caroténoïde. Le caroténoïde est entièrement enfoui dans le domaine N-terminal (NTD) dans la configuration cpcR (dans l'OCPr) alors qu'elle est à cheval sur les domaines N- et C-terminaux (CTD) dans la configuration cpcO (dans l'OCPo). Plus de détails dans Leverenz *et al.* (2015) et Melnicki *et al.* (2016).

6. Etude des homologues du domaine N-terminal de l'OCP chez les cyanobactéries

6.1. Distribution et Analyse phylogénétique des gènes *hcp* dans les cyanobactéries

Dans de nombreuses cyanobactéries, en plus du gène entier *ocp*, de multiples copies codant uniquement des homologues du domaine N-terminal de l'OCP sont dispersées dans leurs génomes (Figure 16 et Kerfeld et al, 2003; Kerfeld, 2004a, 2004b; Kirilovsky et Kerfeld, 2012, 2013). Ces homologues font partie d'une nouvelle famille de protéines en hélices α , liant un caroténoïde, nommée HCPs (Helical Carotenoid Proteins en anglais) (Melnicki, Wilson et al, Mol Plant 2016). Elles sont présentes dans la plupart des souches capables de fixer l'azote moléculaire (N2), par exemple dans Leptolyngbya, Cyanothece, Nostoc, Anabaena, Nodularia, Oscillatoria, Calothrix, etc.... Dans ces souches, un à quatre gènes hcp peuvent être présents par génome, parfois à proximité de l'unique gène codant un homologue du domaine C-terminal de l'OCP (CTDH pour homologue du CTD). Les analyses de protéomique et de transcriptomique ont montré l'expression de quelques gènes hcp dans une variété de souches (Ow et al, 2008; Park et al, 2013). Dans Nostoc punctiforme PCC 73102, plusieurs gènes codant des HCPs s'expriment (Anderson, Campbell and Meeks, 2006). Dans Cyanothece ATCC 51142, le gène codant le CTDH et l'une des gènes codant la HCP, s'expriment sous forte illumination, mais pas à l'obscurité (Stockel et al, 2008). Le génome d'Anabaena (Nostoc) sp. PCC 7120 (ci-après Anabaena) contient quatre gènes hcp dont les transcrits ont été détectés dans la plupart des études d'expression (EHira et Ohmori, 2006; Flaherty et al, 2011; Mitschke et al, 2011). Cependant, le rôle de ces multiples HCPs, s'ils en ont un, restait encore à déterminer.

Nos collaborateurs (M. Melnicki et Cheryl Kerfeld) ont étudié la diversité des HCPs présentes dans les génomes de cyanobactéries en utilisant une approche phylogénétique (Figure 40 et **Melnicki et al, 2016**). Sur les 154 génomes de cyanobactéries, 87 comportent au moins un gène codant une HCP et 66 d'entre eux renferment au moins deux voir plus de gènes *hcp*. Chaque génome codant une HCP (83 sur 87) comprend également un homologue du domaine C-terminal (CTDH) de l'OCP (**Melnicki et al, 2016**).

Dans cette famille de gènes, neuf branches distinctes ont été identifiées par l'analyse phylogénétique (Figure 40). Pour un génome donné, les HCPs sont rarement membres d'une

même branche, mais elles sont plutôt réparties sur des branches différentes. Par exemple, les séquences codant les HCPs dans le génome d'*Anabaena* sont dispersées sur l'arbre phylogénétique, comme l'indique les carrés rouges sur la Figure 40 (**Melnicki et al, 2016**). Bien qu'il n'y ait aucune tendance claire pour le maintien de certaines branches HCPs dans des génomes particuliers, les branches HCP1 à HCP4 sont le plus souvent représentées, et sont les plus susceptibles d'être co-exprimées. Les membres des branches HCP4 et HCP5 sont généralement à proximité de gènes codant le CTDH. Ces branches se situent au centre de l'arbre phylogénétique et sont les plus proches de la branche de l'OCP (**Melnicki et al, 2016**).

6.2. Régulation, Localisation et Fonction des HCPs *dans Anabaena* sp. PCC 7120

(Ce chapitre se réfère à l'article López-Igual, Wilson et al, Plant Physiol 2016 dont je suis co-premier auteur.)

En plus du gène *ocp*, le génome d'*Anabaena* comprend quatre gènes codant des HCPs réparties sur quatre branches différentes (**Melnicki et al, 2016**) : HCP1 (*all1123*), HCP2 (*all3221*), HCP3 (*alr4783*) et HCP4 (*all4941*) (Figure 40). Ils sont tous situés sur le chromosome (et non sur les six plasmides présents dans *Anabaena*). Le gène *all4941* (HCP4) est suivi par le gène codant le CTDH (*all4940*), ce qui est typique des membres de la branche HCP4 (Figure 41A). L'identité (nombre d'acides aminés identiques) par rapport au NTD d'*Anabaena* (*all3149*-NTD) varie entre 50% (*all4941* HCP4, 40% (*all1123* HCP1), 30% (*alr4783* HCP3) et 28% (*all3221* HCP2). La répartition des gènes *hcp* dans les cyanobactéries suggère qu'il pourrait y avoir un lien entre l'aptitude à fixer l'azote et la fonction des protéines codées par ces gènes. Nous avons donc utilisé *Anabaena* comme modèle de cyanobactérie filamenteuse pour étudier l'expression, la localisation et la fonction des quatre HCPs présentes dans son génome, tout en se concentrant sur une possible relation entre la capacité d'*Anabaena* d'assimiler l'azote (N₂) et la présence de ces quatre HCPs.



Figure 40 : Arbre phylogénétique de l'OCP et de ses homologues N-terminaux (HCPs).

La famille des OCPs et les sous-classes d'HCPs sont identifiées par des branches monophylétiques et sont désignées par des chiffres et des couleurs. Les gènes codant l'OCP et les HCPs dans le génome d'*Anabaena* sont indiqués par des carrés rouges.

Au moins 9 branches distinctes ont été identifiées dans la famille des gènes *hcp*. Plus de détails dans Melnicki *et al.* (2016).

6.2.1. Expression et Détection des HCPs dans Anabaena sp. PCC 7120

Lorsqu'Anabaena est cultivée dans des conditions de carence en nitrate, elle est capable de convertir 5-10% de ces cellules végétatives en cellules spécialisées (désignées hétérocystes) qui fixent l'azote (N₂), mais ne réalisent pas l'activité de dégagement d'oxygène (revues : Fay, 1992; Flores et Herrero, 2010). Dans la plupart des études d'expression, les transcrits de certains gènes *hcp* ont été détectés en l'absence de nitrate (EHira et Ohmori, 2006 ; Flaherty et al, 2011 ; Mitschke et al, 2011). Afin de déterminer si les gènes *hcp* sont exprimés dans les cellules d'*Anabaena*, nous avons réalisé des expériences de transcription inverse et de PCR quantitative, en utilisant l'ARN isolé à partir de cellules d'*Anabaena* cultivées en présence ou en absence de nitrate et d'hétérocystes isolés. Tous les gènes *ocp, all1123* HCP1, *all3221* HCP2, *all4941* HCP4 et *alr4783* HCP3 sont exprimés en présence ou en absence de nitrate, ainsi que dans les hétérocystes isolés. Le niveau d'expression des gènes *hcp* est homogène, mais relativement faible par rapport à celui du gène *ocp* (Figure 41B et **López-Igual et al, 2016**). Ces résultats confirment que les HCPs n'ont pas de rôle spécifique dans la formation d'hétérocystes et que ces protéines pourraient avoir des rôles semblables dans les hétérocystes et dans les cellules végétatives.

Nous avons également détecté la présence d'au moins deux des quatre HCPs dans des cellules d'*Anabaena* cultivées avec ou sans nitrate. Les techniques d'immunoblot et de microscopie électronique (détection de la fluorescence dans une souche exprimant la protéine de fusion All1123-GFP) ont permis de démontrer la présence de la protéine All1123 (HCP1) dans les cellules végétatives et les hétérocystes (Figure 41C et 42 et **López-Igual et al, 2016**). Ces résultats ont été confirmés par l'isolation de la protéine All1123 (HCP1), marquée par une étiquette 6xHis et liant un caroténoïde, à partir de cellules d'*Anabaena* WT, mais en faible quantité (**Melnicki et al, 2016**). La présence d'une quantité infime de la protéine All4941 (HCP4) a également été démontrée par immuno-blot (Figure 41D). La concentration de la protéine All3221 (HCP2) est en dessous du seuil de détection par immuno-blot et par microscopie électronique (détection de la fluorescence dans une souche exprimant la protéine de fusion All3221-GFP) (Figure 42 et **López-Igual et al, 2016**).



Figure 41 : Expression et Détection des HCPs dans Anabaena (Nostoc) sp. PCC 7120.

A. Arrangement des gènes *all3149* (OCP), *all4941* (HCP4), *all3221* (HCP2), *all1123* (HCP1) et *alr4783* (HCP3) dans *Anabaena* sp PCC 7120 d'après Kerfeld *et al* (2003).

B. Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes *ocp* et *hcp* dans la souche *Anabaena* sp. PCC 7120. Les ARN ont été isolés à partir de cellules cultivées en présence ("NO₃") ou en absence de nitrate ("-NO₃") et à partir d'hétérocystes isolés (Het).

C. et D. Gel SDS (en haut) et immuno-détection (en bas) des HCPs dans les cellules d'*Anabaena* cultivées en présence (" NO_3 ") ou en absence de nitrate ("- NO_3 ") et à partir d'hétérocystes isolés (Het). (C) Immuno-détection par des anticorps anti-All1123 (HCP1). Chaque puits contient 1 µg de Chl (à gauche) ou 4 µg de Chl (à droite). (D) Immuno-détection des HCPs par des anticorps anti-OCP dans les cellules d'*Anabaena* WT et du mutant 1123-GFP cultivées en présence ou en absence de nitrate (Chaque puits contient 2 µg de Chl). Les protéines OCP, All1123 (HCP1) et All4941 (HCP4) isolées sont également identifiées sur le western-blot.

Tous les gènes *ocp et hcp* sont exprimés et deux des quatre HCPs ont été détectées en présence ou en absence de nitrate ainsi que dans les hétérocystes isolés. Plus de détails dans López-Igual *et al.* (2016).



Platform confocal ImaGif

Figure 42 : Analyse de l'expression des protéines de fusion All1123-GFP et All3221-GFP dans *Anabaena (Nostoc)* sp. PCC 7120.

Les filaments d'*Anabaena* cultivés en présence ("NO₃") ou en absence de nitrate ("-NO₃" pendant 72h) ont été analysés par microscopie confocale. La fluorescence verte de la GFP (à gauche) et l'autofluorescence rouge de la cyanobactérie (à droite) sont représentées. Les souches utilisées sont indiquées sur chaque photo. Les traits blancs représentent 5 μ m (en haut) et 2 μ m (en bas)

La protéine All1123 (HCP1) est présente dans les cellules végétatives et les hétérocystes, par contre la concentration de la protéine All3221 (HCP2) est en dessous du seuil de détection. Plus de détails dans López-Igual *et al.* (2016).

6.2.2. Caractérisation et Activités de déclin d'énergie et d'oxygène singulet des différents HCPs d'*Anabaena* sp. PCC 7120

Nous avons exprimé le NTD de l'OCP d'Anabaena (gène codant les résidus 1-165 de l'OCP) et les quatre HCPs d'Anabaena en présence de CAN dans une souche d'E. coli. Les holos NTD et HCP ont été isolées en utilisant le protocole récemment développé dans notre laboratoire et décrit au 5.1 (Bourcier de Carbon et al, 2015). Le NTD de l'OCP et les quatre HCPs d'Anabaena peuvent lier la CAN et sont de couleur rouge-violet (Figure 43A). Les spectres d'absorbance sont semblables mais pas identiques, indiquant que les interactions caroténoïde-protéine sont légèrement différentes dans les quatre HCPs (Figure 43B et López-Igual et al, 2016). Lorsque les PBS isolés chez Synechocystis et Anabaena sont incubés en présence du NTD de l'OCP et des quatre HCPs, seuls le NTD de l'OCP et la protéine All4941 (HCP4) d'Anabaena induisent un large déclin de la fluorescence des PBS à l'obscurité et sous illumination. Ceci est la première démonstration qu'une HCP peut dissiper l'énergie au niveau des PBS (Figure 43C). En revanche, les protéines All1123 (HCP1), All3221 (HCP2) et All4783 (HCP3) n'induisent aucune extinction de la fluorescence des PBs. La ré-isolation des complexes HCP-PBs par centrifugation sous gradient de sucrose montre que les protéines All1123 (HCP1), All3221 (HCP2) et All4783 (HCP3) d'Anabaena n'induisent aucun déclin de la fluorescence, parce qu'elles sont dans l'incapacité de s'attacher aux PBS isolés (Figure 44 et López-Igual et al, 2016).

Sur la base des activités connues des caroténoïdes dans les plantes, comme désactivateurs d'oxygène singulet (${}^{1}O_{2}$), nous avons déterminé si l'OCP et les HCPs, sont capables de protéger les cellules par réaction directe avec l'oxygène singulet (${}^{1}O_{2}$) (**Sedoud**, Wilson et al, Plant Cell 2014; López-Igual et al, 2016). Premièrement, en utilisant un système de piégeage chimique opéré par l'histidine, nous avons montré que l'OCP diminue la production d' ${}^{1}O_{2}$ dans des cellules de *Synechocystis*. Nous avons observé que dans des conditions de forte lumière, la production d' ${}^{1}O_{2}$ est plus élevée dans un mutant de *Synechocystis* sans OCP que dans le WT ou un mutant surexprimant l'OCP, même sous une forte lumière rouge-orange (**Sedoud et al, 2014**). Ces résultats démontrent que l'OCP est en mesure d'atténuer l' ${}^{1}O_{2}$ formé au cours de l'exposition à une forte lumière rouge-orange, condition où l'OCP ne peut être photo-activée. Ensuite, des mesures par résonance paramagnétique électronique (RPE), en utilisant le TEMPD-HCl (2, 2, 6, 6-tétraméthyl-4-pipéridone), nous ont permis d'étudier l'activité de l'OCP et des HCPs *in vitro* (Figure 45).



Figure 43 : Caractérisation des HCPs isolées d'E. coli.

A. Gel SDS de l'AnaOCP-NTD et des HCPs isolées à partir des cellules d'*E. coli* exprimant la cantaxanthine (CAN). Chaque puits contient 2 µg de protéines. Insertion de la photographie des 4 HCPs attachant 100% de CAN.

B. Spectres d'absorbance de l'AnaOCP-NTD et des HCPs isolés: AnaOCP-NTD (bleu), All4941 (vert), All1123 (rose), All3221 (noir) et Alr4783 (rouge).

C. Mesures du déclin de fluorescence des PBS (0,012 μ M) à l'obscurité en présence d'un excès d'AnaOCP-NTD et des HCPs (0,48 μ M ; 40 HCP par PB) dans 1,4 M phosphate : AnaOCP-NTD (cercles noirs), All4941 (carrés rouges), All1123 (triangles oranges), All3221 (carrés violets) et Alr4783 (losanges verts).

Seule la protéine All4941 (HCP4) est capable de quencher la fluorescence des PBS. Plus de détails dans López-Igual *et al.* (2016).



Figure 44 : Complexes HCP-PBS (reconstitution *in vitro*).

A et B. Les PBS ont été incubées (30 min) à l'obscurité avec les différentes HCPs dans 1,2 M phosphate et les complexes ont été isolés dans un gradient de saccharose. La bande bleue a été recueillie et analysée.

(A) Spectres de fluorescence à température ambiante des PBS isolés (ligne en pointillée noir et PBS) et des complexes HCP-PBS contenant All1123 (HCP1, bleu), All3221 (HCP2, vert) ou All4941 (HCP4, rouge).

(B) (en haut) Composition protéique de la fraction bleue isolée des différents gradients de saccharose et (en bas) Immuno-détection des HCPs et de la protéine All1123 (HCP1) isolée. Chaque puits contient 5 μ M PBS.

Les protéines All1123 (HCP1) et All3221 (HCP2) d'Anabaena n'induisent aucun déclin de la fluorescence car elles sont incapables de s'attacher aux PBS. Plus de détails dans López-Igual *et al.* (2016).

Lorsque cette nitrone (amine-oxyde (N-oxyde) d'une imine) réagit avec $1'^{1}O_{2}$, il est converti en un radical nitroxyde stable et paramagnétique, détectable par spectroscopie RPE. La production d' $^{1}O_{2}$ est induite par l'illumination du photo-sensibilisateur, bleu de méthylène ou Rose Bengale. Nous avons constaté qu'*in vitro*, les OCPs isolées à partir de souches de *Synechocystis* et d'*E. coli* qui diffèrent par leur composition en caroténoïdes (ECN-OCP, ZEA-OCP et CAN-OCP) sont toutes d'excellents désactivateurs d' $^{1}O_{2}$ aussi bien en forme orange que rouge (Figure 45A). Ainsi, l'activité d'extinction d' $^{1}O_{2}$ ne dépend pas du caroténoïde associé (**Sedoud et al, 2014 ; Bourcier de Carbon et al, 2015**).

Nous avons également montré que le NTD de l'OCP, les protéines All3221 (HCP2) et All4783 (HCP3) d'*Anabaena* peuvent diminuer la production d' $^{1}O_{2}$ de manière comparable à l'OCP. Ces résultats suggèrent qu'elles peuvent être impliquées dans la protection des cellules contre le stress oxydatif (**López-Igual et al, 2016**). La protéine All4941 (HCP4) présente une faible activité d'extinction d' $^{1}O_{2}$. Finalement, la protéine All1123 (HCP1), malgré la présence de la cantaxanthine (CAN), est un mauvais désactivateur d' $^{1}O_{2}$. Son activité n'est pas meilleure que celle d'une protéine sans chromophore utilisée comme contrôle (Figure 45B et **Sedoud et al, 2014**; **López-Igual et al, 2016**). Ces résultats indiquent que la structure primaire de la protéine joue un rôle essentiel dans l'activité d'extinction d' $^{1}O_{2}$.

6.2.3. Caractéristiques structurales des HCPs

Globalement, la forte homologie entre les séquences des HCPs et celui du NTD de l'OCP suppose qu'elles pourraient adopter des structures en hélices α similaires à la structure récemment déterminée de la CAN-RCPSyn6803 (Leverenz et al, 2015). De plus, les résidus du NTD de l'OCP, particulièrement impliqués dans la liaison avec le caroténoïde dans la forme cpcR (correspondant à la configuration de la CAN dans l'OCPr), sont hautement conservés dans les HCPs (Melnicki et al, 2016). Par conséquent, nous pouvons prédire que le repliement en hélices α des HCPs pourrait accueillir différents caroténoïdes dans un site de liaison identifié, prévu et conservé. Pour appuyer cette hypothèse, nous avons résolu la structure à 3.2 Å de la CAN-HCP1 en collaboration avec le groupe de Kerfeld (PDB ID : 5FCX, Melnicki et al, 2016). La structure de la protéine CAN-All1123 (HCP1) se superpose parfaitement à la structure de la CAN-RCPSyn6803. La CAN se trouve dans la même cpcR que celle observée dans la structure de la CAN-RCPSyn6803 (Figure 46 et Melnicki et al, 2016).



Figure 45 : Activité de désactivation de l'oxygène singulet (¹O₂) de l'OCP et des HCPs.

A et B. L'oxygène singulet (${}^{1}O_{2}$) a été produit par illumination (1000 µmol photon.m⁻².s⁻¹) du bleu de méthylène (10 µM) pendant 3 min en présence de TEMPD-HCl et en l'absence (contrôle) ou en présence de différentes concentrations de l'OCP et des HCPs.

(A) Signaux RPE observés en l'absence d'OCP ou en présence de 4 et 1.5 µM OCP (16 scans).

(B) Tableau résumant l'I₅₀ de l'OCP, l'AnaOCP-NTD et des HCPs.

Les protéines All3221 (HCP2) et All4783 (HCP3) sont d'excellents désactivateurs d'oxygène singulet comme l'OCP. Plus de détails dans Sedoud *et al* (2014) et López-Igual *et al.* (2016).

Nous avons donc simulé les structures des autres HCPs d'Anabaena. Elles sont aussi composées de deux groupes de quatre hélices α , où la CAN est dans une configuration cpcR caractéristique du NTD de l'OCP. La comparaison des structures de la CAN-RCPSyn6803 (Leverenz et al, 2015) et des HCPs d'Anabaena (Melnicki et al, 2016 ; López-Igual et al, 2016) révèle la conservation des résidus prédits pour lier le caroténoïde, démontrant ainsi que l'attachement d'un caroténoïde est une propriété fondamentale des HCPs. Ceci a été confirmé par la purification des quatre HCPs d'Anabaena liant la CAN. Pourtant, les HCP d'Anabaena ont des fonctions distinctes, qui pourraient probablement être attribuées à des différences au niveau de la structure primaire et l'effet sur les propriétés physiques / chimiques du caroténoïde (CAN), ou des interactions protéine-protéine (par exemple l'interaction HCP-PBS). La protéine All4941 (HCP4) expose, en plus d'une séquence hautement conservée sur la Face 1 (comprenant l'Arg155), une charge positive supplémentaire (Lys156) (également observée dans l'OCP, Asn156), qui pourrait avoir un rôle dans la liaison entre la protéine All4941 (HCP4) et les PBS. Dans les autres HCPs, aucune charge positive supplémentaire n'est présente dans le voisinage immédiat de l'Arg155 (Figure 46 et López-Igual et al, 2016). Nous avons aussi observé que les HCPs incapables de se lier aux PBS forment des ponts salins intramoléculaires, impliquant l'Arg155 et des résidus sur la Face 1: Asp152-Arg155 dans la protéine All3221 (HCP2); Asp156-Arg155 (confirmé par sa structure) et Asp103-Arg155 dans la protéine All1123 (HCP1); et Glu103-Arg155 dans la protéine All4783 (HCP3) (Figure 46). Ce pont salin intramoléculaire pourrait empêcher l'interaction entre l'Arg155 et les PBS, essentielle pour le déclin de la fluorescence (López-Igual et al, 2016).

En conclusion, nous avons établi que les HCPs constituent une nouvelle famille de protéines en hélices α , liant des caroténoïdes, et ayant une homologie élevée et une similitude structurale avec le domaine N-terminal de l'OCP. Membres de différentes branches, les HCPs d'*Anabaena* sont impliquées dans des mécanismes distincts dans les cyanobactéries : nous avons démontré que la protéine All4941 (HCP4) est une dissipatrice efficace d'énergie et de la fluorescence, les protéines All3221 (HCP2) et All4783 (HCP3) sont d'excellents désactivateurs d'oxygène singulet et la protéine All1123 (HCP1) pourrait être impliquée dans un mécanisme inconnu (**Melnicki et al, 2016**; López-Igual et al, 2016).



Figure 46 : Caractéristiques structurales des HCPs.

Vue détaillée de la "Face 1" des structures de l'OCP et des HCPs d'*Anabaena* : (A) NTD (résidus 19-164) de l'OCP (All3149) [PDB 5HGR], (B) la protéine All1123 (HCP1) [PDB 5FCX] et (C-E) structures des autres HCPs générées comme des modèles d'homologie. La CAN est représentée avec des bâtonnets gris. Les chaines latérales des résidus clés contribuant aux différences de charges sur la "Face 1" et à la formation de ponts salins intramoléculaires avec l'Arg155 sont représentées par des bâtonnets avec l'oxygène en rouge et l'azote en bleu. La numérotation des résidus dans les structures des HCPs (entre parenthèses après l'identifiant du résidu) correspond à leurs positions en s'alignant sur la structure d'All3149 (par exemple numérotation suivant l'OCP (All3149) d'*Anabaena*).

La formation de ponts salins intramoléculaires impliquant l'Arg155 empêche l'interaction des HCPS aux PBS. Plus de détails dans López-Igual *et al.* (2016).
Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

Les cyanobactéries possèdent plusieurs mécanismes photoprotecteurs impliquant des changements relativement rapides (< quelques minutes) au niveau de l'appareil photosynthétique, afin d'ajuster la quantité de lumière arrivant au photosystème II (PSII). Les mécanismes de photoprotection dans les cyanobactéries diffèrent de ceux des plantes et des algues, qui possèdent des chlorophylles transmembranaires et des complexes collecteurs de lumière (LHC: light harvesting chlorophyll-antenna en anglais) attachant des caroténoïdes. La plupart des cyanobactéries récolte la lumière via un important complexe extra-membranaire, le phycobilisome (PBS), formé par des phycobiliprotéines auxquelles sont liés de manière covalente des pigments bleus et/ou rouges (les phycobilines et/ou phycoérythrines). L'Orange Carotenoid Protein (OCP) est spécifiquement impliquée dans le mécanisme de photoprotection (NPQcya) associé aux PBS et induit par une intense lumière bleue-verte. L'OCP agit comme un senseur de l'intensité lumineuse et un inducteur de la dissipation d'énergie, et est la première protéine, photo-active à caroténoïde, connue comme senseur. Au cours de cette dernière décennie, depuis l'élucidation de la structure de l'OCP, qui à l'époque était une protéine de fonction inconnue, d'importants progrès ont été accomplis dans la compréhension de son rôle dans la photoprotection des cyanobactéries. En 2006 (Wilson et al, 2006), l'étude des mutants de Synechocystis, nous a permis de démontrer qu'une forte lumière bleue-verte induit un déclin de fluorescence qui n'est pas associé à la photoinhibition ou aux transitions d'état, mais lié à une diminution spécifique de l'émission de fluorescence des PBS. Dans cette même étude, nous avons prouvé que l'OCP est indispensable pour le déclenchement du mécanisme de dissipation thermique, au niveau des PBS, de l'excès d'énergie absorbée. En l'absence de l'OCP, il n'y a pas de mécanisme photoprotecteur démontrant que le mécanisme de photoprotection (NPQcya) induit par une forte lumière bleue-verte est dépendant des PBS et de l'OCP et non de la protéine IsiA, comme l'avaient proposé Cadoret et al. (2004) et Joshua et al. (2005) (Wilson et al, 2006, 2007). Le déclin de fluorescence est corrélé à la diminution de la taille effective des antennes et de l'énergie à destination des centres réactionnels (Wilson et al, 2006; Rakhimberdieva et al, 2010; Gorbunov et al, 2011), protégeant ainsi les cellules du photo-endommagement sous forte illumination (Wilson et al, 2006) et sous des conditions de lumières fluctuantes (Boulay et al, 2008).

L'OCP codée de manière constitutive par le gène *slr1963* dans la cyanobactérie *Synechocystis* PCC 6803 est très répandue dans les souches de cyanobactéries contenant des PBS, mais environ 20% des souches en sont dépourvues (Kirilovsky et Kerfeld, 2012). Par exemple, *S. elongatus* 7942 et *T. elongatus* (et *T. vulcanus*), souches souvent utilisées dans des études sur la photosynthèse des cyanobactéries, n'ont pas ce mécanisme de photoprotection et elles sont plus sensibles aux fortes irradiations (Boulay et al, 2008). L'amplitude du déclin d'énergie et de la fluorescence dépend de la concentration de l'OCP (Wilson et al, 2007; Wilson et al, 2008; Gorbunov et al, 2011; Kuzminov et al, 2012). Dans la souche de *Synechocystis* surexprimant l'OCP ou WT exposée à des conditions de stress telle qu'une forte illumination ou une carence en fer, nous avons observé un large déclin de la fluorescence en rapport avec une concentration élevée d'OCP (Boulay et al, 2008; Wilson et al, 2007, 2008). La présence de l'OCP a dû jouer un rôle clé dans la capacité des cyanobactéries à réguler l'utilisation de la lumière et à s'adapter aux différentes niches écologiques.

Modèle du mécanisme de photoprotection associé à l'OCP

En se basant sur tous les résultats obtenus jusqu'à aujourd'hui, je propose la séquence d'événements suivante de la photo-activation de l'OCP au mécanisme de photoprotection associé (Figure 47). Trois éléments sont nécessaires et suffisants pour l'induction par une lumière bleue-verte du mécanisme de photoprotection dans les cyanobactéries: OCP, PBS et FRP. L'absorption d'une intense lumière bleue-verte par le céto-caroténoïde de l'OCPo (forme orange stable inactive) déclenche des changements conformationnels dans le caroténoïde et la protéine, déstabilisant son interaction avec le domaine C-terminal (CTD). Ces modifications provoquent la rupture des liaisons hydrogènes entre le carbonyle du 3'hECN et les Tyr201 et Trp288. La présence d'un groupement carbonyle conjugué à la position C4 du caroténoïde et des résidus Tyr-201 et Tyr-288 sont requis et nécessaires pour la photoactivation de l'OCP. En revanche, les résidus Tyr44 et Trp110 sont primordiaux pour stabiliser l'OCPr. D'autres changements structurels, impliquant la dynamique du CTD comme la rupture des interactions à l'interface "majeure" (renfermant le pont salin inter-domaine R155-E244) où les deux domaines sont en contact dans l'OCPo, vont induire une forme rouge active métastable, OCPr. La rupture du pont salin R155-E244 induit une conformation ouverte de l'OCPr, et expose la surface (Face 1) du domaine N-terminal (NTD) comprenant l'Arg-155, dont la charge positive est primordiale pour la liaison de l'OCPr aux PBS.





(1) A l'obscurité et sous faible lumière, l'OCP est principalement sous la forme orange (OCPo) et elle n'est pas (ou faiblement) attachée au PBS. (2) L'absorption d'une forte lumière bleue-verte induit des changements conformationnels dans le caroténoïde et la protéine (à savoir, la dissociation de bras Nterminal, la séparation des 2 domaines et la translocation du caroténoïde dans le domaine Nterminal), convertissant l'OCPo en une forme active, rouge (OCPr). L'OCPr revient à l'OCPo à l'obscurité ou lorsque qu'elle interagit avec la FRP (fluoresence recovery protéin). (3) L'OCPr se lie à l'un des cylindres basaux du cœur du PBS par l'intermédiaire de son domaine N-terminal (NTD) qui s'intercale entre les deux derniers trimères alors que le domaine C-terminal (CTD) reste suspendu à l'extérieur du cylindre. Un déclin de la fluorescence et de l'énergie transférée aux centres réactionnels ainsi qu'une augmentation de la dissipation de l'excès d'énergie sous forme de chaleur sont alors induits. (4) La FRP, dimérique se lie au domaine C-terminal de l'OCPr permettant ainsi de la détacher du PBS et (5) d'accélérer la conversion de l'OCPr en OCPo restaurant ainsi son état fondamental (interaction entre les 2 domaines et translocation du caroténoïde dans le CTD). A l'obscurité (ou faible lumière), conditions dans lesquelles l'OCP n'est pas photo-activée, l'action de la FRP permet la récupération de la fluorescence de l'antenne. Plus de détails dans Kirilovsky (2015) et Harris et al. (2016).

La séparation du NTD et du CTD de l'OCP requiert également la dissociation de l'interface "mineure", où le bras N-terminal (constitué par les 19 premiers résidus) et le CTD sont en contact. La structure «ouverte» de l'OCPr, dans laquelle le NTD et le CTD de l'OCP sont complètement dissociés, provoque un déplacement de 12 Å du caroténoïde à l'intérieur du NTD pour se protéger du solvant. La photo-activation de l'OCP et l'accumulation de l'OCPr sont essentielles pour l'induction du mécanisme de photoprotection. Le désassemblage du NTD et du CTD permet à la Face 1 du NTD de l'OCPr de se lier fortement aux PBS, contribuant ainsi à la dissipation thermique de l'énergie et au déclin de la fluorescence des PBS. Par conséquent, le CTD régule l'activité de l'OCPo en empêchant sa liaison aux PBS. Dans la cellule, l'amplitude du déclin d'énergie dépend de la concentration de l'OCPr qui résulte d'une part de la concentration de l'OCP, de l'intensité lumineuse et de la température et d'autre part, de la stabilité et de l'affinité de l'OCPr pour les PBS. Seule l'OCPr est capable de se fixer au PBS. La fixation d'une OCPr est suffisante pour éteindre la quasi-totalité de la fluorescence du PBS. L'OCPr se lie spécifiquement au cœur du PBS sur l'un des cylindres basaux. Le NTD de l'OCPr s'intercale dans le PBS, entre les deux trimères externes d'APC (le second et le trimère terminal) d'un des cylindres basaux, alors que le CTD se retrouve à l'extérieur du cylindre. Par ailleurs, ApcC est déplacé dans la cavité du cylindre, stabilisant ainsi l'interaction entre l'OCPr et le PBS. Le premier site du déclin de la fluorescence et d'énergie est une biline émettant à 660 nm. Une fois attachée aux PBS, l'OCPr est stabilisée et dissipe sous forme de chaleur l'excès d'énergie absorbée, soit par transfert de charge entre une des bilines émettant à 660 nm et le caroténoïde (3'-hECN) de l'OCPr, ou via un transfert d'énergie de l'état excité de la biline aux états ICT et S1 du 3'-hECN dans l'OCPr. Le CTD de l'OCPr intervient dans la désactivation du mécanisme de photoprotection à travers son interaction avec la FRP (Fluorescence Recovery Protein), le 3ème acteur du système. La FRP codée par le gène slr1964 chez Synechocystis est une protéine soluble sans chromophore de 13 kDa et active sous forme dimérique. La FRP interagit uniquement avec l'OCPr et la convertit rapidement en OCPo. Ainsi, la stabilité de l'OCPr non liée au PBS influe aussi sur la vitesse et l'amplitude du déclin de la fluorescence, qui va dépendre également de la concentration de la FRP et de son affinité pour l'OCPr. La FRP, en interagissant avec l'OCPr liée au PBS, induit sa reconversion en OCPo et presque simultanément son détachement du PBS. Sous forte illumination, une nouvelle OCPr va rapidement se fixer au PBS qui «demeure» désactivé.

À l'obscurité ou à faible lumière, la concentration de l'OCPr est nulle ou faible et une récupération rapide de la fluorescence du PBS sera observée, suivi par la récupération d'une antenne entièrement fonctionnelle. Ceci permet ainsi aux PBS de capter l'énergie lumineuse et de le transférer aux centres réactionnels dans les conditions où la photoprotection n'est plus nécessaire. Bien que les dernières découvertes aient permis d'énormes progrès dans la compréhension du mécanisme de photoprotection, des points importants restent en discussion, et sont à élucider.

Quel est le site de fixation de l'OCP et du déclin de la fluorescence dans les PBS ?

L'intercalation du NTD entre le trimère terminal (contenant ApcD) et le second trimère (incluant le monomère ApcEF) pourrait expliquer comment le caroténoïde (3'-hECN) est amené au voisinage des bilines d'APC du cœur du PBS à une distance favorisant un déclin efficace de l'énergie (Harris et al, PNAS 2016). Notre modèle est en accord avec les récents résultats de Kuzminov et al. (2014) qui ont également proposé que le site de fixation de l'OCP sur le PBS est probablement situé entre ces deux trimères. Nos résultats ne sont pas en contradiction avec les résultats de Tian et al. (2011) qui désignent les bilines émettant à 660 nm comme le premier site du déclin de la fluorescence. Par ailleurs, les trimères comprenant ApcD et ApcE renferment également deux paires de bilines émettant à 660 nm. Mais il n'est pas impossible que le NTD puisse réellement interagir avec des bilines sur les deux trimères, expliquant ainsi l'extinction de la fluorescence d'une biline émettant à 660 nm et d'une autre émettant à 680 nm attachée à la protéine ApcE observée par Kuzminov et al. (2012). Nos résultats montrent également que lors de la fixation de l'OCP, ApcC se déplace et se rapproche d'ApcF (Harris et al, PNAS 2016). Nous avons suggéré dans le passé qu'il existe une homologie structurale entre le CTD de l'OCP et ApcC qui stabilise les deux trimères externes d'APC du cœur du PBS (Wilson et al, 2008). En se déplaçant dans le cylindre, ApcC pourrait stabiliser la liaison en mimant le CTD expliquant davantage la stabilité de l'interaction OCP-PBS in vivo et in vitro. Le positionnement du CTD à l'extérieur du cylindre permet son accessibilité à la FRP dont le rôle est de détacher l'OCP du PBS (Gwizdala et al, 2011 ; Sutter et al, 2013). L'OCP interagit également avec des composants du bras (CpcG et CpcB) du PBS (Harris et al, 2016), mais la présence des bras, qui est importante pour la stabilité du complexe OCP-PBS, n'est pas indispensable pour la liaison de l'OCP au PBS.

L'étude des mutants de résidus des trimères d'APC interagissant avec l'OCP et de résidus du linker de l'OCP pourrait nous fournir plus d'informations sur le site de liaison de l'OCP au PBS.

L'intercalation du NTD entre les deux trimères externes et le mouvement du caroténoïde (Leverenz et al, 2015) pourrait rapprocher à une distance de 5-10 Å l'un ou les deux anneaux du 3'-hECN des bilines (Harris et al, PNAS 2016). Tian et al. (2011, 2012) ont proposé que cette faible distance entre le 3'-hECN et la biline émettant à 660 nm pourrait permettre un transfert de charge entre la biline et le 3'-hECN, provoquant un rapide (240 +/-60 fs)⁻¹ et efficace déclin de la fluorescence (80%). Cependant, ils n'excluent pas la possibilité qu'un transfert d'énergie de la biline au 3'-hECN puisse être responsable du déclin. Berera et al. (2012), en se basant sur les caractéristiques des états excités de l'OCPr, ont suggéré un transfert d'énergie de l'état excité de la biline à l'état ICT et S1 du 3'-hECN dans l'OCPr, le rendant extrêmement efficace pour dissiper l'énergie. Des mesures d'absorption ultrarapides des complexes OCP-PBS transitoires seront nécessaires pour distinguer ces deux mécanismes. Néanmoins, la modification de la structure d'un des cylindres basaux du cœur du PBS, provoquée par la liaison du NTD de l'OCP, pourrait être la source réelle de la dissipation d'énergie, empêchant ainsi la transmission d'énergie vers les centres réactionnels. La séparation du trimère terminal du second pourrait affecter l'environnement protéique d'une ou de plusieurs bilines située(s) dans la région d'interaction entre l'OCP et le PBS inhibant, leurs capacités de propagation d'énergie ou les convertissant en dissipateurs d'énergie, comme l'ont proposé Wang et Moerner (2015). La cristallisation du complexe OCPr-PBS quenché ou d'autres études structurales et spectroscopiques seront nécessaires pour élucider le mécanisme d'extinction de l'énergie.

Quel est le mécanisme moléculaire de la FRP et son site d'interaction avec l'OCP ?

Nos résultats indiquent que **la FRP pourrait agir en diminuant l'énergie d'activation de la reconversion OCPr en OCPo**. L'énergie d'activation semble être beaucoup plus élevée pour les OCPs mutées R155E et E244L que pour l'OCP WT. À 10°C, la FRP n'a presque pas d'effet sur la cinétique alors qu'à 19°C, la FRP accélère la reconversion (OCPr en OCPo) des mutants E244L et R155E (Wilson et al, 2012). Ces données suggérent que la diminution de l'énergie d'activation induit par la FRP dans le cas des mutants n'est pas suffisante, pour que la réaction se fasse à 9°C. En 2013, la structure de la FRP de *Synechocystis*, nous a permis d'identifier son site actif - un patch d'acides aminés exposés à l'interface monomère-monomère. En outre, des expériences de co-immunoprécipitation ont révélé que la FRP interagit uniquement avec le domaine C-terminal (CTD) de l'OCP (**Sutter et al, 2013**). Même si un modèle d'interaction OCP-FRP a donné des pistes sur les résidus qui pourraient être de bons candidats pour une mutagenèse ciblée, nous n'avons pas encore déterminé lequel ou lesquels de ces résidus du CTD de l'OCP interagi(ssen)t avec la FRP. La résolution de la structure du domaine C-terminal et/ou du complexe CTD/FRP ainsi que l'étude de mutants de résidus du CTD interagissant avec la FRP, nous permettront de décrire les résidus de l'OCP importants pour les changements conformationnels de l'OCP en OCPo.

Une question sur la manière dont les organismes qui ne possèdent pas la FRP accomplissent la reconversion (OCPr en OCPo) demeure ouverte, mais nous savons que l'OCPr peut thermiquement se reconvertir en OCPo sans interaction avec aucune protéine.

Quel est l'état oligomérique de l'OCP ?

Des expériences par spectrométrie de masse et filtration sur gel ont montré que l'OCPo est sous forme dimérique en solution (Kerlfeld et al, 2003), une forme régulièrement observée dans ses nombreuses structures cristallines. L'existence de changements fonctionnels de l'état oligomérique de protéines sensibles à la lumière bleue valide la possibilité qu'une OCP fonctionnelle soit dimérique. Néanmoins, il reste à démontrer que l'OCPo est sous forme dimérique dans les cellules. Toutefois, l'OCP de Synechocystis a été éluée comme monomère par filtration sur gel (Wilson et al, 2010). Des données récentes montrent qu'en solution, l'OCPo peut être présente sous forme d'une mixture (1:1) monomère/ dimère ou seulement monomérique (Gupta et al, 2015 ; Zhang, Liu et al, 2016), alors que l'OCPr est surtout présente sous forme monomèrique (Zhang et al, 2014). Les structures de l'OCPo représentent deux protéines agencées en dimère antiparallèle. L'interface de dimérisation implique principalement le domaine N-terminal avec 14 liaisons hydrogènes, deux ponts salins (entre Arg27 et Asp19), ainsi que deux molécules d'eau conservées. Cependant, seulement trois des 22 résidus qui composent cette interface sont conservés parmi les homologues de l'OCP. Il a été proposé que le détachement du bras N-terminal du CTD faciliterait la monomérisation de l'OCP, au moins in vitro, lors de la photo-activation (Liu et al, 2014; Zhang et al, 2014).

En revanche, Gupta et al (2015) ont démontré qu'aucune modification de l'état oligomérique (par exemple, la dimérisation) n'est requise pour la photoactivation de l'OCP. Par conséquent, il est probable que la dimérisation observée à plusieurs reprises dans les cristaux est un artefact dû à une concentration relativement élevée de protéines et/ ou aux conditions de cristallisation.

L'analyse d'une préparation de membranes-phycobilisomes ou du lysat cellulaire d'*E. coli* par bleu d'électrophorèse en gel de polyacrylamide natif (BN-PAGE), séparant dans des conditions natives, des protéines dont l'OCP combiné ou non à un gel dénaturant (SDS-PAGE), suivi d'une détection par immuno-blot pourrait aider à démontrer l'état oligomérique de l'OCP dans la cellule. Le développement de BN-PAGE généralement utilisé pour séparer des complexes multiprotéiques ou membranaires (Schagger et Jagow, 1991 ; Schagger, Cramer et al, 1994) pour les protéines solubles permettra de déterminer dans des conditions natives l'état oligomérique de l'OCP isolée en solution.

La technique de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes ou transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET, acronyme de l'anglais Förster resonance energy transfer ou fluorescence resonance energy transfer) est une piste pour étudier les changements de l'état oligomérique de l'OCP (passage de la forme dimère à la forme monomère) lors de la photoactivation. Le FRET mesure des intensités entre deux fluorophores, donneur et accepteur, incorporés à différentes positions de la protéine à l'aide d'un fluorimètre ou en microscopie. Le marquage chimique d'une cystéine unique avec un fluorophore naphtalimide relié à la phénazine, accepteur d'énergie, est utilisé pour la détection sélective de la cystéine. Or deux cystéines (Cys84 et 245) sont présentes dans l'OCP. La Cys84 est à la surface de l'OCP mais elle ne peut pas servir pour les mesures de FRET car la distance entre les Cys84 d'un dimère est trop importante. Il est donc nécessaire qu'elle soit mutée (Cys84Ala par exemple). En revanche, il n'est pas utile de muter la Cys245, qui se trouve à l'intérieur de l'OCP. Le bon candidat pour ces mesures pourrait être dans le dimère, les Glu130 qui se trouvent à une distance de 45 Å, mais il faut les muter en Cys (Glu130Cys). La construction d'un double mutant Cys84Ala / Glu130Cys pourrait permettre de réaliser des mesures de FRET.

Quel est le mécanisme de photo-activation de l'OCP?

L'ensemble de nos données confirment des fonctions distinctes pour chaque domaine de l'OCP dans la photochimie et la photoprotection : l'activité de dissipation d'énergie constitutive du domaine actif N-terminal et le rôle de régulateur du domaine C-terminal (CTD) à travers ses réponses à la lumière et à la FRP. Ces données suggèrent qu'il pourrait avoir des similarités mécanistiques entre l'OCP et d'autres protéines photorécepteurs de la lumière bleue qui comportent des domaines BLUF (Blue Light Using Flavin) et LOV (Light Oxygen Voltage). Les domaines BLUF et LOV fonctionnent généralement comme des domaines récepteurs / d'entrée qui peuvent être associés, soit de manière covalente, ou non covalente à différents domaines de sortie pour réaliser diverses fonctions telles que la transduction du signal, l'activité enzymatique ou la liaison de l'ADN (Crosson et al, 2003; Losi, 2007). Peut-on considérer l'OCP comme un récepteur de lumière bleue ? Il y a une similitude structurelle entre les domaines BLUF et LOV et le domaine C-terminal de l'OCP : tous présentent un noyau en feuillets β entouré par des hélices α . Dans les domaines BLUF et LOV, des changements dans le chromophore en réponse à la lumière provoquent des modifications des liaisons hydrogènes intra-protéine entre les hélices α et les feuillets β . Ces modifications induisent des changements à l'interface inter-domaine et/ou l'exposition de régions de la structure et facilitent de nouvelles interactions protéine-protéine spécifiques, en réponse au signal lumineux. Par exemple, dans certains systèmes photo-senseurs associés à LOV, la lumière altère la liaison hydrogène au chromophore. Elle se propage à travers le feuillet β , aboutissant au déplacement d'une hélice (J α) qui interagit par ailleurs avec le domaine effecteur (Harper et al, 2003, 2004). De plus, dans bon nombre de ces systèmes, les molécules d'eau structurellement conservées sont également connues pour jouer un rôle dans les changements conformationnels qui convertissent le signal lumineux en une fonction effectrice.

Dans l'OCP, l'absorption de la lumière par le caroténoïde (3'-hECN) induit des changements dans le 3'-hECN qui entraînent des modifications au niveau des liaisons hydrogènes entre le groupement carbonyle du caroténoïde et les résidus Tyr201 et Trp288 du domaine C-terminal de la protéine. Celles-ci peuvent se propager par le biais de la protéine et les changements de liaisons hydrogènes, aboutissant à une «ouverture» de l'OCP et à l'exposition de l'Arg155, essentielle pour la liaison de l'OCP au PBS.

Gupta et al, (2015) ont démontré qu'un réseau de liaisons hydrogènes émanant du 3'-hECN jusqu'à la surface de l'OCP ainsi que la présence de molécules d'eau structurellement conservées sont impliqués dans la voie de propagation du signal. De plus, nous avons observé que dans les mutants des résidus Trp288 et Tyr201 (mutants dans lesquels l'une des liaisons hydrogènes entre l'OCP et le 3'-hECN est absent), des changements de conformation, critique pour l'interaction entre le caroténoïde et la biline, ne sont apparemment pas induites, conduisant à l'absence de la dissipation d'énergie (Wilson et al, 2011). La représentation de l'OCP comme une protéine modulaire avec des domaines structurels et fonctionnels distincts a fait progresser de manière significative la compréhension mécanistique de la fonction photoprotectrice de l'OCP. La structure modulaire et la fonction de l'OCP diffèrent des autres protéines photo-senseurs, parce que chaque domaine de l'OCP exige absolument le 3'-hECN pour remplir sa fonction. Le domaine C-terminal ne peut pas fonctionner comme un photosenseur sans l'absorption de la lumière par le 3'-hECN. Le domaine effecteur Nterminal, lorsqu'il est lié au PBS requiert le 3'-hECN pour directement dissiper l'énergie (Tian et al, 2011, 2012; Berera et al, 2012; Polivka et al, 2005). L'OCP représente donc un système remarquablement minimisé dans lequel les domaines senseur et effecteur partagent un seul caroténoïde qui est essentiel, à la fois pour la fonction de photosenseur et de photoprotection. Pour élucider le photocycle de l'OCP, l'étude spectroscopique de la fluorescence des Trp277 et 288 proches du 3'-hECN pourrait nous fournir des informations sur les changements conformationnels de la protéine ainsi que sur les étapes intermédiaires.

Quelle sont les fonctions des homologues N et C-terminaux de l'OCP ?

Dans un certain nombre de génomes cyanobactériens, surtout chez les cyanobactéries fixatrices d'azote, des gènes codant des homologues du NTD et du CTD de l'OCP sont présents. Par exemple, dans la cyanobactérie *Anabaena* (*Nostoc*) PCC 7120, quatre homologues du NTD sont exprimés en présence ou en absence de nitrate (**López-Igual et al**, **2016**). L'analyse phylogénétique montre que ces quatre protéines appartiennent à quatre branches différentes (**Melnicki et al**, **2016**). Le développement de la production d'holo-OCP dans *E. coli* (**Bourcier de Carbon et al**, **2015**) a permis de démontrer clairement que ces protéines sont en hélices α , attachent un caroténoïde, ont des fonctions diverses et constituent une nouvelle famille de protéines liant des caroténoïdes, nommée HCPs (Helical Carotenoid Proteins).

Seule la protéine All4941 (HCP4) est capable de se lier aux PBS avec une haute affinité et d'éteindre efficacement leurs fluorescences. Dans des conditions de stress, telles qu'une baisse de température ou de CO2, dans lesquelles la chaîne photosynthétique de transport d'électrons est réduite ou dans des conditions de faible éclairage où l'OCP n'est pas photo-activable, l'expression du gène all4941 (HCP4) augmente probablement et pourrait être impliquée dans un mécanisme diminuant l'énergie arrivant aux centres réactionnels. Ce rôle serait également essentiel dans les hétérocystes afin de réduire le transfert d'énergie des PBS encore connectés aux PS. En se basant sur une complète analyse phylogénétique, il a été proposé que la protéine All4941 (HCP4) soit l'ancêtre du NTD de l'OCP. Il a aussi été suggéré que l'organisation modulaire de l'OCP contribue à son évolution comme l'assemblage d'homologues N- et C-terminaux, formant des OCPs complètes avec d'exceptionnelles propriétés photosenseurs et photoprotectrices (Kerfeld et al, 2003; Kirilovsky et Kerfeld, 2013; Melnicki et al, 2016). De plus, des données préliminaires ont montré que le gène all4940 (CTDH) adjacent au gène all4941 (HCP4), est exprimé en présence ou en absence de nitrate (López-Igual et al, 2016). Ainsi, la formation d'un complexe All4941-CTDH inhibant un indésirable déclin d'énergie au niveau du PBS dans des conditions de faible éclairage est possible dans les cellules d'Anabaena. Cette hypothèse est actuellement testée. La formation d'un hétérodimère HCP4-CTDH photoactivable comme l'OCP reste à étudier. Pour comprendre l'évolution de l'OCP, la construction d'OCPs à partir des HCP4 et des CTDH de différentes souches de cyanobactéries sera nécessaire. Les protéines All3221 (HCP2) et All4783 (HCP3) se révèlent être d'excellentes

désactivateurs d'oxygène singulet (¹O₂) comme l'OCP (**López-Igual et al, 2016**). En effet, nous avons démontré que l'OCP, en plus de son activité dans le déclin d'énergie, joue un important rôle dans l'extinction de l'¹O₂ produit sous une forte intensité lumineuse, protégeant ainsi les cellules du stress oxydatif (**Sedoud et al, 2014** ; **Bourcier de Carbon et al, 2015**). La protéine All1123 (HCP1) est la seule HCP d'*Anabaena* qui ne semble pas avoir de rôle dans le déclin de la fluorescence des PBS et de l'oxygène singulet, même si elle attache un caroténoïde (**Melnicki et al, 2016** ; **López-Igual et al, 2016**). La protéine All1123 (HCP1) est soluble et est présente dans le cytoplasme des cellules végétatives et des hétérocystes sans aucune interaction claire avec les membranes thylacoïdiennes et les PBS. Nous avons proposé qu'elle pourrait éventuellement avoir une fonction de transporteur de caroténoïdes du site de synthèse situé dans la membrane thylacoïdienne au cytoplasme.

Etant donné que les HCPs sont exprimées dans les cellules d'Anabaena, l'étude de mutants de délétion des HCPs 1, 2, 3 et 4 pourraient nous permettre d'élucider leurs rôles.

Nous avons observé dans les structures des protéines All3221 (HCP2), All4783 (HCP3) et All1123 (HCP1), l'existence d'un pont salin intramoléculaire impliquant l'Arg155 et des résidus sur la Face 1, qui empêche ces HCPs de se lier aux PBS et d'induire le déclin de la fluorescence (Figure 46 et López-Igual et al, 2016). L'étude de mutants causant la rupture du pont salin intramoléculaire pourra nous permettre de rétablir l'activité de dissipation d'énergie de ces HCPs.

Par ailleurs, la question sur l'induction par la lumière du mécanisme de NPQcya dans des souches cyanobactériennes dépourvues du gène entier *ocp* reste ouverte. Le fait que certaines cyanobactéries (comme *T. Elongatus*) possédent des gènes en tandem codant pour les domaines N- et C-terminaux, mais ne présentent pas le mécanisme de photoprotection induit par la lumière bleue-verte (Boulay et al, 2008) ainsi que le gène codant la FRP, suggère que leurs rôles pourraient être complètement différentes de celle de l'OCP. Il sera intéressant d'exprimer le domaine N-terminal dans *E. coli* afin de déterminer si ce domaine peut lier un caroténoïde et avoir une activité d'extinction d'énergie et d'¹O₂. L'étude d'expression par des expériences de transcription inverse, de PCR quantitative et d'isolation dans *T. Elongatus* pourrait nous donner des indices sur l'expression cellulaire des domaines N- et C-terminaux. L'introduction du gène entier *ocp, frp* et des gènes impliqués dans la synthèse de caroténoïdes tel que l'échinénone dans *T. Elongatus* permettra d'obtenir une souche présentant un mécanisme de NPQcya.

Quelles applications pour l'OCP?

L'OCP protège les photosystèmes et les cellules via deux mécanismes différents: par le déclin de l'excès d'énergie d'excitation diminuant ainsi les séparations de charge dans les centres réactionnels, et par l'extinction de l'oxygène singulet formé au cours des réactions photochimiques qui se déroulent dans les centres réactionnels et dans les antennes. Ces deux mécanismes de photoprotection se complètent mutuellement. En effet, le déclin de l'énergie d'excitation ne peut pas éliminer totalement les réactions photochimiques. L' $^{1}O_{2}$ peut également se former à de faibles intensités lumineuses lorsque d'autres stress abiotiques sont présents, conditions dans lesquelles l'activité de dissipation d'énergie de l'OCP n'est pas activée. Ainsi, dans les cyanobactéries, le caroténoïde de l'OCP a une double fonction photoprotectrice (comme déclin d'énergie et d' $^{1}O_{2}$), comme la zéaxanthine dans les antennes des plantes (Frank et Cogdell, 1996).

Le développement de la production d'holo-OCP (OCP liant un caroténoïde) dans E. coli (Bourcier de Carbon et al, 2015) a non seulement accéléré l'élucidation du mécanisme de photoprotection associé à l'OCP par synthèse rapide des mutants de l'OCP. Mais il permettra l'isolation et la caractérisation d'autres protéines liant des caroténoïdes ou d'antioxydants ayant de potentielles applications pharmaceutiques et cosmétiques. Le statut de première protéine photo-active à caroténoïde connue, comme senseur, ainsi que sa solubilité dans l'eau, font de l'OCP un modèle précieux pour l'étude des propriétés énergétiques et photophysiques à l'état-solution des caroténoïdes, qui sont une classe diversifiée de molécules présentes dans tous les domaines de la vie. De plus, les caroténoïdes sont largement étudiés pour leurs propriétés anti-oxydantes, et donc l'OCP peut servir de matrice pour la livraison de caroténoïdes à des fins thérapeutiques en médecine. En raison de sa grande efficacité dans l'extinction de la fluorescence couplée au faible rendement de sa photoactivation par des longueurs d'onde spécifiques de la lumière, l'OCP a des propriétés idéales comme photoswitch (protéine modulaire avec un domaine senseur et effecteur) analogue à d'autres récepteurs de lumière bleue. Ceci suppose qu'elle peut servir de base à un nouveau type de système pour le développement de technologies en optogénétique.

Bibliographie

Abed, R.M., Dobretsov, S., and Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. Journal of Applied Microbiology *106*, 1–12.

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

Ajlani, G., and Vernotte, C. (1998a). Construction and characterization of a phycobiliprotein-less mutant of Synechocystis sp. PCC 6803. Plant Molecular Biology *37*, 577–580.

Ajlani, G., and Vernotte, C. (1998b). Deletion of the PB-loop in the LCM subunit does not affect phycobilisome assembly or energy transfer functions in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6714. European Journal of Biochemistry 257, 154–159.

Ajlani, G., Vernotte, C., DiMagno, L., and Haselkorn, R. (1995). Phycobilisome core mutants of Synechocystis PCC 6803. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1231*, 189–196.

Aliverti, A., Pandini, V., Pennati, A., de Rosa, M., and Zanetti, G. (2008). Structural and functional diversity of ferredoxin-NADP+ reductases. Archives of Biochemistry and Biophysics 474, 283–291.

Allahverdiyeva, Y., Ermakova, M., Eisenhut, M., Zhang, P., Richaud, P., Hagemann, M., Cournac, L., and Aro, E.-M. (2011). Interplay between flavodiiron proteins and photorespiration in Synechocystis sp. PCC 6803. Journal of Biological Chemistry 286, 24007–24014.

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

Anderson, D.C., Campbell, E.L., and Meeks, J.C. (2006). A Soluble 3D LC/MS/MS Proteome of the Filamentous Cyanobacterium Nostoc p unctiforme. Journal of Proteome Research *5*, 3096–3104.

Andrizhiyevskaya, E.G., Schwabe, T.M., Germano, M., D'Haene, S., Kruip, J., van Grondelle, R., and Dekker, J.P. (2002). Spectroscopic properties of PSI–IsiA supercomplexes from the cyanobacterium Synechococcus PCC 7942. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1556*, 265–272.

Archibald, J.M. The Puzzle of Plastid Evolution. Current Biology 19, R81–R88.

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

Arteni, A.A., Liu, L.-N., Aartsma, T.J., Zhang, Y.-Z., Zhou, B.-C., and Boekema, E.J. (2008). Structure and organization of phycobilisomes on membranes of the red alga Porphyridium cruentum. Photosynthesis Research *95*, 169–174.

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

Ashby, M.K., and Mullineaux, C.W. (1999). The role of ApcD and ApcF in energy transfer from phycobilisomes to PS I and PS II in a cyanobacterium. Photosynthesis Research *61*, 169–179.

Aspinall-O'Dea, M., Wentworth, M., Pascal, A., Robert, B., Ruban, A., and Horton, P. (2002). In vitro reconstitution of the activated zeaxanthin state associated with energy dissipation in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences *99*, 16331–16335.

Aspinwall, C.L., Sarcina, M., and Mullineaux, C.W. (2004). Phycobilisome mobility in the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC7942 is influenced by the trimerisation of photosystem I. Photosynthesis Research *79*, 179–187.

Bailey, S., and Grossman, A. (2008). Photoprotection in cyanobacteria: regulation of light harvesting. Photochemistry and Photobiology *84*, 1410–1420.

Bailey, S., Mann, N.H., Robinson, C., and Scanlan, D.J. (2005). The occurrence of rapidly reversible non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence in cyanobacteria. FEBS Letters *579*, 275–280.

Bald, D. (2011). ATP synthase: structure, function and regulation of a complex machine. In Bioenergetic Processes of Cyanobacteria, (Springer), pp. 239–261.

Battchikova, N., Vainonen, J.P., Vorontsova, N., Keränen, M., Carmel, D., and Aro, E.-M. (2010). Dynamic changes in the proteome of Synechocystis 6803 in response to CO2 limitation revealed by quantitative proteomics. Journal of Proteome Research *9*, 5896–5912.

Bendall, D.S., and Manasse, R.S. (1995). Cyclic photophosphorylation and electron transport. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1229*, 23–38.

Berera, R., Herrero, C., Van Stokkum, I.H., Vengris, M., Kodis, G., Palacios, R.E., Van Amerongen, H., Van Grondelle, R., Gust, D., and Moore, T.A. (2006). A simple artificial light-harvesting dyad as a model for excess energy dissipation in oxygenic photosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences *103*, 5343–5348.

Berera, R., van Stokkum, I.H.M., Gwizdala, M., Wilson, A., Kirilovsky, D., and van Grondelle, R. (2012). The Photophysics of the Orange Carotenoid Protein, a Light-Powered Molecular Switch. J. Phys. Chem. B *116*, 2568–2574.

Bhaya, D., Dufresne, A., Vaulot, D., and Grossman, A. (2002). Analysis of the hli gene family in marine and freshwater cyanobacteria. FEMS Microbiology Letters *215*, 209–219.

Bhosale, P., and Bernstein, P.S. (2005). Synergistic effects of zeaxanthin and its binding protein in the prevention of lipid membrane oxidation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease *1740*, 116–121.

Bhosale, P., Larson, A.J., Frederick, J.M., Southwick, K., Thulin, C.D., and Bernstein, P.S. (2004). Identification and characterization of a Pi isoform of glutathione S-transferase (GSTP1) as a zeaxanthin-binding protein in the macula of the human eye. Journal of Biological Chemistry 279, 49447–49454.

Bibby, T.S., Nield, J., and Barber, J. (2001). Iron deficiency induces the formation of an antenna ring around trimeric photosystem I in cyanobacteria. Nature *412*, 743–745.

Biggins, J., and Bruce, D. (1989). Regulation of excitation energy transfer in organisms containing phycobilins. Photosynthesis Research 20, 1–34.

Boekema, E.J., Hifney, A., Yakushevska, A.E., Piotrowski, M., Keegstra, W., Berry, S., Michel, K.-P., Pistorius, E.K., and Kruip, J. (2001). A giant chlorophyll–protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria. Nature *412*, 745–748.

Bonaventura, C., and Myers, J. (1969). Fluorescence and oxygen evolution from Chlorella pyrenoidosa. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *189*, 366–383.

Boulay, C., Abasova, L., Six, C., Vass, I., and Kirilovsky, D. (2008). Occurrence and function of the orange carotenoid protein in photoprotective mechanisms in various cyanobacteria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics *1777*, 1344–1354.

Boulay, C., Wilson, A., D'Haene, S., and Kirilovsky, D. (2010). Identification of a protein required for recovery of full antenna capacity in OCP-related photoprotective mechanism in cyanobacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences *107*, 11620–11625.

Brettel, K., and Leibl, W. (2001). Electron transfer in photosystem I. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1507*, 100–114.

Bricker, T.M., and Frankel, L.K. (2002). The structure and function of CP47 and CP43 in photosystem II. Photosynthesis Research *72*, 131–146.

Bruce, D., Brimble, S., and Bryant, D.A. (1989). State transitions in a phycobilisome-less mutant of the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *974*, 66–73.

Bryant, D.A. (1982). Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: properties and occurrence in cyanobacteria. Microbiology *128*, 835–844.

Bryant, D.A. (1991). Cyanobacterial phycobilisomes: progress toward complete structural and functional analysis via molecular genetics. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants 7, 257–300.

Burnap, R.L., Troyan, T., and Sherman, L.A. (1993). The Highly Abundant Chlorophyll-Protein Complex of Iron-Deficient Synechococcus sp. PCC7942 (CP43 [prime]) Is Encoded by the isiA Gene. Plant Physiology *103*, 893–902.

Cadoret, J.-C., Demoulière, R., Lavaud, J., Van Gorkom, H.J., Houmard, J., and Etienne, A.-L. (2004). Dissipation of excess energy triggered by blue light in cyanobacteria with CP43'(isiA). Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1659*, 100–104.

Campbell, D., Hurry, V., Clarke, A.K., Gustafsson, P., and Öquist, G. (1998). Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. Microbiology and Molecular Biology Reviews *62*, 667–683.

Capuano, V., Braux, A.-S., de Marsac, N.T., and Houmard, J. (1991). The" anchor polypeptide" of cyanobacterial phycobilisomes. Molecular characterization of the Synechococcus sp. PCC 6301 apce gene. Journal of Biological Chemistry *266*, 7239–7247.

Capuano, V., Thomas, J.C., de Marsac, N.T., and Houmard, J. (1993). An in vivo approach to define the role of the LCM, the key polypeptide of cyanobacterial phycobilisomes. Journal of Biological Chemistry *268*, 8277–8283.

de Carbon, C.B., Thurotte, A., Wilson, A., Perreau, F., and Kirilovsky, D. (2015). Biosynthesis of soluble carotenoid holoproteins in Escherichia coli. Scientific Reports 5, 9085–9085.

Cardona, T., Sedoud, A., Cox, N., and Rutherford, A.W. (2012). Charge separation in photosystem II: a comparative and evolutionary overview. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1817*, 26–43. Center for History and New Media Guide rapide pour débuter.

Chábera, P., Durchan, M., Shih, P.M., Kerfeld, C.A., and Polívka, T. (2011). Excitedstate properties of the 16kDa red carotenoid protein from Arthrospira maxima. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1807*, 30–35.

Chauvat, F., De Vries, L., Van der Ende, A., and Van Arkel, G.A. (1986). A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803. Molecular and General Genetics MGG 204, 185–191.

Collins, A.M., Wen, J., and Blankenship, R.E. (2011). Photosynthetic light-harvesting complexes. In Molecular Solar Fuels, pp. 85–106.

Crosson, S., Rajagopal, S., and Moffat, K. (2003). The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. Biochemistry 42, 2-10.

Cunningham, F.X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K.A., DellaPenna, D., and Gantt, E. (1996). Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of Arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. The Plant Cell *8*, 1613–1626.

De Marsac, N.T. (2003). Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations. Photosynthesis Research *76*, 193–205.

de Marsac, N.T., and Cohen-bazire, G. (1977). Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. Proceedings of the National Academy of Sciences 74, 1635–1639.

De Philippis, R., Colica, G., and Micheletti, E. (2011). Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. Applied Microbiology and Biotechnology *92*, 697–708.

Demmig-Adams, B., Garab, G., Adams III, W., and Govindjee, U. of I. (2014). Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria (Springer).

Dominy, P., and Williams, W.P. (1987). The role of respiratory electron flow in the control of excitation energy distribution in blue-green algae. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *892*, 264–274.

Dong, C., and Zhao, J. (2008). ApcD is required for state transition but not involved in bluelight induced quenching in the cyanobacterium Anabaena sp. PCC7120. Chinese Science Bulletin *53*, 3422–3424.

Dong, C., Tang, A., Zhao, J., Mullineaux, C.W., Shen, G., and Bryant, D.A. (2009). ApcD is necessary for efficient energy transfer from phycobilisomes to photosystem I and helps to prevent photoinhibition in the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1787*, 1122–1128.

Ducat, D.C., Way, J.C., and Silver, P.A. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. Trends in Biotechnology *29*, 95–103.

Ducret, A., Müller, S.A., Goldie, K.N., Hefti, A., Sidler, W.A., Zuber, H., and Engel, A. (1998). Reconstitution, characterisation and mass analysis of the pentacylindrical allophycocyanin core complex from the cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120. Journal of Molecular Biology 278, 369–388.

Ehira, S., and Ohmori, M. (2006). NrrA, a nitrogen-responsive response regulator facilitates heterocyst development in the cyanobacterium Anabaena sp. strain PCC 7120. Molecular Microbiology *59*, 1692–1703.

El Bissati, K., and Kirilovsky, D. (2001). Regulation of psbA and psaE expression by light quality in Synechocystis species PCC 6803. A redox control mechanism. Plant Physiology *125*, 1988–2000.

El Bissati, K., Delphin, E., Murata, N., Etienne, A.-L., and Kirilovsky, D. (2000). Photosystem II fluorescence quenching in the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803: involvement of two different mechanisms. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics *1457*, 229–242.

Emlyn-Jones, D., Ashby, M.K., and Mullineaux, C.W. (1999). A gene required for the regulation of photosynthetic light harvesting in the cyanobacterium Synechocystis 6803. Molecular Microbiology *33*, 1050–1058.

Fay, P. (1992). Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. Microbiological Reviews 56, 340–373.

Flaherty, B.L., Van Nieuwerburgh, F., Head, S.R., and Golden, J.W. (2011). Directional RNA deep sequencing sheds new light on the transcriptional response of Anabaena sp. strain PCC 7120 to combined-nitrogen deprivation. BMC Genomics *12*, 1.

Flores, E., and Herrero, A. (2010). Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. Nature Reviews Microbiology *8*, 39–50.

Folea, I.M., Zhang, P., Aro, E.-M., and Boekema, E.J. (2008). Domain organization of photosystem II in membranes of the cyanobacterium Synechocystis PCC6803 investigated by electron microscopy. FEBS Letters *582*, 1749–1754.

Frank, H.A., and Cogdell, R.J. (1996). Carotenoids in photosynthesis. Photochemistry and Photobiology *63*, 257–264.

Frank, H.A., Bautista, J.A., Josue, J.S., and Young, A.J. (2000). Mechanism of nonphotochemical quenching in green plants: energies of the lowest excited singlet states of violaxanthin and zeaxanthin. Biochemistry *39*, 2831–2837.

Fromme, P., and Grotjohann, I. (2006). Structural analysis of cyanobacterial photosystem I. In Photosystem I, (Springer), pp. 47–69.

Fromme, P., and Grotjohann, I. (2011). Structure of cyanobacterial photosystems I and II. In Bioenergetic Processes of Cyanobacteria, (Springer), pp. 285–335.

Fromme, P., Jordan, P., and Krauß, N. (2001). Structure of photosystem I. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1507*, 5–31.

Fukuzawa, H., Ogawa, T., and Kaplan, A. (2012). The uptake of CO2 by cyanobacteria and microalgae. In Photosynthesis, (Springer), pp. 625–650.

Fulda, S., Mikkat, S., Huang, F., Huckauf, J., Marin, K., Norling, B., and Hagemann, M. (2006). Proteome analysis of salt stress response in the cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803. Proteomics *6*, 2733–2745.

Gantt, E., and Conti, S. (1966a). Phycobiliprotein localization in algae. In Brookhaven Symposia in Biology, p. 393.

Gantt, E., and Conti, S.F. (1966b). Granules associated with the chloroplast lamellae of Porphyridium cruentum. The Journal of Cell Biology *29*, 423–434.

Gindt, Y.M., Zhou, J., Bryant, D.A., and Sauer, K. (1992). Core mutations of Synechococcus sp. PCC 7002 phycobilisomes: a spectroscopic study. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 15, 75–89.

Gindt, Y.M., Zhou, J., Bryant, D.A., and Sauer, K. (1994). Spectroscopic studies of phycobilisome subcore preparations lacking key core chromophores: assignment of excited state energies to the L cm, β 18 and α AP-B chromophores. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1186*, 153–162.

Giuffra, E., Cugini, D., Croce, R., and Bassi, R. (1996). Reconstitution and Pigment-Binding Properties of Recombinant CP29. European Journal of Biochemistry 238, 112–120.

GLAUSER, M., BRYANT, D.A., FRANK, G., WEHRLI, E., RUSCONI, S.S., SIDLER, W., and ZUBER, H. (1992). Phycobilisome structure in the cyanobacteria Mastigocladus laminosus and Anabaena sp. PCC 7120. European Journal of Biochemistry *205*, 907–915.

Glazer, A.N. (1984). Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics *768*, 29–51.

Glazer, A.N., and Bryant, D.A. (1975). Allophycocyanin B (λmax 671, 618 nm). Archives of Microbiology *104*, 15–22.

Gorbunov, M.Y., Kuzminov, F.I., Fadeev, V.V., Kim, J.D., and Falkowski, P.G. (2011). A kinetic model of non-photochemical quenching in cyanobacteria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1807*, 1591–1599.

Govindjee, K.J., Messinger, J., and Whitmarsh, J. (2010). Photosystem II. Encyclopedia of Life Sciences (ELS). Wiley, Chichester. Doi *10*, a0000669.

Grigorieva, G., and Shestakov, S. (1982). Transformation in the cyanobacterium Synechocystis sp. 6803. FEMS Microbiology Letters *13*, 367–370.

Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G., and Collier, J.L. (1993). The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. Microbiological Reviews *57*, 725–749.

Grotjohann, I., Jolley, C., and Fromme, P. (2004). Evolution of photosynthesis and oxygen evolution: Implications from the structural comparison of Photosystems I and II. Phys. Chem. Chem. Phys. *6*, 4743–4753.

Gupta, R.S., and Griffiths, E. (2002). Critical issues in bacterial phylogeny. Theoretical Population Biology *61*, 423–434.

Gupta, S., Guttman, M., Leverenz, R.L., Zhumadilova, K., Pawlowski, E.G., Petzold, C.J., Lee, K.K., Ralston, C.Y., and Kerfeld, C.A. (2015). Local and global structural drivers for the photoactivation of the orange carotenoid protein. Proceedings of the National Academy of Sciences *112*, E5567–E5574.

Guskov, A., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Glöckner, C., Hellmich, J., Kern, J., Frank, J., Müh, F., Saenger, W., and Zouni, A. (2010). Recent progress in the crystallographic studies of photosystem II. ChemPhysChem *11*, 1160–1171.

Gutu, A., and Kehoe, D.M. (2012). Emerging perspectives on the mechanisms, regulation, and distribution of light color acclimation in cyanobacteria. Molecular Plant *5*, 1–13.

Gwizdala, M., Wilson, A., and Kirilovsky, D. (2011). In Vitro Reconstitution of the Cyanobacterial Photoprotective Mechanism Mediated by the Orange Carotenoid Protein in Synechocystis PCC 6803. The Plant Cell *23*, 2631–2643.

Gwizdala, M., Wilson, A., Omairi-Nasser, A., and Kirilovsky, D. (2013). Characterization of the Synechocystis PCC 6803 Fluorescence Recovery Protein involved in photoprotection. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics *1827*, 348–354.

Hagemann, M. (2011). Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. FEMS Microbiology Reviews *35*, 87.

Harper, S.M., Neil, L.C., and Gardner, K.H. (2003). Structural basis of a phototropin light switch. Science *301*, 1541–1544.

Harper, S.M., Christie, J.M., and Gardner, K.H. (2004). Disruption of the LOV-Jα helix interaction activates phototropin kinase activity. Biochemistry *43*, 16184–16192.

Harris, D., Tal, O., Jallet, D., Wilson, A., Kirilovsky, D., and Adir, N. (2016). Orange carotenoid protein burrows into the phycobilisome to provide photoprotection. Proceedings of the National Academy of Sciences *113*, E1655–E1662.

Havaux, M., Guedeney, G., He, Q., and Grossman, A.R. (2003). Elimination of high-lightinducible polypeptides related to eukaryotic chlorophyll a/b-binding proteins results in aberrant photoacclimation in Synechocystis PCC6803. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1557*, 21–33.

Havaux, M., Guedeney, G., Hagemann, M., Yeremenko, N., Matthijs, H.C., and Jeanjean, R. (2005). The chlorophyll-binding protein IsiA is inducible by high light and protects the cyanobacterium Synechocystis PCC6803 from photooxidative stress. Febs Letters *579*, 2289–2293.

He, Q., Dolganov, N., Björkman, O., and Grossman, A.R. (2001). The High Lightinducible Polypeptides inSynechocystis PCC6803 EXPRESSION AND FUNCTION IN HIGH LIGHT. Journal of Biological Chemistry 276, 306–314.

Hernandez-Prieto, M.A., Tibiletti, T., Abasova, L., Kirilovsky, D., Vass, I., and Funk, C. (2011). The small CAB-like proteins of the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803: their involvement in chlorophyll biogenesis for Photosystem II. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1807*, 1143–1151.

Hess, W.R. (2011). Cyanobacterial genomics for ecology and biotechnology. Current Opinion in Microbiology *14*, 608–614.

Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A., and Ikeuchi, M. (2001). DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. The Plant Cell *13*, 793–806.

Hill, R., and Bendall, F.A.Y. (1960). Function of the two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis.

Holt, T.K., and Krogmann, D.W. (1981). A carotenoid-protein from cyanobacteria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 637, 408–414.

Holt, N.E., Fleming, G.R., and Niyogi, K.K. (2004). Toward an understanding of the mechanism of nonphotochemical quenching in green plants. Biochemistry 43, 8281–8289.

Horton, P., and Ruban, A.V. (1992). Regulation of photosystem II. Photosynthesis Research *34*, 375–385.

Horton, P., Ruban, A.V., and Walters, R.G. (1996). Regulation of light harvesting in green plants. Annual Review of Plant Biology 47, 655–684.

Horton, P., Ruban, A.V., and Wentworth, M. (2000). Allosteric regulation of the lightharvesting system of photosystem II. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences 355, 1361–1370.

Huang, C., Yuan, X., Zhao, J., and Bryant, D.A. (2003). Kinetic analyses of state transitions of the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002 and its mutant strains impaired in electron transport. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1607*, 121–130.

Ihalainen, J.A., D'Haene, S., Yeremenko, N., van Roon, H., Arteni, A.A., Boekema, E.J., van Grondelle, R., Matthijs, H.C., and Dekker, J.P. (2005). Aggregates of the chlorophyllbinding protein IsiA (CP43') dissipate energy in cyanobacteria. Biochemistry *44*, 10846–10853.

Imlay, J.A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. Annual Review of Biochemistry 77, 755.

Jallet, D., Gwizdala, M., and Kirilovsky, D. (2012). ApcD, ApcF and ApcE are not required for the Orange Carotenoid Protein related phycobilisome fluorescence quenching in the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics *1817*, 1418–1427.

Jallet, D., Thurotte, A., Leverenz, R.L., Perreau, F., Kerfeld, C.A., and Kirilovsky, D. (2014). Specificity of the Cyanobacterial Orange Carotenoid Protein: Influences of Orange Carotenoid Protein and Phycobilisome Structures. Plant Physiology *164*, 790–804.

Jansson, C., and Northen, T. (2010). Calcifying cyanobacteria—the potential of biomineralization for carbon capture and storage. Current Opinion in Biotechnology *21*, 365–371.

Jeanjean, R., Zuther, E., Yeremenko, N., Havaux, M., Matthijs, H.C., and Hagemann, M. (2003). A photosystem 1 psaFJ-null mutant of the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803 expresses the isiAB operon under iron replete conditions. FEBS Letters *549*, 52–56.

Joliot, P., Joliot, A., and Johnson, G. (2006). Cyclic electron transfer around photosystem I. In Photosystem I, (Springer), pp. 639–656.

Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W., and Krauß, N. (2001). Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. Nature 411, 909–917.

Joshua, S., and Mullineaux, C.W. (2004). Phycobilisome diffusion is required for light-state transitions in cyanobacteria. Plant Physiology *135*, 2112–2119.

Joshua, S., and Mullineaux, C.W. (2005). The rpaC gene product regulates phycobilisome-photosystem II interaction in cyanobacteria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1709*, 58–68.

Joshua, S., Bailey, S., Mann, N.H., and Mullineaux, C.W. (2005). Involvement of phycobilisome diffusion in energy quenching in cyanobacteria. Plant Physiology *138*, 1577–1585.

Junge, W. (2005). Protons, proteins and ATP. In Discoveries in Photosynthesis, (Springer), pp. 573–595.

Kaňa, R., Komárek, O., Kotabová, E., Papageorgiou, G.C., and Prášil, O. (2013). The Slow S to M fluorescence rise is missing in the RpaC mutant of Synechocystis sp.(PCC 6803). In Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future, (Springer), pp. 493–496.

Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., and Sasamoto, S. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA Research *3*, 109–136.

Keren, N., Berg, A., Van Kan, P.J., Levanon, H., and Ohad, I. (1997). Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow. Proceedings of the National Academy of Sciences *94*, 1579–1584.

Kerfeld, C.A. (2004a). Structure and Function of the Water-Soluble Carotenoid-Binding Proteins of Cyanobacteria. Photosynthesis Research *81*, 215–225.

Kerfeld, C.A. (2004b). Water-soluble carotenoid proteins of cyanobacteria. Archives of Biochemistry and Biophysics *430*, 2–9.

Kerfeld, C.A., and Kirilovsky, D. (2013). Structural, mechanistic and genomic insights into OCP-mediated photoprotection. Advances in Botanical Research.

Kerfeld, C.A., Sawaya, M.R., Brahmandam, V., Cascio, D., Ho, K.K., Trevithick-Sutton, C.C., Krogmann, D.W., and Yeates, T.O. (2003). The Crystal Structure of a Cyanobacterial Water-Soluble Carotenoid Binding Protein. Structure *11*, 55–65.

Kipe-Nolt, J.A., Stevens, S.E., and Bryant, D.A. (1982). Growth and chromatic adaptation of Nostoc sp. strain MAC and the pigment mutant R-MAC. Plant Physiology *70*, 1549–1553.

Kirilovsky, **D.** (2007). Photoprotection in cyanobacteria: the orange carotenoid protein (OCP)-related non-photochemical-quenching mechanism. Photosynthesis Research *93*, 7–16.

Kirilovsky, D. (2010). The Photoactive Orange Carotenoid Protein and Photoprotection in Cyanobacteria. In Recent Advances in Phototrophic Prokaryotes, C.P. Hallenbeck, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 139–159.

Kirilovsky, D. (2015). Modulating energy arriving at photochemical reaction centers: orange carotenoid protein-related photoprotection and state transitions. Photosynthesis Research *126*, 3–17.

Kirilovsky, D., and Kerfeld, C.A. (2012). The orange carotenoid protein in photoprotection of photosystem II in cyanobacteria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics *1817*, 158–166.

Kirilovsky, D., and Kerfeld, C.A. (2013). The Orange Carotenoid Protein: a blue-green light photoactive protein. Photochem. Photobiol. Sci. *12*, 1135–1143.

Kirilovsky, D., Kaňa, R., and Prášil, O. (2014). Mechanisms modulating energy arriving at reaction centers in cyanobacteria. In Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria, (Springer), pp. 471–501.

Komenda, J., Sobotka, R., and Nixon, P.J. (2012). Assembling and maintaining the photosystem II complex in chloroplasts and cyanobacteria. Current Opinion in Plant Biology *15*, 245–251.

Kondo, K., Ochiai, Y., Katayama, M., and Ikeuchi, M. (2007). The membrane-associated CpcG2-phycobilisome in Synechocystis: a new photosystem I antenna. Plant Physiology *144*, 1200–1210.

Krieger-Liszkay, A. (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. Journal of Experimental Botany *56*, 337–346.

Kruip, J., Bald, D., Boekema, E., and Rögner, M. (1994). Evidence for the existence of trimeric and monomeric Photosystem I complexes in thylakoid membranes from cyanobacteria. Photosynthesis Research *40*, 279–286.

Kuzminov, F.I., Karapetyan, N.V., Rakhimberdieva, M.G., Elanskaya, I.V., Gorbunov, M.Y., and Fadeev, V.V. (2012). Investigation of OCP-triggered dissipation of excitation energy in PSI/PSII-less Synechocystis sp. PCC 6803 mutant using non-linear laser fluorimetry. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1817*, 1012–1021.

Kuzminov, F.I., Bolychevtseva, Y.V., Elanskaya, I.V., and Karapetyan, N.V. (2014). Effect of APCD and APCF subunits depletion on phycobilisome fluorescence of the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology *133*, 153–160.

Larkum, A.W., and Kühl, M. (2005). Chlorophyll d: the puzzle resolved. Trends in Plant Science *10*, 355–357.

Latifi, A., Ruiz, M., and Zhang, C.-C. (2009). Oxidative stress in cyanobacteria. FEMS Microbiology Reviews *33*, 258–278.

Laudenbach, D.E., and Straus, N.A. (1988). Characterization of a cyanobacterial iron stress-induced gene similar to psbC. Journal of Bacteriology *170*, 5018–5026.

Lemeille, S., and Rochaix, J.-D. (2010). State transitions at the crossroad of thylakoid signalling pathways. Photosynthesis Research *106*, 33–46.

Leverenz, R.L., Jallet, D., Li, M.-D., Mathies, R.A., Kirilovsky, D., and Kerfeld, C.A. (2014). Structural and Functional Modularity of the Orange Carotenoid Protein: Distinct Roles for the N- and C-Terminal Domains in Cyanobacterial Photoprotection. The Plant Cell *26*, 426–437.

Leverenz, R.L., Sutter, M., Wilson, A., Gupta, S., Thurotte, A., Bourcier de Carbon, C., Petzold, C.J., Ralston, C., Perreau, F., Kirilovsky, D., et al. (2015). A 12 Å carotenoid translocation in a photoswitch associated with cyanobacterial photoprotection. Science *348*, 1463.

Li, D., Xie, J., Zhao, J., Xia, A., Li, D., and Gong, Y. (2004). Light-induced excitation energy redistribution in Spirulina platensis cells: "spillover" or "mobile PBSs"? Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1608*, 114–121.

Li, H., Li, D., Yang, S., Xie, J., and Zhao, J. (2006). The state transition mechanism simply depending on light-on and-off in Spirulina platensis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1757*, 1512–1519.

Li, X.-P., BjoÈrkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S., and Niyogi, K.K. (2000). A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. Nature 403, 391–395.

Liu, H., Zhang, H., King, J.D., Wolf, N.R., Prado, M., Gross, M.L., and Blankenship, R.E. (2014). Mass spectrometry footprinting reveals the structural rearrangements of cyanobacterial orange carotenoid protein upon light activation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1837*, 1955–1963.

Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., and Biesiadka, J. (2007). Lipids in photosystem II: interactions with protein and cofactors. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1767*, 509–519.

López-Igual, R., Wilson, A., Leverenz, R.L., Melnicki, M.R., Bourcier de Carbon, C., Sutter, M., Turmo, A., Perreau, F., Kerfeld, C.A., and Kirilovsky, D. (2016). Different Functions of the Paralogs to the N-Terminal Domain of the Orange Carotenoid Protein in the Cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120. Plant Physiology *171*, 1852–1866.

Losi, A. (2007). Flavin-based blue-light photosensors: a photobiophysics update. Photochemistry and Photobiology *83*, 1283–1300.

Ludwig, M., and Bryant, D.A. (2011). Transcription profiling of the model cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7002 by Next-Gen (SOLiDTM) sequencing of cDNA. Frontiers in Microbiology 2, 41.

MacColl, R. (1998). Cyanobacterial phycobilisomes. Journal of Structural Biology *124*, 311–334.

Mao, H.-B., Li, G.-F., Ruan, X., Wu, Q.-Y., Gong, Y.-D., Zhang, X.-F., and Zhao, N.-M. (2002). The redox state of plastoquinone pool regulates state transitions via cytochrome b 6 f complex in Synechocystis sp. PCC 6803. FEBS Letters *519*, 82–86.

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. Molecular Microbiology *74*, 409–420.

Mariscal, V., and Flores, E. (2010). Multicellularity in a heterocyst-forming cyanobacterium: pathways for intercellular communication. In Recent Advances in Phototrophic Prokaryotes, (Springer), pp. 123–135.

Martin, W., Scheibe, R., and Schnarrenberger, C. (2000). The Calvin cycle and its regulation. In Photosynthesis, (Springer), pp. 9–51.

Masip, L., Veeravalli, K., and Georgiou, G. (2006). The many faces of glutathione in bacteria. Antioxidants & Redox Signaling 8, 753–762.

Matthijs, H.C., van der Staay, G.W., and Mur, L.R. (1994). Prochlorophytes: The "Other" Cyanobacteria? In The Molecular Biology of Cyanobacteria, (Springer), pp. 49–64.

McConnell, M.D., Koop, R., Vasil'ev, S., and Bruce, D. (2002). Regulation of the distribution of chlorophyll and phycobilin-absorbed excitation energy in cyanobacteria. A structure-based model for the light state transition. Plant Physiology *130*, 1201–1212.

McFadden, G.I. (2001). Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. Journal of Phycology *37*, 951–959.

McGregor, A., Klartag, M., David, L., and Adir, N. (2008). Allophycocyanin trimer stability and functionality are primarily due to polar enhanced hydrophobicity of the phycocyanobilin binding pocket. Journal of Molecular Biology *384*, 406–421.

Medina, M. (2009). Structural and mechanistic aspects of flavoproteins: photosynthetic electron transfer from photosystem I to NADP+. FEBS Journal 276, 3942–3958.

Melkozernov, A.N., Bibby, T.S., Lin, S., Barber, J., and Blankenship, R.E. (2003). Timeresolved absorption and emission show that the CP43'antenna ring of iron-stressed Synechocystis sp. PCC6803 is efficiently coupled to the photosystem I reaction center core. Biochemistry 42, 3893–3903.

Melnicki, M.R., Leverenz, R.L., Sutter, M., López-Igual, R., Wilson, A., Pawlowski, E.G., Perreau, F., Kirilovsky, D., and Kerfeld, C.A. (2016) Structure, Diversity, and Evolution of a New Family of Soluble Carotenoid Binding Proteins in Cyanobacteria. Molecular Plant.

Miller, S.R., Augustine, S., Le Olson, T., Blankenship, R.E., Selker, J., and Wood, A.M. (2005). Discovery of a free-living chlorophyll d-producing cyanobacterium with a hybrid proteobacterial/cyanobacterial small-subunit rRNA gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 850–855.

Minagawa, J. (2011). State transitions—the molecular remodeling of photosynthetic supercomplexes that controls energy flow in the chloroplast. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1807*, 897–905.

Minagawa, J., and Takahashi, Y. (2004). Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins. Photosynthesis Research *82*, 241–263.

Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., Ohtani, T., and Miki, W. (1995). Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. Journal of Bacteriology *177*, 6575–6584.

Mitschke, J., Georg, J., Scholz, I., Sharma, C.M., Dienst, D., Bantscheff, J., Voß, B., Steglich, C., Wilde, A., and Vogel, J. (2011a). An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803. Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 2124–2129.

Mitschke, J., Vioque, A., Haas, F., Hess, W.R., and Muro-Pastor, A.M. (2011b). Dynamics of transcriptional start site selection during nitrogen stress-induced cell differentiation in Anabaena sp. PCC7120. Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 20130–20135.

Miyagishima, S., Wolk, C.P., and Osteryoung, K.W. (2005). Identification of cyanobacterial cell division genes by comparative and mutational analyses. Molecular Microbiology *56*, 126–143.

Miyashita et al. (1996). Chlorophyll d as a major pigment. Nature 383.

Müller, M.G., Slavov, C., Luthra, R., Redding, K.E., and Holzwarth, A.R. (2010). Independent initiation of primary electron transfer in the two branches of the photosystem I reaction center. Proceedings of the National Academy of Sciences *107*, 4123–4128.

Mullineaux, C.W. (1992). Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in a cyanobacterium. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1100*, 285–292.

Mullineaux, C.W. (1994). Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in a cyanobacterial mutant lacking photosystem II. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1184*, 71–77.

Mullineaux, C.W. (2008). Phycobilisome-reaction centre interaction in cyanobacteria. Photosynthesis Research *95*, 175–182.

Mullineaux, C.W., and Allen, J.F. (1986). The state 2 transition in the cyanobacterium Synechococcus 6301 can be driven by respiratory electron flow into the plastoquinone pool. Febs Letters *205*, 155–160.

Mullineaux, C.W., and Allen, J.F. (1990). State 1-State 2 transitions in the cyanobacterium Synechococcus 6301 are controlled by the redox state of electron carriers between Photosystems I and II. Photosynthesis Research *23*, 297–311.

Mullineaux, C.W., and Emlyn-Jones, D. (2005). State transitions: an example of acclimation to low-light stress. Journal of Experimental Botany *56*, 389–393.

Mullineaux, C.W., Tobin, M.J., and Jones, G.R. (1997). Mobility of photosynthetic complexes in thylakoid membranes. Nature *390*, 421–424.

Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K.-I., Endo, T., Tasaka, M., and Shikanai, T. (2004). Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. Nature 429, 579–582.

Murakami, A., Miyashita, H., Iseki, M., Adachi, K., and Mimuro, M. (2004). Chlorophyll d in an epiphytic cyanobacterium of red algae. Science *303*, 1633–1633.

Murata, N. (1969). Control of excitation transfer in photosynthesis I. Light-induced change of chlorophyll a fluoresence in Porphyridium cruentum. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *172*, 242–251.

Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., and Allakhverdiev, S.I. (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1767*, 414–421.

Nelson, N., and Yocum, C.F. (2006). Structure and function of photosystems I and II. Annu. Rev. Plant Biol. *57*, 521–565.

Nevo, R., Charuvi, D., Tsabari, O., and Reich, Z. (2012). Composition, architecture and dynamics of the photosynthetic apparatus in higher plants. The Plant Journal *70*, 157–176.

Niyogi, K.K. (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. Annual Review of Plant Biology *50*, 333–359.

Niyogi, K.K., Li, X.-P., Rosenberg, V., and Jung, H.-S. (2005). Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? Journal of Experimental Botany *56*, 375–382.

Olive, J., Ajlani, G., Astier, C., Recouvreur, M., and Vernotte, C. (1997). Ultrastructure and light adaptation of phycobilisome mutants of Synechocystis PCC 6803. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1319*, 275–282.

Osyczka, A., Moser, C.C., and Dutton, P.L. (2005). Fixing the Q cycle. Trends in Biochemical Sciences *30*, 176–182.

Ow, S.Y., Cardona, T., Taton, A., Magnuson, A., Lindblad, P., Stensjö, K., and Wright, P.C. (2008). Quantitative shotgun proteomics of enriched heterocysts from Nostoc sp. PCC 7120 using 8-plex isobaric peptide tags. Journal of Proteome Research 7, 1615–1628.

Park, J.-J., Lechno-Yossef, S., Wolk, C.P., and Vieille, C. (2013). Cell-specific gene expression in Anabaena variabilis grown phototrophically, mixotrophically, and heterotrophically. BMC Genomics *14*, 759.

Partensky, F., Hess, W.R., and Vaulot, D. (1999). Prochlorococcus, a Marine Photosynthetic Prokaryote of Global Significance. Microbiology and Molecular Biology Reviews *63*, 106–127.

Pascal, A.A., Liu, Z., Broess, K., van Oort, B., van Amerongen, H., Wang, C., Horton, P., Robert, B., Chang, W., and Ruban, A. (2005). Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting. Nature *436*, 134–137.

Paulsen, H., Rümler, U., and Rüdiger, W. (1990). Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein overexpressed inEscherichia coli. Planta *181*, 204–211.

Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., and Neilan, B. (2010). On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. Marine Drugs *8*, 1650–1680.

Petrouleas, V., and Crofts, A.R. (2005). The iron-quinone acceptor complex. In Photosystem II, (Springer), pp. 177–206.

Polívka, T., Kerfeld, C.A., Pascher, T., and Sundström, V. (2005). Spectroscopic properties of the carotenoid 3'-hydroxyechinenone in the orange carotenoid protein from the cyanobacterium Arthrospira maxima. Biochemistry *44*, 3994–4003.

Polívka, T., Chábera, P., and Kerfeld, C.A. (2013). Carotenoid–protein interaction alters the S 1 energy of hydroxyechinenone in the Orange Carotenoid Protein. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1827*, 248–254.

Powles, S.B. (1984). Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. Annual Review of Plant Physiology *35*, 15–44.

Punginelli, C., Wilson, A., Routaboul, J.-M., and Kirilovsky, D. (2009). Influence of zeaxanthin and echinenone binding on the activity of the Orange Carotenoid Protein. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics *1787*, 280–288.

Rakhimberdieva, M.G., Boichenko, V.A., Karapetyan, N.V., and Stadnichuk, I.N. (2001). Interaction of phycobilisomes with photosystem II dimers and photosystem I monomers and trimers in the cyanobacterium Spirulina platensis. Biochemistry *40*, 15780–15788.

Rakhimberdieva, M.G., Stadnichuk, I.N., Elanskaya, I.V., and Karapetyan, N.V. (2004). Carotenoid-induced quenching of the phycobilisome fluorescence in photosystem II-deficient mutant of Synechocystis sp. FEBS Letters *574*, 85–88.

Rakhimberdieva, M.G., Bolychevtseva, Y.V., Elanskaya, I.V., and Karapetyan, N.V. (2007a). Protein–protein interactions in carotenoid triggered quenching of phycobilisome fluorescence in Synechocystis sp. PCC 6803. FEBS Letters *581*, 2429–2433.

Rakhimberdieva, M.G., Vavilin, D.V., Vermaas, W.F., Elanskaya, I.V., and Karapetyan, N.V. (2007b). Phycobilin/chlorophyll excitation equilibration upon carotenoid-induced nonphotochemical fluorescence quenching in phycobilisomes of the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 1767, 757-765.

Rakhimberdieva, M.G., Elanskaya, I.V., Vermaas, W.F., and Karapetyan, N.V. (2010). Carotenoid-triggered energy dissipation in phycobilisomes of Synechocystis sp. PCC 6803 diverts excitation away from reaction centers of both photosystems. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1797*, 241–249.

Rakhimberdieva, M.G., Kuzminov, F.I., Elanskaya, I.V., and Karapetyan, N.V. (2011). Synechocystis sp. PCC 6803 mutant lacking both photosystems exhibits strong carotenoid-induced quenching of phycobilisome fluorescence. FEBS Letters *585*, 585–589.

Raszewski, G., Diner, B.A., Schlodder, E., and Renger, T. (2008). Spectroscopic properties of reaction center pigments in photosystem II core complexes: revision of the multimer model. Biophysical Journal *95*, 105–119.

Redlinger, T., and Gantt, E. (1982). A Mr 95,000 polypeptide in Porphyridium cruentum phycobilisomes and thylakoids: Possible function in linkage of phycobilisomes to thylakoids and in energy transfer. Proceedings of the National Academy of Sciences *79*, 5542–5546.

Renger, G., and Renger, T. (2008). Photosystem II: the machinery of photosynthetic water splitting. Photosynthesis Research *98*, 53–80.

Rippka, R., Waterbury, J., and Cohen-Bazire, G. (1974). A cyanobacterium which lacks thylakoids. Archives of Microbiology *100*, 419–436.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., and Stanier, R.Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. Microbiology *111*, 1–61.

Rögner, M., Mühlenhoff, U., Boekema, E.J., and Witt, H.T. (1990). Mono-, di-and trimeric PS I reaction center complexes isolated from the thermophilic cyanobacterium Synechococcus sp.: Size, shape and activity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1015*, 415–424.

Ruban, A.V., and Johnson, M.P. (2009). Dynamics of higher plant photosystem cross-section associated with state transitions. Photosynthesis Research *99*, 173–183.

Ruban, A.V., Berera, R., Ilioaia, C., Van Stokkum, I.H., Kennis, J.T., Pascal, A.A., Van Amerongen, H., Robert, B., Horton, P., and Van Grondelle, R. (2007). Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. Nature 450, 575–578.

Sarcina, M., Tobin, M.J., and Mullineaux, C.W. (2001). Diffusion of phycobilisomes on the thylakoid membranes of the cyanobacterium Synechococcus 7942 Effects of phycobilisome size, temperature, and membrane lipid composition. Journal of Biological Chemistry 276, 46830–46834.

Satoh, K., and Fork, D.C. (1983). The relationship between state II to state I transitions and cyclic electron flow around photosystem I. Photosynthesis Research *4*, 245–256.

Scanlan, D.J., Ostrowski, M., Mazard, S., Dufresne, A., Garczarek, L., Hess, W.R., Post, A.F., Hagemann, M., Paulsen, I., and Partensky, F. (2009). Ecological Genomics of Marine Picocyanobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 73, 249–299.

Schägger, H., and von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. Analytical Biochemistry 199, 223–231.

Schagger, H., Cramer, W.A., and Vonjagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. Analytical Biochemistry *217*, 220–230.

Scheller, H.V., and Haldrup, A. (2005). Photoinhibition of photosystem I. Planta *221*, 5–8. Schreiber, U., Schliwa, U., and Bilger, W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynthesis Research *10*, 51–62.

Schreiber, U., Endo, T., Mi, H., and Asada, K. (1995). Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. Plant and Cell Physiology *36*, 873–882.

Scott, M., McCollum, C., Vasil'ev, S., Crozier, C., Espie, G.S., Krol, M., Huner, N.P., and Bruce, D. (2006). Mechanism of the down regulation of photosynthesis by blue light in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. Biochemistry *45*, 8952–8958.

Sedoud, A., López-Igual, R., ur Rehman, A., Wilson, A., Perreau, F., Boulay, C., Vass, I., Krieger-Liszkay, A., and Kirilovsky, D. (2014). The Cyanobacterial Photoactive Orange Carotenoid Protein Is an Excellent Singlet Oxygen Quencher. The Plant Cell *26*, 1781–1791.

Shen, G., Boussiba, S., and Vermaas, W.F. (1993). Synechocystis sp PCC 6803 strains lacking photosystem I and phycobilisome function. The Plant Cell *5*, 1853–1863.

Shevela, D., Pishchalnikov, R.Y., and Eichacker, L.A. (2013). 1 Oxygenic Photosynthesis in Cyanobacteria. Stress Biology of Cyanobacteria: Molecular Mechanisms to Cellular Responses 1.

Shi, T., and Falkowski, P.G. (2008). Genome evolution in cyanobacteria: The stable core and the variable shell. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 2510–2515.

Shih, P.M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S.D., Fewer, D.P., Talla, E., Calteau, A., Cai, F., de Marsac, N.T., and Rippka, R. (2013). Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. Proceedings of the National Academy of Sciences *110*, 1053–1058.

Sidler, W.A. (1994). Phycobilisome and phycobiliprotein structures. In The Molecular Biology of Cyanobacteria, (Springer), pp. 139–216.

Singh, A.K., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Elvitigala, T., Ghosh, B., Aurora, R., and Pakrasi, H.B. (2009). A systems-level analysis of the effects of light quality on the metabolism of a cyanobacterium. Plant Physiology *151*, 1596–1608.

Sonoike, K. (2011). Photoinhibition of photosystem I. Physiologia Plantarum 142, 56–64.

Sonoike, K., Kamo, M., Hihara, Y., Hiyama, T., and Enami, I. (1997). The mechanism of the degradation of psaB gene product, one of the photosynthetic reaction center subunits of photosystem I, upon photoinhibition. Photosynthesis Research *53*, 55–63.

Spudich, J.L., Yang, C.-S., Jung, K.-H., and Spudich, E.N. (2000). Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. Annual Review of Cell and Developmental Biology *16*, 365–392.

Srivastava, R., Pisareva, T., and Norling, B. (2005). Proteomic studies of the thylakoid membrane of Synechocystis sp. PCC 6803. Proteomics *5*, 4905–4916.

Stadnichuk, I.N., Yanyushin, M.F., Maksimov, E.G., Lukashev, E.P., Zharmukhamedov, S.K., Elanskaya, I.V., and Paschenko, V.Z. (2012). Site of non-photochemical quenching of the phycobilisome by orange carotenoid protein in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1817*, 1436–1445.

Stadnichuk, I.N., Yanyushin, M.F., Bernát, G., Zlenko, D.V., Krasilnikov, P.M., Lukashev, E.P., Maksimov, E.G., and Paschenko, V.Z. (2013). Fluorescence quenching of the phycobilisome terminal emitter L CM from the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 detected in vivo and in vitro. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology *125*, 137–145.

Stadnichuk, I.N., Krasilnikov, P.M., Zlenko, D.V., Freidzon, A.Y., Yanyushin, M.F., and Rubin, A.B. (2015). Electronic coupling of the phycobilisome with the orange carotenoid protein and fluorescence quenching. Photosynthesis Research *124*, 315–335.

Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). Bacteriological Reviews *35*, 171.

Stöckel, J., Welsh, E.A., Liberton, M., Kunnvakkam, R., Aurora, R., and Pakrasi, H.B. (2008). Global transcriptomic analysis of Cyanothece 51142 reveals robust diurnal oscillation of central metabolic processes. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 6156–6161.

Straub, C., Quillardet, P., Vergalli, J., De Marsac, N.T., and Humbert, J.-F. (2011). A day in the life of Microcystis aeruginosa strain PCC 7806 as revealed by a transcriptomic analysis. PLoS One *6*, e16208.

Su, X., Fraenkel, P.G., and Bogorad, L. (1992). Excitation energy transfer from phycocyanin to chlorophyll in an apcA-defective mutant of Synechocystis sp. PCC 6803. Journal of Biological Chemistry 267, 22944–22950.
Sutter, M., Wilson, A., Leverenz, R.L., Lopez-Igual, R., Thurotte, A., Salmeen, A.E., Kirilovsky, D., and Kerfeld, C.A. (2013). Crystal structure of the FRP and identification of the active site for modulation of OCP-mediated photoprotection in cyanobacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences *110*, 10022–10027.

Swanson, R.V., Ong, L.J., Wilbanks, S.M., and Glazer, A.N. (1991). Phycoerythrins of marine unicellular cyanobacteria. II. Characterization of phycobiliproteins with unusually high phycourobilin content. Journal of Biological Chemistry *266*, 9528–9534.

Tabita, F.R. (1994). The biochemistry and molecular regulation of carbon dioxide metabolism in cyanobacteria. In The Molecular Biology of Cyanobacteria, (Springer), pp. 437–467.

Thor, J. van, Mullineaux, C.W., Matthijs, H.C.P., and Hellingwerf, K.J. (1998). Light harvesting and state transitions in cyanobacteria. Botanica Acta *111*, 430–443.

Thurotte, A., Lopez-Igual, R., Wilson, A., Comolet, L., Bourcier de Carbon, C., Xiao, F., and Kirilovsky, D. (2015). Regulation of Orange Carotenoid Protein Activity in Cyanobacterial Photoprotection. Plant Physiology *169*, 737–747.

Tian, L., van Stokkum, I.H., Koehorst, R.B., Jongerius, A., Kirilovsky, D., and van Amerongen, H. (2011). Site, rate, and mechanism of photoprotective quenching in cyanobacteria. Journal of the American Chemical Society *133*, 18304–18311.

Tian, L., Gwizdala, M., van Stokkum, I.H., Koehorst, R.B., Kirilovsky, D., and van Amerongen, H. (2012a). Picosecond kinetics of light harvesting and photoprotective quenching in wild-type and mutant phycobilisomes isolated from the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803. Biophysical Journal *102*, 1692–1700.

Tian, L., van Stokkum, I.H., Koehorst, R.B., and van Amerongen, H. (2012b). Light harvesting and blue-green light induced non-photochemical quenching in two different C-phycocyanin mutants of Synechocystis PCC 6803. The Journal of Physical Chemistry B *117*, 11000–11006.

Trtílek, M., Kramer, D.M., Koblížek, M., and Nedbal, L. (1997). Dual-modulation LED kinetic fluorometer. Journal of Luminescence 72, 597–599.

Tyystjärvi, E. (2008). Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. Coordination Chemistry Reviews *252*, 361–376.

Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.-R., and Kamiya, N. (2011). Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. Nature 473, 55–60.

Vass, I. (2012). Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1817*, 209–217.

Vass, I., and Aro, E.-M. (2008). Photoinhibition of photosynthetic electron transport. Primary Processes of Photosynthesis: Basic Principles and Apparatus. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK 393–411.

Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E., and Andersson, B. (1992). Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation. Proceedings of the National Academy of Sciences *89*, 1408–1412.

Vavilin, D., Yao, D., and Vermaas, W. (2007). Small Cab-like proteins retard degradation of Photosystem II-associated chlorophyll in Synechocystis sp. PCC 6803 kinetic analysis of pigment labeling with 15N and 13C. Journal of Biological Chemistry 282, 37660–37668.

Vermaas, W.F.J., Timlin, J.A., Jones, H.D.T., Sinclair, M.B., Nieman, L.T., Hamad, S.W., Melgaard, D.K., and Haaland, D.M. (2008). In vivo hyperspectral confocal fluorescence imaging to determine pigment localization and distribution in cyanobacterial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 4050–4055.

Vermaas WF (2001). Photosynthesis and respiration in cyanobacteria. Encyclopedia of Life Sciences.

Vicente, J.B., Gomes, C.M., Wasserfallen, A., and Teixeira, M. (2002). Module fusion in an A-type flavoprotein from the cyanobacterium Synechocystis condenses a multiple-component pathway in a single polypeptide chain. Biochemical and Biophysical Research Communications 294, 82–87.

Wang, Q., and Moerner, W.E. (2015). Dissecting pigment architecture of individual photosynthetic antenna complexes in solution. Proceedings of the National Academy of Sciences *112*, 13880–13885.

Wang, H., Fewer, D.P., and Sivonen, K. (2011). Genome mining demonstrates the widespread occurrence of gene clusters encoding bacteriocins in cyanobacteria. PLoS One 6, e22384.

Wilbanks, S.M., de Lorimier, R., and Glazer, A.N. (1991). Phycoerythrins of marine unicellular cyanobacteria. III. Sequence of a class II phycoerythrin. Journal of Biological Chemistry 266, 9535–9539.

William Schopf, J. (2011). The paleobiological record of photosynthesis. Photosynthesis Research *107*, 87–101.

Williams, P.G. (2009). Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. Trends in Biotechnology 27, 45–52.

Williams, W.P., and Allen, J.F. (1987). State 1/state 2 changes in higher plants and algae. Photosynthesis Research 13, 19–45.

Wilson, A., Ajlani, G., Verbavatz, J.-M., Vass, I., Kerfeld, C.A., and Kirilovsky, D. (2006). A Soluble Carotenoid Protein Involved in Phycobilisome-Related Energy Dissipation in Cyanobacteria. The Plant Cell *18*, 992–1007.

Wilson, A., Boulay, C., Wilde, A., Kerfeld, C.A., and Kirilovsky, D. (2007). Light-Induced Energy Dissipation in Iron-Starved Cyanobacteria: Roles of OCP and IsiA Proteins. The Plant Cell *19*, 656–672.

Wilson, A., Punginelli, C., Gall, A., Bonetti, C., Alexandre, M., Routaboul, J.-M., Kerfeld, C.A., van Grondelle, R., Robert, B., Kennis, J.T.M., et al. (2008). A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor. Proceedings of the National Academy of Sciences *105*, 12075–12080.

Wilson, A., Kinney, J.N., Zwart, P.H., Punginelli, C., D'Haene, S., Perreau, F., Klein, M.G., Kirilovsky, D., and Kerfeld, C.A. (2010). Structural Determinants Underlying Photoprotection in the Photoactive Orange Carotenoid Protein of Cyanobacteria. Journal of Biological Chemistry 285, 18364–18375.

Wilson, A., Punginelli, C., Couturier, M., Perreau, F., and Kirilovsky, D. (2011). Essential role of two tyrosines and two tryptophans on the photoprotection activity of the Orange Carotenoid Protein. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics *1807*, 293–301.

Wilson, A., Gwizdala, M., Mezzetti, A., Alexandre, M., Kerfeld, C.A., and Kirilovsky, D. (2012). The Essential Role of the N-Terminal Domain of the Orange Carotenoid Protein in Cyanobacterial Photoprotection: Importance of a Positive Charge for Phycobilisome Binding. The Plant Cell *24*, 1972–1983.

Wollman, F.-A. (2001). State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. The EMBO Journal *20*, 3623–3630.

Wu, Y.P., and Krogmann, D.W. (1997a). The orange carotenoid protein of Synechocystis PCC 6803. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1322*, 1–7.

Wu, Y.P., and Krogmann, D.W. (1997b). The orange carotenoid protein of Synechocystis PCC 68031. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics *1322*, 1–7.

Wydrzynski, T.J., and Satoh, K. (2005). Photosystem II: the light-induced water: plastoquinone oxidoreductase. Advances in Photosynthesis and Respiration *22*, 756.

Xu, H., Vavilin, D., Funk, C., and Vermaas, W. (2004). Multiple Deletions of Small Cablike Proteins in the Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 CONSEQUENCES FOR PIGMENT BIOSYNTHESIS AND ACCUMULATION. Journal of Biological Chemistry 279, 27971–27979.

Yamaoka, T., Satoh, K., and Katoh, S. (1978). Photosynthetic activities of a thermophilic blue-green alga. Plant and Cell Physiology *19*, 943–954.

Yang, S., Su, Z., Li, H., Feng, J., Xie, J., Xia, A., Gong, Y., and Zhao, J. (2007). Demonstration of phycobilisome mobility by the time-and space-correlated fluorescence imaging of a cyanobacterial cell. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1767*, 15–21.

Yeremenko, N., Kouril, R., Ihalainen, J.A., D'Haene, S., van Oosterwijk, N., Andrizhiyevskaya, E.G., Keegstra, W., Dekker, H.L., Hagemann, M., and Boekema, E.J. (2004). Supramolecular organization and dual function of the IsiA chlorophyll-binding protein in cyanobacteria. Biochemistry *43*, 10308–10313.

Yousef, N., Pistorius, E.K., and Michel, K.-P. (2003). Comparative analysis of idiA and isiA transcription under iron starvation and oxidative stress in Synechococcus elongatus PCC 7942 wild-type and selected mutants. Archives of Microbiology *180*, 471–483.

Zhang, H., Liu, H., Niedzwiedzki, D.M., Prado, M., Jiang, J., Gross, M.L., and Blankenship, R.E. (2013). Molecular mechanism of photoactivation and structural location of the cyanobacterial orange carotenoid protein. Biochemistry *53*, 13–19.

Zhang, H., Liu, H., Blankenship, R.E., and Gross, M.L. (2016). Isotope-Encoded Carboxyl Group Footprinting for Mass Spectrometry-Based Protein Conformational Studies. Journal of The American Society for Mass Spectrometry *27*, 178–181.

Zhang, L., McSpadden, B., Pakrasi, H.B., and Whitmarsh, J. (1992). Copper-mediated regulation of cytochrome c553 and plastocyanin in the cyanobacterium Synechocystis 6803. Journal of Biological Chemistry *267*, 19054–19059.

Zhang, P., Allahverdiyeva, Y., Eisenhut, M., and Aro, E.-M. (2009). Flavodiiron proteins in oxygenic photosynthetic organisms: photoprotection of photosystem II by Flv2 and Flv4 in Synechocystis sp. PCC 6803. PLoS One *4*, e5331.

Zhang, P., Eisenhut, M., Brandt, A.-M., Carmel, D., Silén, H.M., Vass, I., Allahverdiyeva, Y., Salminen, T.A., and Aro, E.-M. (2012). Operon flv4-flv2 provides cyanobacterial photosystem II with flexibility of electron transfer. The Plant Cell 24, 1952–1971.

Zhao, J., Zhou, J., and Bryant, D.A. (1992). Energy transfer processes in phycobilisomes as deduced from analyses of mutants of Synechococcus sp. PCC 7002. Research in Photosynthesis *1*, 25–32.

Zhao, J., Shen, G., and Bryant, D.A. (2001). Photosystem stoichiometry and state transitions in a mutant of the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002 lacking phycocyanin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics *1505*, 248–257.

Zhou, J., and Li, Y. (2010). Engineering cyanobacteria for fuels and chemicals production. Protein & Cell *1*, 207–210.

Annexes

Articles

Principales publications (articles en premier auteur et deuxième auteur)

[1] **Wilson A,** Ajlani G, Verbavatz J-M, Vass I, Kerfeld CA, Kirilovsky D (2006). A Soluble Carotenoid Protein Involved in Phycobilisome-Related Energy Dissipation in Cyanobacteria. Plant Cell 18: 992-1007.

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

[3] **Wilson A,** Punginelli C, Gall A, Bonetti C, Alexandre M, Routaboul JM, Kerfeld CA, van Grondelle R, Robert B, Kennis JT, Kirilovsky D (2008) A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 12075-12080.

[4] Punginelli C, **Wilson A**, Routaboul J-M, Kirilovsky D (2009). Influence of zeaxanthin and echinenone binding on the activity of the Orange Carotenoid Protein. Biochim. Biophys. Acta 1787: 280-288.

[5] **Wilson A,** Kinney JN, Zwart PH, Punginelli C, D'Haene S, Perreau F, Klein MG, Kirilovsky D, Kerfeld CA (2010). Structural Determinants underlying photoprotection in the photoactive orange carotenoid protein of cyanobacteria, J Biol Chem 285 18364-18375.

[6] Boulay C, **Wilson A**, D'Haene S, Kirilovsky D. (2010) Identification of a protein required for recovery of full antenna capacity in OCP-related photoprotective mechanism in cyanobacteria, Proc Natl Acad Sci U S A 107 11620-11625.

[7] **Wilson A**, Punginelli C, Couturier M, Perrau F, Kirilovsky D (2011) Essential role of two tyrosines and two tryptophans on photoprotection activity of the Orange Carotenoid Protein. Biochim Biophys Acta 1807: 293-301

[8] Gwizdala M, **Wilson A**, Kirilovsky D (2011) In vitro reconstitution of the cyanobacterial photoprotective mechanism mediated by the Orange Carotenoid Protein in Synechocystis PCC 6803. Plant Cell 23: 2631-2643

[9] **Wilson A**, Gwizdala M, Mezzetti A, Alexandre M, Kerfeld CA, Kirilovsky D (2012) The essential role of the N-terminal domain of the orange carotenoid protein in cyanobacterial photoprotection: importance of a positive charge for phycobilisome binding. Plant Cell 24: 1972-1983

[10] Gwizdala M, **Wilson A**, Omairi-Nasser A, Kirilovsky D (2013) Characterization of theSynechocystis PCC 6803 Fluorescence Recovery Protein involved in photoprotection. Biochim Biophys Acta 1827(3):348–354.

[11] Sutter M, **Wilson A**, Leverenz RL, Lopez-Igual R, Thurotte A, Salmeen AE, Kirilovsky D, Kerfeld CA (2013) Crystal structure of the FRP and identification of the active site for modulation of OCP-mediated photoprotection in cyanobacteria. Proc Natl Acad Sci USA 110: 10022–10027

[12] Leverenz RL, Sutter M, **Wilson A**, Gupta S, Thurotte A, Bourcier de Carbon C, Petzold CJ, Ralston C, Perreau F, Kirilovsky D, Kerfeld CA (2015). A 12 A carotenoid translocation in a photoswitch associated with cyanobacterial photoprotection. Science 348: 1463-1466

[13] Thurotte A, Igual RL, Wilson A, Comolet L, Bourcier de Carbon C, Xiao F, KirilovskyD (2015) Regulation of Orange Carotenoid Protein Activity in Cyanobacterial Photoprotection. PlantPhysiol 169: 737-747

[14] López-Igual R, **Wilson A**, Leverenz RL, Melnicki MR, Bourcier de Carbon C, Sutter M, Turmo A, Perreau F, Kerfeld CA, Kirilovsky D (2016) Different functions of the paralogs to the Nterminal domain of the Orange Carotenoid Protein in the cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120. Plant Physiology pp.00502



Titre : Etude du mécanisme de photoprotection lié à l'Orange Carotenoid Protein et ses homologues chez les cyanobactéries

Mots clés : Orange Carotenoid Protein, Fluorescence Recovery Protein, Phycobilisome, Cyanobactérie, Photoprotection, Quenching non photochimique.

Résumé : La lumière est essentielle pour les organismes photosynthétiques qui convertissent l'énergie solaire en énergie chimique. Cependant, la lumière devient dangereuse lorsque l'énergie qui arrive aux centres réactionnels de l'appareil photosynthétique, est en excès par rapport à l'énergie consommée. Dans ce cas, la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques se réduit et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont accumulées, notamment au niveau des PSI et PSII. Les cyanobactéries ont développé des mécanismes photoprotecteurs qui diminuent l'énergie transférée au PSII atténuant ainsi l'accumulation de ROS et les dommages cellulaires, comme l'extinction nonphotochimique (NPQcya) induite par la lumière bleue-verte. La soluble Orange Carotenoid Protein (OCPo) est essentielle pour ce mécanisme de photoprotection. L'OCP agit comme un senseur de l'intensité lumineuse et un inducteur de la dissipation d'énergie des phycobilisomes (PBS), l'antenne

extra-membranaire des cyanobactéries. L'OCP est la première protéine photo-active à caroténoïde connue comme senseur. Une forte lumière bleue-verte déclenche des changements structurels dans l'OCPo qui induisent une forme active, rouge (OCPr). Le domaine N-terminal de l'OCPr, en s'intercalant entre les trimères externes d'un des cylindres basaux du cœur du PBS, augmente la dissipation thermique de l'énergie au niveau de l'antenne. L'OCP possède aussi une autre fonction : l'extinction de l'oxygène singulet, qui protège les cellules du stress oxydatif. Pour récupérer pleinement la capacité de l'antenne en faible lumière, une deuxième protéine est nécessaire, la "Fluorescence Recovery Protein" (FRP), dont le rôle est de détacher l'OCPr des PBS et d'accélérer sa reconversion en OCPo inactive. Ce manuscrit est un état des lieux des connaissances et des dernières avancées sur le mécanisme de NPO associé à l'OCP dans les cyanobactéries.

Title : Photoprotective mechanism related to the Orange Carotenoid Protein and paralogs in cyanobacteria

Keywords: Orange Carotenoid Protein, Fluorescence Recovery Protein, Phycobilisome, Cyanobacteria, Photoprotective, Non photochemical quenching.

Abstract: Photosynthetic organisms use light energy from the sun in order to perform photosynthesis and to convert solar energy into chemical energy. Absorbance of excess light energy beyond what can be consumed in photosynthesis is dangerous for these organisms. Reactive oxygen species (ROS) are formed at the reaction centers and collecting light antennas inducing photooxidative damage which can lead to cell death. In cyanobacteria, one of these photoprotective mechanisms consists to reduce the amount of energy arriving to the reaction centers by thermal dissipation of the excess absorbed energy. Energy dissipation is accompanied by a decrease of Photosystem II-related fluorescence emission called non-photochemical quenching (NPQ). The soluble Orange Carotenoid Protein (OCPo) is essential for this photoprotective mechanism. The OCP is the first photo-active protein with a carotenoid known as light intensity sensor and acts as energy quencher

of the phycobilisome (PB), the extra-membrane antenna of cyanobacteria. Structural changes occur when the OCPo absorbs a strong blue-green light leading to a red active form (OCPr). The N-terminal domain of OCPr burrows into the two external trimers of the core basal APC cylinders of the PB and increases thermal energy dissipation at the level of antenna. The OCP has an additional function in photoprotection as oxygen singlet quencher protecting cells from oxidative stress. Under low light conditions, to recover the full antenna capacity, a second protein is needed, the "Fluorescence Recovery Protein" (FRP), whose role is to detach the OCPr from the PB and accelerate its conversion into an inactive OCPo. In this manuscript, I will review the knowledge about the OCP, since the discovery of the mechanism and its characterization to the latest advances on the OCP-related-NPQ mechanism in cyanobacteria.