



HAL
open science

Biosynthèse hétérologue de l'Orange Carotenoid Protein chez *Escherichia coli*

Céline Bourcier de Carbon de Prévinquières

► **To cite this version:**

Céline Bourcier de Carbon de Prévinquières. Biosynthèse hétérologue de l'Orange Carotenoid Protein chez *Escherichia coli*. Biologie végétale. Université Paris-Saclay, 2015. Français. NNT : 2015SACLS089 . tel-01636795v1

HAL Id: tel-01636795

<https://theses.hal.science/tel-01636795v1>

Submitted on 17 Nov 2017 (v1), last revised 12 Jan 2018 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2015SACLS089



THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY,
préparée à
l'UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE N° 567
Sciences du Végétal : du Gène à l'Ecosystème

Spécialité de doctorat : Biologie

Par

Mme Céline Bourcier de Carbon de Prévinquières

Biosynthèse hétérologue de l'Orange Carotenoid Protein chez *Escherichia coli*

Thèse présentée et soutenue à l'Institut des Sciences des Plantes
Paris – Saclay, Université Paris Sud (Orsay) le 16 novembre 2015

Composition du Jury :

M., le Maire, Marc

Mme, Latifi, Amel

M., Kuntz, Marcel

Mme, Zito, Francesca

Mme, Issakidis, Emmanuelle

Mme, Kirilovsky, Diana

Professeur, CEA (Saclay)

Professeur, Université Aix Marseille

Directeur de recherche, CEA (Grenoble)

Chargé de recherche, IBPC Paris

Chargé de recherche, IPS2 Orsay

Directeur de recherche, CEA (Saclay)

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de
thèse



Plan de la thèse

| | |
|--|---------|
| Remerciements | p 5-7 |
| Abréviations | p 11-12 |
| Liste des figures | p 13-15 |
| Objectifs de la thèse de doctorat | p 17-19 |
| Publications, congrès & formations | p 21-22 |

Introduction

| | |
|---|---------|
| 1- Les espèces réactives de l'oxygène | p 24-30 |
| 1.1- Le paradoxe de l'oxygène et le stress oxydant..... | p 24-26 |
| 1.2- Formation et caractérisation des espèces réactives de l'oxygène chez les organismes photosynthétiques..... | p 27-30 |
| 2- Le vaste monde des Antioxydants | p 31-38 |
| 2.1- Les antioxydants enzymatiques..... | p 31-32 |
| 2.2- Les antioxydants non-enzymatiques..... | p 32-38 |
| 3- Le monde photosynthétique cyanobactérien | p 39-52 |
| 3.1- Les cyanobactéries et la photosynthèse..... | p 39-47 |
| 3.2- Les antennes collectrices d'énergie et la photoprotection..... | p 47-52 |
| 4- L'Orange Carotenoid Protein « OCP » | p 53-70 |
| 4.1- Structure et Photoactivité..... | p 53-62 |
| 4.3- Quenching d'énergie- Activité photo-protectrice..... | p 63-65 |
| 4.4- Quenching d'oxygène singulet..... | p 66-70 |
| 5- <i>Escherichia coli</i>, organisme modèle et modèle de production | p 71-78 |
| 5.1- <i>Escherichia coli</i> , organisme modèle à usine de production..... | p 71-73 |
| 5.2- Production de caroténoïdes chez <i>Escherichia coli</i> | p 73-77 |
| 5.3- Production de protéines à pigments chez <i>Escherichia coli</i> | p 78 |

Résultats

Chapitre I

| | |
|---|----------|
| Mise en œuvre du système de production hétérologue de l'OCP chez <i>E.coli</i> | p 80-105 |
| Création des souches <i>E.coli</i> capables de synthétiser les caroténoïdes..... | p 83-94 |
| Création des souches <i>E.coli</i> capables de produire l'OCP..... | p 95-105 |

Chapitre II

| | |
|---|-----------|
| Biosynthèse et caractérisation des OCPs produites chez <i>E.coli</i> | p 107-155 |
| Résumé de la publication..... | p 108-109 |
| Publication..... | p 110-149 |
| Brevet | p 151-155 |

Chapitre III

| | |
|--|-----------|
| Optimisation du système de production hétérologue de l'OCP | p 157-175 |
| Création des souches <i>E.coli</i> produisant l'OCP avec 2 puis 1 plasmide..... | p 158-163 |
| Création des souches <i>E.coli</i> produisant l'OCP liant l'hydroxyechinenone..... | p 164-175 |

Chapitre IV

| | |
|---|-----------|
| Applications du système de production hétérologue afin d'élucider la photo-activation de l'OCP | p 177-226 |
| Rôle du bras N-terminal de l'OCP dans sa photo-activation..... | p 178 |
| Résumé de la publication..... | p 178-179 |
| Publication..... | p 180-223 |
| Résolution de la structure de la forme active de l'OCP..... | p 225 |
| Résumé de la publication..... | p 225-226 |

| | |
|---|-----------|
| Conclusions & Perspectives | p 227-236 |
| Matériels & Méthodes | p 237-251 |
| Bibliographie | p 253-270 |
| Résumés de la thèse | p 271 |

Remerciements

Afin de n'omettre aucune reconnaissance, je souhaite tout d'abord exprimer ma gratitude à tous ceux qui ont participé, à titre personnel ou professionnel, à l'aboutissement de mon travail de doctorat, réalisé au sein du laboratoire de Photoprotection et Photorécepteurs chez les Cyanobactéries de Diana Kirilovsky, au CEA de Saclay.

Durant ces trois années de thèse, j'ai bénéficié d'une bourse CIFRE accordée par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) et l'Entreprise Phycosource. Je tiens à remercier ces deux entités pour m'avoir permise de réaliser mon travail qui n'a jamais cessé de me passionner. Je remercie mon Ecole Doctorale Sciences du Végétale de l'Université Paris SUD (ED N°145), et plus particulièrement sa Directrice, Jacqui Shykoff, pour le dévouement et l'énergie qu'elle déploie au sein de chacun de ses échanges avec les doctorants. Je remercie aussi Marianne Delarue et Martine Fournier pour leurs implications au sein de cette Ecole et de l'Université Paris Sud.

J'exprime ma gratitude à Amel Latifi et Marcel Kuntz qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse ainsi qu'à Francesca Zito, Emmanuelle Issakidis-Bourguet et Marc le Maire pour avoir édifié mon jury.

Ces trois années de doctorat représentent un véritable épanouissement, que je dois à ma Directrice de thèse, Diana Kirilovsky. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance pour m'avoir épaulée, conseillée, et encouragée; pour, en somme, m'avoir guidée. Je me suis toujours sentie soutenue. Je vous remercie de m'avoir transmis votre passion pour les bactéries qui pratiquent ce fabuleux et si complexe mécanisme physiologique à l'origine de la Vie, la photosynthèse. Grâce à votre confiance, j'ai pu mener à bien mon projet. J'ai appris beaucoup, de nombreuses techniques s'inscrivant dans différents domaines tels que la biophysique, la biochimie ou encore la biologie moléculaire. Vous m'avez donné la chance inouïe de présenter mes résultats Outre-Atlantique, lors du Congrès International de Photobiologie dans la ville de Cordoba, en Argentine. Je n'oublierai jamais tout ce que j'ai appris et vécu grâce à vous.

J'exprime toute ma reconnaissance à Elie Duran, Clémence Boulaigre, Alexandre Phulpin et Arezki Sedoud pour avoir fait naître au sein de L'Entreprise Phycosource, en étroite collaboration avec le laboratoire de Diana Kirilovsky, le projet de ma thèse. Un grand merci

pour avoir « parié » sur les capacités que je mettais en avant il y a trois années pour réaliser ce projet de recherche initialement risqué, pour votre confiance et votre bienveillance.

J'ai vécu trois années de doctorat mémorables grâce à Adjélé, Sandrine et Rocio, trois femmes résolument superbes de cœur et d'esprit ! Je les remercie pour leur accueil, leur gentillesse, leur disponibilité et pour tous les moments forts que nous avons partagés, au CEA de Saclay mais aussi à Paris, entre filles ! Vous m'avez fait rire, pleurer de rire, aimer travailler et aimer tout court ! Vous êtes des femmes extraordinaires : ne changez jamais rien !

Je souhaite évoquer Denis, alias « PoulpOoox » Léa, alias « Léon » ainsi que Stéphanie. De nos rencontres au CEA de Saclay sont nées de sincères amitiés. Denis, tu m'as tout montré dans le laboratoire quand je suis arrivée en novembre 2012. Tu m'as accueillie comme une amie et tu as eu à cœur de me transmettre des techniques que j'allais rapidement utiliser pour mon travail. Nos soirées et les restaurants chinois partagés sont gravés à tout jamais dans ma mémoire. Léa, que dire de plus, à part que tu es devenue mon Amie avec un grand « A » ! Stéphanie à grand cœur, à grand sourire venant du Sud et chevelure dorée-cuivrée, partie pour étudier à nouveau la médecine, tu es une véritable force de la nature ! Tu es désormais une Docteur en Sciences et demain tu seras aussi Médecin, tu ne cesseras donc jamais de m'impressionner !

Un grand merci à Adrien, pour avoir partagé son travail tout au long de ces trois années ainsi que ses réflexions scientifiques. Je te remercie aussi pour toutes les discussions nature & sport que nous avons eues, ainsi que cette belle journée où nous sommes allés ramasser des fruits et légumes à La Ferme de Villetain ! Je tiens encore à te féliciter pour ta famille qui s'est agrandie avec la naissance de Raphaël. Je te souhaite beaucoup de bonheur et de sérénité pour t'épanouir en tant que Papa et aussi dans ta future vie professionnelle.

Merci à François Perreau, Anja Krieger et Pierre Sétif pour avoir contribué à ce travail en partageant avec générosité des données scientifiques, en m'enseignant à me servir de nouveaux appareils de biophysique telle que la Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) et pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eues ensemble.

Un grand merci à Ryan Leverenz, Marcus Sutter et Cheryl Kerfeld, pour la collaboration fructueuse que nous avons eue.

Si ces trois années m'ont semblées passer si vite, c'est aussi grâce à tous les membres de l'équipe de Anja Krieger. J'ai passé de délicieux moments à siphonner des litres de thé et/ou café en votre compagnie. Merci à Kathleen, Catherine, Thanh et Clara pour votre bonne humeur et nos discussions !

Je tiens aussi à remercier Hervé Bottin et l'équipe administrative de l'iBiTeC-S du CEA, en particulier Karine, Isabelle, Dominique, Céline, Pascale mais aussi Lilie pour nos discussions partagées.

J'ai aussi une pensée nostalgique pour le Laboratoire de Génétique Moléculaire de la Morphogenèse de Benoît Robert, à L'Institut Pasteur de Paris, où j'ai réalisé mon stage de Master 2. Je souhaite remercier tout particulièrement Nathalie Duval et Philippe Daubas pour avoir fait croître mon profond intérêt pour la Biologie et m'avoir encouragée à continuer la recherche fondamentale en réalisant ce doctorat. Je souhaite aussi saluer Catherine Bodin, Yvan Lallemode et Mathura.

Merci à mes Amis qui n'étaient pas à mes côtés dans le laboratoire, mais qui m'ont insufflée la force de réussir chaque épreuve passée durant ces trois années: Marie Laure, Laetitia, François, Benjamin, Estelle, Marion, Cynthia, Justine, Allison, Léa, Anne Charlotte, Aurélie, Cécile, Bahor, Alizée, Emilie, Lucie, Brice, etc.

Je tiens à remercier tout particulièrement Guillaume Séché, mon mari, qui a toujours été là pour me soutenir, me supporter et qui m'a tant apportée, aidée et aimée. Il m'a apporté un soutien inconditionnel sans faille ni faiblesse tout au long de cette aventure. C'est pourquoi je souhaite lui dédier cette thèse ainsi qu'à ma famille, Papa, Maman & Kikou. C'est grâce à votre éternel amour et votre confiance que j'en suis arrivée là aujourd'hui.

« La vérité scientifique sera toujours plus belle
que les créations de notre imagination et que les illusions de notre ignorance. »

Claude Bernard (1813-1878)

Abréviations

Les organismes

E.coli : *Escherichia coli*

Syn= *Synechocystis* : *Synechocystis* PCC 6803

Ana= *Anabaena* : *Anabaena* PCC 7120

Arthro= *Arthrospira* : *Arthrospira* PCC 7345

Les protéines

OCP : Orange Carotenoïde Protéine

OCP^o/ OCP^f : Forme inactive, orange de l'OCP/ Forme active, rouge de l'OCP

RCP : Rouge Carotenoïde Protéine

FRP : Fluorescence Recovery Protein

La synthèse des caroténoïdes

Opéron *Crt* : Opéron portant les 4 gènes codant les 4 enzymes (CrtE, CrtB, CrtI, CrtY) nécessaires à la synthèse du β -carotène et sous le contrôle du promoteur constitutif du gène *crtE*.

CrtE: Enzyme geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) synthase

CrtB: Enzyme Phytoène synthase

CrtI: Enzyme Phytoène désaturase

CrtY: Enzyme Lycopène cyclase

CrtO: Enzyme β -carotene ketolase provenant de *Synechocystis* PCC 6803 (nécessaire pour la synthèse de l'échinenone et du 3'hydroxy-echinenone)

CrtW: Enzyme β -carotene ketolase provenant de *Anabaena* PCC 7120 (nécessaire pour la synthèse de l'échinenone et du 3'hydroxy-echinenone)

CrtR: Enzyme β -carotene hydroxylase provenant de *Synechocystis* PCC 6803 (nécessaire pour la synthèse de la zeaxanthine et du 3'hydroxy-echinenone)

ECN: échinenone

CAN: canthaxanthine

ZEA: zéaxanthine

hECN: 3'hydroxy-echinenone

Les espèces réactives de l'oxygène

ERO : espèces réactives de l'oxygène

Oxygène : O₂

Eau: H₂O

Oxygène singulet : ¹O₂

Anion superoxyde : O₂⁻

Peroxyde d'hydrogène : H₂O₂

Radical hydroxyle : HO[·]

La photosynthèse

Cytb6f : cytochrome b6f

PSI/PSII : photosystème I et II

P680/ P700 : paire de chlorophylle du centre réactionnel du PSII / paire de chlorophylle du centre réactionnel du PSI

PQ/ PQH₂ : plastoquinone/plastoquinol

ATP : adénosine tri-phosphate

ADP : adénosine di-phosphate

Pi : phosphate inorganique

NADP : nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

Fd : ferrédoxine

FNR : ferrédoxine-NADP⁺ réductase

TyrZ ou Yz : tyrozine Z du photosystem II

COE : complexe d'oxydation de l'eau (PSII)

Chl*a* : chlorophylle *a*

LHC : light Harvesting Complex

PB/ PBs : phycobilisome/ phycobilisomes

ADN : acide désoxyribonucléique

Liste des Figures

Figures de l'Introduction

- Figure 1** : Composition de l'atmosphère depuis la naissance de la Terre
- Figure 2** : Schéma de l'état triplet $^3\Sigma_g^-$ et de l'état singulet $^1\Delta_g$ de l'oxygène
- Figure 3** : Sites de production de l' 1O_2 au sein de la photosynthèse et ses cibles potentielles
- Figure 4** : Structure chimique du glutathion réduit (GSH)
- Figure 5** : Structure chimique de la vitamine E (tocophérol)
- Figure 6** : Structure chimique de la vitamine C (acide ascorbique)
- Figure 7** : Structure chimique des caroténoïdes : lutéine et zéaxanthine
- Figure 8** : Schéma de la structure d'une cyanobactérie
- Figure 9** : Quelques cyanobactéries observées en microscopie optique
- Figure 10** : Schéma du mécanisme de la photosynthèse chez les cyanobactéries
- Figure 11** : Schéma du Photosystème II et de son transfert d'électron
- Figure 12** : Représentation schématique de la structure du phycobilisome de *Synechocystis* PCC 6803
- Figure 13** : Schéma des destins possibles de la chlorophylle excitée
- Figure 14** : Structure de l'OCP de *Synechocystis* PCC 6803 - 3' hydroxyechinenone
- Figure 15** : Photoactivité de l'OCP isolée, illuminée par la lumière bleue verte
- Figure 16** : L'OCP est une protéine photoactive
- Figure 17** : Photoactivité et photoprotection de l'OCP : la zéaxanthine ne peut pas remplacer le hECN pour son activité
- Figure 18** : *In vitro*, quenching de la fluorescence des phycobilisomes par l'OCP^r
- Figure 19** : *In vivo*, activité du Photosystème II de *Synechocystis* PCC 6803
- Figure 20** : *In vitro*, quenching de l' 1O_2 par l'OCP de *Synechocystis* PCC 6803
- Figure 21** : *In vitro*, quenching de l' 1O_2 par l'OCP ou par des antioxydants connus
- Figure 22** : Représentation schématique des deux rôles photo-protecteurs de l'OCP
- Figure 23** : Représentation schématique de la cellule *Escherichia coli*
- Figure 24** : Schéma de la conversion du β -carotène par les enzymes CrtO et CrtR de *Synechocystis* PCC 6803 et CrtW de *Anabaena* PCC 7120.
- Figure 25** : Voie de biosynthèse des caroténoïdes chez *Synechocystis* PCC 6803
- Figure 26** : Voie de biosynthèse des caroténoïdes chez *Anabaena* PCC 7120

Figures du Chapitre I

Figure 27 : Schéma de la biosynthèse enzymatique du β -carotène

Figure 28 : Représentation schématique des deux plasmides contenant les gènes nécessaires à la biosynthèse du β -carotène dans *E.coli*

Figure 29 : Schéma de la conversion du β -carotène par les enzymes CrtO, CrtR et CrtW

Figure 30 : Représentation schématique de la zone du site de clonage multiple au sein du plasmide pBAD/gIIIA

Figure 31 : CCM de l'extrait des caroténoïdes totaux synthétisés par *E.coli* possédant les plasmides pAC-BETA et pBAD-CrtO

Figure 32 : Oligonucléotides utilisés pour cloner les gènes codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse des caroténoïdes et les gènes des trois OCPs et plasmides créés

Figure 33 : Schéma des plasmides créés pour la biosynthèse de l'OCP dans *E.coli*

Figure 34 : Représentation schématique de la production de l'OCP dans *E.coli* avec le système 3 plasmides.

Figure 35 : Gel de protéines totales extraites des cellules *E.coli* (SDS-PAGE 12%)

Figure 36 : Photographie des cellules *E.coli* produisant différentes OCPs

Figures du Chapitre II

Figure 1: The OCP and photoprotection

Figure 2: Schematic representation of OCP production in *E.coli*

Figure 3: Photoactivity of the OCPs produced in *E.coli*

Table I: Percentage and amount of holo-OCP obtained from 1L culture of *E.coli*.

Figure 4: Absorbance spectra and kinetics of photoactivity of recombinant OCPs

Figure 5: $^1\text{O}_2$ Quenching activity of the recombinant OCPs

Figure 6: Induction of PB fluorescence quenching by OCP^f and fluorescence recovery

Sup Fig 1: Schematic carotenoid biosynthetic pathway

Sup Fig 2: Nucleotides and amino acids sequences added to the 3' and 5' ends of *ocp* gene (N-terminus and C-terminus of *Synechocystis ocp* gene).

Sup Fig 3: UV Chromatograms (450 nm) of isolated OCPs from *E.coli* culture

Sup Fig 4: Photoactivity of recombinant OCPs

Sup Fig 5: Apo-OCP influence on singlet oxygen quenching

Sup Fig 6: Induction of PB fluorescence quenching by OCP^f and fluorescence recovery

Sup Fig 7: List of synthetic oligonucleotides used to amplify and to clone *ocp* genes and genes involved in carotenoid synthesis.

Sup Fig 8: Apo-protein effect during phycobilisome quenching

Sup Fig 9: Comparison of different OCPs. Protein sequence alignments and structures

Figures du Chapitre III

Figure 37 : Représentation schématique de la production de l'OCP dans *E. coli* avec le système 2 plasmides

Figure 38 : Représentation schématique de la production de l'OCP dans *E. coli* avec le système 1 plasmide

Figure 39 : Représentation schématique de la souche *E.coli* potentielle productrice d'OCP-hECN N°1

Figure 40 : CCM de l'extrait des caroténoïdes totaux synthétisés par *E.coli* possédant les plasmides pAC-BETA, pBAD-CrtO, pCDF-OCPsyn-CrtRsyn

Figure 41 : Représentation schématique de la souche *E.coli* potentielle productrice d'OCP-hECN N°2

Figure 42 : Représentation schématique de la souche *E.coli* potentielle productrice d'OCP-hECN N°3

Figure 43 : CCM de l'extrait des caroténoïdes totaux synthétisés par *E.coli* possédant les plasmides pAC-BETA, pBAD-CrtO et pCDF-OCPsyn-CrtRana

Figures du Matériel & Méthodes

Figure 44 : Schéma représentatif du plasmide pBAD/gIIIa utilisé pour le clonage des gènes *crt* (kétolases et hydroxylase)

Figure 45 : Schéma représentatif du plasmide pCDFDuet utilisé pour le clonage des gènes *ocp*

Objectif de la thèse de doctorat

Les cyanobactéries, vivant dans un milieu aquatique riche en oxygène et étant parfois soumises à de fortes intensités de lumière, sont particulièrement exposées au stress oxydant. Leurs pigments, les chlorophylles et les bilines, agissent comme des photosensibilisants. En conditions de forte lumière, tous les composants de la chaîne de transport d'électrons sont réduits, la chaîne est donc saturée et les triplets de chlorophylle peuvent alors se former. Les triplets de chlorophylle réagissent avec l'oxygène moléculaire, conduisant à la formation de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). Dans le centre réactionnel du photosystème II, la formation d' $^1\text{O}_2$ augmente sous haute intensité de lumière, due à une augmentation des réactions de recombinaison de charge et la formation de la chlorophylle à l'état de triplet. Les cyanobactéries, comme les plantes et les algues synthétisent des caroténoïdes dans leurs membranes où ces derniers sont attachés à des protéines membranaires. Ils jouent plusieurs rôles dans la protection cellulaire : ils récoltent l'énergie lumineuse, ils font écran à la lumière et quencher le très réactif $^1\text{O}_2$. Chez les organismes non photosynthétiques, comme chez l'homme, les caroténoïdes, apportés par l'alimentation, ont également un rôle de protection contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) induites par des sensibilisateurs exogènes ou produites par le métabolisme.

Ce qui était admis avant que j'arrive au laboratoire était que l'OCP, présente chez la majorité des cyanobactéries, est une protéine soluble et photoactive, attachant un caroténoïde, le 3'hydroxy-echinenone. Elle joue un rôle essentiel au sein d'un mécanisme de photoprotection sous de fortes intensités lumineuses. En absorbant la lumière bleue verte, elle passe d'une forme inactive, orange à une forme active, rouge. L'OCP rouge s'attache aux phycobilisomes, les antennes collectrices d'énergie chez les cyanobactéries, et dissipe l'excès d'énergie lumineuse en la convertissant sous forme de chaleur. Ce mécanisme permet de diminuer l'énergie arrivant aux centres réactionnels du photosystème et la formation des espèces réactives de l'oxygène. Connaissant le rôle protecteur des caroténoïdes, nous nous demandions si l'OCP, outre son rôle de quencher d'énergie, est aussi capable de quencher $^1\text{O}_2$. Une récente étude, menée par Arezki Sedoud et Rocio Lopez Igual au sein du laboratoire, a démontré que l'OCP possède un autre rôle essentiel dans la photoprotection : elle protège les cyanobactéries du très réactif $^1\text{O}_2$ (Sedoud et al, 2014). L'OCP possède une complémentarité photoprotectrice: quencher d'énergie et d'oxygène singulet (Wilson et al., 2006 ; Sedoud et al., 2014).

Le but de mon doctorat était d'obtenir en grande quantité l'OCP, exprimée de façon hétérologue. L'OCP a toujours été sur-exprimée de façon endogène, chez *Synechocystis* PCC 6803 (Wilson et al., 2008). Le rendement de production endogène de l'OCP est trop faible pour qu'il soit adapté à l'Industrie de la Santé. Les cyanobactéries offrent des paramètres de culture peu avantageux (croissance cellulaire et rendement de production protéique faibles, etc.). Pour souhaiter une commercialisation de l'OCP, ce fut une nécessité de la produire dans un organisme exogène étant capable d'en produire beaucoup, en peu de temps. Pour l'Industrie, ce sujet de doctorat fut la promesse d'obtenir un bon rendement de production de l'OCP recombinante afin de pouvoir répondre aux exigences de la commercialisation. Pour le Laboratoire, c'était l'espérance d'obtenir un système d'expression hétérologue robuste. Ce système ayant pour but de construire et d'étudier rapidement des mutations du gène de l'OCP, afin d'étayer d'avantage les questions relatives à son mécanisme de photoprotection.

L'objectif était de produire l'OCP de trois espèces de cyanobactéries : *Synechocystis* PCC 6803, *Arthrospira* PCC 7345 et *Anabaena* PCC 7120 dans l'organisme hétérologue *Escherichia coli* (*E.coli*). Cette expression hétérologue n'est pas uniquement le simple fait de surexprimer le gène de l'OCP, mais, de tout d'abord, reconstituer la voie de biosynthèse des caroténoïdes que ne possède pas *E.coli*, puis d'exprimer le gène de l'OCP. Jusqu'alors, les protéines à pigments, chlorophylles ou caroténoïdes ont toujours été exprimées chez *E.coli*, mais uniquement pour l'expression du gène codant l'apo-protéine (protéine sans son pigment). Le complexe protéine-pigments est, par la suite, reconstitué *in vitro* (Pagano et al., 1998; Ros et al., 1998; Schmid et al., 1997). Afin de pouvoir exprimer l'OCP avec son caroténoïde lié dans *E.coli*, de nombreux points d'interrogation étaient en suspens. En effet, nous ignorons le mécanisme d'entrée du caroténoïde dans l'OCP, ce qui sous-entendait que le sujet de mon doctorat était risqué car il n'était sûrement pas, ou alors, difficilement réalisable. Comment le caroténoïde fait-il pour se lier à l'OCP ? Il y a-t-il besoin d'une protéine chaperon pour le faire rentrer dans la protéine ? Sachant que les caroténoïdes sont hydrophobes et que l'OCP est soluble, comment ces deux acteurs vont-ils pouvoir se rencontrer dans la cellule ? Les finalités de ce travail ainsi que toutes les questions en suspens contribuaient à rendre mon sujet de thèse de doctorat, un challenge, que j'avais à cœur de réaliser avec succès.

Ma thèse de doctorat se divise en quatre chapitres. Le premier expose la mise en place du système de production hétérologue de l'OCP en passant par la reconstitution de la voie de biosynthèse des caroténoïdes aux conditions de culture de la souche produisant l'OCP de *Synechocystis* PCC 6803. Le deuxième porte sur l'exploitation du système développé dans le premier chapitre pour produire et caractériser les OCPs de trois cyanobactéries : *Synechocystis*, *Arthrospira* et *Anabaena*, attachant diverses caroténoïdes directement dans *E.coli*. Le troisième est consacré à l'optimisation du système de production hétérologue pour augmenter le rendement total en OCP. Le quatrième et dernier chapitre expose deux travaux de recherche qui ont exploité le système de production hétérologue de l'OCP afin d'élucider son mécanisme de photoactivation.

Publications

Trois articles

- 1- **de Carbon, C.B.**, Thurotte, A., Wilson, A., Perreau, F., & Kirilovsky, D. (2015). Biosynthesis of soluble carotenoid holoproteins in *Escherichia coli*. *Scientific reports*, 5. (Premier et deuxième chapitre).

- 2- Leverenz, R. L., Sutter, M., Wilson, A., Gupta, S., Thurotte, A., **de Carbon, C.B.**, ... & Kerfeld, C. A. (2015). A 12 Å carotenoid translocation in a photoswitch associated with cyanobacterial photoprotection. *Science*, 348(6242), 1463-1466. (Quatrième chapitre).

- 3- Thurotte, A., Lopez Igual, R., Wilson, A., Comolet, L., **de Carbon, C.B.**, Xiao, F. and Kirilovsky, D. (2015). Regulation of Orange Carotenoid Protein activity in cyanobacterial photoprotection. *Plant Physiology* July 2015 pp.00843.2015. (Quatrième chapitre).

Un depot de brevet

- 4- Dépôt de brevet « Biosynthesis of soluble carotenoproteins in *Escherichia coli* ». Entreprise Phycosource/ CEA/ CNRS le 25 juillet 2014 à l'Office européen des brevets. (Premier et deuxième chapitre).

Congrès & formations

27-28 mai 2013 - **Journées des Doctorants** du CEA de Saclay (CEA, Saclay, France)

17-18 juin 2013 - **Journées françaises de la Photosynthèse** (SFØ, Paris, France)

13-15 octobre 2013- **Retraite des Doctorants** du CEA (CEA, Porquerolles, France)

9 au 12 avril 2014 - Colloque **DYNAMO - CNRS** (Paris, France)

14-15 avril 2014 - **Journées françaises de la Photosynthèse** (SFØ, Paris, France)

30 avril 2014 - Séminaire: « **Mobiliser la Propriété Intellectuelle : Dans la valorisation de la recherche** » (ANRT, Paris, France)

13-14 mai 2014 - **Journées des Doctorants** du CEA (CEA, Saclay, France)

15 mai 2014 - Séminaire « **Comment évaluer l'activité des antioxydants** » Société Française des Antioxydants (SFA, Paris, France)

1 au 4 juillet 2014 - **European Plant Science Retreat -EPSR-** à Amsterdam, organisé par The Plant Physiology and Molecular Plant Pathology research groups of the Swammerdam Institute for Life Sciences (Faculty of Science) pour les Doctorants en Science du Végétal d'Europe (Amsterdam, Pays-Bas)

8 au 12 septembre 2014 - **Congrès International de PHOTOBIOLOGIE**, exposé oral “The cyanobacterial Orange Carotenoid Protein binding canthaxanthin is photoactive and able to quench energy and singlet oxygen » (Cordoba, Argentine)

5 au 7 novembre 2014 - **Journées des Doctorants** (ED 145, Sciences du Végétal, Paris SUD), exposé oral « Biosynthesis of soluble carotenoid holoproteins in *Escherichia coli* » et obtention du prix du meilleur exposé (Orsay, France)

6 mai 2015 - Séminaire au CEA, exposé oral « Biosynthesis of soluble carotenoid holoproteins in *Escherichia coli* » (CEA, Saclay, France)

18-19 mai 2015 - **Journées françaises de la Photosynthèse**, exposé oral “The cyanobacterial Orange Carotenoid Protein binding canthaxanthin is photoactive and able to quench energy and singlet oxygen » et obtention du prix du meilleur exposé (SFØ, Paris, France)

28-29 mai 2015 - **Journées des Doctorants** du CEA, exposé oral « Biosynthesis of soluble carotenoid holoproteins in *Escherichia coli* » (CEA, Saclay, France)

10 au 13 juillet **European Plant Science Retreat -EPSR-** à Paris, organisé par les doctorants en Science du Végétal de Paris SUD (Association Doc'en herbe de l'Ecole Doctoral 145) pour les Doctorants en Science du Végétal d'Europe (www.epsr2015.u-psud.fr), exposé oral « Biosynthesis of soluble carotenoid holoproteins in *Escherichia coli* » (Paris, France).

Introduction

1- Les espèces réactives de l'oxygène

1.1- Le paradoxe de l'oxygène et le stress oxydant

La vie est apparue sur la Terre il y a environ 4 milliards d'années avec l'émergence des premiers microorganismes à l'origine du règne des Archées et des Bactéries (Margulis, 1996; Woese et al., 1990). A cette ère, l'atmosphère était majoritairement composée de dioxyde de carbone (CO₂) rejeté par les éruptions volcaniques (Kasting, 1993; SL Miller and CL Harold 1959).

Les premiers organismes capables d'utiliser l'énergie solaire et le dioxyde de carbone pour réaliser la photosynthèse oxygénique furent les cyanobactéries, anciennement appelées algues bleues. Elles sont apparues dans l'Océan Primordial du Précambrien il y a plus de 3,5 milliards d'années et y ont permis l'accumulation progressive de l'oxygène. L'enrichissement en oxygène de l'atmosphère primitive a permis la création de la couche d'ozone, qui protège la Terre des rayonnements solaires. Ce bouleversement a engendré des modifications du climat et de la composition de la croûte terrestre qui ont, à leur tour, permis la colonisation terrestre par de nouvelles formes de vie animale et végétale (Figure 1). L'atmosphère et la vie telles que nous les connaissons aujourd'hui sont apparues suite à des évènements biologiques en cascade ; citons le processus d'endosymbiose, qui a donné vie aux premiers organismes eucaryotes (Falkowski et al., 2004a).

Nous pouvons mentionner l'endosymbiose d'une cyanobactérie dans une cellule eucaryote primitive il y a environ 1,5 milliard d'années qui a donné naissance aux chloroplastes des cellules végétales (Giovannoni et al., 1988; McFadden et al., 1994; Theissen et al., 2003) Ou encore le processus d'endosymbiose d'un ancêtre de l'eubactérie qui possédait des signatures géniques du sous-groupe des α -Proteobactéries et qui a donné naissance aux mitochondries des cellules (Dolezal et al., 2006; Gray et al., 1999).

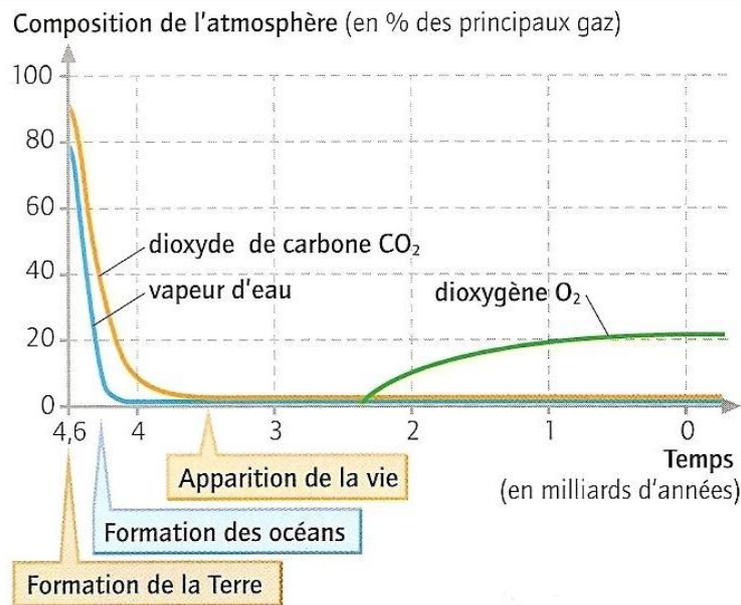


Figure 1

Composition de l'atmosphère depuis la naissance de la Terre

(http://jeanvilarsciences.free.fr/?page_id=669)

La Terre s'est formée il y a 4,6 milliards d'années par collision et agglomération de poussières et corps célestes. De nombreuses modifications affectèrent la Terre entre 4,6 et 3,5 milliards d'années. Durant 1 milliard d'années, le bombardement météoritique se dissipa, une croûte terrestre externe solide se forma, la température diminua (moins de 90°C), la composition de l'atmosphère évolua et les océans se formèrent par condensation de la vapeur d'eau. Ces transformations ont permis l'apparition des premières formes de vie au sein des océans. L'eau permettait de bloquer les rayons solaires qui s'abattaient sur la Terre à cette époque, non protégée par la couche d'ozone. Sur les continents, aucune vie n'était présente car l'atmosphère était dépourvue en oxygène.

Les premiers êtres vivants furent les cyanobactéries qui fabriquent leur matière organique à partir du dioxyde de carbone et de l'énergie lumineuse en libérant de l'oxygène. Les cyanobactéries contribuèrent alors à enrichir l'eau puis l'air en oxygène, ce qui permis de modifier la composition de l'atmosphère et l'apparition de nouvelles formes de vie.

L'oxygène est indispensable à tous les animaux, plantes et bactéries pratiquant la respiration cellulaire. L'oxygène est utilisé par les complexes respiratoires localisés dans les membranes thylakoidiennes chez les cyanobactéries (Revue: Schmetterer, 1994) et dans les mitochondries chez les plantes (Revue: Plaxton and Podestá, 2006), et chez les cellules eucaryotes en générale (Revue: Vonck and Schäfer, 2009). La molécule d'oxygène est indispensable et vitale pour les organismes mais peut devenir toxique si sa concentration intracellulaire est mal régulée. Cette singularité s'appelle le paradoxe de l'oxygène (Cadenas, 1989; Gerschman, 1981; Halliwell and Gutteridge, 1984). L'oxygène est majoritairement assimilé par la chaîne respiratoire où il est réduit en eau (H₂O), mais, une infime partie de cet oxygène subit une réduction partielle par la chaîne respiratoire (Revue : B Chance, H Sies, A Boveris, 1979). Cette réduction partielle entraîne la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO réagissent avec les principaux constituants cellulaires comme l'ADN, l'ARN, les protéines et les lipides. En ciblant ces molécules, les radicaux libres les endommagent, ce qui conduit à nuire à l'intégrité de la cellule (Cadenas, 1989; Ck, 1995; Halliwell, 1994).

Dans la cellule, il y a un équilibre entre la génération et l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Lorsque cet équilibre est rompu, les ERO peuvent devenir toxiques (Halliwell, 1994; Storz and Imlay, 1999; D Harman, 1955). En 1955, Harman évoqua la possibilité que les dérivés hautement réactifs de la molécule qui nous est vitale, l'oxygène, seraient responsables du vieillissement cellulaire (D Harman, 1955).

Un contrôle du métabolisme cellulaire oxydatif de la cellule est essentiel pour maintenir son intégrité et son bon fonctionnement. De nombreuses conditions peuvent être impliquées dans l'augmentation de la production des ERO dans la cellule, comme des stress cellulaires abiotiques (l'exposition à la lumière intense du soleil, les chocs thermiques, la sécheresse, la salinité ou bien directement par la biodisponibilité en oxygène) ou des stress cellulaires biotiques comme les infections par d'autres organismes exogènes (Fujita et al., 2006). Le stress oxydant correspond au dérèglement dans l'équilibre pro-oxydant - antioxydant en faveur du pro-oxydant, conduisant la cellule à des dommages potentiels (Sies, 1991). Ce déséquilibre peut être causé par une surproduction d'ERO et/ou une perte de la capacité à les neutraliser par des bio-facultés antioxydantes.

1.2- Formation et caractérisation des espèces réactives de l'oxygène chez les organismes photosynthétiques

La formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) est importante dans la chaîne photosynthétique procaryote ou eucaryote. Cette dernière peut laisser échapper une certaine proportion d'électrons qui vont alors réduire que partiellement l'oxygène et ainsi former des ERO (Revue: Asada, 1994, 2006a).

En condition de forte lumière, la chaîne de transport d'électrons est saturée et les ERO se forment au sein des photosystèmes I et II. La fuite d'électrons sur l'oxygène moléculaire forme le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), connu pour initier une cascade de réactions conduisant à la formation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et au très oxydant hydroxyle (OH^{\cdot}).

L'oxygène subissant une réduction monoélectronique, par l'addition d'un seul électron, conduit à la formation du radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) : $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$.

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 peut se former par réduction non-enzymatique du superoxyde. Le superoxyde se dismuterait spontanément en H_2O_2 et en oxygène moléculaire par interaction entre deux radicaux superoxydes: $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Si le superoxyde s'est formé au sein du site accepteur d'électrons du PSII, au PQ pool, il est réduit par la plastoquinol pour former l' H_2O_2 : $O_2^{\cdot-} + PQH_2 \rightarrow H_2O_2 + PQ^{\cdot-}$, mais il peut aussi être formé par réduction enzymatique, par la superoxyde dismutase (McCord and Fridovich, 1969a).

Le radical hydroxyle, puissant oxydant, est formé par la réduction mono-électronique du H_2O_2 . Selon le mécanisme de Fenton, le H_2O_2 est réduit par des métaux libres. Dans la réaction de Fenton (Fenton, 1876), le H_2O_2 serait réduit par le Fe^{2+} libre provenant du PSII endommagé sous de fortes illuminations : $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + \cdot OH$. Ce radical attaque tout ce qui l'entoure et est très toxique (Gutteridge and Halliwell, 1990). C'est le radical le plus réactif, il est largement incriminé dans le processus du stress oxydant.

Le cas de l'oxygène singulet (1O_2) est un peu différent. L'oxygène singulet est un état instable de l'oxygène. L'oxygène, dans son état fondamental, est à l'état triplet. L'oxygène triplet peut devenir singulet après absorption d'un photon (Figure 2). Sa durée de vie est courte, de l'ordre de quelques micro-secondes. C'est un oxydant fort, impliqué dans de nombreux processus de photo-oxydation.

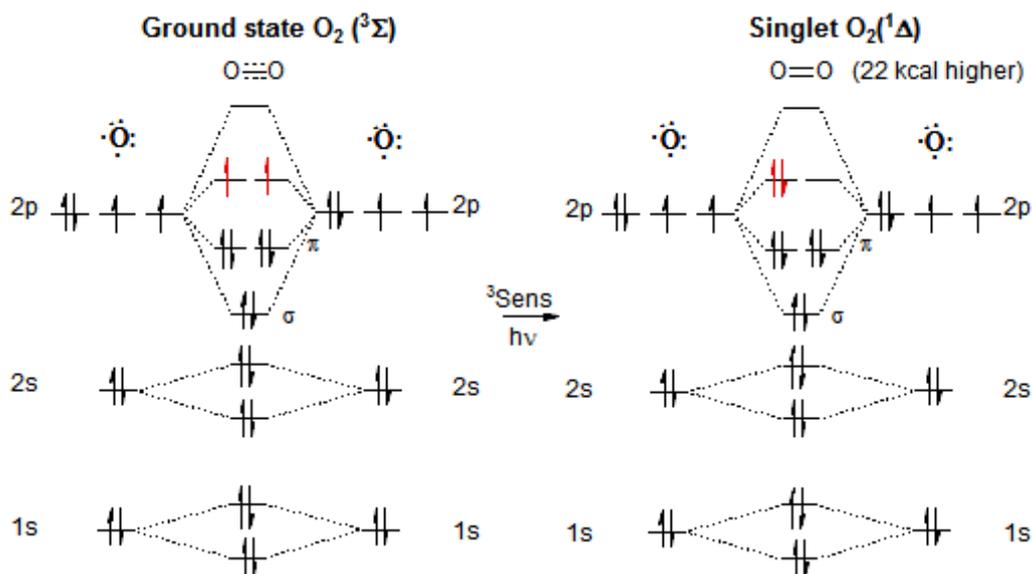


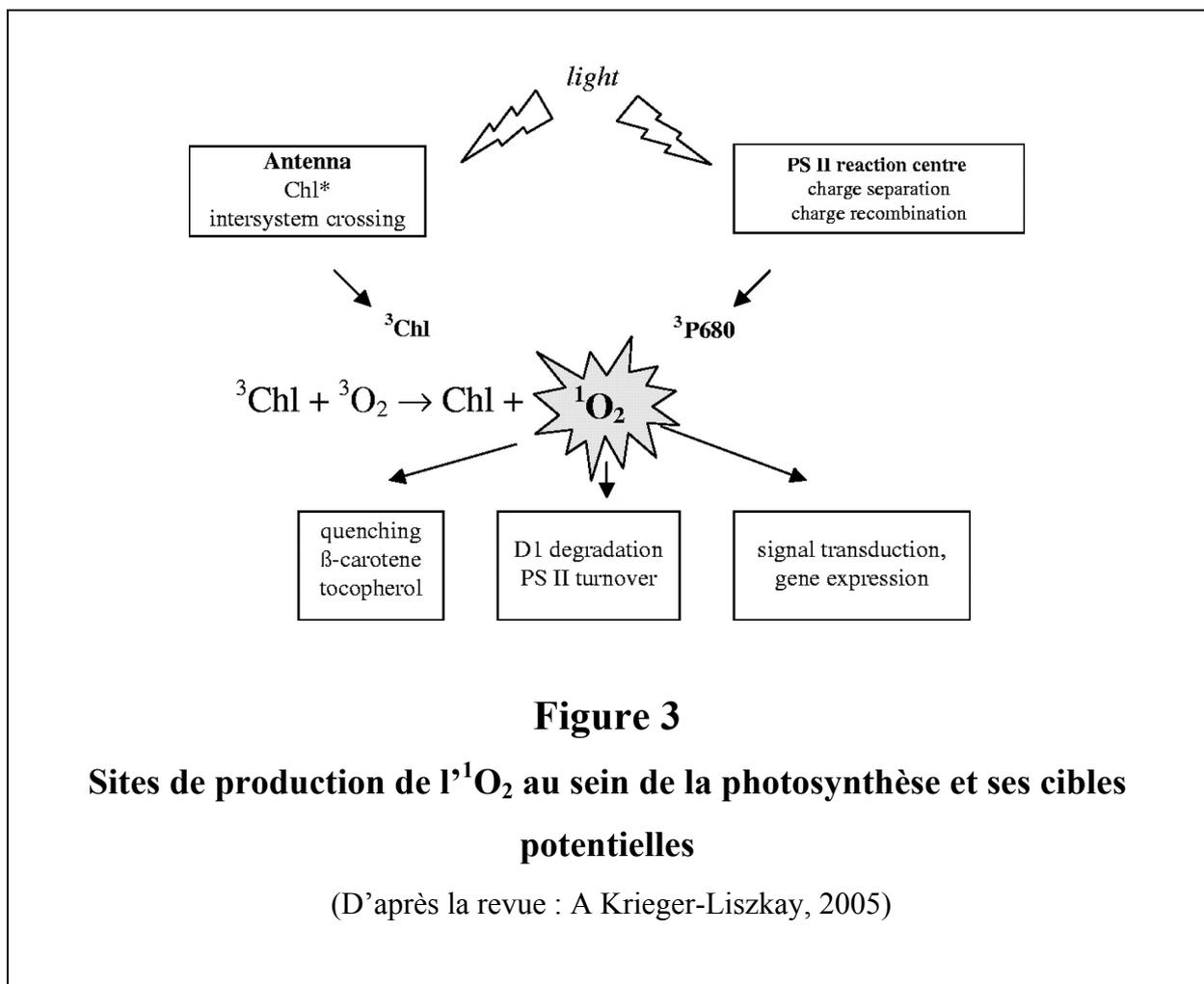
Figure 2

Schéma de l'état triplet ³Σ_g⁻ et de l'état singulet ¹Δ_g de l'oxygène

(<http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/chem547/2-redox%7B26%7D.htm>)

L'oxygène fondamental O₂ (gauche), se caractérise par une configuration électronique ³Σ_g⁻ et correspond à deux électrons à spins parallèles (↑ ↑) répartis entre deux orbitales π* et π*. L'oxygène singulet (droite) est un état instable de l'oxygène O₂ et se caractérise par une configuration électronique particulière, notée ¹Δ_g, dans laquelle les deux électrons possèdent des spins opposés (↑ ↓) et se trouvent sur une même orbitale antiliante π*.

Au sein des organismes photosynthétiques, en condition de forte lumière, l'oxygène singulet est généré par l'énergie d'excitation triplet-singlet transférée depuis la chlorophylle excitée, état triplet, à l'oxygène moléculaire : $O_2(^3\Sigma_g^-) + {}^3\text{Chl}^* \rightarrow O_2(^1\Delta_g) + \text{Chl}$ (Figure 3). La chlorophylle triplet est formée de deux façons : la première est depuis la chlorophylle singulet au sein du complexe antennaire du PSII ou par recombinaison de charges au sein du centre réactionnel du PSII (Revue :Krieger-Liszkay, 2005,Figure 3). L'organisme photosynthétique est soumis à un stress oxydant lorsque l'énergie lumineuse absorbée est plus importante que celle qui peut être utilisée dans la photosynthèse. L'oxygène singulet peut être neutralisé par interaction avec les caroténoïdes (β -carotène, lutéine et zéaxanthine), l' α -tocophérol ou peut réagir avec la protéine D1 du photosystème II (Figure 3, d'après la revue :Krieger-Liszkay, 2005).



Malgré leur toxicité démontrée et incontestée, les ERO peuvent toutefois jouer un rôle au sein du fonctionnement cellulaire : elles sont aussi des messagers de la signalisation cellulaire (Figure 3). Elles ont des rôles multiples dans l'orchestration de l'expression des gènes de la plante. L'homéostasie redox est considérée comme un " intégrateur " des informations du métabolisme cellulaire et de l'environnement. Elle contrôle ainsi la prolifération cellulaire, la croissance de la plante, les réponses d'acclimatation, ainsi que l'événement de mort cellulaire programmée, l'apoptose (Foyer and Noctor, 2008; Krieger-Liszkay, 2005a; Triantaphylidès and Havaux, 2009).

2- Le vaste monde des Antioxydants

2.1- Les antioxydants enzymatiques

Les organismes tentent de « garder l'oxygène actif sous contrôle » (Noctor and Foyer, 1998). Mais si les cellules sont soumises à un stress trop important, les ERO peuvent se former à partir de l'oxygène. Les organismes ont créé des systèmes de défense antioxydants hautement efficaces, chez les cellules de mammifères (Revue: Blokhina et al., 2003), comme chez les organismes photosynthétiques (Foyer et al., 1994). Le système d'élimination des ERO repose sur différents types de mécanismes enzymatiques tels que : la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX) et la catalase (CAT) (Livre : Halliwell and Gutteridge, 1999). Les enzymes antioxydantes les plus étudiées sont : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR) et la glutathion S-transférase (GST). Les séquences génétiques de ces enzymes ont été conservées au cours de l'évolution, ce qui prouve leur importance au sein de la cellule (Revue: Blokhina et al., 2003).

La superoxyde dismutase (SOD) est une métalloprotéine qui a été découverte en premier chez les mammifère (McCord and Fridovich, 1969b) puis dans les chloroplastes des cellules végétales (Asada, 2006a). La SOD régule la concentration de l' $O_2^{\cdot-}$ intracellulaire en accélérant la dismutation du radical $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . Les SOD représentent la première défense enzymatique contre les ERO (Scandalios, 1993).

La catalase (CAT) est une enzyme qui contient un groupe hème qui catalyse la décomposition du H_2O_2 en H_2O et O_2 (Vainshtein et al., 1981).

La glutathion peroxydase (GPX) est une enzyme permettant également la décomposition du H_2O_2 . Elles permettent la décomposition de l' H_2O_2 par l'oxydation de son co-substrat, le GSH en GSSG, qui sera réduit par la suite par l'action de la glutathion réductase (Review : Blokhina et al., 2003).

La glutathion réductase (GR) n'est pas une enzyme antioxydante dans le sens étymologique du terme car elle n'agit pas directement sur les ERO. Son rôle intervient dans réduction du glutathion ($GSSG \rightarrow GSH$), puissant antioxydant et co-substrat de la GPX. Elle fut identifiée

la première fois chez les plantes (Foyer and Halliwell, 1976). La GR permet la régénération du glutathion sous sa forme réduite (GSH) *via* la consommation de NADPH, évitant ainsi la synthèse *de novo* du glutathion (GSSG) qui présente un coût énergétique plus élevé, dû à la consommation d'ATP (Foyer and Halliwell, 1976; Halliwell and Foyer, 1978).

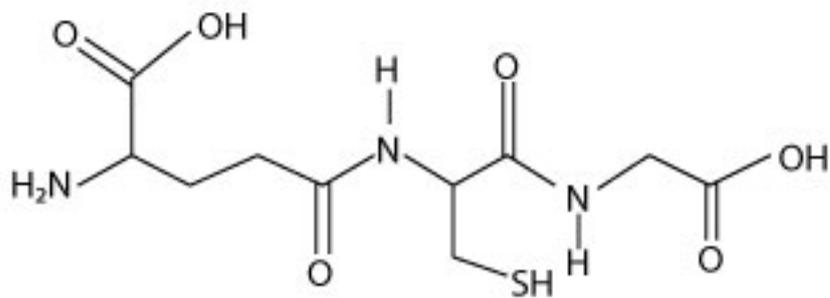
La glutathion S-transférase (GST) bénéficie aussi d'une action indirecte sur l'élimination des ERO en transportant le glutathion réduit (GSH) vers les zones cellulaires exposés à des dommages oxydatifs (Frear and Swanson, 1970). La GST possède un rôle de détoxification des cellules. Avec la GPX et la GR, elle joue un rôle central dans la lutte des ERO par le glutathion réduit (GSH).

Les enzymes citées ci-dessus constituent les premières défenses antioxydantes directes ou indirectes *via* la régénération et le transport du GSH. Il existe également d'autres défenses antioxydantes telles que les transferrines, les ferritines, les métallothionéines (Chiancone et al., 2004). Ces enzymes inhibent la biodisponibilité cellulaire des métaux lourds en les complexant, ce qui prévient les processus de production de radicaux libres. Enfin, les enzymes de réparation des molécules endommagés par les ERO, telles que les méthionines sulfoxydes, les réductases, les endonucléases et les ADN glycosylases, peuvent également être considérées comme des défenses antioxydantes (Revue : B Demple and Harrison, 1994).

2.2- Les antioxydants non-enzymatiques

Les principaux antioxydants non-enzymatiques sont le glutathion, la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et les thiols (fonction SH) dont certains sont synthétisés *in vivo* comme le glutathion (Revue :Cadenas, 1989). Il est commun de définir un « bon » antioxydant comme étant un bon « quencher » de ERO. Toutefois il est aussi nécessaire que l'antioxydant soit disponible dans la cellule, donc régénéré, recyclé *in vivo* de façon à jouer son rôle plusieurs fois.

Le glutathion (GSH sous sa forme réduite) est un tri-peptide formé par la condensation de l'acide glutamique, de la cystéine et de la glycine (Figure 4).



Formule développée du glutathion

Figure 4

Structure chimique du glutathion réduit (GSH)

(<http://biologiedelapeau.fr/spip.php?mot145>)

La glutamylcystéine synthétase et la glutathion synthétase sont les deux enzymes qui interviennent dans sa synthèse. Le glutathion est primordial pour détoxifier les métaux lourds. Le groupement thiol réagit avec les métaux lourds en créant avec eux une liaison soufre-métal pour qu'ils soient ensuite excrétés sans causer de dommages à la cellule. La fonction thiol du GSH lui confère son rôle antioxydant, soit réducteur (donneur d'électron ou d'atome H). Il est le substrat de plusieurs enzymes antioxydantes et est largement généré dans la cellule *de novo* ou facilement régénéré par le NADPH. Il joue un rôle majeur dans la détoxification des ERO formées dans la cellule (Foyer and Noctor, 2011; Noctor and Foyer, 1998).

La vitamine E (tocophérol) est un antioxydant liposoluble en raison de sa longue chaîne aliphatique comportant 16 atomes de carbone (GW Burton et al.,1989 ; Figure 5)

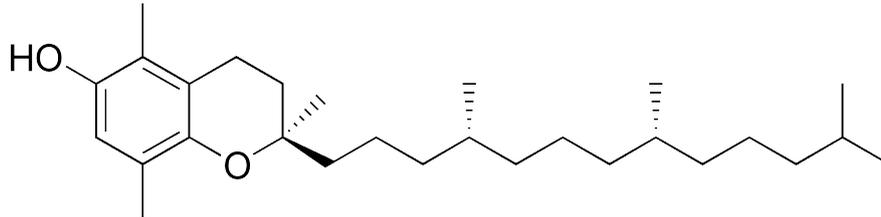


Figure 5

Structure chimique de la vitamine E (tocophérol)

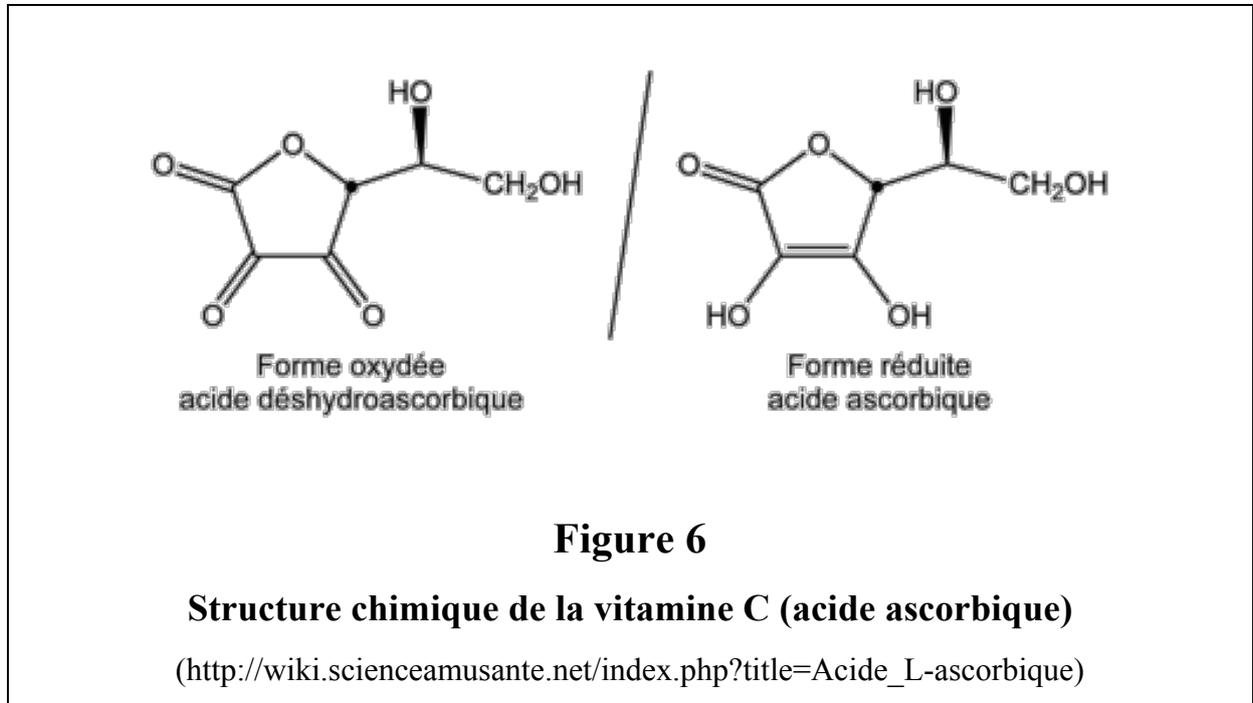
(https://fr.wikipedia.org/wiki/Vitamine_E)

Elle est localisée parmi les chaînes d'acides gras des phospholipides constituant les membranes et les lipoprotéines. Le rôle de la vitamine E est de capter les radicaux peroxydes lipidiques RO_2 qui propagent à leur tour les chaînes de peroxydation ; elle prévient et stoppe la peroxydation lipidique. Elle permet aussi le captage du superoxyde, de l'hydroxyle, ainsi que l'oxygène singulet.

Le tocophérol est présent dans les chloroplastes des plantes où il désactive principalement l'oxygène singulet et le radical hydroxyle et empêche la propagation de la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux peroxydes dans les membranes thylakoïdes (Munné-Bosch, 2005).

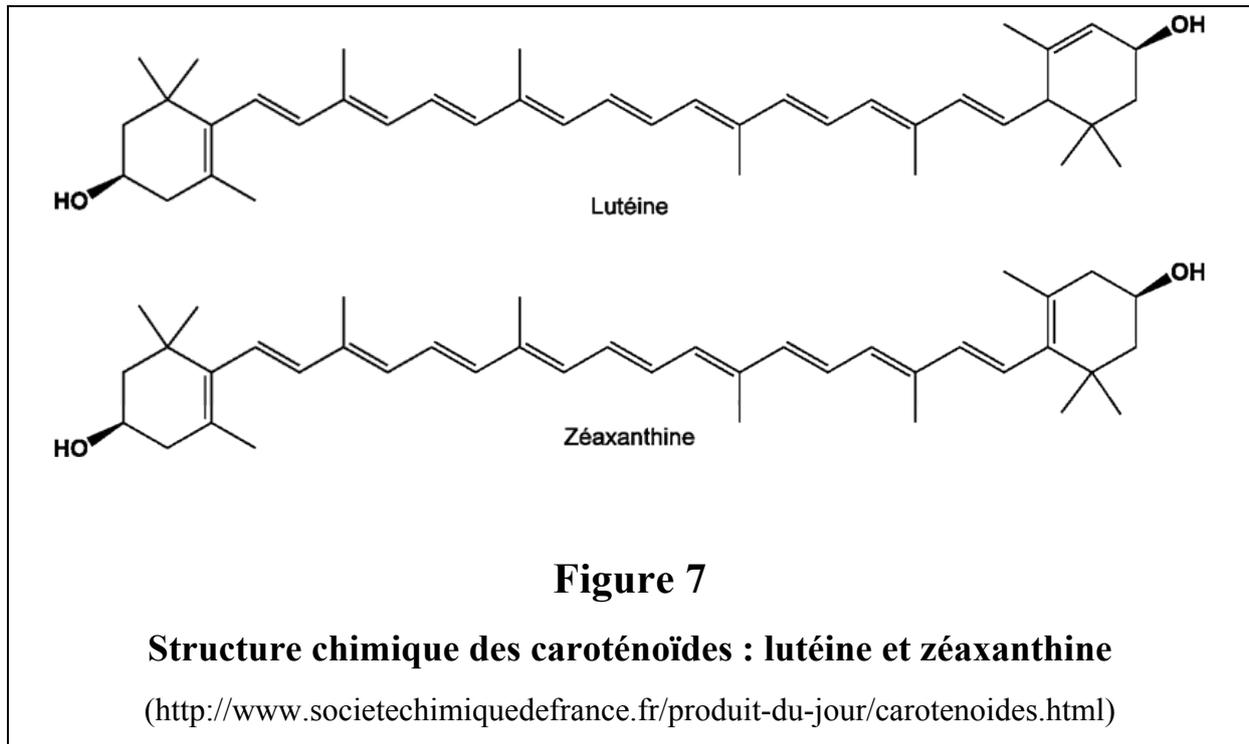
Les animaux, eux, ne la synthétisent pas, ils doivent donc puiser cette ressource dans l'alimentation.

La vitamine C ou l'ascorbate, est une vitamine hydrosoluble (Figure 6).



Elle est synthétisée par les plantes et la plupart des animaux, excepté chez certains mammifères comme l'homme. C'est une molécule antioxydante qui réagit avec tous les ERO, prévenant ainsi la peroxydation lipidique et l'oxydation des protéines et de l'ADN. La vitamine C a également un pouvoir antioxydant indirect en recyclant les caroténoïdes et la vitamine E (Padayatty et al., 2003). Elle peut aussi être régénérée dans le chloroplaste chez les plantes par d'autres mécanismes dépendant de la ferrédoxine ou du NADPH (Asada, 1999).

Les **caroténoïdes** sont des molécules liposolubles produites par les organismes photosynthétiques et qui doivent être acquis par l'alimentation chez les animaux.



Les caroténoïdes sont des composés isoprénoïdes hydrophobes synthétisés dans les membranes cellulaires (Figure 7). La majorité s'accumule au sein de complexes protéiques dans la membrane photosynthétique. Les caroténoïdes les plus répandus dans le règne végétal sont le β -carotène et la zéaxanthine, mais les cyanobactéries, elles, synthétisent des céto-caroténoïdes rares tels que l'échinénone, l'hydroxyéchinénone ou la canthaxanthine et des caroténoïdes glycosylés tels que les myxoxanthophylles (Revue : Takaichi and Mochimaru, 2007a). Chez *Synechocystis*, les principaux caroténoïdes accumulés sont le β -carotène, la zéaxanthine, l'échinénone et les myxoxanthophylles (Bramley et Sandmann 1985). Le β -carotène est le substrat de deux enzymes qui catalysent la formation de l'échinénone et de la zéaxanthine. L'enzyme β -carotène mono-cétolase CrtO, codée par le gène *slr0088* chez *Synechocystis* PCC 6803 et l'enzyme β -carotène hydroxylase codée par le gène *sll1468* chez *Synechocystis* PCC 6803 catalysent respectivement la formation de l'échinénone et de la zéaxanthine (Revue:Takaichi and Mochimaru, 2007a). L'hydroxy échinénone est synthétisé à partir de l'échinénone par l'enzyme CrtR (Fernández-González et al., 1997; Takaichi and Mochimaru, 2007a) .

Chez les organismes photosynthétiques, ils jouent un rôle majeur dans la capture de l'énergie solaire. Parmi les nombreux caroténoïdes, pas moins de cinquante jouent un rôle au sein de la récolte de la lumière (revue :Polívka and Frank, 2010). Les couleurs des caroténoïdes varient du jaune pâle au brun rougeâtre. Cette variation provient de la structure même de la molécule, selon le nombre de doubles liaisons conjuguées le long du squelette de 40 atomes de carbones (C40), ainsi que des autres modifications cycliques et oxygénés. Pour illustrer leurs couleurs, citons que lors de la période automnale, les végétaux deviennent de plus en plus jaunâtres-rougeâtres, caractéristique de la couleur des caroténoïdes collecteurs de lumière, comme la lutéine et la zéaxanthine. Cela est dû à la dégradation de la chlorophylle à l'automne, qui laisse alors apparaître la couleur vive des caroténoïdes.

Les caroténoïdes absorbent la lumière et transfèrent l'énergie d'excitation reçue à la chlorophylle, initiant alors les événements photochimiques de la photosynthèse (Revue :Polívka and Frank, 2010). Ils jouent aussi un rôle structural en étant nécessaires à l'assemblage des photosystèmes (Hendrickson et al., 2005). Chez les plantes, les caroténoïdes sont généralement liés à des complexes protéine-pigment nommés LHC pour « Light Harvesting Complex » pour transférer l'énergie d'excitation captée au niveau des antennes collectrices vers la chlorophylle des photosystèmes (Demmig-Adams and Adams, 2006; Hendrickson et al., 2005; Dall'Osto et al., 2010).

Les plantes sont en permanence en équilibre entre absorption de la lumière pour les processus phototochimiques et lutte contre les dommages photo-oxydatifs causés par un excès de lumière. Pour s'adapter, les caroténoïdes synthétisés par les plantes jouent plusieurs rôles : ils sont capables de quencher les triplets de chlorophylles formés au sein de l'appareil photosynthétique sous un excès de lumière, ils quenchent aussi les ERO comme l'oxygène singulet qui endommagent fortement les membranes et les protéines (P Di Mascio et al., 1989 ; Revue :Krieger-Liszkay, 2005a), se comportant ainsi comme de véritables antioxydants, avec l'ascorbate et le tocophérol. Leur potentiel antioxydant pour lutter contre la peroxydation lipidique a été démontré très tôt (Krinsky, 1989; Monaghan and Schmitt, 1932). De nombreuses études sur l'importance du cycle des caroténoïdes au sein des végétaux ont été menées. Des mutants délétés de gènes codant des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes ont été créés et les phénotypes résultants furent drastiques. Les plantes mutantes exposent des couleurs très pâles jusqu'au blanchiment, un retard important de leur croissance et des phénotypes semi-létaux (Alboresi et al., 2011; Bailey and Grossman, 2008; Niyogi, 1999).

Les caroténoïdes jouent un rôle majeur dans la photoprotection de l'appareil photosynthétique

(Revue : Cazzonelli, 2011).

Le caractère bénéfique des caroténoïdes pour la santé n'est plus à démontrer. Il est largement admis qu'ils protègent les cellules contre le stress oxydatif et les humains contre les maladies chroniques telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'ostéoporose et le diabète (Revue : Rao and Rao, 2007).

Les animaux accumulent les caroténoïdes parce qu'ils sont essentiels pour la reproduction, les comportements sexuels mais aussi pour stimuler leur système immunitaire et améliorer leur santé (Baron et al., 2008; McGraw, 2006).

Citons pour exemple le flamant rose, dont les plumes sont de couleur rose vif. La couleur de leur plume est due à leur alimentation riche en algues et invertébrés comme les écrevisses, qui sont gorgés de caroténoïdes, tels que la canthaxanthine et la β -cryptoxanthine. La source alimentaire en caroténoïde dicte, chez ces animaux, une attraction sexuelle. La nature esthétique de l'accumulation des caroténoïdes dans le plumage engendre chez leur partenaire un attrait physique pour la reproduction. Le plumage riche en caroténoïdes permet alors aux flamants roses de courtiser pendant le saison des accouplements (Amat et al., 2010). Citons aussi les crustacés, comme le homard, qui accumulent l'astaxanthine dont les propriétés spectrales sont modifiées par l'environnement protéique dans lequel il évolue : au sein de la protéine crustacyanine. L'astaxanthine en solvant est de couleur rougeâtre, mais au sein de la crustacyanine, elle nous apparaît bleue. Lors de sa cuisson, le crustacé passe du bleu foncé au rouge car la protéine crustacyanine se dénature, l'astaxanthine change d'environnement où elle se retrouve plus exposée, le crustacé nous apparaît alors rouge (Krawczyk and Britton, 2001).

Les caroténoïdes sont capables de régénérer la vitamine E et sont eux-mêmes régénérés par la vitamine C (Revue : Krinsky, 1989).

3- Le monde photosynthétique cyanobactérien

3.1- Les cyanobactéries et la photosynthèse

Les cyanobactéries, anciennement appelées algues bleues, appartiennent au domaine des bactéries photosynthétiques oxygéniques. Comme les bactéries, elles n'ont pas d'organites, leur information génétique est portée par une molécule cyclique d'ADN et par des plasmides. Ce sont des organismes procaryotes, par opposition aux organismes possédant un noyau, les eucaryotes. Elles possèdent une cytologie de bactéries, avec la couleur des algues et un appareil photosynthétique proche de celui des plantes (Figure 8). La couleur de leurs pigments leur a valu de se faire classer pendant des années dans le règne des Cyanophycées ou encore « algues bleues ». Mais le caractère procaryote des cyanobactéries les a fait reclasser dans le règne des bactéries Gram négatives (Classification Bergey's).

Les cyanobactéries constituent un groupe génétiquement et morphologiquement hétérogène. Certaines cyanobactéries sont retrouvées en cellules isolées (unicellulaires) et sphériques (ex : *Synechocystis* PCC 6803 ; Figure 9) ou en bâtonnets et se multiplient par divisions binaires (ex : *T. elongatus*, *Synechococcus*), d'autres sont filamenteuses et se propagent par rupture du filament végétatif ou par germination des akinètes (spores). Certaines peuvent se différencier en cellules spécialisées, telles que les hétérocystes (ex: *Anabaena*) qui jouent un rôle majeur dans la fixation de l'azote (Figure 9).

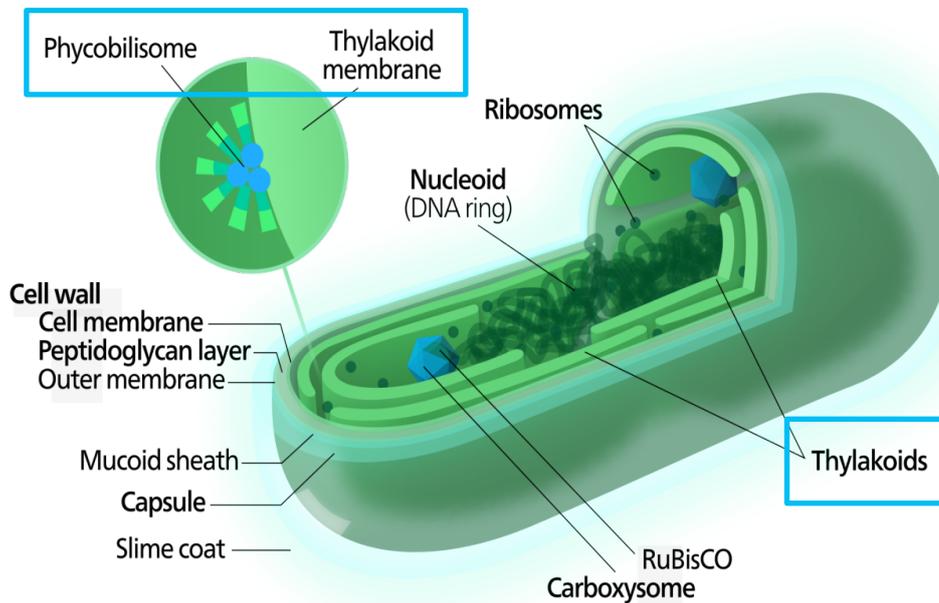


Figure 8

Schéma de la structure d'une cyanobactérie

(<https://en.wikipedia.org/wiki/Cyanobacteria>)

La cyanobactérie est dépourvue d'organites (ex : noyau, réticulum endoplasmique, etc.). On y distingue deux zones cellulaires principales : la zone possédant les membranes et les thylakoïdes contenant les appareils photosynthétique et respiratoire qui se situe, dans sa grande majorité, en périphérie de la cellule, et la zone cellulaire centrale qui comporte l'ADN, la machinerie de répllication de l'ADN et division cellulaire ainsi que les carboxysomes.

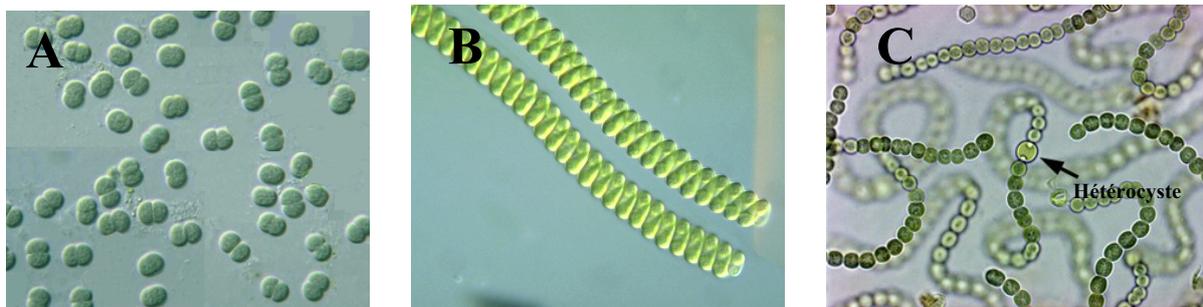


Figure 9

Quelques cyanobactéries observées en microscopie optique

Les souches représentées sont les suivantes:

(A) *Synechocystis* PCC 6803

(B) *Arthrospira* PCC 7345

(C) *Anabaena* PCC 7120

(A) *Synechocystis* PCC6803 est unicellulaire et sphérique

(B) *Arthrospira* PCC7345 est multicellulaire, en spirale et filamenteuse

(C) *Anabaena* PCC 7120 est multicellulaire et peut différencier certaines de ses cellules en cellules spécialisées (ex: les hétérocystes pour la fixation de l'azote).

Cette hétérogénéité de morphologie a permis aux cyanobactéries de coloniser la grande majorité des écosystèmes terrestres ou aquatiques (eau douce ou de mer, les marais, les sols, les rochers, le monde végétal, le milieu urbain), jusqu'aux milieux les plus extrêmes (forte chaleur, froid, sécheresse, salinité, etc.).

Leur couleur est due à la présence de pigments tels que les chlorophylles (vertes), les caroténoïdes (rouges à jaunes), les phycobiliprotéines (bleue à rouge). Les cyanobactéries sont des organismes photosynthétiques qui captent et utilisent la lumière comme source d'énergie et le CO₂ comme source carbonée. Ce sont les seuls organismes procaryotes effectuant la photosynthèse oxygénique comme le font les plantes, en utilisant l'eau comme donneur d'électrons pour produire de l'oxygène. Les cyanobactéries possèdent un appareil photosynthétique similaire à celui des plantes et des algues. La photosynthèse est le processus au sein duquel l'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique utilisée pour la biosynthèse des constituants cellulaires (Revue : Gest, 2002).

Chez les cyanobactéries, la photosynthèse se déroule au sein des membranes thylakoïdiennes, en général en périphérie de la cellule. Chez les plantes, la photosynthèse s'établit dans les chloroplastes où se trouvent les membranes thylakoïdiennes où est logée la chaîne photosynthétique, de transport des électrons. Cette caractéristique nous rappelle la théorie endosymbiotique qui révèle qu'une cellule eucaryote autotrophe, capable de métaboliser des éléments inorganiques pour synthétiser ses propres constituants organiques, est née il y a environ 2 milliards d'années grâce à l'absorption d'une bactérie photosynthétique (cyanobactérie) par une cellule eucaryote hétérotrophe, cellule incapable d'effectuer elle-même la synthèse de ses constituants à partir d'éléments minéraux (Falkowski et al., 2004b). Au cours de l'évolution, cette cyanobactérie est alors devenue un organite, le chloroplaste, au sein de la cellule autotrophe. En effet, cet organite cellulaire possède ses membranes internes d'origine bactérienne et la membrane externe de son enveloppe chloroplastique a pour origine la membrane plasmique de la cellule elle-même, autotrophe (Cavalier-Smith, 2000). La photosynthèse implique la capture de l'énergie lumineuse et sa canalisation vers les centres photochimiques (P680 au sein du PSII et P700 au sein du PSI). Sous illumination, la chaîne de transfert des électrons crée un potentiel redox qui est transféré d'accepteur en accepteur (revue: Witt, 1996). Un gradient de protons est concomitamment créé, permettant le fonctionnement de l'ATPase. La photosynthèse fournit le NADPH et l'ATP nécessaire pour le cycle de Calvin. Les cyanobactéries, les plantes et les algues possèdent un appareil photosynthétique composé de deux photosystèmes (PSI et PSII), le cytochrome b6f (cytb6f),

plusieurs composants mobiles (plastoquinone (PQ), plastocyanine (PC), ferrédoxine (Fd)) et l'ATP synthase (Figure 10).

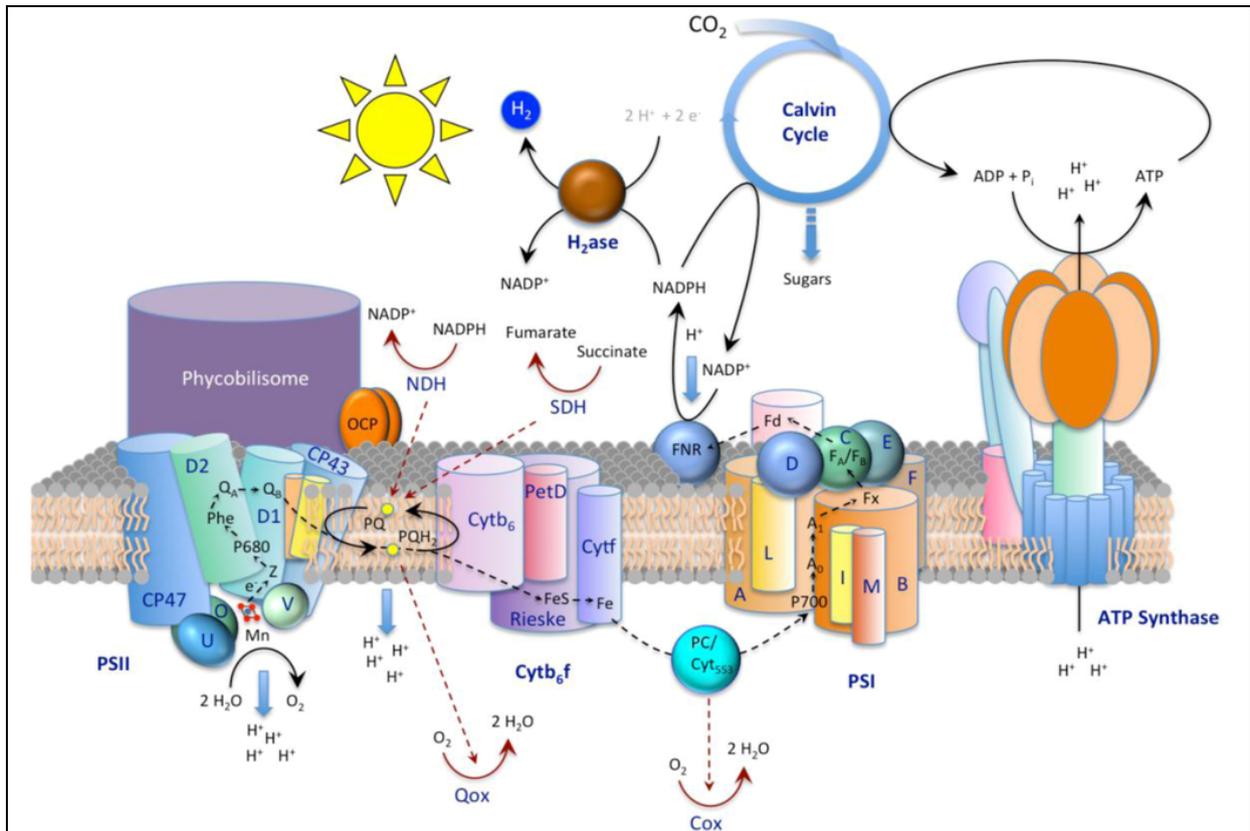


Figure 10

Schéma du mécanisme de la photosynthèse chez les cyanobactéries

(N.A Kamennaya et al., 2012)

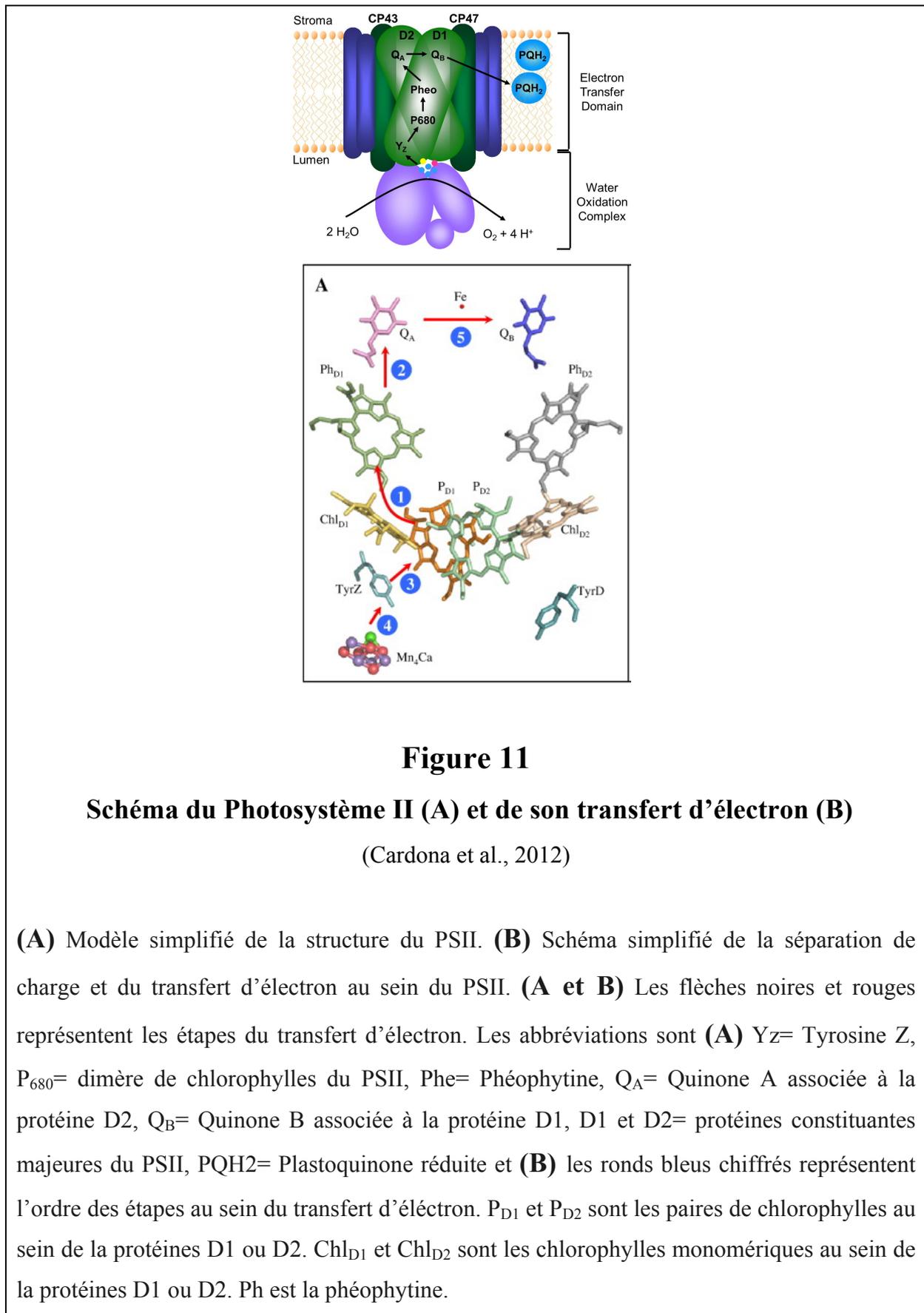
La chaîne de transport d'électrons est composée de nombreux complexes protéiques. On observe la présence des deux photosystèmes reliés électroniquement par le cytochrome b6f.

Abréviations :

- (PSI et PSII) Photosystèmes I et II
- (Cytb6f) Cytochrome b6f
- (FNR) Ferredoxine NADP Oxidoreductase
- (PC) Plastocyanine
- (ATP) adénosine tri-phosphate
- (ADP) adénosine di-phosphate
- (Pi) phosphate inorganique.

Les deux photosystèmes sont des complexes protéines-pigments logés au sein de la membrane thylakoïdienne. Ils contiennent la chlorophylle a (Chla) liée aux antennes qui récolte la lumière et transfère son énergie associée vers les centres réactionnels du PSII et du PSI où la photochimie a lieu. Après excitation des chlorophylles des centres réactionnels, P680 et P700 donnent un électron en réalisant une séparation de charges. Les cofacteurs recevant les électrons de P680 et P700 forment le site accepteur tandis que ceux donnant les électrons à P680 + / P700 + forment le site donneur; la composition et les cofacteurs diffèrent dans entre les deux photosystèmes, PSII et PSI (Figure 10).

Le PSII est une eau/plastoquinone photo-oxydo-réductase, dimérique dans les thylakoïdes (Figure 11). Il a été largement étudié au cours des dernières décennies (Nelson and Yocum, 2006; Cardona, 2014 et Cardona 2012). Chaque monomère est constitué de plus de 20 sous-unités protéiques, de 35 molécules de chlorophylles a par monomère mais aussi de Mn, Ca, Cl et Fe qui sont des co-facteurs redox du transfert d'électrons (Loll et al., 2005 ; Umena et al., 2011a). Le centre réactionnel (CR) est constitué par l'hétérodimère formé par les protéines D1 et D2 qui lient tous les cofacteurs redox nécessaires pour la séparation de charge et leur stabilisation et le cyt b559, nécessaire à son assemblage (Revue: Nanba and Satoh, 1987). La première structure du PSII a été obtenue chez *Thermosynechococcus elongatus* à 3,8 Å de résolution (Zouni et al., 2001). En 2009, la structure du PSII de *Thermosynechococcus elongatus* à 2.9 Å a été réalisée (Guskov et al., 2009). Plus récemment, deux structures du PSII de *Thermosynechococcus Vulcanus* ont été résolues à 1.9 puis 1.95 Å permettant la visualisation de son complexe d'oxydation de l'eau (COE) (Umena et al., 2011). Le premier évènement qui a lieu lors du transfert d'électrons au sein du PSII est la séparation de charge entre la chlorophylle a excitée (P680*) du CR et la molécule accepteur d'électron : la Phéophytine (Phe associée à D1) qui est ensuite transférée à QA (quinone associée à D2) et QB (quinone associée à D1). QB peut recevoir 2 électrons avant d'être protonée et de quitter le PSII. Au sein du site donneur d'électrons, la Tyrosine Z redox active (TyrZ ou Yz associée à D1) réduit la P680*+. Le complexe d'oxydation de l'eau (COE) peut récupérer les électrons de l'eau pour réduire la TyrZ +, avec une production d'O₂ associée (Revue: Vinyard et al., 2013). Quatre séparations de charge successives de P680 conduisent à la formation d'une molécule d'O₂ et de deux molécules de PQH₂ (Figure 11 : Schéma du PSII).



Le cytochrome b6f connecte électroniquement le PSII et le PSI. Le cytochrome b6f est un dimère. Chacun de ses monomères est composé de 8 sous-unités. Elles sont constituées de 4 grandes sous-unités: le cytochrome f, le cytochrome b6, la protéine Rieske fer-souffre contenant un centre 2(Fe-S), et une sous-unité IV puis 4 petites sous-unités : PetG, PetL, PetM, et le PetN. Sa structure a été réalisée à 3.1 Å puis 3.0 Å de résolution (D Stroebel et al., 2003 et Kurisu et al., 2003). Le cytb6f lie la PQH2 et l'oxyde. Un électron passe via la protéine Rieske avant d'atteindre la PC; l'autre suit une route différente à travers 3 hèmes, en réduisant le semiquinol au sein du site Qi du cytb6f (A Osyczka et al., 2005). Pour une PQH2 oxydée, deux protons sont transférés au lumen (Figure 10 : Schéma de la chaîne photosynthétique chez les Cyanobactéries).

Chez les cyanobactéries le PSI est monomérique ou trimérique. Cependant, il peut aussi exister sous la forme d'un tétramère (ex : chez *Anabaena*). Chaque monomère de PSI contient 96 molécules de chlorophylles *a*, contre seulement 35 au sein du PSII (Revue: Grotjohann and Fromme, 2005; Jordan et al., 2001). L'hétérodimère PsaA / PsaB / PsaC et le dimère de chlorophylles *a* P700 constituent le centre réactionnel du PSI. La structure du PSI a été déterminée chez *Synechococcus elongatus* avec 4 Å de résolution (Schubert et al., 1997); la résolution a été améliorée à 2,5 Å (Jordan et al., 2001). La plastocyanine (PC) réduit la paire de chlorophylles P700+ après la séparation de charge, au niveau du site donneur d'électrons. Sur le site accepteur, les électrons sont transférés de la chlorophylle A₀ à la phylloquinone A₁, aux trois centres fer-souffre (F_X, F_A/F_B), à la Ferredoxine soluble (Fd) puis à la Ferredoxine NADP+ Oxidoreductase (FNR), dernière enzyme à intervenir dans le transfert des électrons au cours de la photosynthèse. Elle utilise les électrons à haut potentiel issus de la Ferredoxine réduite du photosystème I pour réduire le NADP+ en NADPH, ce dernier étant par la suite utilisé dans le cycle de Calvin. Deux séparations de charge successives de P700 conduit à la formation d'une molécule de NADPH avec un proton extrait du cytoplasme (Figure 10 : Schéma de la chaîne photosynthétique chez les Cyanobactéries).

L'ATP synthase catalyse la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et du Pi (phosphate inorganique) en utilisant le gradient de protons transmembranaire créée par le transfert des électrons linéaire et cyclique (au sein duquel le PSII ne participe pas) (Revue : Boyer, 1997). Pour résumer, les électrons peuvent circuler de l'eau à la plastoquinone (PQ) via le PSII, de la plastoquinone réduite (PQH2) à la plastocyanine (PC) via le cytb6f et de la plastocyanine (PC) à la Ferredoxine (Fd) via le PSI. Au cours du transfert d'électrons, un gradient de protons est formé avec un pH bas dans le lumen et un pH élevé dans le stroma. Ceci constitue la chaîne de transport linéaire des électrons. Le NADPH et l'ATP produits vont être les substrats

du Cycle de Calvin, qui va permettre la fixation du carbone. Cette fixation est un processus grâce auquel l'atome de carbone inorganique CO_2 est converti en carbone réduit organique : carbohydrates.

3.2- Les antennes collectrices d'énergie et la photoprotection

Les cyanobactéries vivant dans des milieux aquatiques variés, peuvent vivre en surface ou en profondeur. En fonction de leur position, la qualité de la lumière reçue est variable. C'est pourquoi elles ont développé des antennes collectrices d'énergie accessoires, contenant différents pigments et complexes pigments-protéines pour accroître la gamme d'absorption de longueurs d'onde de la lumière disponible. Les antennes externes collectrices d'énergie des cyanobactéries sont différentes de celles des plantes, bien que leur rôle soit similaire. Les cyanobactéries ne possèdent pas d'antennes photosynthétiques intrinsèques aux membranes photosynthétiques contrairement aux protéines Lhc chez les plantes terrestres. Cette fonction est assurée par des macrostructures de taille importante nommées « les phycobilisomes (PBs) » (Gantt, 1975; MacColl, 1998). Ces macrocomplexes protéiques sont composés d'un cœur sur lequel sont fixés des projections radiaires appelées « bras ». Le cœur peut être tri- ou penta-cylindrique. Les phycobilisomes sont constitués de protéines solubles, les phycobiliprotéines, auxquelles des pigments, les bilines, sont liés de façon covalente. Leur composition en pigment et leur organisation permet l'utilisation d'une large portion du spectre visible (Marsac and Cohen-bazire, 1977). Trois familles de phycobiliprotéines sont connues, en fonction de la longueur d'onde à laquelle elles absorbent : les phycoérythrine (PE ; $A_{\text{max}} = 450\text{-}550 \text{ nm}$), les phycocyanines (PC ; $A_{\text{max}} = 600 \text{ nm}$) et les allophycocyanines (APC ; $A_{\text{max}} = 650 \text{ nm}$). Quatre bilines, ont été décrits chez les cyanobactéries et les algues rouges : la cyanobiline (bleue), l'érythrobliline (rouge), l'urobliline (orange) et la bilivioline (violette). Les bilines sont des groupements tetrapyrroles linéaires liés à l'apoprotéine par une liaison covalente de type thioéther. Les bilines diffèrent entre elles par la disposition des doubles liaisons mais ceci leur confère des configurations moléculaires différentes ayant pour conséquence des propriétés spectroscopiques distinctes. L'étude des phycobilisomes débuta avec l'isolement de « granules » composées de phycobiliprotéines, associées aux membranes photosynthétiques d'algues rouges (Gantt and Conti, 1966). Par la suite, des phycobilisomes ont été isolés et intacts. Les premières études structurales par microscopie électronique ont été réalisées (Gray and Gantt, 1975). Les phycobilisomes sont composés de 85 % de phycobiliprotéines et de 15 % de protéines non pigmentées qui stabilisent la structure des phycobilisomes (Marsac and Cohen-bazire, 1977). Tous les PBs ont un centre (cœur), dont le

constituant majeur est l'APC, et des projections radiales, où les autres phycobiliprotéines sont localisées. Le cœur du phycobilisome de *Synechocystis* PCC 6803 provient de l'assemblage de trois cylindres d'APC parallèles entre eux (Elmorjani et al., 1986; Figure 12).

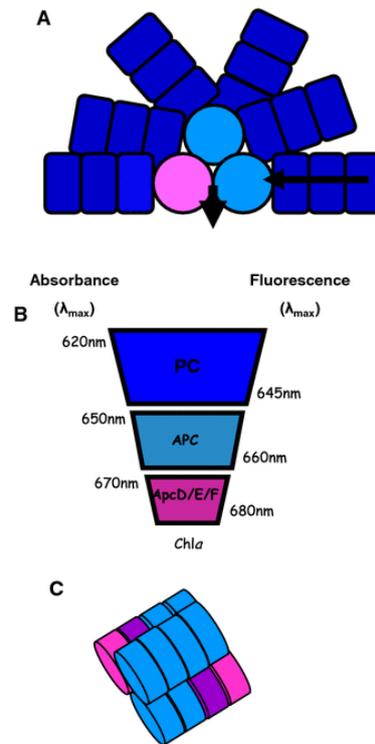


Figure 12

Représentation schématique de la structure du phycobilisome de *Synechocystis* PCC 6803

(Jallet et al., 2012; Revue: Kirilovsky, 2014)

(A) Le PB de *Synechocystis* est héli-discoïdale et possède un cœur composé de trois cylindres de trimères d'APC. Six bras rayonnent autour du cœur. Les bras sont formés par 3 hexamères de PC. (B) Représentation de l'absorbance maximale et de l'émission de fluorescence des différentes phycobiliprotéines du PB. (C) Représentation du cœur du PB. Les deux cylindres de base du cœur du PB sont constitués de trimères d'APC émettant à 660 nm (bleu) et à 680 nm (rose et violet), alors que le cylindre supérieur du cœur du PB est constitué uniquement du trimère d'APC émettant à 660 nm (bleu). L'ApcD est constituant du trimère rose. Les ApcF et ApcE sont constituants du trimère violet.

Les bras des phycobilisomes sont composés de différentes phycobiliprotéines et sont plus ou moins longs selon les organismes considérés. Les disques proches du centre sont composés de phycocyanine (PC), alors que la phycoérythrine (PE) ou la phycoérythrocyanine (PEC) composent les disques les plus périphériques des bras. Les bras des cyanobactéries d'eau douce contiennent généralement de la PC, comme chez *Synechocystis* PCC6803 et *Synechococcus elongatus* PCC7942 (Elmorjani et al., 1986; guide : Glazer, 1989), et rarement de la PE ou de la PEC à leur extrémité comme chez *Anabaena* PCC 7120. Les bras des cyanobactéries marines sont généralement riches en PE.

Les PBs assurent la fonction d'antenne collectrice d'énergie externe à la membrane photosynthétique (Glazer, 1984). L'énergie lumineuse récoltée par les PBs est transférée aux centres réactionnels des PSII et PSI (Mullineaux, 1992; Rakhimberdieva et al., 2001). Ils présentent un maximum d'émission de fluorescence vers 680 nm. Les études des propriétés de fluorescence des phycobilisomes isolés ont montré que les phycobiliprotéines constituent une chaîne de transfert d'énergie interne (Revue: MacColl, 2004). Les niveaux d'énergie des bilines au sein des phycobiliprotéines ne sont pas équivalents. Les bilines qui absorbent l'énergie d'excitation pour la transférer sont des chromophores dits « donneurs » alors que les bilines qui reçoivent l'énergie et fluorescent sont appelées « accepteurs ». La différence d'énergie entre les PE et les PC entraîne un transfert d'énergie directionnel (Revue : Glazer 1989). Les bilines « acceptrices » assurent un transfert d'énergie très rapide vers le cœur du phycobilisome et, in fine, à la chlorophylle du centre réactionnel du photosystème. L'ordre d'agencement des phycobiliprotéines, de l'extrémité des bras vers le cœur est : PE ($\lambda_{max}=450-550$ nm) puis PC (600 nm) et enfin APC (650 nm). Le cœur du PB, composé d'APC, est majoritairement trimérique : $(\alpha APC \beta APC)^3$ (Revue: Sidler, 1994).

Stress Lumineux : la photoinhibition et la photoprotection

La lumière est la force motrice de la photosynthèse, elle est très énergétique mais peut potentiellement devenir une source d'énergie délétère pouvant endommager l'appareil photosynthétique (Revue : Powles, 1984). La lumière qui induit un déclin d'activité du photosystème II est caractérisée de photo-inhibitrice (Aro et al., 1993). Si, au sein de la chaîne de transport d'électrons, l'apport de photons est en excès par rapport à ce qui peut être utilisé pour l'assimilation du CO₂, l'état redox du pool de plastoquinones sera « sur-réduit », ce phénomène s'appelle la photoinhibition, induit par la lumière (Revue : Imre Vass, 2012). Dans de telles conditions, l'accumulation d'énergie d'excitation au niveau des antennes collectrices d'énergie et du centre réactionnel du PSII favorise la production de chlorophylles excitées à l'état triplet (³Chl). Celles-ci peuvent ensuite interagir avec l'oxygène et former des espèces réactives de l'oxygène. Cela conduit principalement à la formation de l'oxygène singulet (Figure 13). L'oxygène singulet produit est hautement réactif, il peut déstabiliser la membrane thylakoïdienne par peroxydation lipidique et aussi réagir avec tous les composants cellulaires (protéines, RNA, ADN) en plus d'endommager le PSII (K Asada, 2006).

Au sein des photosystèmes, l'anion superoxyde (HO⁻²), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxyle (OH[·]) peuvent aussi se former (Revue: Krieger-Liszkay, 2005). Le PSI peut lui aussi subir les conséquences destructrices d'un excès de lumière quand le transport d'électrons provenant du PSII est saturé (revue : Scheller and Haldrup, 2005).

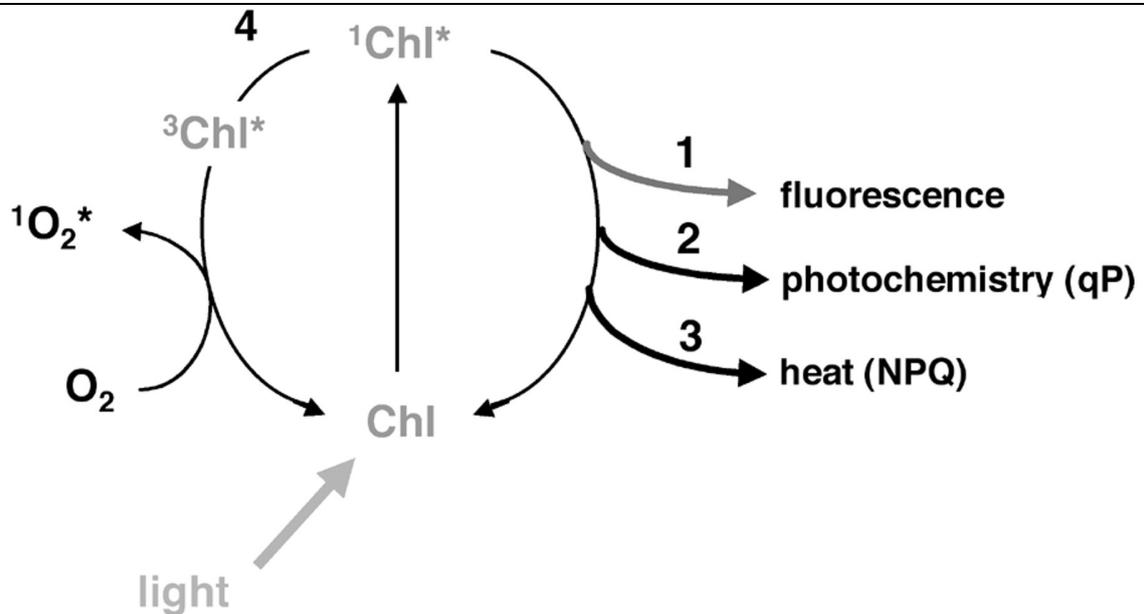


Figure 13

Schéma des destins possibles de la chlorophylle excitée

(Müller et al., 2001)

Lorsque la chlorophylle (Chl) absorbe la lumière, elle passe de son état fondamental à son état excité singulet: ¹Chl*.

Elle a plusieurs façons de revenir à son état fondamental :

- (1) par émission de fluorescence
- (2) pour des réactions au sein de la photosynthèse
- (3) par dissipation sous forme de chaleur
- (4) La ¹Chl* peut, à son tour, générer la chlorophylle triplet (³Chl*), qui à son tour, peut engendrer la formation de l'oxygène singulet : ¹O₂*, espèce très réactive de l'oxygène.

Les organismes photosynthétiques ont mis en place des mécanismes de photoprotection pour échapper aux dommages liés aux excès de lumière. Un de ces mécanismes de prévention consiste à augmenter l'efficacité de la dissipation sous forme de chaleur, de l'énergie absorbée par les antennes, afin que l'excès d'énergie d'excitation ne puisse atteindre le centre réactionnel du PSII. Ce phénomène est appelé Non Photochemical Quenching : NPQ (P Müller et al., 2001; Figure 13). Chez les plantes, le premier signal qui engendre l'activation du NPQ est un fort gradient de pH transmembranaire, puis une modification de l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse des caroténoïdes, plus particulièrement de la zéaxanthine, et la protonation de la protéine PsbS (KK Niyogi, 2000 ; T Roach et A Krieger-Liszkay, 2012). Chez les cyanobactéries, le mécanisme NPQ possède la même finalité que celui mis en place chez les plantes mais il est différent et a été découvert au sein du laboratoire (Wilson et al., 2006). Les cyanobactéries, comme les plantes et les algues, se protègent contre les dommages photo-oxydatifs, en convertissant une partie de l'énergie d'excitation reçue en excès sous forme de chaleur, régulant ainsi l'énergie transférée de leurs systèmes antennaires (les phycobilisomes) vers les centres réactionnels du PSII et du PSI. Une protéine soluble attachant un ketocaroténoïde (le 3' hydroxy-echinenone) nommée « Orange Carotenoid Protein » (OCP), est essentielle pour l'induction du mécanisme NPQ chez les cyanobactéries au niveau des phycobilisomes. L'OCP est la première protéine photo-active contenant un caroténoïde comme chromophore et ayant un mécanisme original et unique de NPQ (Wilson et al., 2006).

4- L'Orange Carotenoid Protein « OCP »

4.1- Structure et Photoactivité

La première fois que l'OCP fut évoquée c'était en 1981 par Holt et Krogmann. Ils avaient identifié une protéine à caroténoïde liant le 3'-hydroxyechinenone chez trois espèces de cyanobactéries : *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa* et *Arthrospira maxima* (Kay Holt and Krogmann, 1981). C'est en 1997 que Wu et Krogmann ont plus amplement caractérisé l'OCP avant la compréhension de ses fonctions au sein de la photoprotection. Suite à son isolation à partir des cellules de *Synechocystis* PCC 6803, l'OCP s'est révélée être une protéine soluble, orange de masse moléculaire égale à 35kDa (Wu and Krogmann, 1997). Son spectre d'absorption présentait un épaulement à 440 nm ainsi que deux pics distincts à 467 nm et 496 nm, indiquant la présence d'un caroténoïde lié, identifié comme 3'-hydroxyechinenone (Wu and Krogmann, 1997). La région codante du gène de l'OCP de *Synechocystis* PCC6803 a aussi été déterminée: gène *slr 1963* (Wu and Krogmann, 1997).

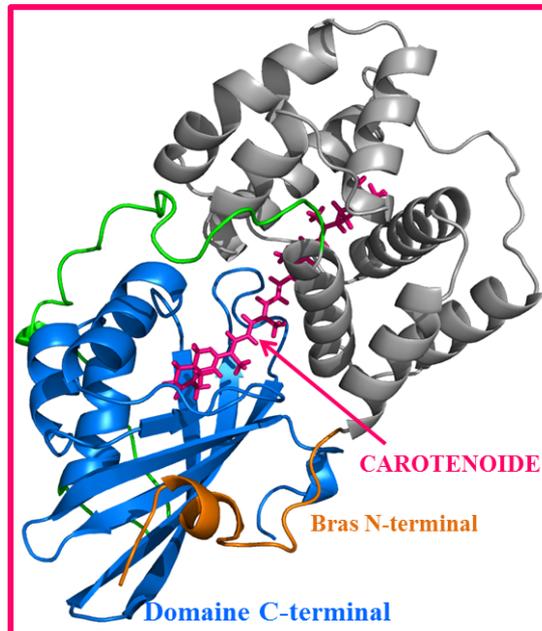
Une étude d'homologies de séquences révèle de nombreux homologues du gène de l'OCP au sein d'autres génomes de cyanobactéries (Revue :Kerfeld, 2004; Kirilovsky and Kerfeld, 2012). Cette protéine a donc été conservé au cours de l'Evolution ce qui laisse entrevoir son importance au sein de la cellule. Le gène de l'OCP est constitutivement exprimée chez *Synechocystis* PCC 6803 (Wilson et al., 2006) et peut être sur-exprimée en condition de stress cellulaire comme une forte intensité lumineuse (Hihara et al., 2001), de stress salin (Fulda et al., 2006; Revue: Kirilovsky, 2007) ou encore en condition de carence en fer (Wilson et al., 2007). Certaines cyanobactéries ne possèdent pas de gènes homologues au gène codant l'OCP, comme *Thermosynechococcus elongatus* et *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Ces deux souches sont plus sensibles aux dommages causés par de fortes intensités lumineuses au sein du PSII (Boulay et al., 2008). Il existe chez certaines cyanobactéries, différents gènes codant pour le domaine N-terminal de l'OCP, localisés à différents locus sur le génome et une seule et unique copie de gène codant pour le domaine C-terminal de l'OCP (Kerfeld, 2004; Kirilovsky and Kerfeld, 2012). Le gène codant pour le domaine C-terminal est généralement localisé à côté d'un gène codant le domaine N-terminal. Par exemple, chez *Cyanothece* 51142, le gène codant le domaine C-terminal ainsi que l'un des gènes codant le domaine N-terminal s'expriment ensemble en condition de forte intensité lumineuse et ne s'expriment pas à l'obscurité (Stöckel et al., 2008). La fonction de ces gènes est encore méconnue mais leur

origine semble provenir d'une duplication ancestrale de gènes. L'étude du mutant de *Synechocystis* PCC 6803, exprimant le gène de l'OCP fusionné avec le gène rapporteur de la Green Fluorescent Protein (GFP), a permis de déterminer la localisation cellulaire de l'OCP. L'OCP est localisée dans la région stromale des membranes thylakoïdiennes, à proximité des phycobilisomes (Wilson et al., 2006). L'existence d'une interaction entre l'OCP, les phycobilisomes et les thylakoïdes était soutenue par le fait que la protéine fusion OCP-GFP a été co-isolée avec les phycobilisomes associés à la fraction membranaire (Wilson et al., 2006).

L'OCP est structurée par un domaine N-terminal en hélices- α : résidus 1 à 165, et un domaine C-terminal en feuillets- β et hélices- α : résidus 190 à 317 (Kerfeld et al., 2003; Wilson et al., 2010) ; Figure 14). Le domaine C-terminal possède des similarités de structure avec la superfamille des facteurs de transport nucléaire 2 (NTF2), alors que la séquence et la structure du domaine N-terminal lui sont propres. Elle attache un seul caroténoïde lié de façon non-covalente : le 3'-hydroxyéchinonone (Kerfeld et al., 2003; Wilson et al., 2010 ; Figure 14). La protéine influence les caractéristiques spectroscopiques du caroténoïde qui lui est lié. En effet, dans les solvants organiques, le 3'-hydroxyéchinonone est jaune ($\lambda_{\max} = 450$ nm), mais dans l'OCP, il apparaît orange ($\lambda_{\max} = 465$ nm et 495 nm) (Kerfeld et al., 2003; Polívka et al., 2005).

L'attachement du 3'-hydroxyéchinonone entraîne la stabilisation du transfert de charge intramoléculaire (ICT) ce qui confère à l'OCP la caractéristique d'être un excellent dissipateur d'énergie. Le caroténoïde lié possède une configuration « trans » et est localisé à cheval au sein des deux domaines (Kerfeld et al. 2003). Le groupement hydroxyle du caroténoïde est logé dans la partie N-terminale de la protéine tandis que le groupement carbonyle est niché dans le domaine C-terminal (Kerfeld et al. 2003).

L'OCP a été cristallisée sous forme de dimère et sa structure met en évidence qu'uniquement 3.4% du caroténoïde est accessible au solvant au sein du monomère (Kerfeld et al. 2003). Au sein du domaine N-terminal, les Tyr44 et Trp110 établissent des interactions hydrophobes avec le groupement hydroxyle. Au sein du domaine C-terminal, les Tyr203 et Trp290 forment des liaisons hydrogène avec le groupement carbonyle grâce à leurs chaînes latérales (Kerfeld et al., 2003).



Structure de l'OCP

(Kerfeld *et al*, 2003)
(Wilson *et al*, 2010)

Figure 14

Structure de l'OCP de *Synechocystis* PCC 6803 - 3' hydroxyechinenone

D'après (Wilson *et al.*, 2010)

OCP *Synechocystis* PCC 6803 (Protein Data Bank ID: 3MG1)

L'OCP est constituée de deux domaines distincts: le domaine N-terminal est représenté en gris, le domaine C-terminal en bleu. L'extrémité 5' du domaine N-terminal possède une prolongation, nommée "bras N-terminal", qui constitue une sorte de loquet qui se referme sur le domaine C-terminal, il est représenté en orange. La région de liaison entre les deux domaines est représentée en vert. Le caroténoïde lié, le hECN, est représenté en bâtonnets et rose. La figure a été réalisée avec Pymol (<http://www.pymol.org/>).

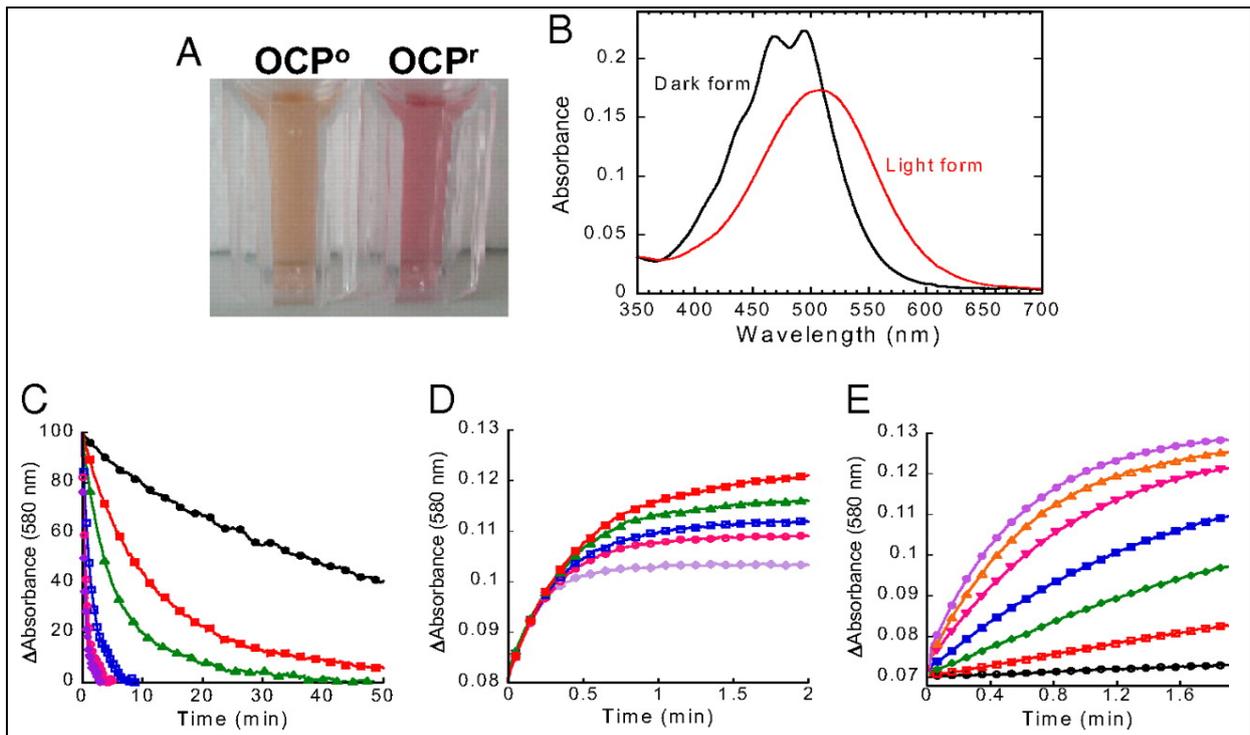


Figure 15

Photoactivité de l'OCP isolée, illuminée par la lumière bleu verte

(Wilson et al., 2008)

(A) Photographie de l'OCP isolée sous sa forme inactive, orange (OCP^o) et sous sa forme active, rouge (OCP^r). Afin de convertir l'OCP^o en OCP^r, la protéine a été illuminée avec une lumière bleu verte à 740 pmol photons.m-2.s-1 à 12 ° C pendant 2 minutes.

(B) Spectres d'absorption de la forme inactive, orange (OCP^o; noir) et la forme active, rouge (OCP^r; rouge).

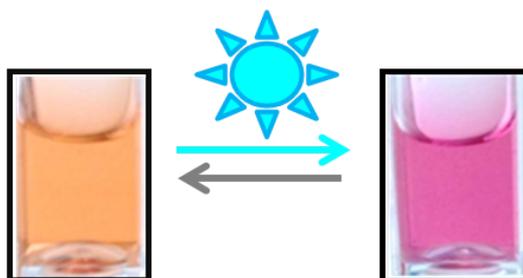
(C) Reconversion à l'obscurité de l'OCP^r à l'OCP^o et **(D)** Photoconversion à la lumière de l'OCP^o à l'OCP^r sous intensité lumineuse bleu verte de 350 pmol photons.m-2.s-1 à différentes températures: 32°C (violet), 28°C (rose), 24°C (bleu), 19°C (vert), 15°C (rouge), 9°C (noir). La concentration en protéine était de DO=0,2 à 495 nm.

(E) Accumulation de l'OCP^r à 11°C et à différentes intensités lumineuses: 20 (noir), 50 (rouge), 120 (vert), 210 (bleu), 350 (rose), 740 (orange), et 1200 (violet), unités en μmolphotons. m-2.s-1 de la lumière bleu-verte.

L'illumination de l'OCP par la lumière intense bleue verte induit sa conversion en une forme active. La forme inactive de l'OCP est orange (OCP^o) tandis que sa forme active est rouge (OCP^r) (Figure 15A et 16). Le spectre d'absorbance de la forme inactive, orange met en évidence deux pics à 470 et 495 nm tandis que son spectre d'absorbance de sa forme active, rouge présente un pic d'absorbance à 500 nm (Figure 15B). L'accumulation de l'OCP^r augmente en corrélation directe avec l'augmentation de l'intensité lumineuse (Figure 15E), (Wilson et al., 2008). Les variations de température (de 15°C à 32°C) ne semblaient pas influencer significativement le taux de photoconversion, mais elles conduisaient à des concentrations plus élevées en OCP^r à l'équilibre (Figure 15D). Mais depuis, il a été démontré que la photoconversion est aussi influencée par les variations de température mais nettement moins que la reconversion. En effet, les variations de température influencent significativement la reconversion OCP^r → OCP^o à l'obscurité : plus la température est basse, plus lente est la reconversion de l'OCP^r en OCP^o (Figure 15C).

Il a été démontré que lorsque l'OCP est photoactivée, elle subit des changements structuraux de la protéine, observé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et au sein de son caroténoïde, observé par spectroscopie Raman (Wilson et al., 2008 ; Figure 16). La forme rouge est la forme active de la protéine (Punginelli et al., 2009; Wilson et al., 2008).

L'OCP est une protéine photoactive



La lumière bleu-verte induit:



- Des changements structuraux au sein de la protéine OCP (FTIR)
- Des changements structuraux au sein du caroténoïde lié (Raman)

(Wilson *et al*, 2008)

Figure 16

L'OCP est une protéine photoactive

(à partir de Wilson *et al.*, 2008)

L'OCP est une protéine photoactive, qui est orange (gauche) dans un cuvette en quartz, à l'obscurité et qui, après illumination avec la lumière bleue verte, change de conformation pour atteindre sa forme active, rouge (droite).

Des calculs d'énergies d'activation du mécanisme de photo-activation de l'OCP, à différentes températures, ont suggérés que son ouverture a lieu suite à l'illumination avec le lumière bleue verte (Rakhimberdieva et al., 2007a). Sur le fondement de calculs similaires, il a été proposé que l'isomérisation des prolines (Pro224 et Pro225) peuvent aussi être impliqués dans sa photo-activation (Gorbunov et al., 2011). De plus, certains résultats laissent penser que les changements opérés au sein du caroténoïde induisent la rupture de la liaison entre les deux domaines de la protéine et que la forme rouge, active, adopte ainsi une conformation dite « ouverte » (Wilson et al., 2012).

Durant mon doctorat, une grande avancée sur la compréhension du mécanisme de cette ouverture, pour passer de la forme OCP^o à OCP^r a été réalisée. L'étude est fondée sur la résolution de la structure cristalline d'une forme active, rouge de l'OCP, en collaboration avec le laboratoire de Cheryl Kerfeld. Le domaine N-terminal de l'OCP (1 à 165 acides aminés) aussi appelé RCP pour « Red Carotenoid Protein », est toujours sous sa forme rouge, active et est aussi capable de quencher les PBs de *Synechocystis*. Cette protéine lie un seul caroténoïde de façon non-covalente, comme l'OCP. La structure de la RCP a été réalisée à 1.54 Å de résolution et a permis de démontré que la photo-activation de l'OCP, sa forme OCP^r consiste en une translocation de 12 angströms du caroténoïde au sein de la protéine et en une reconfiguration des interactions protéine-caroténoïde (Leverenz et al., 2015). Les résultats obtenus ont permis d'identifier l'origine des changements photochromiques dans l'OCP, déclenchés par la lumière. Ils révèlent les déterminants structurels impliqués dans l'interaction avec l'antenne collectrice de la lumière (le phycobilisome) pendant la photo-protection (voir les résultats dans le quatrième chapitre).

L'OCP est aussi capable de lier d'autres caroténoïdes que le 3'-hydroxyechinenone. Lorsque le gène de l'OCP a été surexprimé chez *Synechocystis* PCC 6803, environ 10 fois plus d'OCP a été produite dans cette souche par rapport à son expression dans la souche sauvage. Le 3'-hydroxyechinenone est un caroténoïde peu synthétisé dans *Synechocystis*, sa concentration dans la cellule n'était donc pas suffisante pour se lier à la totalité de l'OCP produite par la souche la surexprimant. Dans cette souche, l'OCP isolée liait alors l'échinenone et la zéaxanthine en plus du 3'-hydroxyechinenone (Punginelli et al., 2009). Dans l'un des mutants de *Synechocystis* crée au sein du laboratoire, délété du gène codant l'enzyme CrtO, une β -carotène cétolase conduisant à l'abolition de la synthèse de l'échinenone et du 3'-hydroxyechinenone, l'OCP produite liait uniquement la zéaxantine. Dans l'un des autres mutants de *Synechocystis*, délété du gène codant l'enzyme CrtR, une β -carotène hydroxylase

conduisant à l'abolition de la synthèse de la zéaxanthine et du 3'-hydroxyechinenone, l'OCP produite liait uniquement l'échinenone (Punginelli et al., 2009).

La zéaxanthine contient deux groupements hydroxyles sur chaque cycle en extrémités 3 et 3' de sa chaîne carbonée (Figure 7 - Introduction). L'échinenone et le 3'-hydroxyechinenone contiennent eux, un groupement carbonyle sur l'un des cycle. Le 3'-hydroxyechinenone possède lui un groupement hydroxyle sur l'autre cycle. L'OCP qui attache l'échinenone, ou l'OCP attachant le 3'-hydroxyechinenone, est orange à l'obscurité alors que l'OCP attachant la zéaxanthine, isolée de la souche délétée du gène de la CrtO apparaît jaune (Punginelli et al., 2009 ; Figure 17A).

L'illumination de l'OCP liant l'échinenone ou le 3'-hydroxyechinenone induit des changements conformationnels au sein de la protéine et du caroténoïde ; l'OCP est alors photoactivée en forme active, rouge (Wilson et al., 2008). Le caroténoïde est en configuration trans dans la forme orange inactive de l'OCP (Kerfeld et al., 2003 ; Polivka et al., 2005). Quand l'OCP est photoactivée, la caroténoïde est aussi en configuration trans ; il n'y a pas de trans-cis isomérisation, mais la conjugaison des doubles liaisons évolue pour rendre le caroténoïde moins distordu et plus planaire (Wilson et al., 2008). Sachant que le 3'-hydroxyechinenone et l'échinenone peuvent engendrer la forme active, rouge de l'OCP avec des cinétiques de photoactivation équivalentes, le groupement hydroxyle du 3'-hydroxyechinenone n'est donc pas essentiel pour la photoactivité de l'OCP, au moins chez *Synechocystis* (Punginelli et al., 2009). L'OCP attachant la zéaxanthine est non photoactive, donc incapable de passer de sa forme inactive, jaune à une quelconque forme activée (Punginelli et al., 2009, Figure 17A). Cette observation suppose fortement que le groupement carbonyle du caroténoïde est lui essentiel pour la photoactivité de l'OCP, groupement que ne possède pas la zéaxanthine.

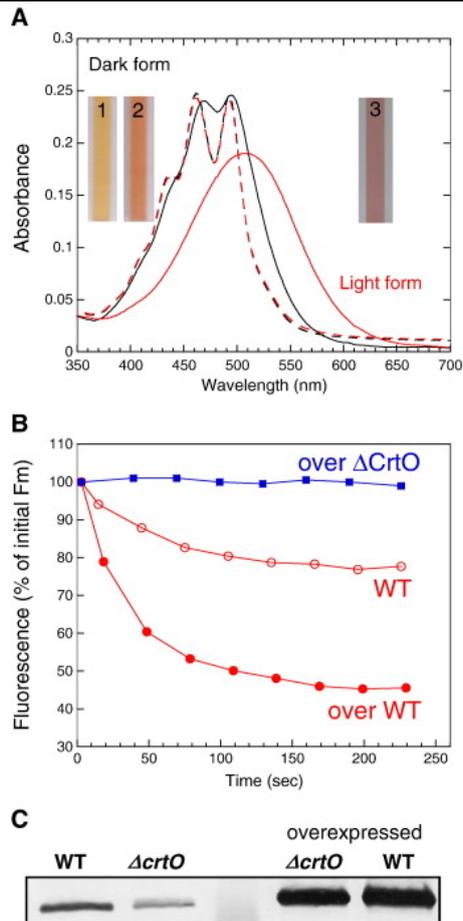


Figure 17

Photoactivité et photoprotection de l'OCP : la zéaxanthine ne peut pas remplacer le hECN pour son activité

(Punginelli et al., 2009 ; revue : Diana Kirilovsky et Cheryl Kerfeld, 2012)

(A) Spectres d'absorbance à l'obscurité (noir) et à la lumière (rouge) de l'OCP-ECN (ligne pleine) de l'OCP-ZEA (ligne pointillée). L'OCP-ECN est orange à l'obscurité (2) et rouge sous illumination (3) tandis que l'OCP-ZEA est toujours jaune (1).

(B) Diminution de fluorescence maximale (Fm) induite par la forte lumière bleue verte au sein de la souche *Synechocystis* WT (cercles rouges creux), la souche *Synechocystis* surexprimant l'OCP (cercles rouges pleins) et la souche *Synechocystis* Δ CrtO surexprimant l'OCP (carrés bleus pleins) au sein de laquelle l'OCP lie uniquement la ZEA.

(C) Immunodétection de l'OCP isolée de la souche *Synechocystis* WT, Δ CrtO, surexprimant l'OCP et Δ CrtO surexprimant l'OCP.

L'étude de mutations de l'OCP de *Synechocystis* a permis d'élucider le rôle de certains acides aminés spécifiques et essentiels dans sa photo-activation et sa photo-protection. La mutation de la tyrosine en position 44 (Tyr44) par une sérine, dans la souche de *Synechocystis* permettant la sur-expression de l'OCP, n'a pas affectée son affinité de liaison vis à vis de l'échinenone. S'ajoute à cette observation qu'aucune modification de son spectre d'absorbance de la forme orange, inactive n'a été observée (Wilson et al., 2010). Néanmoins, cette mutation a affecté la conversion de l'OCP en sa forme active, rouge sous illumination. En effet, l'OCP Tyr44Ser est incapable de se convertir en sa forme active, rouge, révélant l'importance de la tyrosine 44 dans le processus de photoactivation. Des approches de mutagenèse équivalentes ont permis de démontrer que les Trp110, Tyr201 et Trp288 sont aussi des acides aminés essentiels pour la photoactivation de l'OCP (Wilson et al, 2010). Il est aussi intéressant de noter que la substitution de ces acides aminés a engendré des teneurs en caroténoïdes liés par la protéine modifiées par rapport à l'OCP native, suggérant alors l'importance de l'implication de ces résidus dans la liaison au caroténoïde (Wilson et al, 2010). Aucun de ces mutants cités en amont n'étaient capables d'induire un quenching de la fluorescence *in vivo*, donc d'induire le mécanisme de photoprotection. Ce qui implique que la photo-activité de l'OCP est requise pour sa photo-protection, comme pour l'OCP liant la zéaxanthine qui n'est pas photo-active (Figure 17B). Le laboratoire a aussi mis en évidence le phénotype d'un nouveau mutant qui consistait à la substitution de l'arginine en position 155 (Arg155) par une leucine. Cette mutation, située à l'interface entre les domaines N- et C-terminaux, n'a pas influencée la nature du caroténoïde lié par cette OCP ni la photo-activité de la protéine ; néanmoins, aucun quenching de la fluorescence *in vivo* n'a été observé. Ce mutant a donc permis de dissocier le phénomène de photo-activation, du phénomène de photo-protection. En effet, la photo-activation est nécessaire au processus de photo-protection, mais n'est pas suffisante (Wilson et al, 2012).

4.2- Quenching d'énergie – Activité photo-protectrice

Dans les années 2000, des résultats préliminaires suggèrent l'existence d'un mécanisme permettant de diminuer l'énergie arrivant aux centres réactionnels des cyanobactéries, par quenching d'un excès d'énergie absorbée au niveau de PBs (Bissati et al., 2000). Une forte intensité lumineuse bleue verte induit une diminution de la fluorescence non liée au phénomène de photoinhibition ou aux transitions d'états. Quelques années plus tard, il a clairement été montré que les PBs étaient impliqués dans ce mécanisme de photoprotection (Rakhimberdieva et al., 2004; Scott et al., 2006; Wilson et al., 2006). Les résultats obtenus suggéraient qu'une protéine à caroténoïde était impliquée dans le quenching de la fluorescence des PBs (Rakhimberdieva et al., 2004). En 2006 au sein du laboratoire, il a été montré que L'Orange Caroténoïde Protéine (OCP) était essentielle pour déclencher le mécanisme de photoprotection chez les cyanobactéries (Wilson et al., 2006) : La lumière bleue verte était incapable d'induire un quenching de fluorescence et d'énergie d'excitation chez le mutant de *Synechocystis* PCC 6803, délété du gène de l'OCP (Wilson et al., 2006). L'OCP possède un rôle majeur au sein de ce mécanisme de photoprotection qui permet de diminuer la quantité d'énergie d'excitation arrivant aux photosystèmes et cela engendre aussi une diminution de l'émission de fluorescence des phycobilisomes (PBs), plus connu sous le nom de Non-Photochemical Quenching (NPQ) (Wilson et al., 2006 ; Wilson et al., 2008 ; Gwizdala et al., 2011). C'est la première fois qu'une protéine à caroténoïde joue le rôle de photorécepteur et photomédiateur de réponse face à un stress lumineux au sein des antennes collectrices d'énergie (Wilson et al., 2006 ; Kirilovsky, 2007 ; Wilson et al., 2008). Le quenching de fluorescence des PBs est réversible, la fluorescence des PBs est récupérée dès lors que la source de lumière disparaît car l'OCP^f est métastable et revient rapidement à sa forme inactive, orange (Bissati et al., 2000 ; Wilson et al., 2008). *In vivo*, la récupération de la fluorescence est due à une autre protéine : la « Fluorescent Recovery Protein » (FRP) (Boulay et al., 2010). La FRP est une protéine soluble de 13 kDa ne possédant pas de chromophore (Boulay et al., 2010; Gwizdala et al., 2013) Elle est active sous forme de dimère (Sutter et al., 2013). La FRP accélère la conversion de OCP^f à OCP^o et aide le détachement de l'OCP, du PB (Boulay et al., 2010 ; Gwizdala et al., 2013).

La forme active, rouge de l'OCP (OCP^f) est la seule à pouvoir se fixer aux phycobilisomes et d'induire ainsi la dissipation thermique de l'excès d'énergie d'excitation absorbée (Gwizdala et al., 2011). En effet, des études par électrophorèse SDS-PAGE combinée à un Western Blot a révélé la fixation d'une ou deux OCP par PB quenché, sous illumination. A contrario, aucun

attachement OCP-PB n'est détecté dans des conditions d'obscurité totale. Cette expérience a prouvé que l'OCP^o doit être photoconvertie en OCP^f pour pouvoir se lier aux PBs (Gwizdala et al., 2011). Les changements opérés au sein du caroténoïde lorsque l'OCP est photoactivée, induisent la rupture de la liaison entre les deux domaines et l'OCP adopte alors une conformation « ouverte ». La forme photoactivée permet alors l'interaction entre le caroténoïde lié et la biline du cœur du phycobilisome afin d'induire le quenching d'énergie d'excitation par dissipation thermique (Wilson et al., 2012). Le domaine C-terminal de l'OCP est le senseur de l'intensité lumineuse et l'inducteur des changements tandis que le domaine N-terminal est le quencher d'énergie (Leverenz et al., 2014).

En 2011, le système *in vitro* permettant la reconstitution du quenching de fluorescence des phycobilisomes par l'OCP, directement corrélé au quenching d'énergie d'excitation a été développé (Gwizdala et al., 2011, Figure 18). Quatre types de PBs de *Synechocystis* PCC 6803 ont été isolés: le PB CK déficient en phycocyanine (PC) qui est le constituant du bras du PB, le PB CB dépourvu des deux premiers monomères de phycocyanine (PC), le PB Δ AB déficient en allophycocyanine (APC) qui est le constituant du cœur du PB et les PBs des cellules sauvages. L'OCP^f quenche les PBs sauvages, CK et CB mais pas les PBs provenant du mutant (Δ AB) qui ne possèdent pas de cœur. L'OCP se lie donc au cœur du PB (Gwizdala et al., 2011 ; Figure 18E). Le modèle de quenching de fluorescence proposé fut que l'OCP détecte les fortes intensités lumineuses et se photoconvertit en sa forme active, qui s'attache alors au cœur du PB et déclenche le mécanisme de photoprotection en dissipant l'excès d'énergie d'excitation reçue sous forme de chaleur (Gwizdala et al., 2011). De récents résultats suggèrent que l'OCP se lie plus précisément à un (ou deux) des cylindres basaux d'APC du cœur du PB (Jallet et al., 2013; Zhang et al., 2014). En effet, l'OCP est capable de quencher la fluorescence des PBs de *Synechococcus* PCC7942 qui contiennent deux cylindres basaux d'APC, contrairement à *Synechocystis* PCC 6803 qui en possède trois (Jallet et al. 2013). Une seule molécule d'OCP est capable de quencher la fluorescence d'un PB (Gwizdala et al., 2011). Ces résultats suggèrent que l'OCP possède un site spécifique de liaison au sein du cœur du PB. Grâce à des études spectroscopiques, d'analyse de mutants, et d'expériences de « cross-linking », il a été suggéré que l'OCP quenche une biline au sein d'un trimère d'APC₆₆₀ (Jallet et al., 2012b; Tian et al., 2011, 2012; Zhang et al., 2014). De plus, il a été clairement démontré que l'ApcD et l'ApcF ne sont pas requis pour le quenching de la fluorescence des PBs par l'OCP au sein de *Synechocystis* PCC 6803 (Jallet et al., 2012b; Stadnichuk et al., 2012) ou au sein d'*Anabeana* PCC 7120 (Dong and Zhao, 2008).

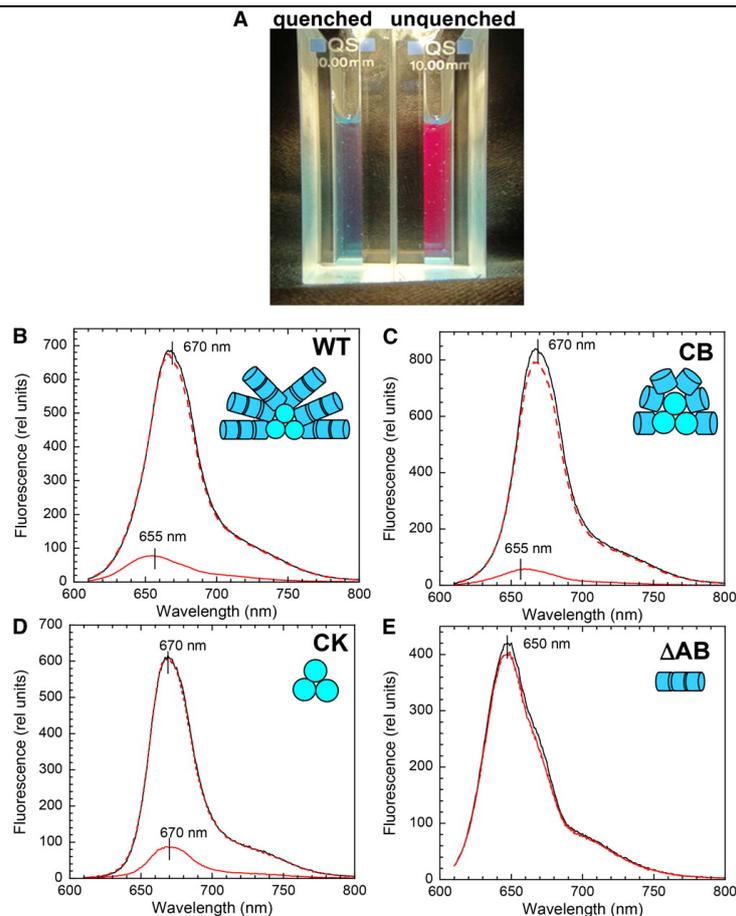


Figure 18

***In vitro*, quenching de la fluorescence des phycobilisomes par l'OCP^r**

(Gwizdala et al., 2011)

(A) Photographie de la fluorescence des PBs quenchés (à gauche) et non-quenchés (à droite). Les PBs sont éclairés par la lumière blanche qui met en évidence la fluorescence émise par les échantillons. La couleur des PBs non-quenchés correspond à la fluorescence dans le rouge de la phycocyanine.

(B à E) Spectres de fluorescence à température ambiante des PBs isolés de *Synechocystis* non-quenchés à l'obscurité (ligne noire), non-quenchés à la lumière (ligne pointillée rouge) et quenchés à la lumière (ligne rouge continue) des PBs de *Synechocystis* PCC 6803 isolés de type sauvage **(B)**, CB **(C)**, CK **(D)** et Δ AB **(E)**. Les PBs (à 0,013 mM) ont été illuminés pendant 5 min avec une lumière blanche (5000 pmol photons.m⁻².s⁻¹) en l'absence (non-quenchés) ou en présence de l'OCP^r à 0,53 mM (quenchés).

4. 3- Quenching d'oxygène singulet – Autre activité photo-protectrice

Les cyanobactéries et les autres organismes photosynthétiques vivent dans un environnement riche en oxygène et sont donc particulièrement exposés au stress oxydant. Leurs pigments, chlorophylle et bilines, agissent comme des photosensibilisants. Dans le centre réactionnel du PSII, la formation d' $^1\text{O}_2$ augmente sous haute intensité de lumière, due à une augmentation des réactions de recombinaison de charge et la formation de la chlorophylle à l'état de triplet (Revue: Krieger-Liszkay et al., 2008; Rutherford and Krieger-Liszkay, 2001; Vass, 2011, 2012). Les cyanobactéries, comme les plantes et les algues, synthétisent des caroténoïdes logés dans leurs membranes ou attachés à des protéines membranaires. Ils jouent plusieurs rôles dans la protection cellulaire : ils récoltent l'énergie lumineuse, ils font écran à la lumière et quenchent le très réactif et destructeur $^1\text{O}_2$ (revue :Frank and Cogdell, 1996).

Connaissant le rôle photo-protecteur des caroténoïdes au sein des organismes photosynthétiques, la question soulevée fut : outre son rôle de quencher d'énergie, l'OCP est-elle aussi capable de quencher l' $^1\text{O}_2$?

Au sein du laboratoire, il a récemment été démontré que l'OCP est capable de quencher l' $^1\text{O}_2$. Les cellules dépourvues en OCP (ΔOCP) sont plus sensibles aux fortes intensités lumineuses et présentent une plus forte concentration intracellulaire d' $^1\text{O}_2$ (Figure 19). Cette photoprotection est active aussi sous de fortes intensités de lumière orange-rouge, conditions sous lesquelles l'OCP n'est pas photoactivée et ne peut pas s'attacher aux PBs. Un autre mécanisme de photoprotection doit être mise en place. Sedoud et al ont montré qu'*in vitro* l'OCP est un très bon quencher d' $^1\text{O}_2$ indiquant qu'*in vivo* l'OCP peut protéger les cellules en réagissant directement avec lui. (Sedoud et al., 2014; Figure 20A).

Cette nouvelle caractéristique allouée à l'OCP n'est pas valable pour toutes les protéines à caroténoïde. En effet, une autre protéine à caroténoïde possédant une forte homologie de séquence avec le domaine N-terminal de l'OCP, la RCP (gène *All1223*) pour « Red Carotenoid Protein », est incapable de quencher l' $^1\text{O}_2$ (Sedoud et al., 2014). Bien que l'OCP soit une protéine soluble, elle quenche aussi l' $^1\text{O}_2$ formé dans les membranes thylakoïdes, *in vitro* (Sedoud et al., 2014 ; Figure 20A).

Quel que soit le caroténoïde lié à l'OCP (ECN, hECN ou ZEA), l'OCP est capable de quencher l' $^1\text{O}_2$ à une faible concentration: $I_{50}=1,5 \mu\text{M}$ (Sedoud et al., 2014 ; Figure 20B). L'OCP serait un meilleur anti- oxygène singulet que les caroténoïdes seuls, comme l'asthaxanthine, l'échinénone ou encore l'histidine ou la protéine soluble trolox, analogue de la vitamine E (Sedoud et al., 2014 ; Figure 21A et B). L'OCP possède une fonction double et

complémentaire au sein de la photoprotection: quencher d'énergie et d'oxygène singulet (Wilson et al., 2006 ; Sedoud et al., 2014 ; Figure 22).

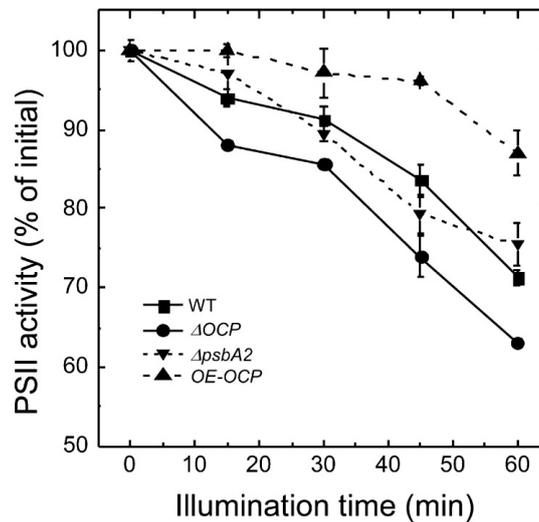


Figure 19

***In vivo*, activité du Photosystème II de *Synechocystis* PCC 6803**

(Sedoud et al., 2014)

Suivi de l'activité du photosystème II (PSII), éclairé par une intense lumière rouge, chez diverses souches de *Synechocystis* PCC 6803. Les souches de *Synechocystis* PCC 6803 sont les suivantes: sauvages (WT, carrés), délétées de l'OCP (Δ OCP, cercles), délétées du gène *psbA2*, un des trois homologues des gènes codant la protéine D1 (*ApsbA2*, triangles en bas) et sur-exprimant l'OCP dans le fond *ApsbA2* (OE-OCP, triangles en haut). (Sedoud et al., 2014) Il est important de noter que sous illumination intense rouge, l'OCP n'est pas photo-activée, donc n'est pas convertie en sa forme active, rouge.

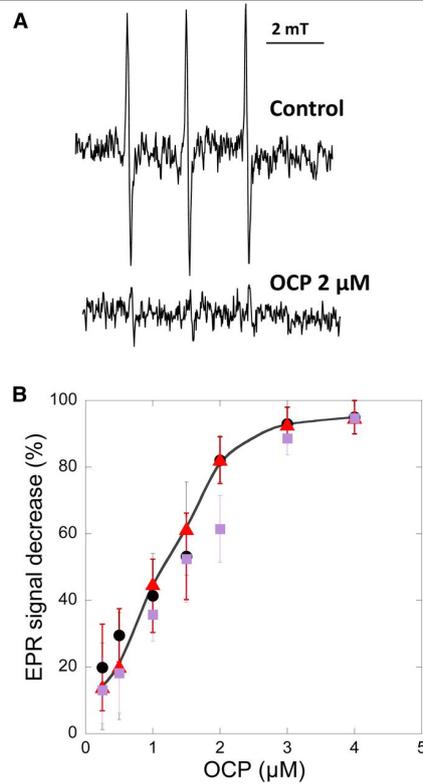


Figure 20

***In vitro*, quenching de l' $^1\text{O}_2$ par l'OCP de *Synechocystis* PCC 6803**

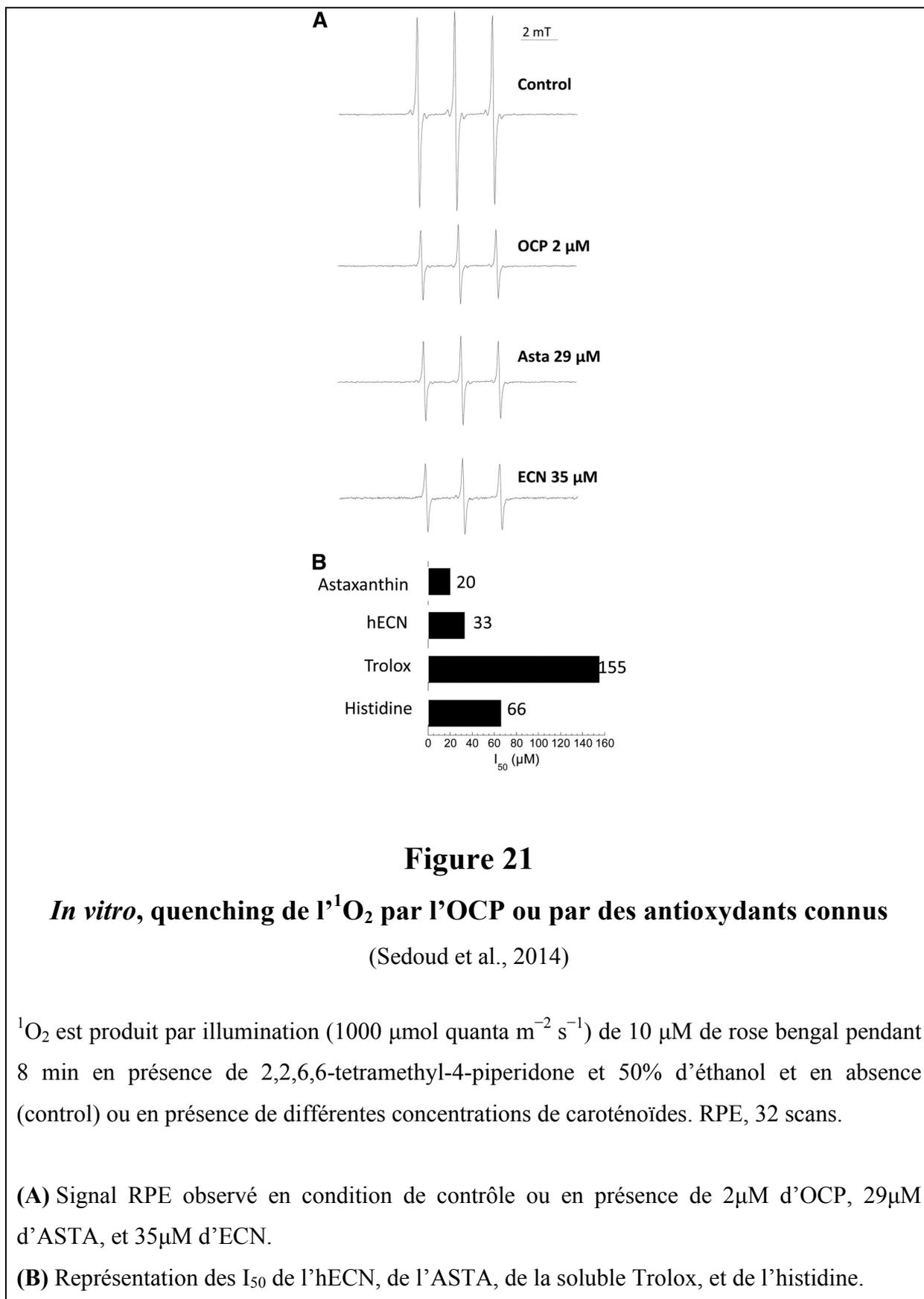
(Sedoud et al., 2014)

$^1\text{O}_2$ est produit par illumination ($1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de $10 \mu\text{M}$ de bleu de methylene pendant 3 min en présence de TEMPd-HCl et en absence (control)) ou en présence de différentes concentrations en OCP.

(A) Signal RPE (16 scans) observé en absence d'OCP ou en présence de $2\mu\text{M}$ d'OCP.

(B) Le pourcentage de diminution du signal RPE en fonction de la concentration en OCP. Les symboles sont les suivants : ECN-OCP (ronds noirs), hECN-OCP (triangles rouges), et ZEA-OCP (carrés violets). La courbe représente la moyenne de trois expériences indépendantes.

→ L'OCP est un très bon antioxydant grâce à sa capacité de neutraliser l' $^1\text{O}_2$, quelque soit le caroténoïde lié, à seulement $4 \mu\text{M}$ (ECN, hECN ou ZEA).



L'OCP possède deux rôles dans la photoprotection

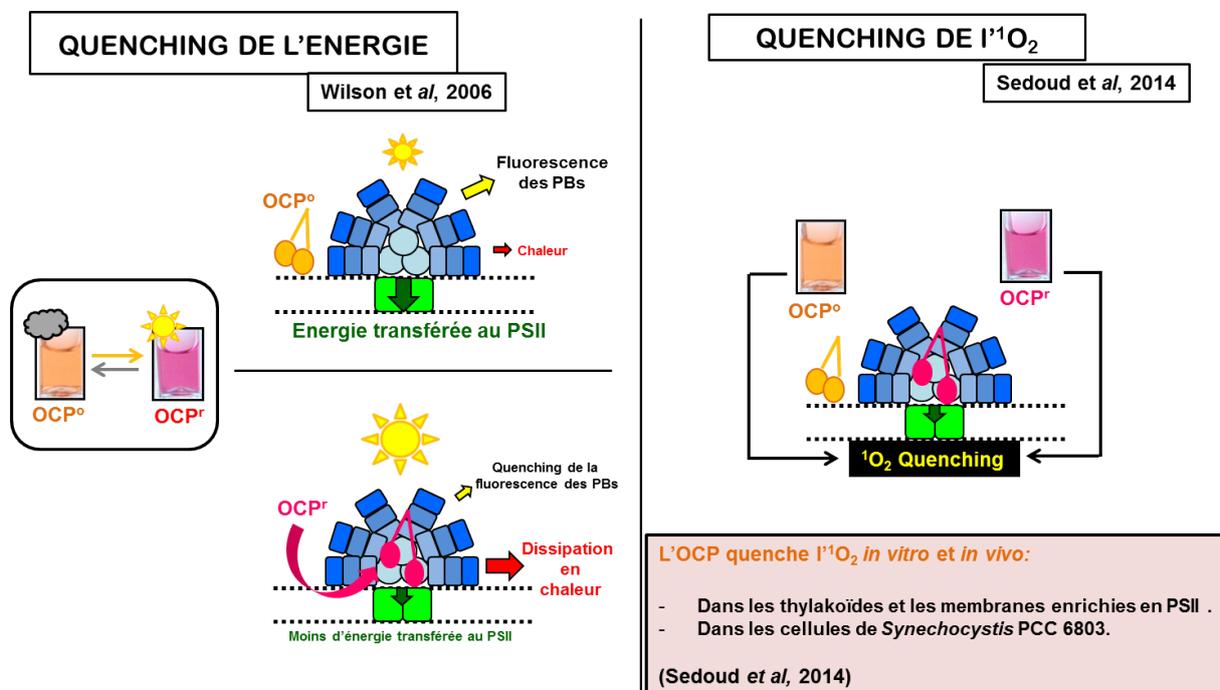


Figure 22

Représentation schématique des deux rôles photo-protecteurs de l'OCP

(Wilson et al., 2006 ; Sedoud et al., 2014)

L'OCP possède deux rôles complémentaires dans la photoprotection : quenching de l'énergie sous une forte intensité lumineuse (gauche) et quenching de l'oxygène singulet, à l'obscurité ou à la lumière (droite).

Lorsque l'OCP est illuminée par la lumière bleue verte, elle se photo-convertit en sa forme active, rouge. Sa forme active a la capacité de se fixer au cœur du PB pour diminuer l'énergie qui arrive au centre réactionnel du PSII. Une partie de l'énergie reçue en excès est alors dissipée sous forme de chaleur (gauche).

L'OCP protège aussi les cellules de la formation du très réactif oxygène singulet, et ce, même lorsqu'elle n'est pas photoactivée, illuminée par la lumière intense rouge (droite).

5- *Escherichia coli*, organisme modèle et modèle de production

5.1- *Escherichia coli*, organisme modèle à usine de production

Escherichia coli (*E.coli*) est un organisme unicellulaire procaryote, modèle et pilier de la biologie moléculaire (Figure 23). Elle est étudiée et utilisée depuis de nombreuses années par les généticiens, les biologistes moléculaires et les microbiologistes. Son génome fut entièrement séquencé en 1997 (Blattner et al., 1997).

Depuis les années 1950, elle fut au cœur des premières découvertes qui ont fondées la génétique bactérienne et la biologie moléculaire que nous connaissons aujourd'hui. Elle est le modèle d'étude qui a permis de comprendre les mécanismes biologiques essentiels, allant de la recombinaison génétique à la chimiotaxie en passant par la régulation métabolique, la réparation de l'ADN et l'expression de protéines (Hanahan, 1983; Kowalczykowski et al., 1994; Witkin, 1976). La recherche fondamentale a très souvent recours à cet organisme modèle pour exprimer une protéine d'intérêt grâce au clonage moléculaire. La biologie tire profit de ses capacités de multiplication végétative et de sa vitesse de division, en effet, son temps de doublement est d'environ 20 minutes (Sezonov et al., 2007). Pour exprimer des protéines recombinantes, la transformation par ADN plasmidique est largement utilisée (Hanahan, 1983) ou bien l'insertion du fragment d'ADN dans le génome par recombinaison homologue ou bien par transposition (McKenzie and Craig, 2006a; Yu et al., 2000). Avec les années, *E.coli* est devenu la plate-forme d'expression la plus populaire.

Elle est aussi économiquement intéressante, puisqu'elle peut être utilisée par l'industrie de la santé. Dans le domaine pharmaceutique, *E.coli* est utilisée pour produire l'hormone de croissance et l'insuline recombinantes, identiques aux protéines humaines (Derynck et al., 1984; Goeddel et al., 1979).

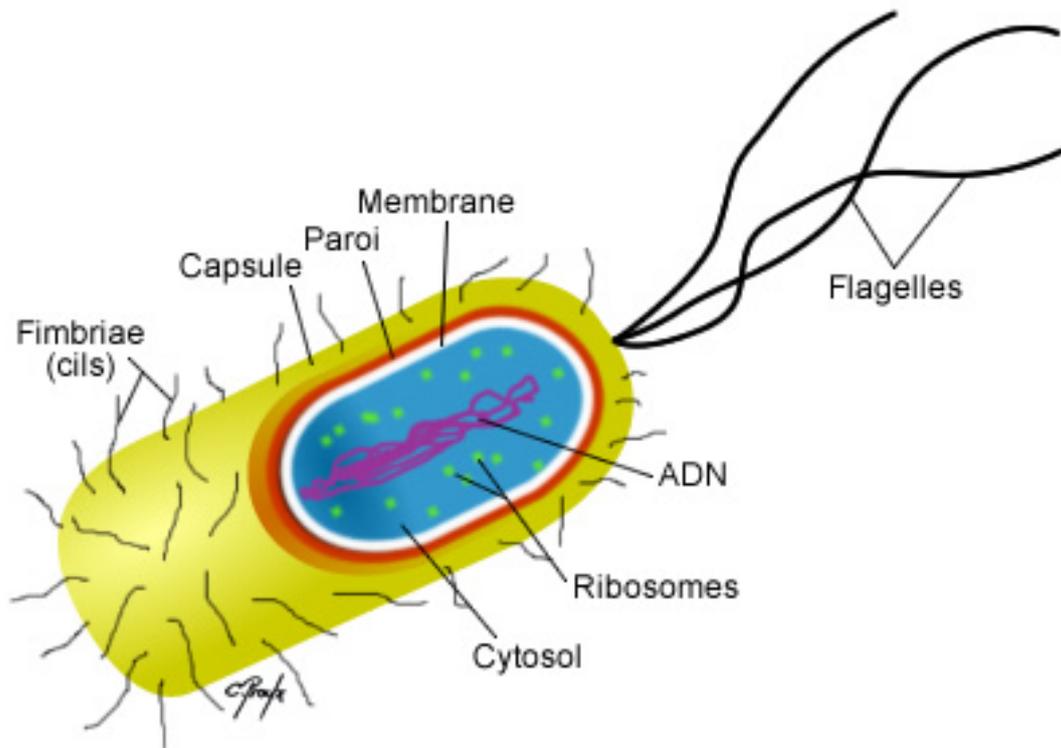


Figure 23

Représentation schématique de la cellule *E.coli*

(<http://www.cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/cellules-procaryotes-et-cellules-eucaryotes.html>)

E.coli est un organisme procaryote. Sa caractéristique majeure est qu'elle ne possède pas de noyau et est dotée d'un seul chromosome circulaire. Toute la machinerie d'expression des gènes est localisée dans le cytoplasme. La cellule possède des flagelles, organites permettant sa mobilité. *E.coli* est dépourvue de compartimentations cellulaires telles que le réticulum endoplasmique, les mitochondries, les chloroplastes ou le cytosquelette (microtubule).

L'expression de protéines recombinantes dans *E.coli* n'est pas toujours achevée avec succès. La protéine recombinante peut soit ne pas être exprimée, soit mal se replier et être alors inactive ou soit être exprimée mais stockée dans des corps d'inclusion (Baneyx and Mujacic, 2004). Le moyen le plus utilisé pour diminuer la formation de corps d'inclusion est la diminution de la température de culture (Mujacic et al., 1999; Schein, 1989). Ce moyen a fait ses preuves pour l'expression de la luciférase, la β -lactamase, la glycogène phosphorylase de lapin, ou l'interféron α -2 (Vasina and Baneyx, 1997). Cela permet une exposition moindre des régions hydrophobes des protéines ainsi qu'une diminution de l'activité des protéases (Chesshyre and Hipkiss, 1989) qui participent à la formation des corps d'inclusion. La diminution de la température a aussi pour effet de ralentir le métabolisme cellulaire pour arborer un meilleur repliement de la protéine recombinante. C'est en revanche une contrainte car la biomasse et la quantité de protéines recombinantes produites sont plus faibles (Shaw and Ingraham, 1967; Vasina and Baneyx, 1996). Il n'y a donc pas de stratégie « universelle » pour contrer les problèmes d'expression hétérologue, mais quelques méthodes peuvent l'améliorer. En 2013, Gopal et Kumar ont énoncé cinq paramètres pouvant être modifiés pour augmenter l'expression de la protéine d'étude: le choix du vecteur, le choix de l'hôte, les paramètres de culture, la co-expression avec d'autres gènes codant des protéines chaperons et les changements de séquences au sein du gène par le biais des codons rares (Gopal and Kumar, 2013; Kane, 1995). Chaque expression hétérologue doit être considérée de façon indépendante et affinée en fonction de l'expression protéique obtenue. Il est important d'optimiser chaque paramètre pour une meilleure production: souche hôte, vecteur de clonage, usage de codon rare, choix du promoteur, nature et concentration de l'inducteur, temps de l'induction, température de culture, séquence signal (sécrétion ou non), etc.

5.2- Production de caroténoïdes chez *Escherichia coli*

De nos jours, plus de 750 caroténoïdes sont structurellement définis. Dans leur grande majorité, les caroténoïdes sont synthétisés par les organismes photosynthétiques. Ils sont largement impliqués dans la photosynthèse ou peuvent être des intermédiaires accumulés dans la cellule lors de leur synthèse. La plupart des cyanobactéries synthétisent le β -carotène, la zéaxanthine, l'échinenone et les myxoxanthophylles. Les myxoxanthophylles sont aussi des caroténoïdes, mais constitués d'un monosaccharide (quinovose ou 2,4-diméthylfucose) attaché à la fonction hydroxyle du myxol. Comme la zéaxanthine ou l'échinenone, ils font

partie des caroténoïdes logés dans les membranes des cyanobactéries. Les voies de biosynthèse des caroténoïdes et l'étude des enzymes impliquées ont été principalement étudiés chez les cyanobactéries (Revue : (Takaichi and Mochimaru, 2007) mais aussi chez *E.coli* transformée avec les gènes de cyanobactéries codant les enzymes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Cunningham et al., 1996; Makino et al., 2008; Misawa et al., 1995). *E.coli* est une bactérie non-photosynthétique qui ne synthétise pas de caroténoïdes mais, qui produit le précurseur farnésyl pyrophosphate (FPP) par la voie isoprénoïde. La production de caroténoïdes dans *E.coli* nécessite donc l'expression hétérologue des gènes codant les enzymes impliquées dans la voie de synthèse des caroténoïdes en aval du précurseur farnésyl pyrophosphate. De nombreux travaux ont été réalisés pour reconstituer diverses voies de synthèse de caroténoïdes dans *E.coli*. Ces travaux ont contribué à caractériser les enzymes impliquées dans la synthèse des caroténoïdes et à créer des souches *E.coli* capables de les synthétiser en grandes quantités pour l'industrie de la santé.

Le β -carotène a été synthétisé dans *E.coli* à partir de deux opérons de gènes de deux espèces de bactéries différentes : *Erwinia uredovora* et *Erwinia herbicola* (Cunningham et al., 1996; Misawa et al., 1995). La zéaxanthine a aussi été synthétisée dans *E.coli* grâce à l'opéron de gènes de *Erwinia uredovora* (Misawa et al., 1995). Je tiens tout particulièrement à présenter le travail de l'Equipe du Professeur Norihiko Misawa pour avoir déterminé, grâce à des expressions hétérologues chez *E.coli*, les voies de biosynthèse des caroténoïdes chez *Synechocystis* PCC 6803 et *Anabaena* PCC 7120, deux cyanobactéries que j'ai étudié pendant mon doctorat (Makino et al., 2008). Les enzymes hydroxylases (CrtR) et kétolases (CrtO / CrtW) provenant de *Synechocystis* PCC 6803 ou *Anabaena* PCC 7120 ne possèdent pas les mêmes activités et produisent alors des caroténoïdes de nature différente (Figure 24). En effet, L'enzyme CrtR de *Synechocystis* catalyse la formation de la zéaxanthine à partir du β -carotène et est impliquée dans la voie des myxoxanthophylles tandis que l'enzyme CrtR de *Anabaena* est uniquement impliquée dans la voie des myxoxanthophylles et ne catalyse pas la formation de la zéaxanthine. *Synechocystis* ne possède pas d'enzyme kétolase CrtW mais uniquement la CrtO qui catalyse la formation de l'échinonone à partir du β -carotène (Figure 25). *Anabaena* possède elle, deux kétolases : CrtO et CrtW qui catalysent la formation de l'échinonone et de la canthaxanthine respectivement à partir du β -carotène. L'enzyme CrtW est aussi impliquée dans la voie des myxoxanthophylles et plus particulièrement dans la synthèse du ketomyxol 2'-fucoside (Makino et al., 2008; Takaichi and Mochimaru, 2007; Figure 26).

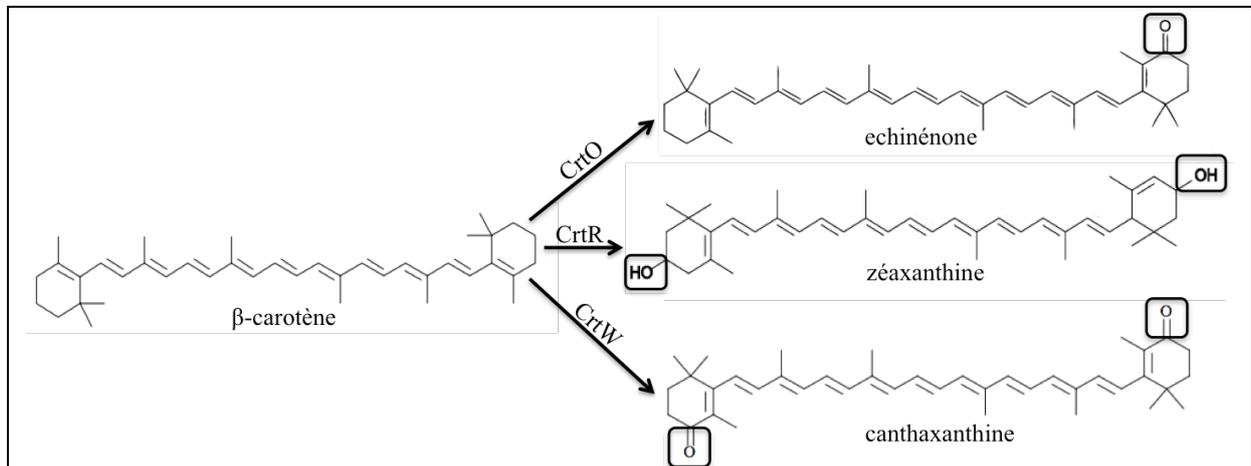


Figure 24

Schéma de la conversion du β-carotène par les enzymes CrtO et CrtR de *Synechocystis* PCC 6803 et CrtW de *Anabaena* PCC 7120.

Les enzymes CrtO et CrtW provenant de *Synechocystis* PCC 6803 et *Anabaena* PCC 7120 respectivement, sont des β-carotène ketolases. Ces enzymes ont la capacité d'ajouter un ou des groupement(s) carbonyle(s) sur le β-carotène afin de le convertir en echinenone ou canthaxanthine, respectivement. L'enzyme CrtR de *Synechocystis* PCC 6803 est, elle, une β-carotène hydroxylase. Elle a donc la propriété d'ajouter des groupements hydroxyles sur le β-carotène afin de le convertir en zeaxanthine.

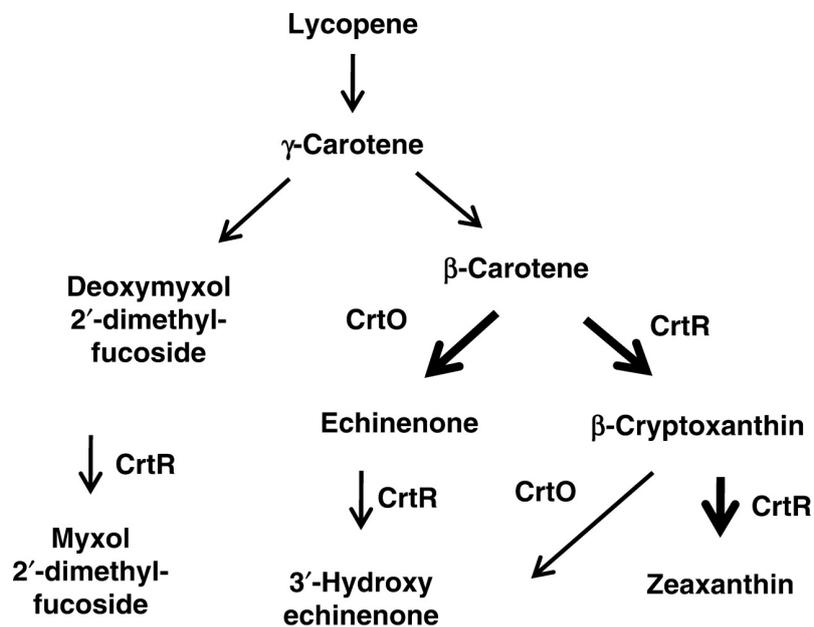


Figure 25

Voie de biosynthèse des caroténoïdes chez *Synechocystis* PCC 6803

(Makino et al., 2008)

Voie de biosynthèse des caroténoïdes chez *Synechocystis* PCC 6803. Mise en évidence des fonctions catalytiques des enzymes kétolase (CrtO) et hydroxylase (CrtR). Il est important de noter que les voies de biosynthèse qui ont été prouvées expérimentalement dans (T Makino et al., 2008) sont indiquées par des flèches épaisses.

L'enzyme kétolase CrtO catalyse la formation de l'échinonone à partir du β-carotène tandis que l'enzyme hydroxylase CrtR catalyse la formation de la zéaxanthine à partir du β-carotène avec, pour intermédiaire de synthèse, le β-cryptoxanthine et serait aussi impliquée dans la voie des myxoxanthophylles.

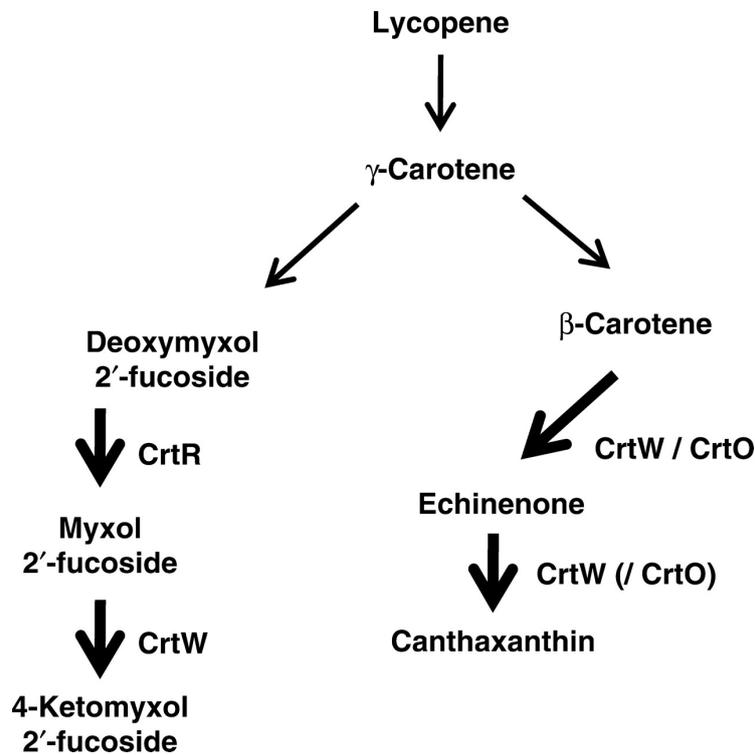


Figure 26

Voie de biosynthèse des caroténoïdes chez *Anabaena* PCC 7120

(Makino et al., 2008)

Voie de biosynthèse des caroténoïdes chez *Anabaena* PCC 7120. Mise en évidence des fonctions catalytiques des enzymes kétolases (CrtO et CrtW) et hydroxylase (CrtR). Il est important de noter que les voies de biosynthèse qui ont été prouvées expérimentalement dans (Makino et al., 2008a) sont indiquées par des flèches épaisses.

Les enzymes kétolases CrtO et CrtW catalysent la formation de l'échinenone et de la canthaxanthine à partir du β-carotène tandis que l'enzyme hydroxylase CrtR est uniquement impliquée dans la voie des myxoxanthophylles.

5.3- Production de protéines à pigments chez *Escherichia coli*

Les protéines à pigments, telles que les protéines liant les chlorophylles et/ou les caroténoïdes impliquées ou non dans les complexes collecteurs de lumières ont déjà été surexprimées de façon hétérologue, mais la surexpression concerne uniquement les produits des gènes codant les protéines, sans leurs pigments, nommées « apo-protéines ». La reconstitution de leur association est alors ensuite réalisée *in vitro*, en présence de pigments.

En 1997, VHR Schmid et al. ont reconstitué les complexes protéines-pigments Lhca (Lhca1 et Lhca4) de l'antenne collectrice de lumière du photosystème I avec les chlorophylles a et b *in vitro*. Les protéines ont été obtenues par la surexpression des gènes *Lhca* de tomate chez *E.coli* (Schmid et al., 1997).

En 1998, l'équipe de Roberto Bassi a reconstitué *in vitro* la protéine-pigment CP24. Cette protéine-pigment liant la violaxanthine est une sous-unité de l'antenne collectrice de la lumière du photosystème II, chez les plantes. Elle était peu caractérisée en raison de la difficulté à l'isoler et de son instabilité pendant la purification. Pour la caractériser d'avantage, le produit du gène *Lhcb6* a été surexprimé chez *E.coli* afin d'obtenir l'apo-protéine CP24. La protéine CP24, associée aux pigments, a ensuite été reconstituée *in vitro* avec des xanthophylles, chlorophylles a et b. Cette reconstitution *in vitro* a permis l'obtention d'un complexe protéine-pigment avec des propriétés essentiellement identiques à la protéine native extraite de thylakoïdes de maïs (Pagano et al., 1998).

En 1998, l'équipe de Harald Paulsen a, elle aussi, surexprimé chez *E.coli* une protéine de l'antenne collectrice de lumière chez les plantes : CP26. Ils ont pour cela exprimé le produit du gène *Lhcb5* codant la protéine CP26 et ont reconstitué le complexe protéine-pigment en présence de chlorophylle a, de chlorophylle b et xanthophylles *in vitro*. La possession de la protéine CP26 recombinante a permis de mieux caractériser le complexe protéine-pigment à l'égard de sa biochimie et ses fonctions physiologiques (Ros et al., 1998).

Résultats

Chapitre I

Mise en œuvre du système de production hétérologue de
l'OCP chez *Escherichia coli*

Avant mon arrivée au laboratoire, l'Orange Carotenoid Protein, aussi appelée « OCP », avait toujours été surexprimée de façon endogène chez les cyanobactéries pour la purifier afin d'étudier ses propriétés impliquées dans le mécanisme de photoprotection (Wilson et al., 2008). La surexpression de l'OCP par les cyanobactéries est un processus très laborieux en raison de la faible quantité en OCP dans les cellules. En effet, même en cultivant la souche de cyanobactéries surexprimant le gène de l'OCP, sa culture jusqu'à la purification de la protéine requiert au moins 3 semaines afin de récupérer 40mg de protéines OCP à partir de 30l de cellules (A Wilson et D Kirilovsky, données non publiées). Pour caractériser d'avantage l'OCP par mutagenèse de son gène, il était nécessaire pour le laboratoire de créer un système d'expression hétérologue du gène *ocp*, fiable, robuste et rapide. Le choix de l'organisme hôte *E.coli* s'est avéré être une évidence car les cyanobactéries, comme *E.coli*, sont tous les deux des organismes procaryotes. De plus, les expressions hétérologues d'apo-protéines de complexes protéine-pigments dans la littérature ont été réalisées avec succès (Schmid et al., 1997; Pagano et al., 1998 ; Ros et al., 1998), mais la reconstitution du complexe protéine-pigments a, elle, toujours été réalisée *in vitro*.

Au cours de mon travail de doctorat, j'ai réalisé la production hétérologue de l'OCP chez *E.coli*, avec une innovation majeure : le complexe protéine-pigment, plus précisément, l'OCP liant son caroténoïde, est associé directement *in vivo*, dans la cellule. L'association de la protéine avec son pigment implique que *E.coli* doit synthétiser le caroténoïde lié par l'OCP et aussi exprimer le produit du gène *ocp* et que l'OCP ainsi produite puisse lier le caroténoïde *in vivo*.

De nombreuses questions initiales se posaient à nous telles que : comment allons-nous construire ce système d'expression impliquant deux acteurs : le caroténoïde et la protéine ? Comme nous ne connaissons pas le mécanisme d'entrée du caroténoïde dans l'OCP, nous n'avons pas non plus la connaissance de quand rentre-t-il : durant la synthèse de l'OCP ou bien une fois que l'OCP est déjà synthétisée ? A cela s'ajoute la complexité du système à exprimer, en effet, l'OCP lie un caroténoïde, résultant d'une cascade de réactions enzymatiques. Il faut alors reconstituer cette cascade afin de synthétiser le caroténoïde lié par l'OCP dans *E.coli*. Pour cela, 5 gènes sont nécessaires pour produire du β -carotène dans la cellule et le convertir en le caroténoïde lié par l'OCP et un gène est nécessaire pour l'expression de l'OCP. Le système de production hétérologue de l'OCP liant son caroténoïde est donc dicté par six gènes. Les questions qui se posaient à nous furent alors : comment exprimer ces gènes afin que l'OCP puisse lier son caroténoïde et conserver ses propriétés

natives ? Faut-il induire l'expression de tous les gènes simultanément ? Faut-il créer un ordre d'induction de ces gènes ? Si oui, lequel ? Les premières constructions du système n'étaient que pures hypothèses de travail. Le début de mon travail était fondé sur la biologie moléculaire pour construire le système d'expression hétérologue des gènes portés par les plasmides codant les acteurs protéiques impliqués dans la production de l'OCP *in vivo*. Par la suite, une étude approfondie des conditions de culture fut réalisée. *In fine*, l'analyse biophysique des OCPs recombinantes obtenues fut menée afin de déterminer les caractéristiques de ces protéines et de les comparer aux OCPs sauvages, exprimées de façon endogène dans la cyanobactérie *Synechocystis* PCC 6803.

Afin de commencer la biologie moléculaire, nous avons demandé gracieusement, à deux équipes de recherche, de nous faire don de deux plasmides nous permettant de synthétiser le β -carotène dans *E.coli* (Cunningham et al., 1996b; Misawa et al., 1995b) pour gagner du temps, en s'affranchissant du clonage des quatre gènes qui sont impliqués dans sa synthèse. Par la suite, nous avons choisi de cloner le gène codant l'enzyme capable de convertir le β -carotène en caroténoïde lié par l'OCP et le gène *ocp* sur deux plasmides distincts afin de conserver la liberté d'induire indépendamment ces gènes. Cette liberté d'induction était nécessaire pour étudier de nombreuses conditions de culture, afin d'en trouver une fonctionnelle.

Ce travail de production hétérologue de l'OCP est important, non seulement pour accélérer l'élucidation du mécanisme de photoprotection de l'OCP grâce à la construction rapide de mutants, mais il promet aussi de caractériser et de produire d'autres protéines à caroténoïdes avec des applications potentielles pour la santé humaine.

Pour une meilleure compréhension de la mise au point de cette production hétérologue, je vais présenter l'ensemble des constructions de biologie moléculaire et expériences réalisées afin d'y parvenir. Je décrirai la construction des souches *E.coli* capables de synthétiser le β -carotène, les souches capables de convertir ce β -carotène en échinénone, canthaxanthine ou zéaxanthine et enfin, les souches produisant l'OCP liant les caroténoïdes directement dans la cellule.

Cette production rapide et robuste de l'OCP nous a permis de mieux comprendre la fonction de différents caroténoïdes liés par l'OCP, que je présenterai dans la deuxième partie des résultats obtenus. Cela nous a aussi permis de réaliser un grand nombre de mutants du gène de l'OCP qui ont été essentiels dans l'élucidation de la photo-activation et de la structure de la forme active de la protéine, présentés dans le quatrième chapitre de résultats (Leverenz et al., 2015; Thurotte et al., 2015).

1^{ère} sous-partie

Création des souches *Escherichia coli* synthétisant le β -carotène et convertissant le β -carotène en échinénone, zéaxanthine ou canthaxanthine

Construction des plasmides contenant les gènes codant les enzymes nécessaires à la synthèse du β -carotène et à la conversion du β -carotène en échinénone, zéaxanthine ou canthaxanthine

1-1 Plasmides portant les gènes nécessaires à la synthèse du β -carotène dans *Escherichia coli*

Pour exprimer l'OCP, protéine liant un caroténoïde dans *E.coli*, la première étape qu'il fallait réaliser fut la synthèse des caroténoïdes, et plus précisément, la reconstitution de la voie de biosynthèse des caroténoïdes dans la cellule.

Au début de ma thèse, je me suis donc concentrée sur la création des souches *E.coli*, capables de synthétiser divers caroténoïdes. *E.coli* ne possède pas les enzymes impliquées dans la biosynthèse des caroténoïdes, mais elle exprime naturellement un substrat de la voie isoprénoïde qui peut aussi être substrat de la voie de biosynthèse des caroténoïdes, nommé le farnesyl-pyrophosphate (FPP). Grâce à l'expression de 4 enzymes exogènes, il est possible, pour *E.coli*, de convertir ce FPP en β -carotène (Figure 27). Ces 4 enzymes sont exprimées, de façon endogène, chez les bactéries *Pantoea ananatis* (anciennement appelée *Erwinia uredovora*) et chez *Pantoea agglomerans* (anciennement appelée *Erwinia herbicola*).

Les gènes codant ces 4 enzymes sont organisés génétiquement sous forme d'opéron nommé l'opéron *Crt*. Cet opéron est constitué de 4 gènes sous le contrôle du promoteur constitutif du premier gène: *crtE*. Le gène *crtE* code une enzyme geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPP synthase), le gène *crtB* code une phytoène synthase, le gène *crtI* code une phytoène desaturase et le gène *crtY* code une lycopen cyclase (Figure 28 ;Nishizaki et al., 2007). L'enzyme CrtE permet la synthèse du GGPP à partir du FPP et du IPP. L'enzyme CrtB forme le phytoène à partir de deux molécules de GGPP. L'enzyme CrtI permet la conversion du

phytoène en lycopène et enfin, l'enzyme CrtY convertit le lycopène en β -carotène. Les opérons *Crt* de *Pantoea agglomerans* et de *Pantoea ananatis* ont été clonés dans deux plasmides respectifs: pAC-BETA (Cunningham et al., 1996 ; Figure 28) et pACCAR16 Δ CrtX (Misawa et al., 1995 ; Figure 28). Afin que les cellules *E.coli* synthétisent le β -carotène, ces dernières doivent être transformées avec le plasmide requis : pAC-BETA ou pACCAR16 Δ CrtX. Une étude préliminaire a été réalisée afin de savoir quel plasmide allons-nous utiliser pour une synthèse de β -carotène optimale dans notre système d'expression. Pour cela, les cellules *E.coli* BL21, permettant l'expression des protéines recombinantes, ont été transformées avec pAC-BETA ou avec pACCAR16 Δ CrtX. Ces cellules ont été cultivées à 37°C pendant 12 heures (sur la période d'une nuit) sans aucune condition de culture particulière. En effet, ces deux plasmides possèdent les opérons de gènes *Crt* qui s'expriment de façon constitutive, grâce au promoteur constitutif endogène du premier gène : *crtE*. Le β -carotène est alors synthétisé de façon constitutive. Les cellules sont récoltées le lendemain et incubées avec de l'éthanol 100% afin de les casser et d'en extraire les caroténoïdes contenus dans leur membrane. Les caroténoïdes contenus dans les cellules ont ensuite été dosés au spectrophotomètre. Les cellules ayant été transformées avec le plasmide pAC-BETA avaient synthétisé d'avantage de β -carotène que les cellules ayant été transformées par le plasmide pACCAR16 Δ CrtX. Le choix s'est donc porté sur l'utilisation du plasmide pAC-BETA pour synthétiser le β -carotène au sein du système d'expression hétérologue.

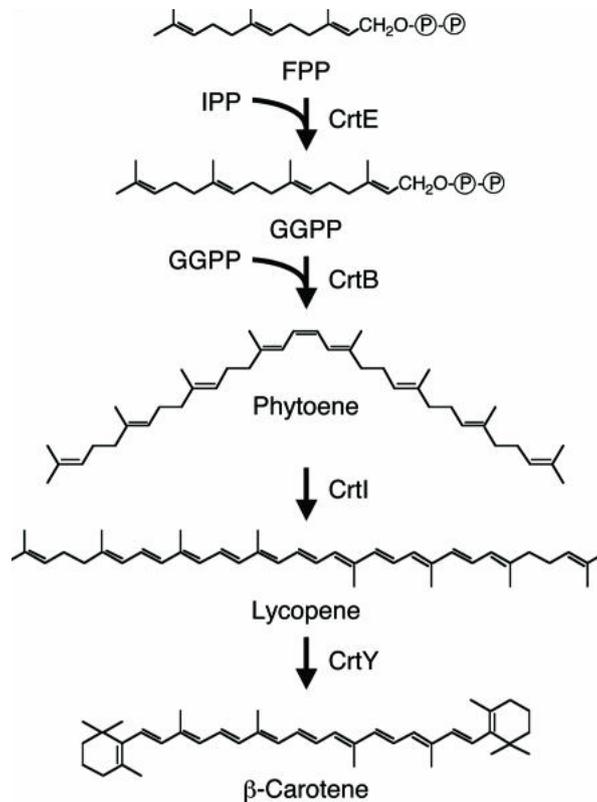


Figure 27

Schéma de la biosynthèse enzymatique du β-carotène

(T Nishizaki et al., 2007)

L'enzyme CrtE (GGPP synthase) permet la synthèse du GGPP à partir du FPP et du IPP. L'enzyme CrtB (phytoene synthase) forme le phytoène à partir de deux molécules de GGPP. L'enzyme CrtI (phytoene desaturase) permet la conversion du phytoène en lycopène et enfin, l'enzyme CrtY (lycopene cyclase) convertit le lycopène en β-carotène.

Abréviations :

FPP : farnesyl pyrophosphate

IPP : isopentenyl diphosphate

GGPP : geranylgeranyl pyrophosphate

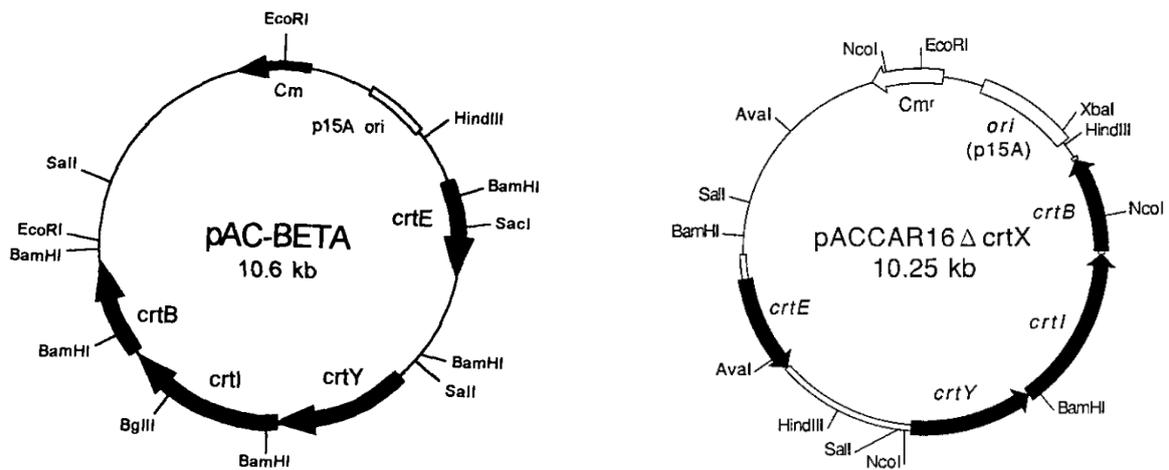


Figure 28

Représentation schématique des deux plasmides contenant les gènes nécessaires à la biosynthèse du β -carotène dans *E.coli*

(Cunningham et al., 1996 et Misawa et al., 1995)

Les deux plasmides, pAC-BETA (Cunningham et al., 1996) et pACCAR16 Δ crtX (Misawa et al., 1995) sont nécessaires à la synthèse du β -carotène à partir du FPP dans *E.coli*. Les 4 gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse du β -carotène sont organisés sous la forme d'un opéron, nommé opéron *Crt* contenant les gènes : *crtE*, *crtB*, *crtI* et *crtY* sous le contrôle du promoteur constitutif du premier gène: *crtE*. Les deux plasmides possèdent le gène Cm pour la résistance au chloramphénicol et l'origine de répliation p15A.

Légende :

Enzyme CrtE : GGPP synthase, formation du GGPP à partir du FPP et du IPP

Enzyme CrtB : phytoene synthase, formation du phytoène à partir de deux GGPPs

Enzyme CrtI : phytoene desaturase, conversion du phytoène en lycopène

Enzyme CrtY : lycopene cyclase, conversion du lycopène en β -carotène

1-2 Plasmides portant les gènes nécessaires à la conversion du β -carotène en échinénone, canthaxanthine ou zéaxanthine dans *Escherichia coli*

Chez *Synechocystis* PCC 6803 et *Arthrospira* PCC 7345, l'OCP lie le caroténoïde 3'hydroxyechinénone. Des études ont démontré qu'il est très difficile d'obtenir ce caroténoïde chez *E.coli* puisque les gènes impliqués dans sa synthèse sont aussi impliqués dans de voies de synthèse d'autres caroténoïdes (Makino et al., 2008b). Nous avons alors décidé de synthétiser trois autres caroténoïdes dans la cellule : l'échinénone, la zéaxanthine et la canthaxanthine. Nous savons que l'OCP de *Synechocystis* est capable de lier l'échinénone. Cette OCP possède les mêmes propriétés de photoactivation et de quenching de fluorescence des phycobilisomes que l'OCP liant le 3' hydroxyechinénone (C Punginelli et al., 2009 ; Wilson et al., 2010). Nous savons aussi que l'OCP de *Synechocystis* est capable de lier la zéaxanthine. Mais cette OCP n'est pas photoactive et elle est incapable d'induire le quenching de fluorescence des phycobilisomes (C Punginelli et al., 2009). Par contre elle est un très bon quencher de l'oxygène singulet (Sedoud et al., 2014). D'autre part, rien n'était connu à propos de l'OCP d'*Anabaena* ; nous savons uniquement que les cellules d'*Anabaena* synthétisent la canthaxanthine. Nous ne savons pas si les OCPs pourraient lier la canthaxanthine dans la cellule et si ces OCPs seraient photoactives. Mais nous supposons que les groupements carbonyles présents sur les deux cycles du squelette carboné de la canthaxanthine pourraient permettre la stabilisation de la fixation du caroténoïde dans l'OCP et sa photoactivité.

Les gènes *crtO* (*slr0088*) provenant de *Synechocystis* PCC 6803 et *crtW* (*alr3189*) provenant d'*Anabaena* PCC 7120 codent tous les deux des enzymes β -carotène ketolases. Le gène *crtR* (*slr1468*) de *Synechocystis* PCC 6803 code, elle, une enzyme β -carotène hydroxylase. Nous avons décidé de cloner les séquences correspondant aux cadres ouverts de lecture de ces gènes dans un plasmide dont leur expression est induite en présence d'arabinose, et qui possède une origine de répllication différente de celle du plasmide pAC-BETA. Suite à une erreur au sein de la commande (réception du plasmide pBAD/gIII A au lieu du plasmide pBAD/His A (Invitrogen)), nous avons modifié le plasmide reçu : pBAD/gIIIA afin d'abolir l'exportation des protéines recombinantes exprimées dans l'espace périplasmique cellulaire. Les cadres ouverts de lecture des gènes *crtO*, *crtW* et *crtR* ont alors été clonés dans le plasmide pBAD/gIIIA préalablement modifié. A cette fin, la région codant pour la "séquence de signal du gène III" a été supprimée par PCR mutagénèse avec le couple de primers pBADmut. Le plasmide pBAD/gIIIA modifié a été nommé pBAD. **Rappelons que les séquences correspondant aux cadres ouverts de lecture des gènes *crtO*, *crtW* et *crtR* ont**

été clonées dans le plasmide pBAD sous le contrôle du promoteur *araBad* dont l'expression des gènes est induite par l'arabinose. Dans toutes ces constructions, la séquence Shine Dalgarno est apportée par le plasmide pBAD. Les enzymes CrtO et CrtW catalysent la conversion du β -carotène en échinénone et canthaxanthine respectivement, et l'enzyme CrtR catalyse la conversion de β -carotène en zéaxanthine (Figure 29). Le plasmide pBAD a été digéré avec les enzymes de restriction *BglIII* et *EcoRI* pour cloner le gène *crtO* de *Synechocystis* PCC 6803 ; avec les enzymes de restriction *NcoI* et *EcoRI* pour cloner le gène *crtW* d'*Anabaena* PCC 7120 ; ou avec les enzymes de restriction *NcoI* et *XhoI* pour cloner le gène *crtR* de *Synechocystis* PCC 6803 (Figure 30). Les oligonucléotides pBAD-CrtO (F et R), pBAD-CrtW (F et R) et pBAD-CrtR (F et R) ont été utilisés pour amplifier ces gènes respectivement (Figure 32). Les plasmides résultants ont été nommés pBAD-CrtO, pBAD-CrtR et pBAD-CrtW (Figure 33). Les gènes ont été amplifiés par PCR en utilisant les génomes des cyanobactéries comme matrice. L'enzyme "iProof High Fidelity" polymérase (de chez BioRad) a été utilisée pour réaliser les clonages au sein de cette thèse.

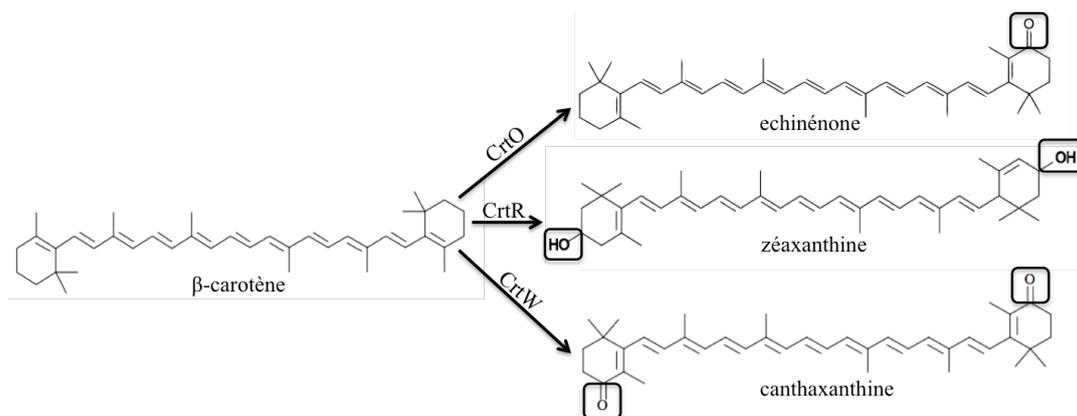


Figure 29

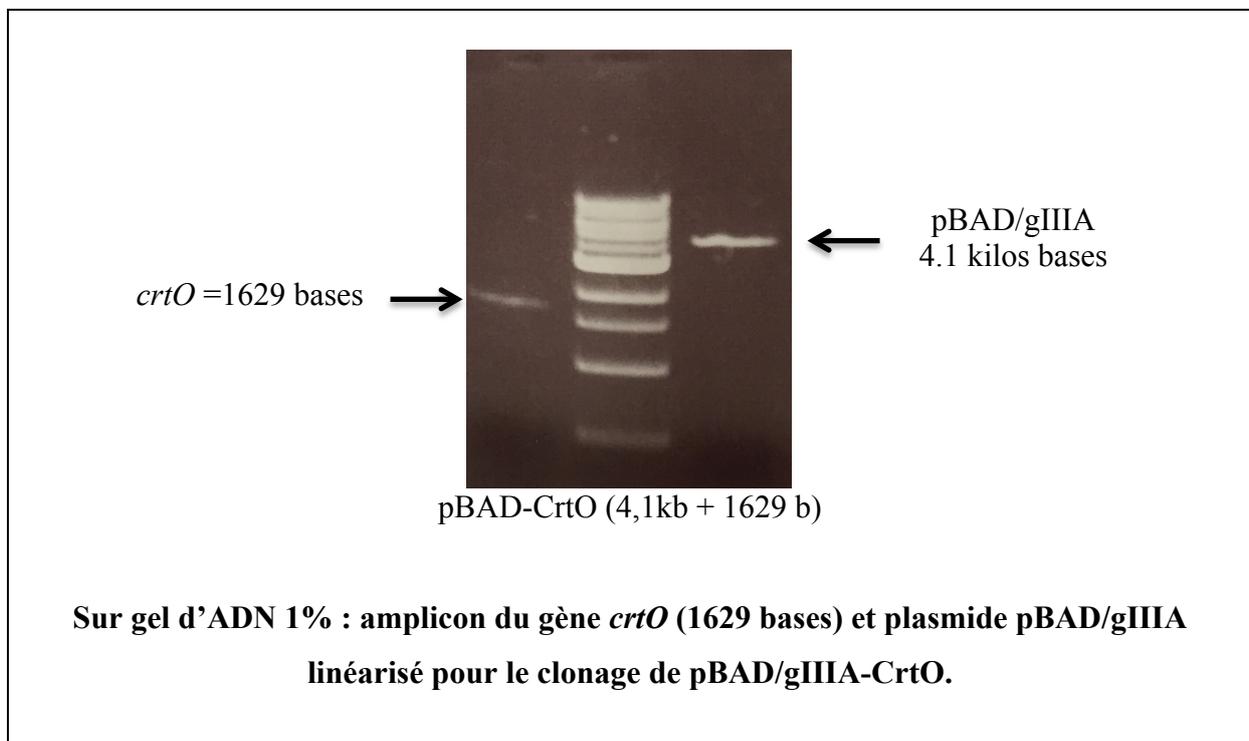
Schéma de la conversion du β -carotène par la CrtO, CrtR et la CrtW

Les enzymes CrtO et CrtW provenant de *Synechocystis* PCC 6803 et *Anabaena* PCC 7120 respectivement, sont des β -carotène ketolases. Ces enzymes ont la capacité d'ajouter un ou deux groupement(s) carbonyle(s) sur le β -carotène afin de le convertir en échinénone ou canthaxanthine, respectivement. L'enzyme CrtR de *Synechocystis* PCC 6803 est, elle, une β -carotène hydroxylase. Elle a donc la propriété d'ajouter un groupement hydroxyle sur le β -carotène afin de le convertir en zéaxanthine.

Constructions des plasmides pBAD-CrtO (Conversion du β -carotène en echinénone), pBAD-CrtR (Conversion du β -carotène en zéaxanthine) et pBAD-CrtW (Conversion du β -carotène en canthaxanthine)

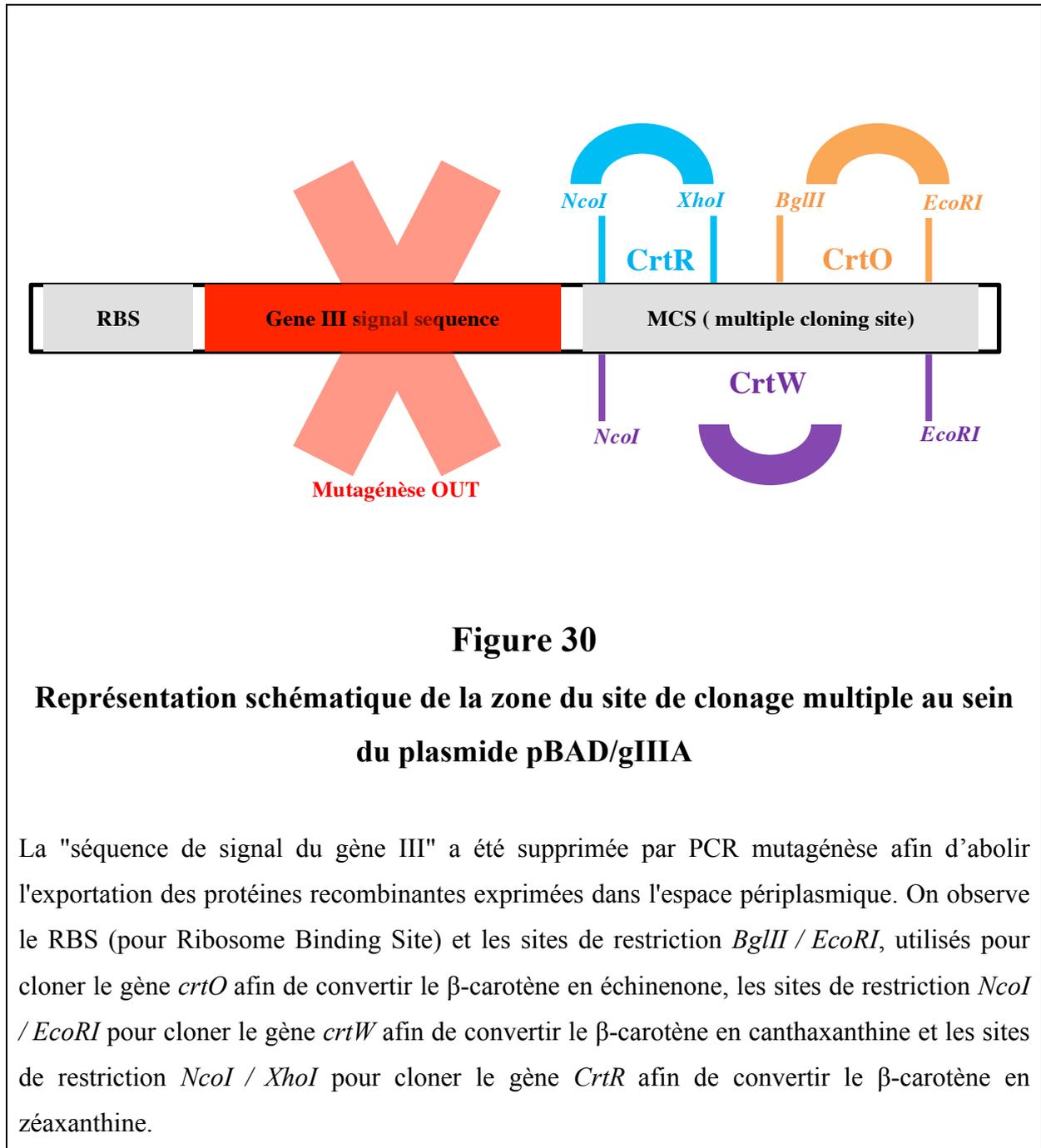
Les amplifications des gènes *crtO* et *crtR* ont été réalisées à partir de l'ADN génomique de *Synechocystis* PCC 6803 comme matrice. L'amplification du gène *crtW* a été réalisée à partir de l'ADN génomique de *Anabaena* PCC 7120 comme matrice.

Le couple d'oligonucléotides pBADgIII-CrtO a été utilisé pour amplifier le gène *crtO*. L'amplicon obtenu a ensuite été cloné dans le plasmide pBAD/gIIIa aux sites *Bgl*III et *Eco*RI.

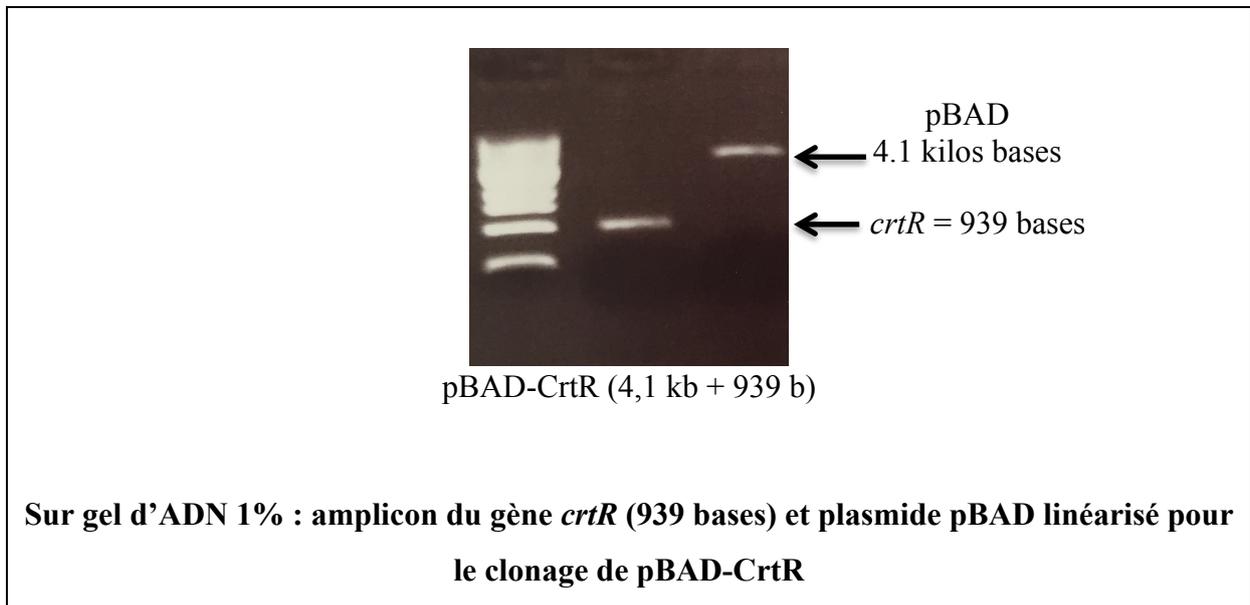


La délétion de la "séquence signal du gène III", séquence présente sur le plasmide pBAD/gIIIa, a ensuite été effectuée par mutagenèse dirigée (Figure 30), une fois le gène *crtO* cloné, avec le couple d'oligonucléotides pBAD-CrtO. Le plasmide ainsi créé se nomme pBAD-CrtO, permettant la synthèse de l'enzyme CrtO qui convertit le β -carotène en echinénone (Figure 29).

Avant de cloner les gènes codant les enzymes CrtR ou CrtW dans le plasmide pBAD/gIIIa, la "séquence signal du gène III" a été éliminée par PCR mutagénèse pour créer le plasmide pBAD avec le couple d'oligonucléotides pBADmut (Figure 30).

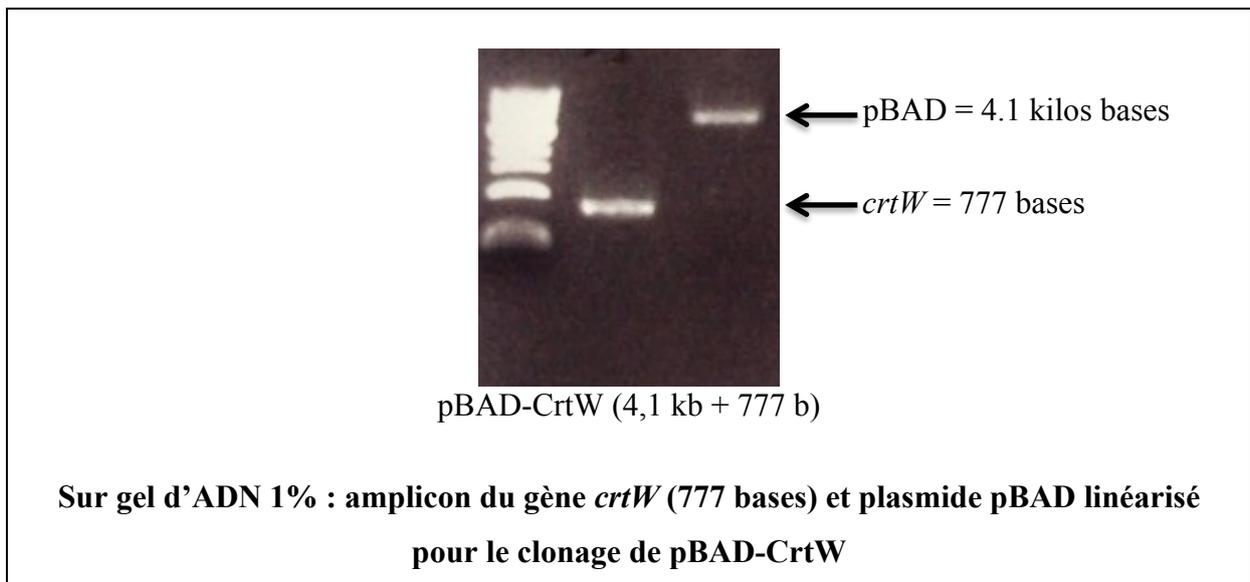


L'amplification du gène *CrtR* a été réalisée avec le couple d'oligonucléotides pBAD-CrtR. L'amplicon obtenu a ensuite été cloné dans le plasmide pBAD aux sites *NcoI* et *XhoI*.



Le plasmide ainsi créé se nomme pBAD-CrtR, permettant la synthèse de l'enzyme CrtR qui convertit le β -carotène en zéaxanthine (Figure 29).

L'amplification du gène *CrtW* a été réalisée avec le couple d'oligonucléotides pBAD-CrtW. L'amplicon obtenu a ensuite été cloné dans le plasmide pBAD aux sites *NcoI* et *EcoRI*.



Le plasmide ainsi créé se nomme pBAD-CrtW, permettant la synthèse de l'enzyme CrtW qui convertit le β -carotène en canthaxanthine (Figure 29).

1-3 Conditions de culture des cellules *Escherichia coli* synthétisant les caroténoïdes

Pour que les cellules *E.coli* synthétisent l'échinone, la canthaxanthine ou bien la zéaxanthine, ces dernières doivent être transformées avec les deux plasmides requis : celui nécessaire à la synthèse du β -carotène (pAC-BETA) et celui nécessaire pour convertir ce β -carotène en échinone (pBAD-CrtO), canthaxanthine (pBAD-CrtW) ou zéaxanthine (pBAD-CrtR).

De nombreuses conditions de culture ont été testées afin de déterminer les conditions optimales pour convertir le β -carotène synthétisé. Les tests ont été réalisés sur la souche *E.coli* transformée avec les plasmides pAC-BETA et pBAD-CrtO afin de convertir le β -carotène en échinone.

Initialement j'ai essayé d'induire le gène *crtO*, codant l'enzyme CrtO, permettant de convertir le β -carotène en échinone, en tout début de culture, soit en même temps que les cellules synthétisaient constitutivement le β -carotène. Différentes concentrations en arabinose, conseillées dans le manuel du plasmide pBAD/gIIIa (de 0,00002% à 0,2%), ont été testées. Aucune de ces conditions de culture ne m'a permis d'obtenir des souches *E.coli* qui étaient gorgées de caroténoïdes dans leur membrane. En effet, les cellules étaient très pâles, traduisant peu de caroténoïdes synthétisés. Les caroténoïdes sont à chaque fois dosés par spectrophotométrie et chromatographie en couche mince (CCM).

J'ai ensuite réalisé une expression différentielle des gènes portés par chaque plasmide. C'est à dire que j'ai laissé durant la nuit, à 37°C, les cellules croître et exprimer les enzymes permettant la synthèse constitutive du β -carotène. Le lendemain, j'ai dilué les cellules jusqu'à obtenir une densité optique cellulaire à 600 nm environ égale à 0,6 ou 0,8 ($DO_{600}=0,6-0,8$), qui correspond à la moitié de la phase exponentielle de croissance des cellules en milieu liquide, puis j'ai ajouté l'arabinose. A ce stade, les cellules étaient déjà de couleur jaunes intenses, prouvant que le β -carotène avait bien été synthétisé durant la nuit dans les cellules. J'ai à nouveau testé plusieurs concentrations d'arabinose (de 0,00002% à 0,2%) afin d'induire le gène *crtO*, codant l'enzyme CrtO permettant la conversion du β -carotène en échinone. Après avoir ajouté l'arabinose, j'ai laissé la culture sous agitation à 37°C durant la nuit. Le lendemain matin, les cellules ont été récoltées afin d'identifier les caroténoïdes présents. A notre agréable surprise, une condition avait bien fonctionné : les cellules étaient devenues plus rouges-orangées suite à la condition d'induction arabinose à 0,02%. Cela nous laissait supposer que l'induction différentielle des gènes nécessaires à la synthèse de l'échinone

était la bonne solution et que l'expression de l'enzyme CrtO était sensible à la concentration d'inducteur ajouté dans le milieu de culture.

Suite à ce résultat préliminaire prometteur pour la construction du système, les protéines cellulaires et les caroténoïdes ont été analysés en CCM et en gel SDS-PAGE 12%. La CCM a révélée que les membranes des cellules étaient gorgées de β -carotène et d'échinenone avec des traces de canthaxanthine, aussi synthétisée par l'enzyme CrtO de *Synechocystis* PCC 6803 en faible quantité (C Punginelli et al., 2009 ; Wilson et al., 2010, Figure 31 (CCM)). Les protéines totales de ces cellules ont été analysées sur gel de protéines SDS-PAGE 12%. Malgré l'induction du gène *crtO* avec 0,02% d'arabinose, l'enzyme CrtO n'est pas considérée comme étant surexprimée (Gel de protéines, Figure 35). Il est important de souligner ici que la surexpression de l'enzyme CrtO n'est pas réalisée pour purifier l'enzyme, mais pour que cette enzyme soit suffisamment exprimée dans la cellule afin de convertir le β -carotène en échinenone. C'est alors que même si on induit le gène *crtO* avec 0,02% d'arabinose, l'enzyme CrtO n'est pas surexprimée, mais sa quantité synthétisée est suffisante pour convertir le β -carotène présent dans les cellules. Cette expérience a été réalisée une seconde fois afin de s'assurer de la reproductivité du résultat.

Pour conclure, une induction séquentielle des gènes impliqués dans la synthèse des caroténoïdes liés par l'OCP est nécessaire. Il est tout d'abord important de laisser les cellules synthétiser de façon constitutive le β -carotène sur la nuit à 37°C puis d'induire le lendemain matin, à une $DO_{600}=0,6-0,8$, le gène permettant la conversion du β -carotène avec l'arabinose à 0,02% et de laisser les cellules toute la nuit à 37°C pour synthétiser l'échinenone, la canthaxanthine ou la zéaxanthine.

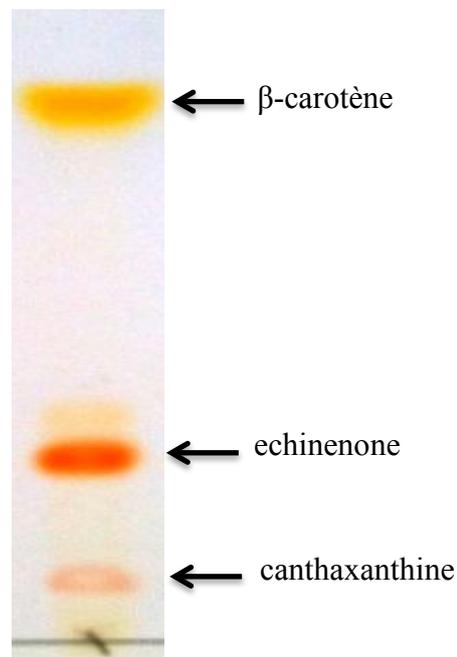


Figure 31

CCM de l'extrait des caroténoïdes totaux synthétisés par *E.coli* possédant les plasmides pAC-BETA et pBAD-CrtO

Les cellules *E.coli* BL21 transformées avec les plasmides pAC-BETA et pBAD-CrtO ont été cultivées over night à 37°C sous agitation pour la synthèse constitutive du β -carotène. Le lendemain, après dilution à $DO_{600}=0,6$ de la culture des cellules gorgées de β -carotène dans leur membrane, 0,02% d'arabinose a été ajouté. Les cellules ont à nouveau été cultivées over night à 37°C pour que le β -carotène soit converti en echinenone avec l'induction du gène codant la CrtO en présence d'arabinose 0,02%. Le lendemain, les cellules sont récoltées, cassées avec de l'éthanol 100% et analysées en CCM pour identifier les caroténoïdes présents. Les cellules BL21 + pAC-BETA/pBAD-CrtO synthétisent efficacement l'echinenone avec un pool constant et constitutif de β -carotène et des traces de canthaxanthine.

2^{ème} sous-partie

Création des souches *Escherichia coli* produisant l'OCP de *Synechocystis*, d'*Arthrospira* et d'*Anabaena*

2-1 Construction des plasmides contenant les gènes *ocp* de *Synechocystis* PCC 6803, d'*Arthrospira* PCC 7345 ou d'*Anabaena* PCC 7120

Rappelons ici que les séquences correspondant aux cadres ouverts de lecture des gènes *ocp* ont été clonées dans le plasmide pCDFDuet-1 sous le contrôle du promoteur *T7lac*. Au sein de ces constructions, la séquence Shine Dalgarno est apportée par le plasmide pCDFDuet-1. Le plasmide pCDFDuet-1 contient le promoteur *T7lac*, la résistance à la streptomycine / spectinomycine et l'origine de replication CDF, différente de celles présentes dans les deux autres plasmides du système (pAC-BETA et pBAD). L'expression du gène *ocp* est induite en présence d'IPTG dans le milieu de culture. Le plasmide pCDFDuet-1 a été digéré avec *EcoRI* et *NotI* au sein du premier site de clonage multiple (MCS1) pour le clonage des différents gènes *ocp* (*Synechosystis* PCC6803, *Arthrospira* PCC7345 et *Anabaena* PCC 7120).

Les oligonucléotides OCPsyn-pDuet (F et R) ont été utilisés pour amplifier le gène *ocp* de *Synechocystis* (1104 nucléotides) en utilisant l'ADN génomique de *Synechocystis* PCC 6803 comme matrice. Les oligonucléotides OCPana-pDuet (F et R) ont été utilisés pour amplifier le gène *ocp* d'*Anabaena* (1076 nucléotides) en utilisant l'ADN génomique de *Anabaena* PCC 7120 comme matrice. Les oligonucléotides OCParthro-pDuet (F et R) ont été utilisés pour amplifier le gène *ocp* d'*Arthrospira* (1355 nucléotides) en utilisant le plasmide pOF7345 comme matrice (Jallet et al, 2014). Les produits PCR résultants ont été clonés dans le plasmide pCDFDuet-1 au sein des sites de restriction *EcoRI* et *NotI*, pour créer les plasmides pCDF-OCPsyn-pDuet, pCDF-OCPana-pDuet, pCDF-OCParthro-pDuet. Notons ici que les OCPs qui seront isolées de ces cellules contiendront une extension de 15 acides aminés au sein de leur extrémité N-terminale. Cette extension contient une étiquette 6-histidines.

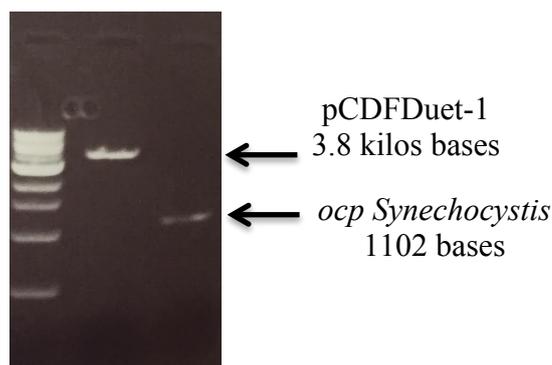
Construction des plasmides pCDF-OCP *Synechocystis* PCC 6803, pCDF-OCP *Arthrospira* PCC 7345 et pCDF-OCP *Anabaena* PCC 7120

L'amplification du gène *ocp* a été réalisée à partir de l'ADN génomique de *Synechocystis* PCC 6803 comme matrice, avec le couple d'oligonucléotides pCDF-OCPsyn-pDuet (Figure 32).

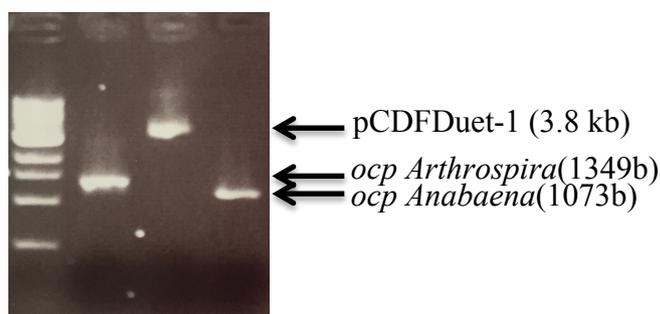
L'amplification du gène *ocp* a été réalisée à partir du plasmide pOF7345 comme matrice (Jallet et al, 2014), avec le couple d'oligonucléotides pCDF-OCParthro-pDuet (Figure 32).

L'amplification du gène *ocp* a été réalisée à partir de l'ADN génomique d'*Anabaena* PCC 7120 comme matrice, avec le couple d'oligonucléotides pCDF-OCPana-pDuet (Figure 32).

Les amplicons obtenus ont été clonés dans le plasmide pCDFDuet-1 aux sites *EcoRI* et *NotI*.



Amplicon du gène *ocp Syn* (1102 bases) et pCDFDuet-1 linéarisé pour le clonage de pCDF-OCPsyn-pDuet



Amplicons des gènes *ocp Arthro* et *Ana* (1349 bases et 1073 bases) et pCDFDuet-1 linéarisé pour le clonage de pCDF-OCParthro-pDuet et pCDF-OCPana-pDuet

Les plasmides ainsi créés se nomment pCDF-OCPSyn-pDuet, pCDF-OCParthro-pDuet et pCDF-OC Pana-pDuet, permettant la synthèse des apo-OCPs de *Synechocystis* PCC 6803, d'*Arthrospira* PCC 7345 et d'*Anabaena* PCC 7120 (Figure 33).

| Plasmides | Noms des | Séquence des oligonucléotides |
|---------------------------------------|--|---|
| Restriction | oligonucléotides | |
| pBADgIII- CrtO | pBADgIII-CrtO-F pBADgIII-CrtO-R | aacaga agatct atcaccaccgatgttgc tctgtt gaattc gcttcacttgccatacac |
| BgIII/EcoRI | | |
| pBAD-CrtO | pBAD-CrtO-F pBAD-CrtO-R | caggaggaattaacatgatcaccaccgatgttgcattattggggcg catggttaattcctcctgtagcccaaaaaacgggatggagaaacag |
| pBAD | pBAD-mut-F pBAD-mut-R | caggaggaattaacatgaccatggagctcgagatctgcagctggtac catggttaattcctcctgtagcccaaaaaacgggatggagaaacag |
| pBAD-CrtR | pBAD-CrtR-F pBAD-CrtR-R | aacaga ccatgg gctgccaggagtccgtcata tctgtt ctcgag caataacttaccgat |
| NcoI/XhoI | | |
| pBAD-CrtW | pBAD-CrtW-F pBAD-CrtW-R | gatata ccatgg ttcagtgcaacatcatc gcatc gaattc agtcgtattccagcag |
| NcoI/EcoRI | | |
| pCDF- OCPSyn-pDuet | pCDF-OCPSyn-pDuet-F pCDF-OCPSyn-pDuet-R | aacaga gaattc tccattcaccattgactct tctgtt gcggccgc tgtaacattaacttatga |
| EcoRI/ NotI | | |
| pCDF- OC Pana-pDuet | pCDF-OC Pana-pDuet-F pCDF-OC Pana-pDuet-R | aacaga gaattc tgcaatactatcgattccgc tctgtt gcggccgc gactcaatcttaaacttgta |
| EcoRI/ NotI | | |
| pCDF- OCParthro- pDuet | pCDF-OCParthro-pDuet-F pCDF-OCParthro-pDuet-R | aacaga gaattc tccattcaccattgactcggc tctgtt gcggccgc ttatcattacctaattgagcatt |
| EcoRI/ NotI | | |

Figure 32

Noms des plasmides créés et oligonucléotides utilisés

pour cloner les gènes codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse des caroténoïdes et les gènes *ocp*

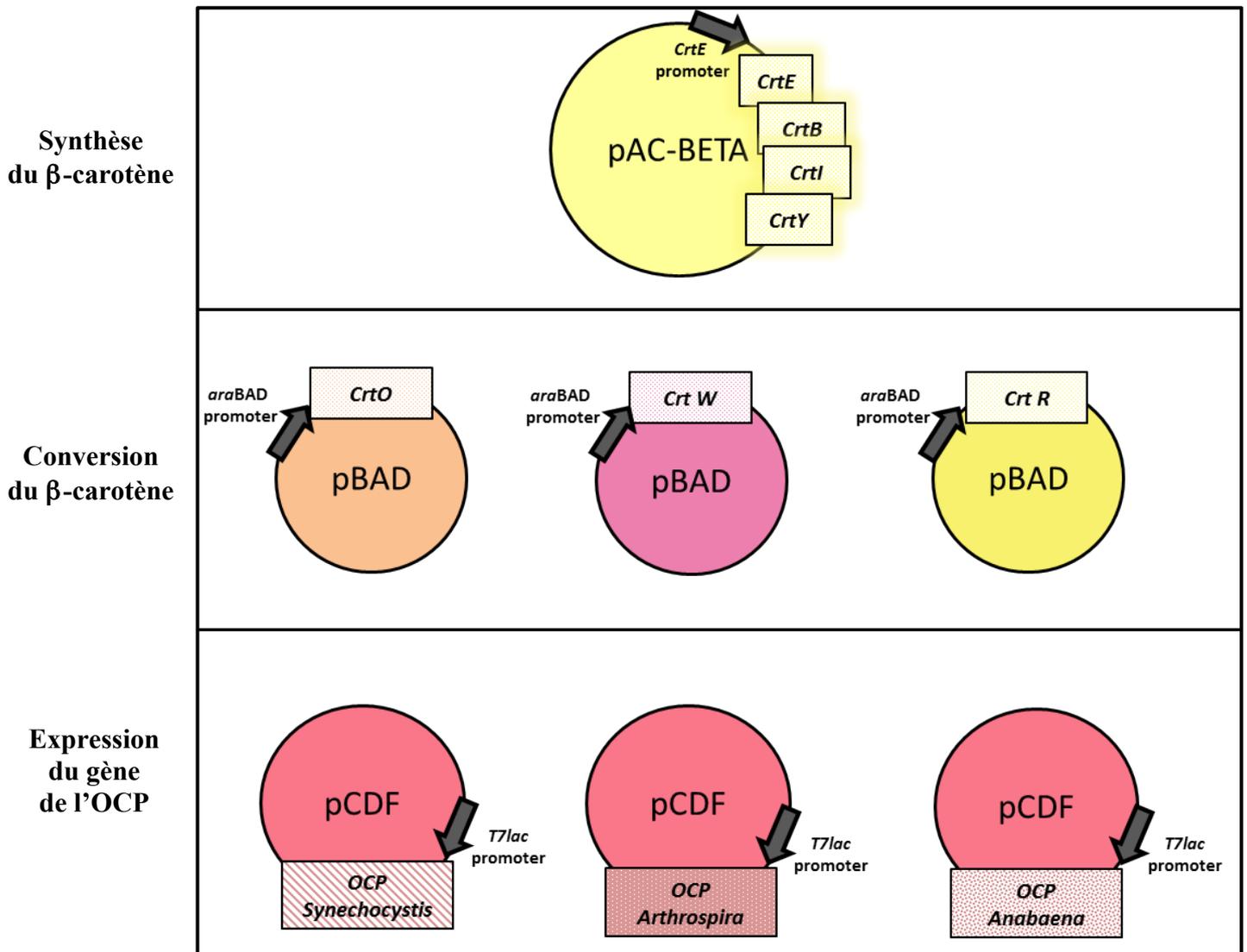


Figure 33

Schéma des plasmides créés pour la biosynthèse de l'OCP dans *Escherichia coli*

2-2 Conditions de culture des cellules *Escherichia coli* produisant l'OCP

Afin que les cellules *E. coli* produisent les OCPs de *Syn*, *Arthro* ou *Ana* liant l'ECN, la CAN ou bien la ZEA, ces dernières doivent être transformées avec les 3 plasmides requis (Figure 34) : celui nécessaire à la synthèse du β -carotène (pAC-BETA), celui convertissant le β -carotène en échinénone (pBAD-CrtO), canthaxanthine (pBAD-CrtW) ou zéaxanthine (pBAD-CrtR) et celui nécessaire à la production de l'apo-protéine OCP de *Synechocystis* (pCDF-OCPsyn-pDuet), d'*Arthrospira* (pCDF-OCParthro-pDuet) ou d'*Anabaena* (pCDF-OCPana-pDuet). Rappelons que les OCPs qui seront isolées de ces cellules *E. coli* contiendront une extension de 15 acides aminés au sein de leur extrémité N-terminale. Cette extension contient une étiquette 6-histidines.

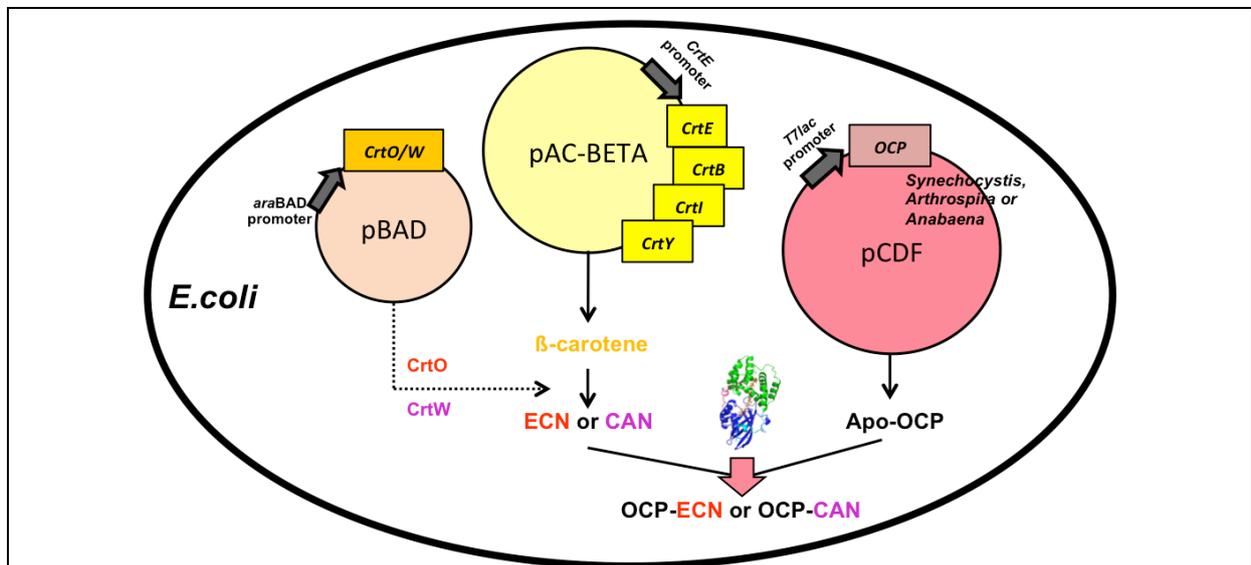


Figure 34

Représentation schématique de la production de l'OCP dans *E. coli* avec le système 3 plasmides

E. coli produisant l'OCP contient trois plasmides: le plasmide pAC-BETA (jaune) portant les gènes impliqués dans la synthèse du β -carotène (*crtE*, *crtB*, *crtI* et *crtY*) sous le contrôle du promoteur constitutif *crtE*; le plasmide pBAD (orange), portant les gènes codant les enzymes permettant la conversion du β -carotène en ECN ou CAN sous le contrôle du promoteur *araBAD* (arabinose inducible); le plasmide pCDF-OCP (rouge) portant les gènes *ocp* de *Syn*, *Arthro* ou *Ana*, sous le contrôle du promoteur *T7lac*, IPTG inducible.

De nombreuses conditions de culture ont été testées afin de déterminer les conditions optimales pour produire les OCPs *in vivo*. Les tests ont été réalisés sur la souche transformée avec le plasmide pAC-BETA, pBAD-CrtO et pCDF-OCPSyn-pDuet afin de convertir le β -carotène en echinenone et de produire l'OCP de *Synechocystis* liant ce caroténoïde directement dans la cellule.

L'induction séquentielle des gènes impliqués dans la synthèse des caroténoïdes liés par l'OCP a été prouvée nécessaire. Il est tout d'abord important de laisser les cellules synthétiser le β -carotène constitutivement puis d'induire l'expression du gène de l'enzyme permettant de convertir le β -carotène en echinenone, canthaxanthine ou zéaxanthine. Deux questions se posaient alors. La première concernait l'induction IPTG du gène *ocp* cloné dans le plasmide pCDF-OCPSyn-pDuet. Fallait-il induire en même temps l'expression du gène *ocp* et l'expression du gène codant l'enzyme permettant de convertir le β -carotène en echinenone ou faut-il induire séquentiellement les gènes portés par ces deux plasmides ? La deuxième impliquait la concentration en IPTG à utiliser pour l'induction. Les gènes clonés au sein de plasmides possédant des promoteurs *T7lac*, sont communément induits avec 1mM d'IPTG. Comme les cellules produisant l'OCP sont transformées avec 3 plasmides, j'ai testé 5 concentrations en IPTG : 0,2mM / 0,4mM / 0,6mM / 0,8mM et 1mM. Les 4 concentrations en IPTG inférieures à 1mM sont expérimentées pour ne pas que les cellules soient énergétiquement trop sollicitées par la réplication et l'induction des gènes portés par 3 plasmides.

Pour débiter, j'ai essayé d'induire en même temps l'arabinose à 0,02% et l'IPTG. Pour cela, j'ai laissé durant la nuit, à 37°C, les cellules croître et exprimer les enzymes permettant la synthèse constitutive du β -carotène grâce au plasmide pAC-BETA. Le lendemain, j'ai dilué les cellules jusqu'à obtenir une densité optique cellulaire à 600 nm environ égale à 0,6 ou 0,8 ($DO_{600}=0,6-0,8$), puis j'ai induit le gène *crtO* avec 0,02% d'arabinose pour convertir le β -carotène en echinenone et en même temps avec 0,2mM / 0,4mM / 0,6mM / 0,8mM ou 1mM d'IPTG pour induire le gène *ocp* afin de produire l'apo-OCP grâce au plasmide pCDF-OCPSyn-pDuet, le tout à 28°C (température faible pour que la protéine soit bien repliée). Le lendemain matin les cellules récoltées étaient devenues jaunes pâles, ce qui nous laissait supposer que l'induction arabinose et IPTG en même temps n'était pas la bonne solution.

J'ai par la suite expérimenté l'induction séquentielle des gènes avec 0,02% arabinose et l'IPTG. Pour cela, j'ai laissé durant la nuit, à 37°C, les cellules croître et exprimer les enzymes permettant la synthèse constitutive du β -carotène (pAC-BETA). Le lendemain, j'ai dilué les cellules jusqu'à obtenir une densité optique cellulaire à 600 nm environ égale à 0,6

ou 0,8 ($DO_{600}=0,6-0,8$) pour induire le gène *crtO* avec 0,02% d'arabinose pour convertir le β -carotène en échinénone. J'ai laissé les cellules convertir le β -carotène en échinénone durant la nuit à 37°C. Le lendemain j'ai dilué les cellules jusqu'à obtenir une densité optique cellulaire à 600 nm environ égale à 1-1,2 ($DO_{600}=1,2$) correspondant au début de la phase stationnaire de croissance des *E.coli* ayant pour but de ne pas diluer en excès la culture qui présente des cellules gorgées d'échinénone dans leur membrane. L'induction IPTG à 0,2mM / 0,4mM / 0,6mM / 0,8mM ou 1mM a été réalisée pour induire l'expression du gène *ocp* cloné dans le plasmide pCDF-OCPsyn-pDuet. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant la nuit à 28°C. Le lendemain matin, les cellules ont été récoltées et une condition avait bien fonctionné : les cellules étaient devenues rouges intenses suite à l'induction IPTG à 0,2mM. L'induction séquentielle des gènes impliqués dans la synthèse de l'OCP, portés sur les 3 plasmides était nécessaire. La concentration en IPTG était importante, les cellules semblaient être très sensibles à sa concentration. Les protéines totales, extraites de ces cellules ont été analysées sur gel de protéines SDS-PAGE 12%. L'induction du gène *crtO* avec 0,02% arabinose met en évidence sur le gel une enzyme CrtO peu surexprimée mais suffisante pour convertir le β -carotène en échinénone. L'induction du gène *ocp* avec seulement 0,2mM d'IPTG montre que la protéine synthétisée est, elle, surexprimée (Gel de protéines, Figure 35). Cette expérience a été réalisée une seconde fois afin de s'assurer de la reproductivité du résultat.

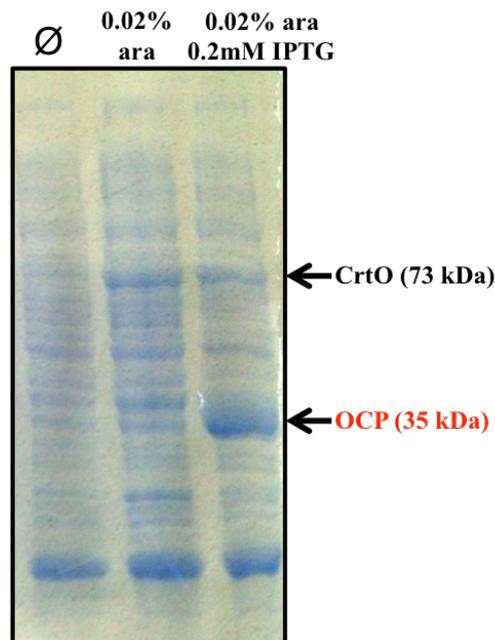


Figure 35

Gel de protéines totales, extraites des cellules *E.coli* (SDS-PAGE 12%)

La première piste (Ø) montre les protéines totales extraites d'une souche *E.coli* non transformée (contrôle).

La deuxième piste (0,02% ara) montre les protéines totales, extraites de la souche *E.coli* transformée avec les 3 plasmides pAC-BETA, pBAD-CrtO et pCDF-Syn-pDuet, induite uniquement avec 0,02% d'arabinose. L'enzyme CrtO est faiblement exprimée dans la cellule car une légère bande à 73 kDa est observée sur le gel.

La troisième piste (0,02% ara + 0,2mM IPTG) montre les protéines totales, extraites de la souche *E.coli* transformée avec les 3 plasmides pAC-BETA, pBAD-CrtO et pCDF-Syn-pDuet, permettant la production de l'OCP de *Synechocystis* liant l'échinénone, induite avec 0,02% d'arabinose et 0,2mM d'IPTG. L'enzyme CrtO est faiblement exprimée dans la cellule car une légère bande est observée sur le gel et l'OCP est, elle, largement sur-exprimée car une intense bande à 35 kDa est observée.

Pour conclure, une induction séquentielle des gènes portés sur les 3 plasmides, impliqués dans la production de l'OCP est nécessaire. Il est tout d'abord important de laisser les cellules synthétiser de façon constitutive le β -carotène sur la nuit à 37°C, d'induire le lendemain matin, à une $DO_{600}=0,6-0,8$, le gène *crtO* avec 0,02% d'arabinose et de laisser les cellules toute la nuit à 37°C convertir le β -carotène en échinénone, canthaxanthine ou zéaxanthine, et enfin, d'induire le lendemain, à une $DO_{600}=1-1,2$, le gène *ocp* avec de l'IPTG à 0,2mM et de laisser les cellules toute la nuit à 28°C pour que l'apo-OCP soit synthétisée et bien repliée pour qu'elle puisse lier le caroténoïde déjà présent dans les membranes d'*E.coli* afin de reconstituer l'OCP directement dans la cellule, *in vivo*. L'étude approfondie des conditions de culture a été indispensable pour que l'OCP rencontre et attache son caroténoïde *in vivo*. Le choix des promoteurs et l'ordre des inductions des gènes se sont avérés cruciaux pour obtenir un système de production de l'OCP optimisé.

Pour illustrer la robustesse de ce système, les OCPs recombinantes de *Synechocystis* PCC 6803 et *Arthrospira* PCC 7345 liant l'échinénone et l'OCP de *Synechosystis* PCC 6803 liant la zéaxanthine ont été produites et une photo a été prise des culots cellulaires de ces cellules. On observe que les cellules productives des OCPs de *Synechocystis* PCC 6803 et d'*Arthrospira* PCC 7345 liant l'échinénone sont orangées intenses (Figure 36, culots 1 et 2) et les cellules productives de l'OCP de *Synechosystis* PCC 6803 liant la zéaxanthine sont jaunes intenses (Figure 36, culot 3).

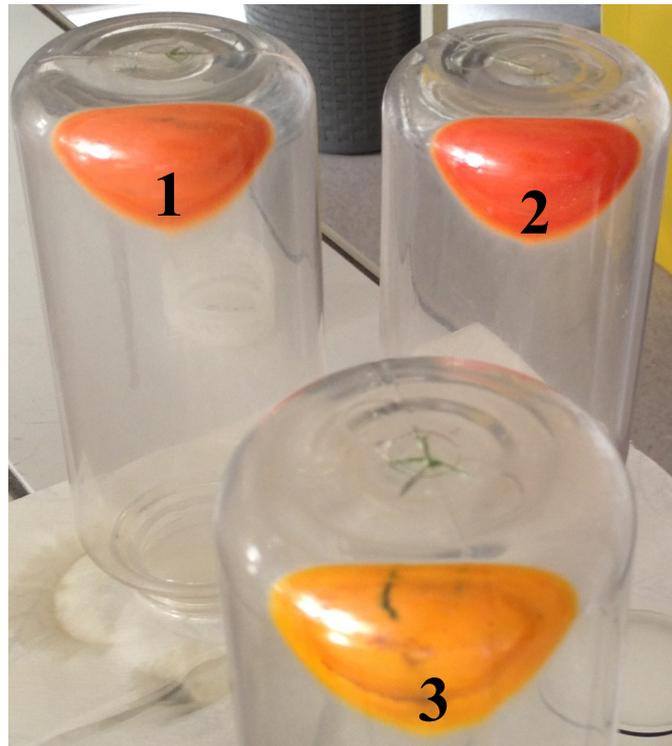


Figure 36

Photographie des cellules *Escherichia coli* produisant différentes OCPs

Les cellules *E.coli* produisant les OCPs de *Synechocystis* (1) et d'*Arthrospira* (2) liant l'échinenone sont de couleur orangées intenses tandis que les cellules produisant l'OCP de *Synechosystis* liant la zéaxanthine (3) est jaune intense.

(1) Les cellules produisant l'OCP de *Synechosystis* liant l'échinenone, ont été transformées avec les plasmides pAC-BETA + pBAD-CrtO + pCDF-OCPsyn-pDuet.

(2) Les cellules produisant l'OCP d'*Arthrospira* liant l'échinenone, ont été transformées avec les plasmides pAC-BETA + pBAD-CrtO + pCDF-OCParthro-pDuet.

(3) Les cellules produisant l'OCP de *Synechosystis* liant l'échinenone, ont été transformées avec les plasmides pAC-BETA + pBAD-CrtR + pCDF-OCPsyn-pDuet.

Pour conclure ce premier chapitre, nous pouvons affirmer que le système de production hétérologue de l'OCP dans *E.coli* a été un succès.

Notons qu'après purification et isolation de ces OCPs portées par la plasmide pCDF-OCP-pDuet au sein du système d'expression 3 plasmides, environ 30 à 45% des OCPs totales obtenues, quelque soit le caroténoïde lié (échinénone, canthaxanthine ou zéaxanthine), lient le caroténoïde. Cela signifie qu'environ 60% des OCPs produites avec la construction pCDF-OCP-pDuet ne lient pas son caroténoïde *in vivo*. Cette observation nous a donc donné l'envie d'optimiser le rendement de production d'OCP liant son caroténoïde, et pour ce faire, des modifications de séquence du gène *ocp* ont été réalisées. Ces modifications ainsi que l'étude des protéines obtenues sont présentées dans le deuxième chapitre de résultats « Biosynthèse et caractérisation des OCPs de *Synechocystis* PCC 6803, *Arthrospira* PCC 7345 et *Anabaena* PCC 7120 liant l'échinénone et la canthaxanthine dans *E.coli*».

Chapitre II

Biosynthèse et caractérisation des OCPs produites
chez *Escherichia coli*

Résumé de la publication

Mon projet de doctorat consistait à produire l'OCP dans l'organisme hétérologue *E.coli*, attachant directement le caroténoïde *in vivo*. Suite au succès de la construction des souches capables de synthétiser les OCPs de *Synechocystis* PCC 6803, d'*Arthrospira* PCC 7345 et d'*Anabaena* PCC 7120 liant l'échinenone ou la canthaxanthine *in vivo*, et ce grâce au choix des plasmides, des promoteurs et de l'ordre des inductions des gènes, le travail qui s'en suivait fut d'augmenter le rendement de production hétérologue de ces OCPs par modifications de séquence codante et de caractériser les protéines obtenues.

La premier volet du projet fut de modifier la séquence du gène de l'OCP en position 5', suite à l'observation faite sur les rendements en holo-OCP (OCP avec son caroténoïde lié) obtenus lorsque l'OCP possédait une extension de 15 acides aminés contenant l'étiquette 6-histidines en position N-terminale (plasmide pCDF-OCP-pDuet) en comparaison avec l'OCP qui ne possédait aucune extension en position N-terminale, mais qui était étiquetée en position C-terminale (plasmide pCDF-OCP-Ctag). L'étiquette placée en position C-terminale, sans prolongation en position N-terminale, faisait chuter drastiquement le rendement en holo-OCP. De nombreuses modifications de séquence du gène de l'OCP en position 5' ont été testées et analysées afin de trouver une construction qui permettait d'obtenir environ 100% d'holo-OCP. Les résultats ont montré qu'une construction permettait d'obtenir 100% d'holo-OCP pour l'OCP de *Synechocystis* PCC 6803 : une extension en position N-terminale de 9 acides aminés contenant l'étiquette 6-histidines (pCDF-OCPSyn-3aaNtag). Cette modification a été réalisée pour produire les OCPs d'*Arthrospira* PCC 7345 et d'*Anabaena* PCC 7120, puis ces protéines ont été étudiées.

Le second volet du projet fut d'étudier si les OCPs recombinantes obtenues étaient capables, comme l'OCP native de *Synechocystis* PCC 6803, d'induire une diminution de la fluorescence des phycobilisomes qui révèle une augmentation de la dissipation thermique de l'énergie. Cet étude a été fait en utilisant un système de reconstitution *in vitro* développé au sein du laboratoire (Gwizdala et al., 2011). Il fallait aussi étudier si elles étaient capables de quencher l'oxygène singulet, synonyme de leur capacité à lutter contre le stress oxydant (Sedoud et al., 2014) grâce aux mesures réalisées en résonance paramagnétique électronique (RPE).

Pour conclure ce travail, en plus d'obtenir une grande quantité de ces OCPs recombinantes grâce au système mis en oeuvre, cette production a permis de mieux les caractériser par des outils biochimiques et biophysique. Elles se convertissent toutes en forme active (rouge) à la lumière puis, reviennent en forme inactive (orange) à l'obscurité; en d'autres termes, elles sont toutes photoactives. Elles sont aussi capables de quencher la fluorescence des phycobilisomes de *Synechocystis* PCC 6803 *in vitro*. Le plus remarquable est qu'elles possèdent toutes la faculté de neutraliser l'oxygène singulet au même titre que l'OCP native de *Synechocystis* PCC 6803, quel que soit le caroténoïde qui est attaché par la protéine (echinenone ou canthaxanthine). Toutes les OCPs produites dans *E.coli* sont d'excellents antioxydants.

Ce modèle de production hétérologue de l'OCP constitue une avancée fondamentale dans l'étude des protéines à caroténoïde et dans la production d'antioxydants solubles qui présentent un grand intérêt pour les industries pharmaceutiques et cosmétiques (Bourcier de Carbon, C., et al., 2015).

Contribution à ce travail

A. Thurotte a réalisé les mesures de fluorescence PAM, A. Wilson a effectué le clonage du plasmide pBAD-CrtW et l'extraction de l'ADN génomique de *Synechocystis* PCC 6803 et de l'ADN génomique d'*Anabaena* PCC 7120. F. Perreau a dosé les caroténoïdes par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). J'ai effectué toutes les constructions de biologie moléculaire, la mise en oeuvre du système de production hétérologue de l'OCP, la biochimie et les études de spectroscopie et de résonance paramagnétique électronique (RPE).

Ce chapitre se réfère à la publication :

Bourcier de Carbon, C., Thurotte, A., Wilson, A., Perreau, F. & Kirilovsky, D. Biosynthesis of soluble carotenoid holoproteins in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 5, 9085; DOI:10.1038/srep09085 (2015).

Biosynthesis of soluble carotenoid holoproteins in *Escherichia coli*

Céline Bourcier de Carbon^{1,2,3}, Adrien Thurotte^{1,2}, Adjélé Wilson^{1,2}, François Perreau^{4,5} and Diana Kirilovsky^{1,2}

¹Commissariat à l’Energie Atomique (CEA), Institut de Biologie et Technologies de Saclay (iBiTec-S), 91191 Gif sur Yvette, France

²Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 8221, 91191 Gif sur Yvette, France

³Phycosource, 13 boulevard de l’Hautil, 95092 Cergy Cedex, France

⁴INRA, Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR 1318, ERL CNRS 3559, Saclay Plant Sciences, RD10, F-78026 Versailles, France

⁵AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR 1318, ERL CNRS 3559, Saclay Plant Sciences, RD10, F-78026 Versailles, France

Corresponding author:

Diana Kirilovsky, iBiTec-S, Bât 532, CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette, FRANCE; E-mail:

diana.kirilovsky@cea.fr

Abstract

Carotenoids are widely distributed natural pigments that are excellent antioxidants acting in photoprotection. They are typically solubilized in membranes or attached to proteins. In cyanobacteria, the photoactive soluble Orange Carotenoid Protein (OCP) is involved in photoprotective mechanisms as a highly active singlet oxygen and excitation energy quencher. Here we describe a method for producing large amounts of holo-OCP in *E.coli*. The six different genes involved in the synthesis of holo-OCP were introduced into *E. coli* using three different plasmids. The choice of promoters and the order of gene induction were important: the induction of genes involved in carotenoid synthesis must precede the induction of the *ocp* gene in order to obtain holo-OCPs. Active holo-OCPs with primary structures derived from several cyanobacterial strains and containing different carotenoids were isolated. This approach for rapid heterologous synthesis of large quantities of carotenoproteins is a fundamental advance in the production of antioxidants of great interest to the pharmaceutical and cosmetic industries.

Introduction

The human body is constantly exposed to external (ultraviolet radiation, pollution, cigarette smoke, toxic chemicals) and internal (side reactions of respiration, oxidation of nutrients) factors which induce the formation of Reactive Oxygen Species (ROS). Due to the harmful effects of ROS, the pharmaceutical and cosmetic industries have a significant interest in the production of new antioxidant molecules. For many applications, the medium in which the anti-oxidant effect is desired is water-based and requires a hydrophilic antioxidant. Water-soluble carotenoid proteins fit these requirements. Carotenoids are widely distributed natural pigments, which play important roles in photosynthesis, nutrition and illness prevention. They have a protective role in photosynthetic and non-photosynthetic organisms including humans by serving as protective colorants or by quenching singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and free radicals induced by exogenous sensitizers or produced by metabolic processes (reviews^{1, 2, 3, 4}). Carotenoids, which are relatively hydrophobic molecules, typically occur solubilized in membranes or non-covalently attached to membrane or soluble proteins. In photosynthetic organisms, they are mainly found in the membrane-embedded, chlorophyll containing antennae where they have the dual activities of harvesting solar energy and quenching excess energy and $^1\text{O}_2$ (see reviews^{1, 5}). A number of water-soluble carotenoid proteins from photosynthetic organisms have also been characterized^{6, 7, 8}. The cyanobacterial Orange Carotenoid Protein (OCP) is one of the best-characterized soluble carotenoid proteins. We have recently demonstrated that the OCP is an excellent antioxidant--better than vitamin C, trolox, tocopherol and isolated carotenoids⁹. The OCP protects cyanobacteria by quenching the $^1\text{O}_2$ formed in reaction centers and antennae⁹. It was first described by Holt and Krogmann in 1981¹⁰ and is present in the majority of cyanobacteria containing phycobilisomes (PBs), the large extra-membrane antenna formed by blue and red phycobiliproteins¹¹.

The OCP is a photoactive protein¹²; it is essential for a photoprotective mechanism that decreases the excitation energy arriving at photochemical reaction centers¹³. The OCP has an α -helical N-terminal domain (residues 15-165) and an α/β C-terminal domain (residues 190-317) (Fig 1A)¹⁴. The carotenoid, 3'-hydroxyechinenone (hECN), spans both domains, which are joined by a flexible linker. The presence of a ketocarotenoid is essential for OCP photoactivity¹⁵. Light absorption by the carotenoid induces conformational changes in the carotenoid and in the protein that are essential for its photoprotective function¹² (Fig 1B). In

darkness, the OCP is orange (OCP^o); upon illumination, it becomes red. The red form (OCP^r) is the active form of the protein^{12, 15}. Only OCP^r is able to bind the PBs. Once the OCP^r is bound, the carotenoid interacts with a chromophore of the PB core and quenches the excitation energy^{16, 17, 18}. This photoprotective mechanism is activated by blue-green light but not by orange or red light that are not absorbed by the carotenoid. However, the OCP photoprotects cyanobacteria from strong orange-red light; this protection is related to the ¹O₂ quenching activity of the OCP⁹.

Due to the outstanding antioxidant properties of carotenoids and their role in human health, substantial effort has been devoted to the engineering of noncarotenogenic bacteria to produce high quantities of these colorants; this also requires the development of methods to isolate the carotenoids from the engineered microorganisms (reviews^{19, 20, 21, 22}). For many applications, a water-soluble antioxidant is needed. The soluble OCP, which is an excellent ¹O₂ quencher, is an ideal candidate. However, to-date there are no reports showing that it is possible to insert a carotenoid molecule in a protein in *E.coli*. To-date, genes encoding carotenoid proteins have been expressed in *E.coli* to isolate the apo-protein (protein without carotenoid) and then the carotenoid is attached to the apo-protein by *in vitro* reconstitution (examples^{20, 23, 24, 25}). The OCP has been isolated from the WT cyanobacterial strains *Synechocystis* PCC 6803 (thereafter *Synechocystis*) and *Arthrospira maxima* or from *Synechocystis* mutants overexpressing WT or mutated OCPs^{12, 14, 26, 27, 28}. This, however, is a labor-intensive process because of the low concentration of the OCP in cyanobacterial cells. Indeed, even when using OCP-overexpressing strains purification requires 3 weeks to obtain 40 mg protein from 30 L of cyanobacteria cells (A Wilson and D Kirilovsky, unpublished data).

Here we describe the construction of *E.coli* strains that are able to synthesize large amounts of OCP homologs from different cyanobacterial strains incorporating various carotenoids *in vivo*. This fast holo-OCP production has already enabled us to further understand the function of different carotenoids in OCPs, for example that canthaxanthin-OCPs are very good energy and ¹O₂ quenchers. The work described here is important not only to accelerate the elucidation of the OCP photoprotective mechanism by rapid synthesis of variant OCPs, but promises to enable the isolation and characterization of other carotenoid proteins with potential applications for promoting human health.

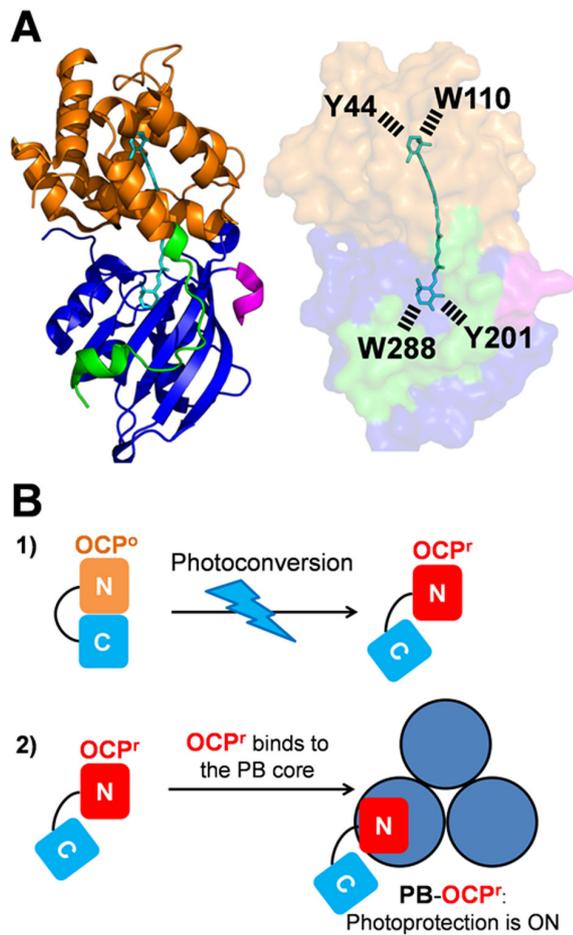


Figure 1
The OCP and photoprotection

(A) Structure of the OCP from *Synechocystis* PCC 6803 (Protein Data Bank ID: 3MG1). The OCP monomer, in the OCP^o state. The N-terminal arm (residues 1-22) (green) interacts with the C-terminal domain (residues 196 -315) (blue). The C-terminus is colored in rose. The N-terminal domain (residues 22-165) is orange. The hydroxy-echinenone (hECN) spans both domains of the protein. Tyr201 and Trp288 of the C-terminal domain hydrogen bond to the carbonyl group of hECN. Tyr44 and Trp110 of the N-terminal domain interact with the hydroxyl ring of hECN. The OCP was modified adding amino acids in the N-terminus (green) and/or the C-terminus (rose).

(B) Model of the OCP-related photoprotective mechanism. 1) Upon light absorption the orange OCP^o is converted into the active open red OCP^r. 2) OCP^r binds to the PB core and induces fluorescence and excitation energy quenching.

Results

Biosynthesis of His-tagged holo-OCPs in *E.coli* cells

The aim of our work was to synthesize holo-OCPs (OCPs attaching one carotenoid molecule) from *Synechocystis*, *Arthrospira* and *Anabaena* strains in *E.coli* cells. For this purpose, the genes coding for enzymes involved in the synthesis of the desired carotenoids and the *ocp* gene must be expressed in the same cell. It is known that in *Synechocystis* and *Arthrospira* OCP binds hECN^{10,14}. Previous work showed that it is difficult to obtain large quantities of this carotenoid in *E.coli* cells^{29,30}. We decided to express the *ocp* gene in the presence of two other ketocarotenoids: echinenone (ECN) and canthaxanthin (CAN). *Synechocystis* OCP is able to bind ECN and the ECN-OCP is photoactive and induces PB fluorescence quenching²⁷. In contrast, *Arthrospira* OCP weakly binds ECN³¹. Prior to this study, nothing was known about the *Anabaena* OCP. Although we did not know if CAN-OCP would be active, we hypothesized that the carbonyl groups present in CAN rings could allow photoactivity and stabilization of the carotenoid binding.

The *E. coli* cells producing holo-OCPs carried three plasmids. The first plasmid, pAC-BETA (or pACCAR16ΔcrtX)^{32,33}, contained the *Erwinia herbicola* (or *Erwinia uredovora*) operon carrying the four genes (*crtB*, *crtE*, *crtI*, *crtY*), which are necessary to synthesize β-carotene. In the second plasmid the *crtO* gene of *Synechocystis* or the *crtW* gene from *Anabaena* PCC 7210 was introduced. While CrtO is a monoketolase synthesizing mostly echinenone from β-carotene³⁴, CrtW is a diketolase that catalyses the formation of canthaxanthin³⁵ (supplementary Fig1). The *ocp* genes were cloned in a third plasmid (pCDFDuet-1). In order to maintain the three plasmids within the same *E.coli* cell, the use of three different and compatible replication origins and three different antibiotic resistances was required (Fig 2).

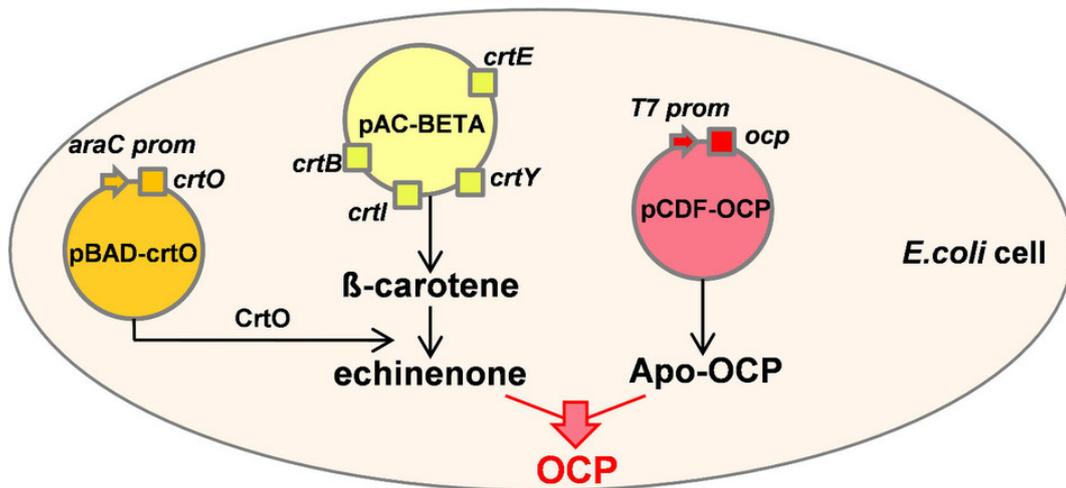


Figure 2
Schematic representation of OCP production in *E. coli*

E. coli producing ECN-OCP contain three plasmids: pAC-Beta (yellow) carries the genes involved in β -carotene synthesis (*crtB*, *crtE*, *crtI* and *crtY*) under the control of the *crtE* promoter; pBAD-crtO (orange), carries the *crtO* gene under the control of *ara* promoter (arabinose inducible); CrtO enzyme converts β -carotene in echinenone; pCDF-OCP carries the *ocp* gene under the control of an IPTG inducible promoter (red).

The operon containing the *crtB*, *crtE*, *crtI* and *crtY* genes was under the control of the constitutive *crtE* promoter. Thus, the β -carotene was constitutively synthesized in the *E.coli* cells. The *crtO* and *crtW* genes were under the control of the arabinose inducible promoter araBAD. The transcription of *ocp* genes was controlled by the IPTG-inducible T7lac promoter. A sequential induction of these genes was essential to isolate high quantities of holo-OCP. The expression of *crtO* or *crtW* genes was induced in *E.coli* containing a relatively high concentration of b-carotene. Subsequently the expression of *ocp* genes was induced in *E.coli* cells containing high concentrations of ECN or CAN in their membranes.

The *E. coli* cells carrying the *crtO* gene contained 15-25 % of b-carotene, 70-80% ECN and 4-6% CAN. When the *ocp* genes were expressed in the presence of ECN, a mixture of apo- and holo-OCPs was obtained in all cases, but the proportion of holo-OCP varied (Table I). The presence of photoactive holo-OCPs was already detected *in vivo*. Orange cells containing holo-OCPs became red when they were illuminated with high intensities of white light (Fig 3A). In contrast, yellow and orange *E.coli* cultures containing only genes involved in b-carotene and ECN (without the *ocp* gene) did not change colour upon illumination (Fig 3A). Once the cells were broken, a notable difference in the colour of the supernatants (soluble fraction) was observed. The supernatant derived from *E. coli* cells synthesizing only carotenoids, because the *ocp* gene was not induced, was clear (Fig 3Bb) and the orange colour was concentrated in the membranes (Fig 3Ba). The slight colour observed in the supernatant is attributable to a leak of the T7 promoter and the presence of a small concentration of OCP. In contrast, in the cells in which the *ocp* gene was induced, the supernatant was distinctly orange (Fig 3Bc) indicating the presence of high concentrations of holo-OCPs. Moreover, under illumination the supernatant became red (Fig 3Bd). Nevertheless, the membranes remained orange indicating that the presence of apo-proteins was not related to a lack of ECN in the cells.

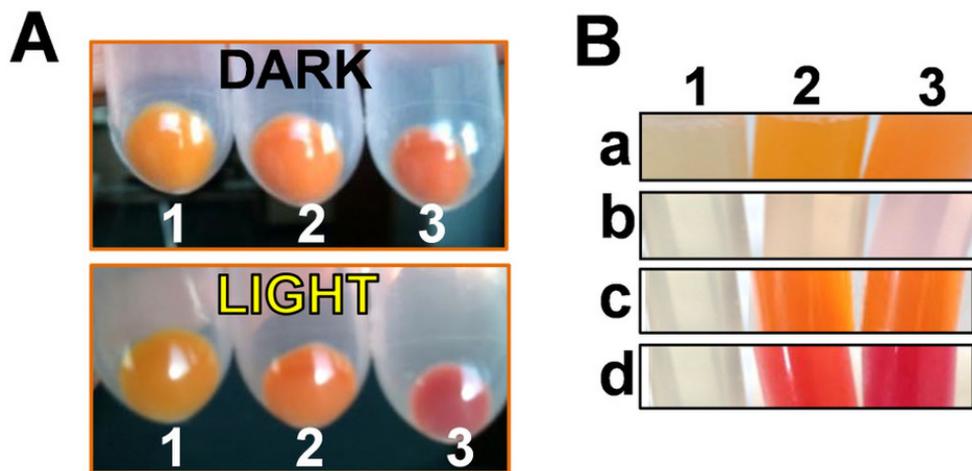


Figure 3
Photoactivity of the OCPs produced in *E. coli*

(A) Photoactivity observed in cells. Cell pellets carrying the three plasmids required for the synthesis of OCP in darkness or after 5 min illumination ($5000 \mu\text{moles photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ of white light): cells pellet without any induction (1), cells after arabinose induction producing ECN (2), cells after induction with both, arabinose and IPTG, producing holo-OCP (3).

(B) Location of carotenoids and OCPs in *E. coli* cells: (a) membrane and (b) soluble fractions of *E. coli* cells without plasmids (1) or with the three plasmids and after arabinose induction, synthesizing ECN (2) or CAN (3). (c) and (d) show the soluble fractions of cells producing ECN-OCP (2) and CAN-OCP (3) in darkness (c) and after illumination (d).

The first *Synechocystis ocp* overexpressed genes contained an addition of 18 nucleotides coding for six His just before the stop codon (Syn-Ctag) or an extension of 45 nucleotides after the first ATG (Syn-pDuet) (supplementary Fig 2 and Table I). This extension which includes the sequence coding for six-His is already included in the commercial pCDFDuet-1 plasmid. Analysis of the resulting two isolated *Synechocystis* OCPs revealed that the addition of the N-terminal extension of 45 nucleotides increased the total amount of OCP present in the cells (from 4-6 mg/L to 18-22 mg/L) and the yield of holoOCP (from 25-40% (Syn-Ctag-ECN) to 35-45 % (Syn-pDuet-ECN)) (Table I).

Since a modification on the N-terminus seemed to increase the yield of holoOCPs in *E.coli* cells, other *ocp* modifications were tested. In all cases (with the exception of one), nine to 45 nucleotides coding for a series of non-charged or charged amino acids were added just after the first ATG in the *ocp* gene containing a sequence coding for six-His in its 3' end (supplementary Fig 2 and Table I). In the construction lacking the C-terminal His-tag, 27 nucleotides including the sequence coding for six-His were added to the 5' end (Syn-3aaNtag) (supplementary Fig 2 and Table I). Analysis of the isolated *Synechocystis* OCPs showed that addition of 8 to 10 amino acids largely increased the yield of holo-OCP. More than 95% of isolated *Synechocystis* OCP contained a carotenoid molecule. When only 3 to 6 amino acids were added, the yield of holoprotein also increased but slightly less (Table I). Finally, addition of 9 amino acids, including 6 His, in the N-terminus, in the absence of C-terminal His-tag (Syn-3aaNtag) allowed the isolation of the largest quantity of holo-OCP containing almost no apo-protein: 30-35 mg holo-OCP (Table I). All of the isolated *Synechocystis* holo-OCPs contained more than 95% ECN with only traces of CAN (supplementary Fig 3). These results suggested that a slight destabilisation of the OCP N-terminal arm is necessary to increase and/or to stabilize OCP carotenoid binding. In the OCP^o, this arm interacts with the C-terminal domain and seems to stabilize the closed structure of the orange form^{14,27} (Fig 1).

Table I: Percentage and amount of holo-OCP obtained from 1L culture of *E.coli*. The Sequences of amino acids added to the N- or C-terminus are given.

| Name of OCP | Added Amino acid sequence | Total OCP (mg/L) | Holo-OCP (% of total OCP) | Holo-OCP (mg/L) |
|--|---------------------------|------------------|---------------------------|-----------------|
| ECN – <i>Synechocystis</i> OCPs | | | | |
| Syn-Ctag-ECN | -HHHHHH-StopCodon | 4-6 | 25-40 | 1-5 |
| Syn-pDuet-ECN | MGSS-HHHHHH-SQDP- | 18-22 | 35-45 | 5-10 |
| Syn-MIX15aaCtag-ECN | MGSSRLDNPEKTDIEP- | 20-22 | 30-40 | 5-10 |
| Syn-NC15aaCtag-ECN | MGSSNQANQVTLNPQV- | 18-21 | 45-55 | 8-10 |
| Syn-NC10aaCtag-ECN | MGSSNQANQVT- | 9-11 | >95 | 10 |
| Syn-NC8aaCtag-ECN | MGSSNQANQ- | 15-17 | >95 | 15 |
| Syn-NC6aaCtag-ECN | MGSSNQA- | 19-21 | 78-85 | 15-20 |
| Syn-NC3aaCtag-ECN | MGSS- | 8-10 | 70-80 | 5-10 |
| Syn-C8aaCtag-ECN | MGSSKKRRA- | 20-22 | 78-85 | 15-20 |
| Syn-3aaNtag-ECN | MGSS-HHHHHH- | 30-35 | ≥95 | 30-35 |
| ECN - <i>Anabaena</i> and <i>Arthrospira</i> OCPs | | | | |
| Ana-3aaNtag-ECN | MGSS-HHHHHH- | 50-60 | 50-60 | 25-35 |
| Ana-Ctag-ECN | -HHHHHH-StopCodon | 50-60 | 40-45 | 20-25 |
| Arthro-3aaNtag-ECN | MGSS-HHHHHH- | 25-30 | 30-40 | 5-15 |
| Arthro-Ctag-ECN | -HHHHHH-StopCodon | 15-20 | 10-25 | 1-5 |
| CAN - OCPs | | | | |
| Arthro-3aaNtag-CAN | MGSS-HHHHHH- | 25-30 | 60-65 | 15-20 |
| Arthro-Ctag-CAN | -HHHHHH-StopCodon | 30-35 | 50-60 | 15-20 |
| Syn-3aaNtag-CAN | MGSS-HHHHHH- | 8-10 | 75-85 | 5-10 |
| Ana-3aaNtag-CAN | MGSS-HHHHHH- | 60-70 | 40-45 | 25-30 |
| Ana-Ctag-CAN | -HHHHHH-StopCodon | 60-70 | 50-60 | 30-45 |

Arthrospira and *Anabaena ocp* genes, containing sequences coding for an His-tag in the N- or the C-terminus, were also expressed in *E.coli* cells synthesizing ECN. Although the His-tag in the N-terminus increased the yield of holo *Anabaena* and *Arthrospira* OCPs (to 60 and 40%, respectively), still a large amount of apo-OCP was present (Table I). Since the membranes remained coloured indicating the presence of ECN, the low concentration of holo-OCPs was not related to insufficient carotenoid production. The holo-*Anabaena* and holo-*Arthrospira* OCPs contained mostly ECN with traces of CAN (supplementary Fig 3).

In an attempt to increase the yield of *Arthrospira* and *Anabaena* holo-OCPs, the *ocp* genes were induced in *E.coli* cultures synthesizing CAN. This strain, carrying the *crtW* gene, contained 15-25 % of b-carotene, 50-60% CAN, 7-9% ECN and 5-7% of an unknown carotenoid. Indeed, the presence of CAN increased the yield of holoprotein to 60 % in the case of *Arthrospira* OCP. In contrast, the presence of CAN decreased the yield of holo-*Synechocystis*-OCP (Syn-3aaNtag-CAN) to 75-85% and of holo *Anabaena*-OCP (Ana-3aaNtag-CAN) to 40-45% (Table I). While the holo-*Anabaena*-CAN-OCP contained mostly CAN with only traces of ECN, holo-*Synechocystis*-CAN-OCP contained 50-70% CAN and holo-*Arthrospira*-CAN-OCP contained only 50-55 % CAN (supplementary Fig 3). Our results indicated that the binding and/or the stability of carotenoids in the protein differs between *Synechocystis* and *Arthrospira* or *Anabaena* OCPs. Most probably only the presence of hECN will allow the isolation of more than 95% of holo *Arthrospira* or *Anabaena* OCPs.

Characteristics of the isolated OCPs

The isolated proteins are orange in darkness and red in strong light (Fig 4A). Orange ECN-OCPs (OCP^o) absorbance spectra show maxima at 472 and 496 nm and a shoulder at 450 nm, comparable to the native cyanobacteria OCPs (Fig 4A and supplementary Fig 4A). The absorbance spectra of CAN-OCP^os were slightly red shifted compared to ECN-OCP^os with maxima at 475 and 500 nm (Fig 4A and supplementary Fig 4B). The maximum of OCP^r absorbance spectra was at 510 nm for ECN-OCPs and 525 nm for CAN-OCPs.

All three CAN-OCPs and *Synechocystis* and *Arthrospira* ECN-OCPs completely converted to their red form (OCP^r) under illumination (Fig 4B). The kinetics of OCP^o to OCP^r photoconversion of the three CAN-OCP and ECN-*Arthrospira*-OCP were similar ($t_{1/2}$ =4-7sec) and faster than that of the ECN-*Synechocystis* OCP ($t_{1/2}$ =18sec) (Fig 4B). The slower photoconversion of *Synechocystis* OCP compared to *Arthrospira* OCP was previously

observed when the proteins were overexpressed in *Synechocystis* cells³¹. *Anabaena* ECN-OCP^o only partially converted to OCP^r, suggesting slight differences in the carotenoid-protein interaction in this protein (Fig 4B). N- and C-terminal His-tagged *Synechocystis* OCPs presented similar conversion kinetics from OCP^o to OCP^r (Fig 4C). When both termini of the protein were modified, an acceleration of OCP^r accumulation was observed, suggesting a destabilization of the closed OCP^o (Fig 4C). Only one exception was observed: the addition of 8 charged amino acids hindered the conversion OCP^o to OCP^r (Fig 4C).

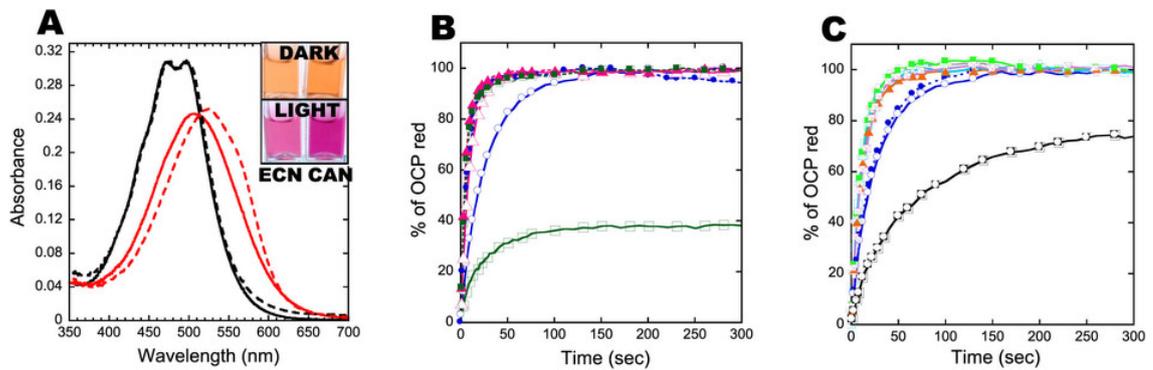


Figure 4

Absorbance spectra and kinetics of photoactivity of recombinant OCPs

(A) Absorbance spectra of *Synechocystis*-3aaNtag-ECN-OCP (solid line) and of *Synechocystis*-3aaNtag-CAN-OCP (dashed line). In darkness (black) or after 5 min illumination (at 18°C) with 5000 $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of white light (red). Inset: The OCPs in darkness (orange) and after 5 min illumination (red).

(B) Kinetics of photoactivity (OCP⁰ to OCP^f) at 18°C of *Syn*-3aaNtag-ECN-OCP (open circle), *Syn*-3aaNtag-CAN-OCP (closed circle), *Arthro*-3aaNtag-ECN-OCP (open triangle), *Arthro*-3aaNtag-CAN-OCP (closed triangle), *Ana*-3aaNtag-ECN-OCP (open square) and *Ana*-3aaNtag-CAN-OCP (closed square).

(C) Influence of N-terminal modifications in accumulation of OCP^f. Light-induced OCP⁰ to OCP^f conversion at 18°C in Tris-HCl pH8.0 (40mM) of *Syn*-Ctag-ECN-OCP (closed circle), *Syn*-3aaNtag-ECN-OCP (open circle), *Syn*-NC15aaCtag-ECN-OCP (closed triangle), *Syn*-NC10aaCtag-ECN-OCP (open cross), *Syn*-NC8aaCtag-ECN-OCP (closed square), *Syn*-NC6aaCtag-ECN-OCP (open square), *Syn*-NC3aaCtag-ECN-OCP (square with cross), *Syn*-C8aaCtag-ECN-OCP (square with open circle). *Syn*=*Synechocystis*; *Ana*=*Anabaena*; *Arthro*=*Arthrospira*.

The capacity of N-terminal His-tagged ECN- and CAN-OCPs to quench $^1\text{O}_2$ was studied. Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping was applied for $^1\text{O}_2$ detection using TEMPD-HCl (2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone). When this nitron reacts with $^1\text{O}_2$, it is converted into the stable nitroxide radical, which is paramagnetic and detectable by EPR spectroscopy. The production of $^1\text{O}_2$ was induced by illumination of the photosensitizer methylene blue. Figure 5A shows the typical EPR signal of the nitroxide radical obtained after 3 min illumination ($1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) of a solution containing methylene blue and TEMPD-HCl in the absence or presence of the OCP. The presence of only $1.5 \mu\text{M}$ holo-OCP decreased the EPR signal between 65 and 85 % and $4 \mu\text{M}$ OCP quenched nearly the entire EPR signal. These results indicated that all of the *E. coli*-derived OCPs are very good $^1\text{O}_2$ quenchers (Fig 5B). The slight differences in the efficiency of $^1\text{O}_2$ quenching are likely due to the presence of higher concentrations of apo-protein for the same concentration of holo-OCP (see supplementary Fig 5). Nevertheless, our results suggested that *Arthrospira* OCP has a slightly better activity as $^1\text{O}_2$ quencher than *Synechocystis* OCP. In contrast, *Anabaena*-ECN-OCP had a slightly lower activity as $^1\text{O}_2$ quencher. The nature of the bound carotenoid seemed not to influence the activity, as previously suggested⁹.

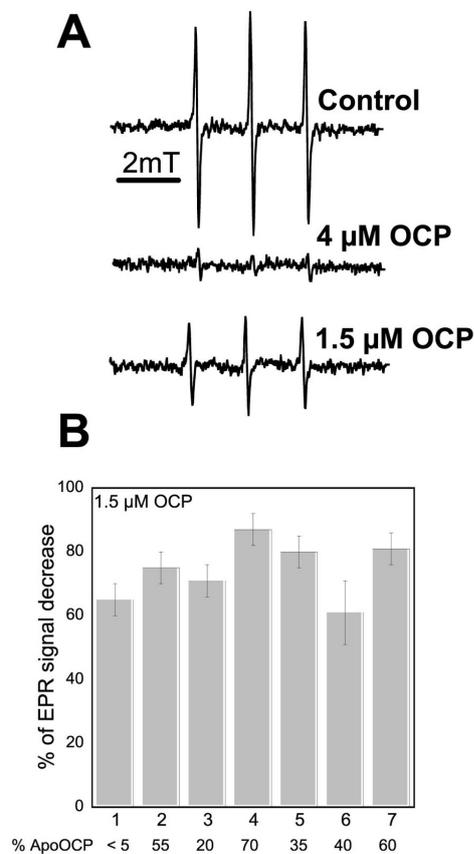


Figure 5

$^1\text{O}_2$ Quenching activity of the recombinant OCPs

$^1\text{O}_2$ was produced by illumination of 10μM methylene blue for 3 min in the presence of TEMPD-HCl and in the absence (control) or the presence of different OCPs.

(A) EPR signal observed in the absence of OCP (control) or in presence of 4 μM or 1.5 μM of *Synechocystis*-3aaNtag-ECN-OCP.

(B) Comparison of $^1\text{O}_2$ quenching activity of different OCPs. The percentage (%) of EPR signal decrease induced by *Syn*-3aaNtag-ECN-OCP (1), *Syn*-Ctag-ECN-OCP (2), *Syn*-3aaNtag-CAN-OCP (3), *Arthro*-3aaNtag-ECN-OCP (4), *Arthro*-3aaNtag-CAN-OCP (5), *Ana*-3aaNtag-ECN-OCP (6) and *Ana*-3aaNtag-CAN-OCP (7). *Syn*=*Synechocystis*; *Ana*=*Anabaena*; *Arthro*=*Arthrospira*. The % of apo-OCP is indicated at the bottom of the figure.

Finally, the ability of the OCPs to quench PB fluorescence was tested. *Arthrospira* and *Synechocystis* OCPs isolated from *E. coli* were able to induce a large PB fluorescence quenching (Fig 6A and supplementary Fig 6A). *Arthrospira* OCPs induced the fastest kinetics of fluorescence quenching and *Anabaena* OCPs the slowest, as previously observed with native OCPs (³¹ and supplementary Fig 6C). The activity of *Synechocystis* ECN-OCP was higher than that of *Synechocystis* CAN-OCP; the opposite was observed with *Anabaena* OCP since ECN-OCP was only partially converted to the red form (Fig 6A). Addition of 6 to 10 amino acids to the N-terminus of the C-terminal His-tagged OCP partially inhibited the fluorescence quenching, suggesting that OCP binding to PBs is hindered (Fig 6B and supplementary Fig 6B). The weaker binding of these modified OCPs was confirmed by the rapid fluorescence recovery observed when PBs-OCP complexes were incubated in darkness (Fig 6C). In contrast, C-terminal His-tagged OCP remained mostly attached to the PBs (Fig 6C). Both N- and C-terminal His-tagged *Synechocystis* ECN-OCPs isolated from *E. coli* were able to induce a large fluorescence quenching (Fig 6A). However, a fast fluorescence recovery was observed only with *Synechocystis* N-terminal His-tagged OCPs (Fig 6C). Thus, the behaviour of OCPs is affected by the location of the His-tag.

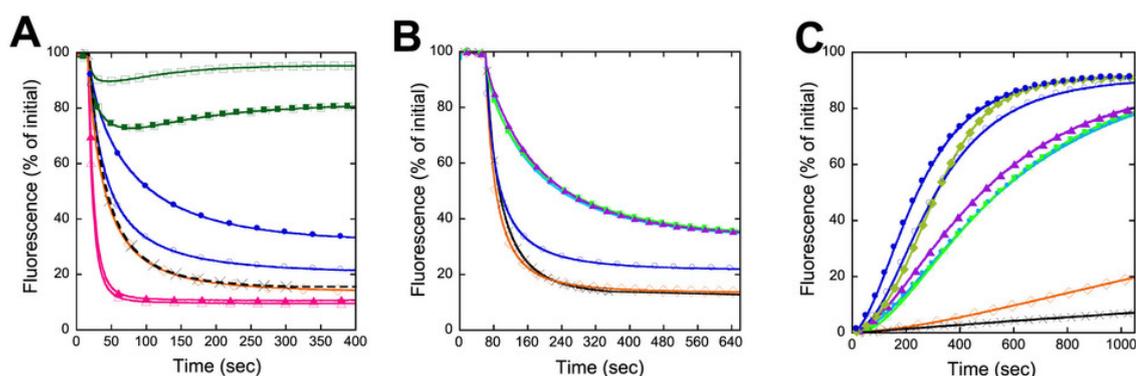


Figure 6

Induction of PB fluorescence quenching by OCP^f and fluorescence recovery

WT *Synechocystis* PBs (0.012 μM) were incubated in 0.5 M phosphate buffer with pre-converted OCP^f (0.48 μM) during 5 min under blue-green light illumination (900 $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

(A and B) Fluorescence quenching under illumination and (C) fluorescence recovery in darkness. In (A) Native *Synechocystis* OCP (cross), *Syn*-Ctag-ECN-OCP (open diamond), *Syn*-3aaNtag-ECN-OCP (open circle), *Syn*-3aaNtag-CAN-OCP (closed circle), *Ana*-3aaNtag-ECN-OCP (open square), *Ana*-3aaNtag-CAN-OCP (closed square), *Arthro*-3aaNtag-ECN-OCP (open triangle), *Arthro*-3aaNtag-CAN-OCP (closed triangle).

In (B) Native *Synechocystis* OCP (cross), *Syn*-3aaNtag-ECN-OCP (open circle), *Syn*-Ctag-ECN-OCP (open diamond), *Syn*-NC6aaCtag-ECN-OCP (closed circle), *Syn*-NC8aaCtag-ECN-OCP (closed square), *Syn*-NC10aaCtag-ECN-OCP (closed triangle).

In (C) Native *Synechocystis* OCP (cross), *Syn*-Ctag-ECN-OCP (open diamond), *Syn*-NC8aaCtag-ECN-OCP (closed square), *Syn*-NC10aaCtag-ECN-OCP (closed triangle), *Syn*-3aaNtag-ECN-OCP (open circle), *Syn*-3aaNtag-CAN-OCP (closed circle), *Syn*-pDuet-ECN-OCP (closed diamond).

Discussion

The use of soluble carotenoproteins as antioxidants to promote human health is an area of active research and, consequently, methods to produce them in high yields are important. The aim of our work was to synthesize holo-OCPs (OCPs attaching the carotenoid) in *E.coli* to develop a method for obtaining high quantities of carotenoproteins.. Using the method described here, we obtained 200 times more holo-OCP in 20% of the time of previously established purifications involving overexpression in cyanobacterial cells (C Bourcier de Carbon, A Wilson and D Kirilovsky, unpublished data). In only four days more than 30 mg holo-*Synechocystis* OCP can be obtained from 1L of *E.coli* cells using the construction Syn-3aaNtag-ECN.

The key elements of this production method are the choice of promoters and the sequential induction of genes. b-carotene must be present in the membrane before induction of *ctrO* or *crtW* genes leading to the synthesis of ECN or CAN, respectively. More importantly, ECN and CAN have to be synthesized in advance and present in the membrane before induction of the *ocp* gene. The presence of IPTG in the growth medium inhibits cell growth even at low concentrations. In addition, the T7lac promoter cannot be induced at temperatures higher than 30°C. In contrast, arabinose enhances cell growth and the araBAD promoter allows induction at 37°C. Thus, the carotenoid genes must be induced first with arabinose at 37°C to obtain a high concentration of carotenoid- containing cells and then, the carotenoprotein gene could be induced by IPTG addition at lower temperatures (20 to 28°C) to slow down protein synthesis, allowing protein folding and carotenoid binding.

The possibility of isolate holo-OCPs from *E.coli* cells constitutes a major advance for the investigation of the molecular mechanism of OCP since it facilitates rapid isolation of mutant proteins with new characteristics. The method has already permitted us to further characterize OCPs revealing different phenotypes related to specificity and strength of carotenoid binding. We demonstrate here that all OCPs are able to bind CAN and that CAN-OCPs are photoactive and able to induce large PB fluorescence quenching, like the native hECN-OCPs. This demonstration was not previously possible when OCPs were isolated by overexpression in *Synechocystis* cells since they contain only traces of CAN.

We also show here that *Arthrospira*, *Anabaena* and *Synechocystis* OCPs are characterized by different phenotypes in terms of specificity and strength of carotenoid

binding. *Synechocystis* OCP binds and stabilizes ECN better than CAN. In contrast, *Arthrospira* and *Anabaena* OCPs preferentially bind CAN over ECN and have a low affinity for both carotenoids. It is difficult to explain these differences based in the comparison of *Arthrospira* and *Synechocystis* OCP^o structures due to the high sequence identity among amino acids forming the carotenoid-binding pocket and the similar carotenoid orientation in the proteins (supplementary Fig 9A). Nothing is known about how the carotenoid is introduced in the apo-OCP. We can hypothesize that the OCP is synthesized by membrane bound ribosomes and that the carotenoid is introduced during the synthesis of the N-terminal domain. It could be possible that the amino acids involved in this initial binding differ from those in the carotenoid-binding pocket of mature OCP^o. Many of the amino acid substitutions among the three OCPs are localized on the outer surface of the N-terminal domain and could have a role in primary binding (supplementary Fig 9B and C).

The most unexpected result was the different behavior in PBs binding of *Synechocystis* OCPs with a His-Tag on the N-terminus compared to those with the tag on the C-terminus. In the past, all OCP characterizations and the construction of stable OCP-PBs complexes were made with isolated C-terminal His-tagged OCPs^{12, 16, 28}. These OCPs, once bound to PBs at 0.5 or 0.8 M phosphate, remain almost permanently attached and the PBs remain quenched^{16, 28}. This characteristic allowed the isolation of quenched OCP-PB complexes^{16, 28}. Here, we show that the absence of the C-terminal His-tag largely accelerates the dark recovery of PB fluorescence, suggesting a decreased stability of bound OCP^f. In contrast, OCP^f binding kinetics were only slightly affected. In addition, a longer N-terminus in C-terminal His-tagged OCPs hinders the OCP binding and destabilizes the strong OCP^f attachment to PBs. Our results strongly suggest that while the C-terminal His-tag increases the stability of OCP^f-PB complexes, a longer N-terminus destabilizes this attachment.

Production of antioxidant molecules and proteins is a topic of considerable general interest to plant and human biologists since oxidative stress is involved in many processes leading to cell death or tissue damage. Here we show that all three recombinant OCPs show excellent activity as ¹O₂ quencher. Other soluble carotenoproteins also display good antioxidant properties like Asta P⁶ and could be used in nutraceuticals, cosmetics, etc. The possibility of engineering noncarotenogenic bacteria to produce carotenoproteins, like the OCP, which are present at relative low concentrations in the native organisms, constitutes a major breakthrough in efforts to obtain large quantities of carotenoid molecules as antioxidants.

In addition, the ability to synthesize holo-OCPs in *E.coli* is an important step in the construction of a biofuel (biomass) producing minimal microbe using sunlight as natural source of energy. In order to create these minimal entities new synthetic reaction centers containing the minimal number of components needed for electron transport are being constructed and antenna molecules are being attached to them to expand the spectral range for light absorption. Presently, nothing is done to protect these systems. The OCP, a good quencher of excitation energy and singlet oxygen, is an excellent candidate for this function. It can regulate the excitation energy arriving to the reaction centers and quench the singlet oxygen formed by the inevitable secondary, dangerous reactions.

Materials and methods

Amplification and cloning of *Crt* genes encoding enzymes involved in carotenoid synthesis and of *ocp* gene

The plasmids pAC-BETA (gift of Prof F. Cunningham) and pACCAR16 Δ crtX (gift of Prof G. Sandmann), which contain a P15A origin of replication and the *crtB*, *crtE*, *crtI* and *crtY* genes under the control of the promoter of *crtE* from *Erwina herbicola* and *Erwina uredovora* respectively, were used^{32, 33}. All results presented in this article were obtained with pAC-BETA.

The *crtO* and *crtW* genes were cloned into a modified Plasmid pBAD/gIII A (from Invitrogen) which contains a PBR322 origin of replication, an arabinose inducible promoter (araBAD) and an ampicillin resistance marker. The Plasmid pBAD/gIII A was first modified to avoid the export of the recombinant protein into the periplasmic space of the cells. For this purpose, the region encoding the “gene III signal sequence” was deleted. Primers used for the PCR mutagenesis were pBAD/gIIIAmut (F and R) (supplementary Fig 7). The modified plasmid pBAD/gIII A was named pBAD. The Plasmid pBAD was digested with BgIII and EcoRI restriction enzymes to clone the *crtO* gene (slr0088) of *Synechocystis* PCC6803 or with NcoI and EcoRI restriction enzymes to clone the *crtW* gene (*alr3189*) of *Anabaena* PCC7120. Primers CrtO (F and R) and CrtW (F and R) were used to amplify *crtO* and *crtW* genes respectively (supplementary Fig 7). The resulting plasmids were named pBAD-CrtO and pBAD-CrtW.

The *ocp* gene was cloned in the plasmid pCDFDuet-1 (from Novagen). The plasmid pCDFDuet-1 contains a CDF origin of replication, T7lac promoter and Streptomycin/Spectinomycin resistance. The sequences of synthetic oligonucleotides (primers) used in the amplification and modification of all the genes is described in supplementary Fig 7.

N-terminal His-tagged OCP

The pCDFduet-1 plasmid was digested with EcoRI and NotI to clone the different *ocp* genes (*slr1963* from *Synechosystis* PCC6803, *NIES39_N00720* from *Arthrospira Platensis* PCC7345 and *all3149* from *Anabaena* PCC 7120). The primers OCPSyn-pDuet (F and R) were used to amplify the *Synechocystis ocp* gene (1104 nucleotides) using genomic DNA of *Synechocystis* PCC6803 as template. The primers OCPAna-pDuet (F and R) were used to

amplify the *Anabaena ocp* gene (1076 nucleotides) using genomic DNA of *Anabaena* PCC 7120 as template. The primers OCPArthro-pDuet (F and R) were used to amplify the *Arthrospira ocp* gene (1355 nucleotides) using the plasmid pOF7345 as template ³¹. The resulting PCR products were introduced into pCDFDuet-1 to create the pCDF-OCPSyn-pDuet, pCDF-OCPArthro-pDuet and pCDF-OCPAna-pDuet plasmids. In the OCP isolated from *E.coli* strains carrying these plasmids, an extension of 15 amino acids was present in the N-terminal of the OCP protein. This extension contains a His-tag comprising 6 His residues.

C-terminal His-tagged OCP

To obtain a C-terminal His-tagged *Synechocystis* OCP, it was first, necessary to abolish a NcoI site in the *Synechocystis ocp* gene sequence; accordingly the GCC sequence coding for Ala73 was changed to GCG (also coding for in alanine) using the plasmid pSK-OCPsyn-CterHisTagΔFRP ¹². Then, pCDFDuet-1 was digested with NcoI and NotI to excise the N-terminal extension containing the His-tag initially present in this plasmid. The *ocp* genes containing a C-terminal His-Tag from *Synechosystis* PCC6803, *Arthrospira Platensis* PCC7345 and *Anabaena* PCC 7120 were cloned in the plasmid. The primers OCPsyn-Ctag (F and R) were used to amplify the *ocp* gene tagged in C-terminal domain from the plasmid pSK-OCPsyn- CterHisTagΔFRP- A73A ¹². The primers OCParthro-Ctag (F and R) were used to amplify the *ocp* gene from the plasmid p2A7345His ³¹. The primers OCPana-Ctag (F and R) were used to amplify the *ocp* gene from genomic DNA of *Anabaena* PCC 7120, the C-terminal His-tag was then added by PCR mutagenesis. The resulting PCR products were introduced into pCDFDuet-1 to create the pCDF-OCPSyn-Ctag, pCDF-OCParthro-Ctag and pCDF-OCPana-Ctag plasmids.

Modifications in His-tagged OCPs

The sequences added after the first ATG of the *ocp* *Synechocystis* gene are described in supplementary Fig 2. The modifications (NC15, NC10, NC8, NC6, NC3, Mix15 and C8, Table I) were introduced by directed mutagenesis, using the pCDF-OCPSyn-Ctag plasmid as template and the different oligonucleotides described in supplementary Fig 7. The modification 3aaNtag (Table I) was created by site-directed mutagenesis using the pCDF-OCPSyn-pDuet plasmid as template and the oligonucleotides described in supplementary Fig 7. This mutagenesis causes the deletion of part of the OCP N-terminal extension present in the pCDF-OCPSyn-pDuet plasmid. The modification 3aaNtag was also created in the *ocp* genes

of *Arthrospira* and *Anabaena* using the pCDF-OCParthro-pDuet and pCDF-OC Pana-pDuet plasmids as templates and the oligonucleotides described in supplementary Fig 7.

Transformation of *E.coli* cells and induction of genes

E.coli BL21-Gold (DE3) cells from Agilent Technologies (F⁻ ompT hsdS(rB – mB⁻) dcm⁺ Tetr gal λ(DE3) endA Hte) were used for OCP production. BL21 cells were transformed simultaneously with three plasmids : pAC-BETA, pBAD-CrtO (or pBAD-CrtW) and pCDF-OCP . The pCDF-OCP plasmid contains WT or modified sequences of *ocp* genes. The transformed *E.coli* cells were grown in the presence of three antibiotics (ampicillin (50 µg/ml), chloramphenicol (17 µg/ml) and streptomycin (25 µg/ml)) to maintain the three different plasmids in the same *E.coli* cell. For induction of the different genes, transformed *E.coli* were grown in TB medium at 37°C for 3-4 hours until OD₆₀₀=0.6. Then arabinose was added (0.02%) and the culture was grown overnight at 37°C. In the morning the cells are diluted with fresh medium and Arabinose 0.02% and they are grown at 37°C till OD₆₀₀=1-1.2. Then isopropyl b-D-thiogalactoside (IPTG) (0.2 mM) was added and the cells incubated overnight at 28 °C. In the morning, the cultures were harvested and pellets were stored at -80°C until they were used.

OCP isolation and calculation of holo-OCP concentration

E.coli frozen cells were resuspended in the lysis buffer containing 40 mM Tris pH 8, 10% glycerol and 300 mM NaCl and were broken in dim light using a French Press. The membranes were pelleted and the supernatant was loaded onto a nickel column (Ni-Probond resin, Invitrogen). The OCP was eluted with 200 mM Imidazol. The *Synechocystis*, *Arthrospira* and *Anabaena* OCPs overexpressed in *Synechocystis* cells were isolated as described in ¹².

Total OCP concentration was measured using the Bradford method. At least five independent Bradford measurements of each isolated OCP were done. The concentration in mg/mL obtained by this method was converted to molar concentration using a MW of 35 kDa for the OCP. Holo-OCP concentration was calculated based in the fact that each holo-OCP binds one carotenoid molecule and thus, the molar concentrations of carotenoid and holo-OCP are identical. Carotenoid concentration was first calculated in mg/ mL from the carotenoid absorbance at 496 nm and using $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2158$ and then converted to molar concentration. The ratio between the molar concentration of holo-OCP and total OCP gives the percentage of

holo-protein described in Table I. When this ratio is around 1, we estimated that the preparation contained 100% holo-protein.

Absorbance spectra and photoactivity kinetics of OCP

Absorbance spectra and kinetics of photoactivity (illumination with 5000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of white light) and dark recovery were measured in a Specord S600 (Analyticjena) at 18°C.

Measurements of OCP fluorescence quenching activity

Isolated *Synechocystis* PBs in 0.5 or 0.8 M phosphate were incubated in the presence of different modified OCP^rs under illumination with strong blue-green light. The high concentration of phosphate was needed to maintain the integrity of PBs. Phosphate also influences the strength of OCP binding to PBs; it is stronger at 0.8M than at 0.5 M phosphate¹⁶. The ratio of OCP to PB was 40 in all the experiments as previously described^{16, 18}. The concentration of the OCP for these experiments was calculated from the carotenoid absorbance spectra since only the OCP attaching a carotenoid is able to be photoactivated and to bind to PBs. The presence of apo-OCP did not hinder OCP^r binding (supplementary Fig 8). Fluorescence quenching and recovery were monitored with a pulse amplitude modulated fluorometer (101/102/103-PAM; Walz, Effelrich, Germany). The fluorescence quenching was induced by 900 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of blue-green light (400-550 nm). All measurements were carried out at 23°C in 0.5 or 0.8 M phosphate buffer. The OCP was pre- converted to the red form by 10 min illumination with 5000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of white light at 4°C.

¹O₂ detection by EPR spin trapping

Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping was applied for ¹O₂ detection using TEMPD-HCl (2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone) (100 mM). When this nitrene reacts with ¹O₂, it is converted into the stable nitroxide radical, which is paramagnetic and detectable by EPR spectroscopy. The production of ¹O₂ was induced by illumination of the photosensitizer methylene blue (10 μM). The measurements were done in buffer 100 mM Tris-HCl pH 8 in the absence or in the presence of different concentrations of purified OCPs. The samples were illuminated for 3 min with white light (1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The EPR settings were as follows: hall center field = 3467.270 G, microwave frequency = 9.74 Ghz, power = 4.450 mV and number of scans = 12.

Measurement of carotenoid content in OCPs

The carotenoid content of *E.coli* cells and the isolated OCPs was analysed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Mass spectrometry as described in ⁹.

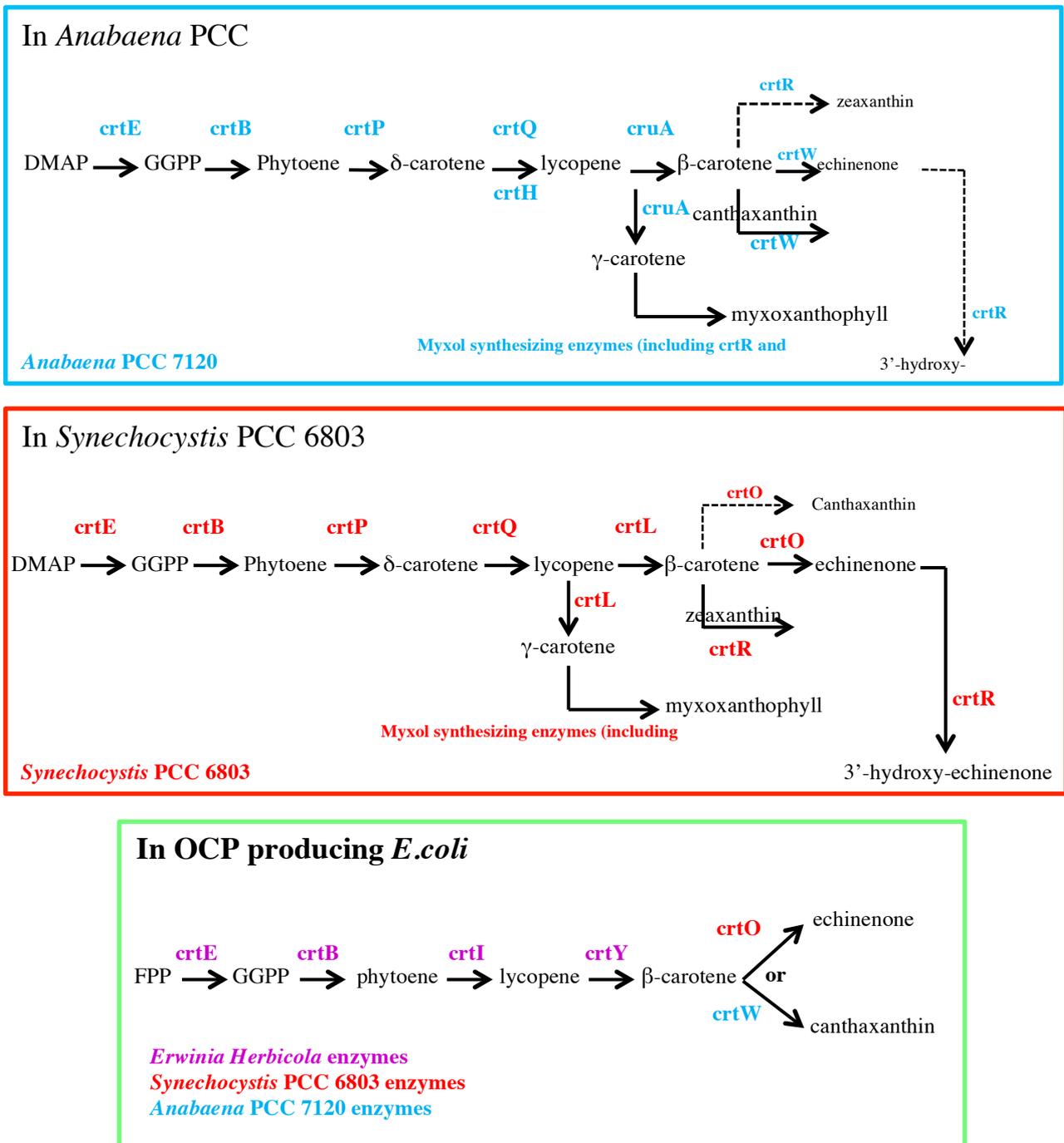
Acknowledgements

We thank Prof Francis Cunningham and Prof Gerhard Sandmann for the gift of plamids pAC-BETA and pACCAR16 Δ crtX respectively. We thank Dr. Anja Krieger for help in EPR experiments, critical reading of the article and stimulating discussions. We thank Sandrine Cot for technical assistance. This research was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR, project CYANOPROTECT), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) and Phycosource. CBC is financed by a CIFRE fellowship from Phycosource.

Author contributions: CBC and DK designed research; CBC, AT, AW and FP performed research; CBC, AT and DK analyzed data; DK wrote the paper with inputs of CBC and AT.

Supplementary Data

Supplementary Figures S1 to S9



Sup Fig 1: Schematic carotenoid biosynthetic pathway

Carotenoid biosynthesis in *Synechocystis* and *Anabaena* cyanobacteria strains and in *E. coli* strains producing ECN or CAN-OCPs created in this work.

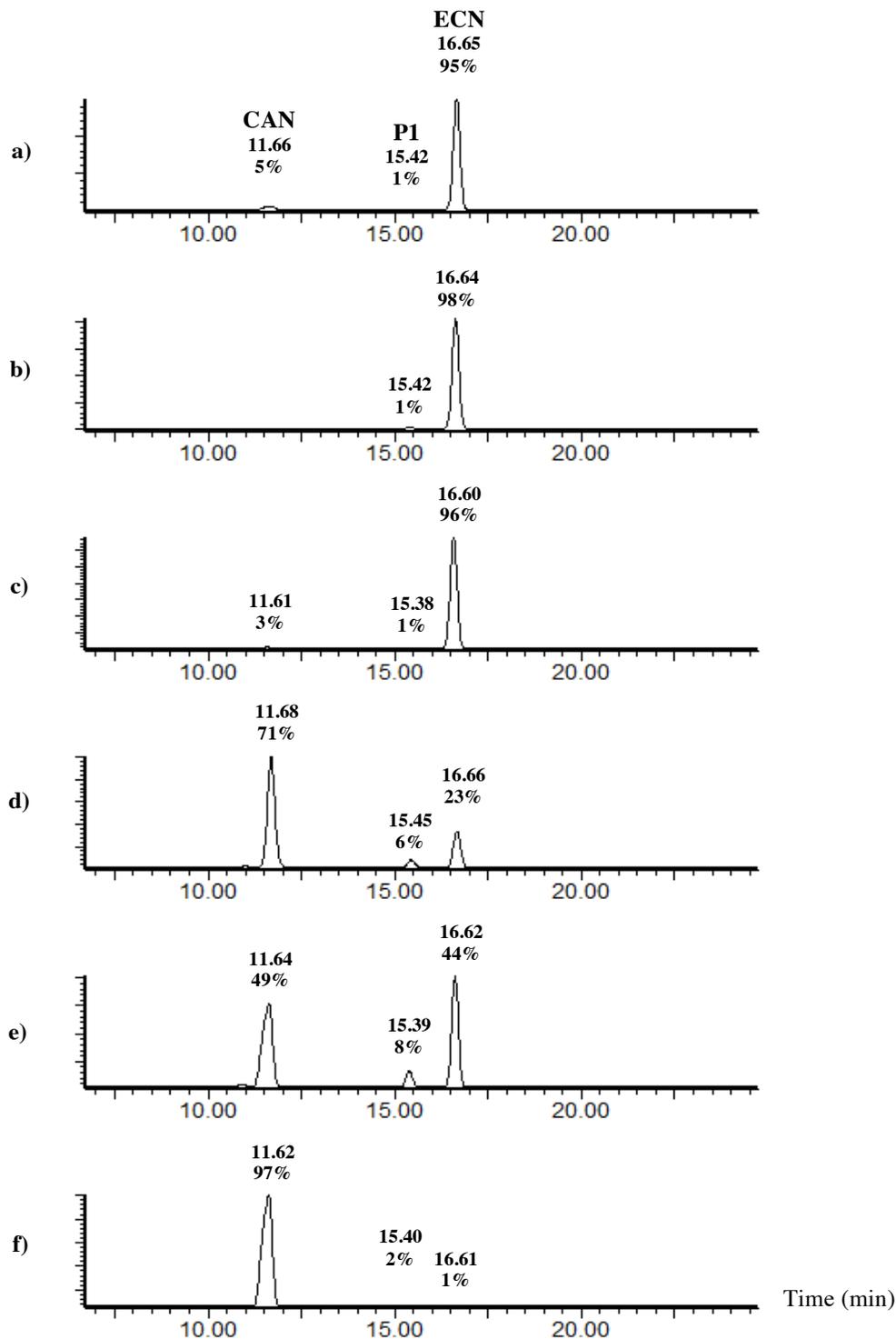
A- Sequence including the **His-tag** added in the C-terminus of WT OCPs
 Syn-Ctag: *ocp* gene-**CACCACCACCACCACCAC**-STOPcodon

B- Sequences including the **His-Tag** added on the N-terminus of WT OCPs
 Syn-pDuet: **ATGGGCAGCAGCCATCACCATCATCACCAC**AGCCAGGATCCG-*ocp* gene-STOPcodon
 Syn-3aaNtag: **ATGGGCAGCAGCCATCACCATCATCACCAC**-*ocp* gene-STOPcodon

C- Sequences added on the N-terminus of C-terminal His-tagged *Synechocystis* OCP

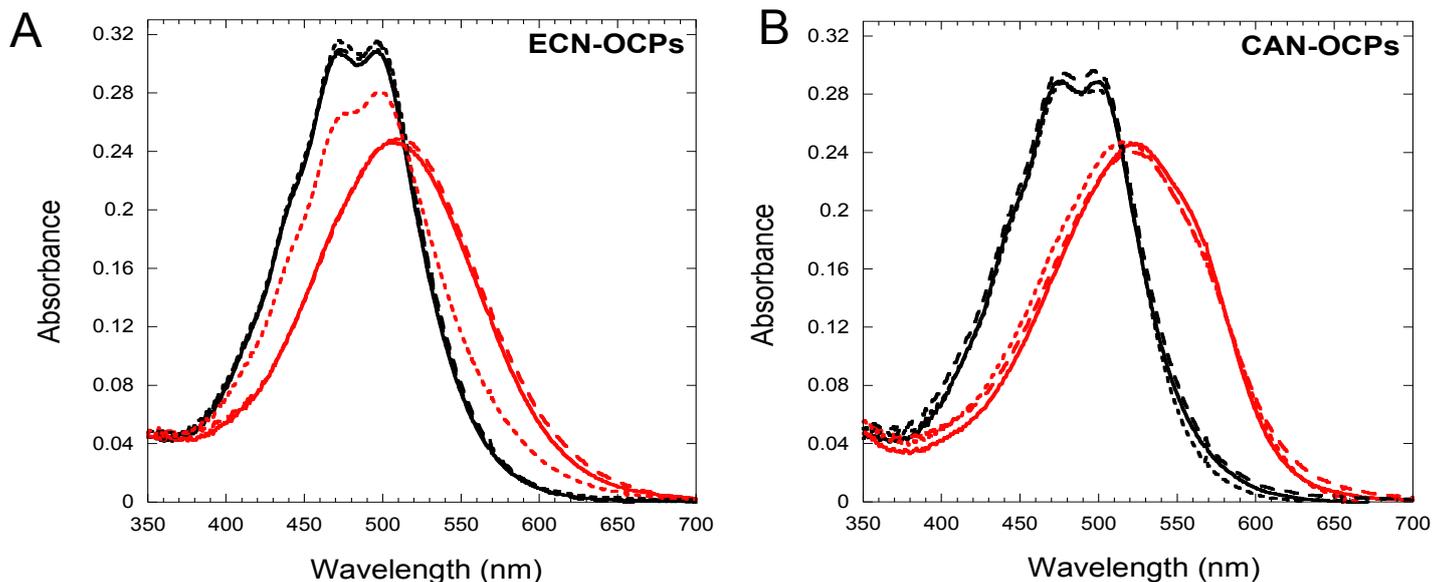
| Name of OCP | Sequence added on the N-terminus |
|----------------------------------|---|
| Syn-NC15aaCtag (nucleotids) | ATGGGCAGCAGCAATCAGGCTAATCAGGTGACTCTAAATCCACAAGTT |
| Syn-NC15aaCtag (amino acids) | MGSSNQANQVTLNPQV |
| Syn-NC10aaCtag (nucleotids) | ATGGGCAGCAGCAATCAGGCTAATCAGGTGACT |
| Syn-NC10aaCtag (amino acids) | MGSSNQANQVT |
| Syn-NC8aaCtag (nucleotids) | ATGGGCAGCAGCAATCAGGCTAATCAG |
| Syn-NC8aaCtag (amino acids) | MGSSNQANQ |
| Syn-NC6aaCtag (nucleotids) | ATGGGCAGCAGCAATCAGGCT |
| Syn-NC6aaCtag (amino acids) | MGSSNQA |
| Syn-NC3aaCtag (nucleotids) | ATGGGCAGCAGC |
| Syn-NC3aaCtag (amino acids) | MGSS |
| Syn-MIX15aaCtag (nucleotids) | ATGGGCAGCAGCCGACTAGACAATCCAGAAAAAACTGACATTGAACCA |
| Syn-MIX15aaCtag (amino acids) | MGSSRLDNPEKTDIEP |
| Syn-C8aaCtag (nucleotids) | ATGGGCAGCAGCAAAAAGAGAAGGGCT |
| Syn-C8aaCtag (amino acids) | MGSSKKRRA |

Sup Fig 2: Nucleotides and amino acids sequences added to the 3' and 5' ends of *ocp* gene (N-terminus and C-terminus of *Synechocystis ocp* gene)



Sup Fig 3: UV Chromatograms (450 nm) of isolated OCPs from *E.coli* culture

a) *Syn*-3aaNtag-ECN-OCP, b) *Arthro*-3aaNtag-ECN-OCP, c) *Ana*-3aaNtag-ECN-OCP, d) *Syn*3aaNtag-CAN-OCP, e) *Arthro*-3aaNtag-CAN-OCP and f) *Ana*-3aaNtag-CAN-OCP. Retention time (min) and relative integration of peak area indicated (% of shown). CAN: canthaxanthin, P1: unknown carotenoid of MW 548, ECN: echinenone.



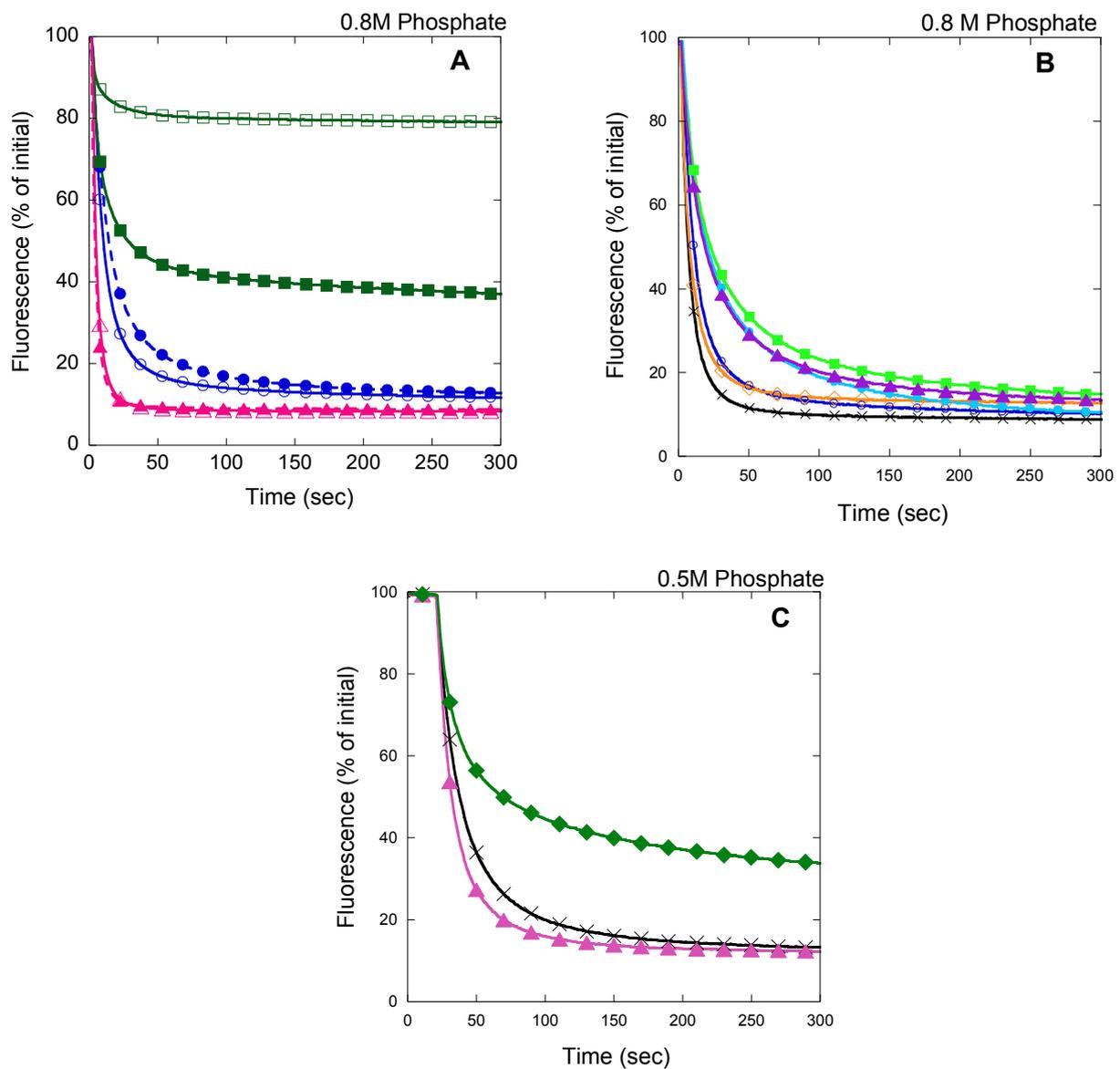
Sup Fig 4: Photoactivity of recombinant OCPs

(A) Absorbance spectra of the dark (black) and light (red) forms of the ECN-OCPs. OCP-*Syn-3aaNtag-ECN* (solid line), OCP-*Arthro-3aaNtag-ECN* (dashed line) and OCP-*Ana-3aaNtag-ECN* (dotted line). To obtain the spectrum of the light form, the OCP was illuminated with $5000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of white light, at 18°C , for 5 min.

(B) Absorbance spectra of the dark (black) and light (red) forms of the CAN-OCPs. Symbols are the same as in (A).

| OCP | % of EPR signal decrease | % of Apo-OCP |
|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Syn-3aaNtag-ECN | 65 | < 5 |
| Syn-3aaNtag-ECN + 20% ApoOCP | 67 | 20 |
| Syn-3aaNtag-ECN + 40% ApoOCP | 71 | 40 |
| Syn-3aaNtag-ECN + 60% ApoOCP | 73 | 60 |
| Syn-Ctag-ECN | 72 | 60 |

Sup Fig 5: Apo-OCP influence on singlet oxygen quenching

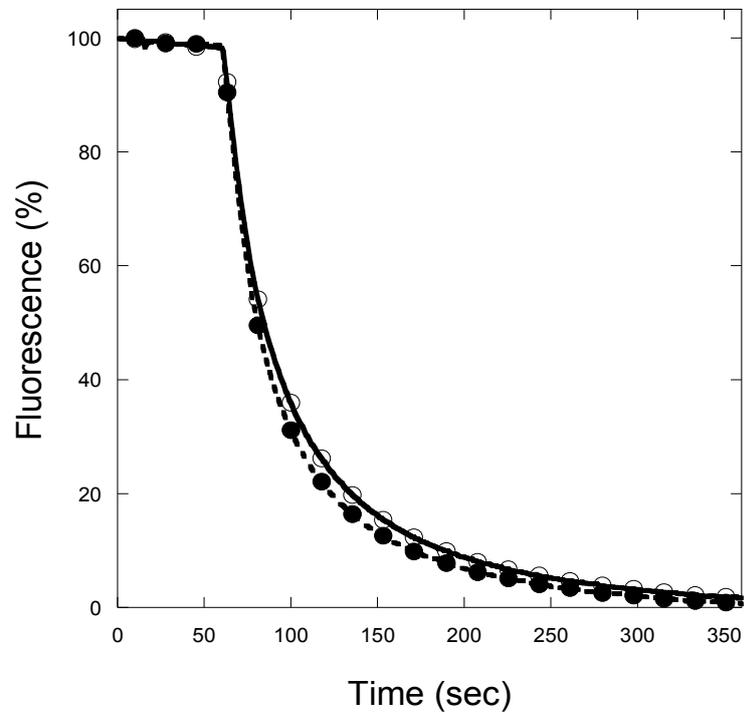


Sup Fig 6: Induction of PB fluorescence quenching by OCP^r and fluorescence recovery WT *Synechocystis* PBs (0.012 μM) were incubated in 0.8 M (A,B) or 0.5 M (C) phosphate buffer with preconverted OCP^r (0.48 μM) during 5 min under blue-green light illumination (900 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). In (A) *Syn*-3aaNtag-ECN (open circle), *Syn*-3aaNtag-CAN (closed circle), *Ana*-3aaNtag-ECN (open square), *Ana*-3aaNtag-CAN (closed square), *Arthro*-3aaNtag-ECN (open triangle), *Arthro*-3aaNtag-CAN (closed triangle). In (B) fluorescence quenching under illumination of native *Synechocystis* OCP (cross), *Syn*-3aaNtag-ECN (open circle), *Syn*-Ctag-ECN (open diamond), *Syn*-NC6aaCtag-ECN (closed circle), *Syn*-NC8aaCtag-ECN (closed square), *Syn*-NC10aaCtag-ECN (closed triangle; in (C) Native *Ana*-OCP (closed diamond), Native *Syn*-OCP (cross) and Native *Arthro*-OCP (closed triangle). The differences in the kinetics of fluorescence quenching are bigger at 0.5 M phosphate than at 0.8M phosphate. Compare Figs 6A and 6 B with sup Figs 6A and 6B respectively.

| Primer names | Primer sequences |
|-------------------------------------|---|
| pBADgIII-CrtO (BglIII/EcoRI) | Cloning using pBAD/gIII A (Invitrogen) 5'-AACAGAAGATCTATCACCACCGATGTTGTC-3' 5'-TCTGTTGAATTCGCTTCACTTGCCATACAC-3' |
| pBAD-CrtO | Mutagenesis using pBADgIII-CrtO 5'-CAGGAGGAATTAACCATGATCACCACCGATGTTGTCATTATTGGGGCG-3' 5'-CATGGTTAATTCCTCCTGTTAGCCCCAAAAACGGGTATGGAGAAACAG-3' |
| pBAD | Mutagenesis using pBAD/gIII A 5'-CAGGAGGAATTAACCATGACCATGGAGCTCGAGATCTGCAGCTGGTAC-3' 5'-CATGGTTAATTCCTCCTGTTAGCCCCAAAAACGGGTATGGAGAAACAG-3' |
| pBAD-crtW (NcoI/ EcoRI) | pBAD-crtW NcoI/ EcoRI Cloning using pBAD and primers : 5'- GATATACCATGGTTCAGTGTCAACCATCATC- 3' 5'- GCATCGGAATTCAGTCGTATTCCAGCAG -3' |
| OCPSyn-pDuet (EcoRI/NotI) | 5'-AACAGAGAATTCTCCATTACCATTGACTCT-3' 5'-TCTGTTGCGGCCGCTGTAACATTA ACTTATGA-3' |
| OCPSyn-Ctag | Mutagenesis of NcoI site [GCC(A)73GCG(A)] in OCP 5'-CAAGGAAATTCAAGCGATGGGGCCCCTC-3' 5'-GAGGGGCCCATCGCTTGAATTCCTTG-3' Amplification of the modified <i>ocp</i> gene: 5'-AACAGACCATGGCATTACCATTGACTCT-3' 5'-TCTGTTGCGGCCGCTGTAACATTA ACTTATGA-3' |
| OCPSyn-3aaNtag | 5'-CATCACCATCATCACCACCCATTACCATTGAC-3' 5'-GTGGTGATGATGGTGATGGCTGCTGCCCATGGT-3' |
| OCParthro-Ctag | 5'-AACAGACCATGGCATTACCATTGACTCG-3' 5'-TCTGTTGCGGCCGCTTATCATTACCTAATTGAGCATT-3' |
| OCParthro-3aaNtag | 5'-CATCACCATCATCACCACCCATTACCATTGAC-3' 5'-GTGGTGATGATGGTGATGGCTGCTGCCCATGGT-3' |
| OCAna-Ctag | 5'-AACAGACCATGGCAACTACTATCGATTCC-3' 5'-TCTGTTGCGGCCGCGACTCAATCTTAAACTTGTA-3' |
| OCAna-3aaNtag | 5'-CATCACCATCATCACCACGCAACTACTATCGATTCC-3' 5'-GTGGTGATGATGGTGATGGCTGCTGCCCATGGT-3' |

| Primer names | Primer sequences |
|---------------------------|--|
| OCPSyn-NC15aaCtag | Mutagenesis using pCDF-OCPSynCter 5' AATCAGGCTAATCAGGTGACTCTAAATCCACAAGTTCCATTACCATTTGACTCTGCC-3' 5' AACTTGTGGATTTAGAGTCACCTGATTAGCCTGATTGCTGCTGCCCATGGTATATCTCCT-3' |
| OCPSyn-MIX15aaCtag | 5' CGACTAGACAATCCAGAAAAAAGTACATTGAACCACCATTACCATTTGACTCTGCC-3' 5' TGGTTCAATGTCAGTTTTTTTCTGGATTGTCTAGTCGGCTGCTGCCCATGGTATATCTCCT-3' |
| OCPSyn-NC10aaCtag | 5'-AATCAGGCTAATCAGGTGACTCCATTACCATTTGACTCTGCCCGCG-3' 5'-AGTCACCTGATTAGCCTGATTGCTGCTGCCCATGGTATATCTCCT-3' |
| OCPSyn-NC8aaCtag | 5'-AATCAGGCTAATCAGCCATTACCATTTGACTCTGCCCGCGGA-3' 5'-CTGATTAGCCTGATTGCTGCTGCCCATGGTATATCTCCT-3' |
| OCPSyn-NC6aaCtag | 5'-CCATTACCATTTGACTCTGCCCGCGGAATT-3' 5'-AGAGTCAATGGTGAATGGAGCCTGATTGCTGCTGCCCATGGTATATCT-3' |
| OCPSyn-NC3aaCtag | 5'-CCATTACCATTTGACTCTGCCCGCGGAATT-3' 5'-AGAGTCAATGGTGAATGGGCTGCTGCCCATGGTATATCTCCT-3' |
| OCPSyn-C8aaCtag | 5'-AAAAAGAGAAGGGCTCCATTACCATTTGACTCTGCCCGCGGA-3' 5'-AGCCCTTCTCTTTTGTGCTGCTGCCCATGGTATATCTCCT-3' |

Sup Fig 7: List of synthetic oligonucleotides used to amplify and to clone *ocp* genes and genes involved in carotenoid synthesis.



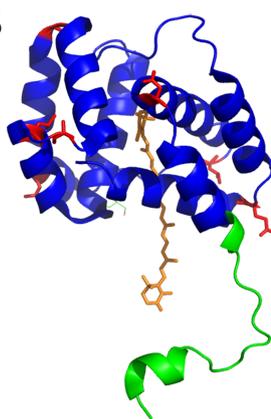
Sup Fig 8: Apo-protein effect during phycobilisome quenching

Synechocystis PBS (0.012 μM) were illuminated (30 sec, 900 photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of blue-green light) and then fluorescence quenching was induced by addition of pre-converted *Syn-3aaNtag-ECN-OCP^r* (0.48 μM) in the absence (closed symbols) or the presence of 0.48 μM of apo-OCP (open symbols) in 0.5 M phosphate buffer, in 900 photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of blue-green light.

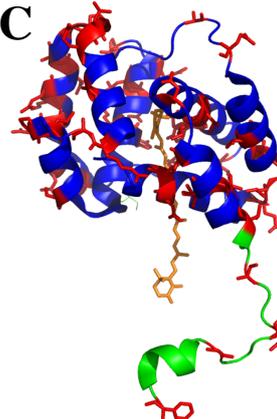
A

| | |
|---------------|---|
| Synechocystis | MPFTIDSARGIFPNTLAADVVPAT [♥] IARFSQLNAEDQLALIWFAYLEMGKTL [♥] IAAPGAAS 60 |
| Arthrospira | MPFTIDSARSIFPETLAADVVPAT [♥] IARFKQLSAEDQLALIWFAYLEMGKTL [♥] IAAPGAAN 60 |
| Anabaena | MATIDSARRIFPNTIQADAVPAL [♥] TARFNQLSAEDQLAWTWFAFLEMGKTL [♥] IVAAPGAAS 60 |
| | *.:***** **:* ** *.* ** *.* ** *.* ** *.* ** *.* ** *.* ** *.* ** *.* ** *.* ** *.* |
| Synechocystis | MQLAENALKEIQAMG [♥] PLQQTQAMCDLANR [♥] ADT [♥] PLCR [♥] TYASWSPNIKLGFWYRLGELMEQG 120 |
| Arthrospira | MQFAENTLQ [♥] EIRQ [♥] MTPLQQTQAMCDLANR [♥] TD [♥] PTIC [♥] RTYASWSPNIKLGFWYELGRFMDQG 120 |
| Anabaena | MQFAEGILKQ [♥] IKEMTFEEQTQVMCDLANH [♥] TDT [♥] PTIC [♥] RTYATWSPNIKLGFWNQLGEWMEQG 120 |
| | **:* ** *.:** * :****.*****:***.*****:***** **.* **.* |
| Synechocystis | FVAPIPAGYQLSANANAVLATI [♥] QGLESGQQTIVLRNAV [♥] VDMGF [♥] TAKD [♥] G--KRIAEPVVP 178 |
| Arthrospira | LVAPIPEGYKLSANANA [♥] ILVTIQ [♥] GIDPGQQTIVLRNCV [♥] VDMGF [♥] DTSKLGSYQRVAEPVVP 180 |
| Anabaena | AVAPIPAGYQLSANANAVLETLKSLDQ [♥] GQQTIVLRSSV [♥] VDMGF [♥] DAKLDGYTRVAEPLVA 180 |
| | **** **.*:*****:* *.:**.*: *****.***** :.* . **.*:* |
| Synechocystis | PQDTASRTK [♥] VSIEGVTNATVLNYMDNLNANDFD [♥] TIELF [♥] TS [♥] DGALQPPFQRPIV [♥] GKENVL 238 |
| Arthrospira | PQEMSQR [♥] TKVQIEGVTNSTVLQYMDNLNANDFD [♥] NLISL [♥] FAEDGALQPPFQRPIV [♥] GKENVL 240 |
| Anabaena | PKDISQR [♥] VCTIEGINNSTVLNYMNNL [♥] NANDFDEL [♥] IKLFV [♥] EDGALQPPFQRPIV [♥] GKDA [♥] IL 240 |
| | *.:**.*: * **.*:***.***:***** **.* **.* **.*:*****:*****: ** |
| Synechocystis | RFREECQNLKLI [♥] PERGVTEPAEDGFTQIKVTGK [♥] VQTPWF [♥] GGNVGMNIAWR [♥] FLLNPEGI 298 |
| Arthrospira | RFREECQNLKLI [♥] PERGVSEPTEDGYTQIKVTGK [♥] VQTPWF [♥] GGNVGMNIAWR [♥] FLLNPE [♥] NI 300 |
| Anabaena | RFREECQNLNLL [♥] PERGVAEPAD [♥] DGYTQVKVTGK [♥] VQTPWF [♥] GAAVGMNMAWR [♥] FLLNPQGI 300 |
| | *****:*.*****:*.**:* **.*:***** **.*:*****:*.** |
| Synechocystis | FFVAIDLLASPKELLNFAR 317 |
| Arthrospira | FFVAIDLLASPKELLNLVR 319 |
| Anabaena | FFVAIDLLASPKELLNLVR 319 |
| | *****:*****:* |

B



C



Sup Fig 9: Comparison of different OCPs. **(A)** Protein sequence alignment of *Synechocystis* PCC 6803, *Arthrospira* PCC 7345 and *Anabaena* PCC 7120 OCPs. In blue, OCP N-terminal domain. In green, OCP C-terminal domain. In purple, OCP loop linking both domains. (♥) corresponds to *Synechocystis* different amino acid compared to *Arthrospira* and *Anabaena*. Non-identical amino-acids in the three sequences of the N-terminal domain are marked in orange and red. **(B and C)** Structure of the N-terminal domain of *Synechocystis* OCP. The N-terminal arm is marked in green. The carotenoid is in orange. **(B)** In red, amino acids that are present in *Synechocystis* OCP but not in *Anabaena* and *Arthrospira* OCPs. **(C)** In red, all non-conserved amino acids in the three OCPs.

References

1. **Armstrong GA.** Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Annual review of microbiology* **51**, 629-659 (1997).
2. **Britton G.** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **9**, 1551-1558 (1995).
3. **Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG.** The carotenoids as anti-oxidants: a review. *Journal of photochemistry and photobiology* **41**, 189-200 (1997).
4. **Stahl W, Sies H.** Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of medicine* **24**, 345-351 (2003).
5. **Frank HA, Cogdell RJ.** Carotenoids in photosynthesis. *Photochem Photobiol* **63**, 257-264 (1996).
6. **Kawasaki S, Mizuguchi K, Sato M, Kono T, Shimizu H.** A novel astaxanthin-binding photooxidative stress-inducible aqueous carotenoprotein from a eukaryotic microalga isolated from asphalt in midsummer. *Plant & cell physiology* **54**, 1027-1040 (2013).
7. **Kerfeld CA.** Water-soluble carotenoid proteins of cyanobacteria. *Arch Biochem Biophys* **430**, 2-9 (2004b).
8. **Pilbrow J, Garama D, Carne A.** Carotenoid-binding proteins; accessories to carotenoid function. *Acta biochimica Polonica* **59**, 163-165 (2012).
9. **Sedoud A, et al.** The Cyanobacterial Photoactive Orange Carotenoid Protein Is an Excellent Singlet Oxygen Quencher. *Plant Cell* **26**, 1781-1791 (2014).

10. **Holt TK, Krogmann DW.** A carotenoid-protein from cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta* **637**, 408-414 (1981).
11. **Kerfeld CA, Kirilovsky D.** Structural, mechanistic and genomic insights into OCP-mediated photoprotection. In: *Advances in Botanical Research: Genomics in cyanobacteria* (eds Chauvat F, Cassier-Chauvat C). Elsevier (2013).
12. **Wilson A, et al.** A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 12075-12080 (2008).
13. **Wilson A, Ajlani G, Verbavatz JM, Vass I, Kerfeld CA, Kirilovsky D.** A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria. *Plant Cell* **18**, 992-1007 (2006).
14. **Kerfeld CA, et al.** The crystal structure of a cyanobacterial water-soluble carotenoid binding protein. *Structure* **11**, 55-65 (2003).
15. **Punginelli C, Wilson A, Routaboul JM, Kirilovsky D.** Influence of zeaxanthin and echinenone binding on the activity of the Orange Carotenoid Protein. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 280-288 (2009).
16. **Gwizdala M, Wilson A, Kirilovsky D.** *In vitro* reconstitution of the cyanobacterial photoprotective mechanism mediated by the Orange Carotenoid Protein in *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Cell* **23**, 2631-2643 (2011).
17. **Leverenz RL, Jallet D, Li MD, Mathies RA, Kirilovsky D, Kerfeld CA.** Structural and Functional Modularity of the Orange Carotenoid Protein: Distinct Roles for the N- and C-Terminal Domains in Cyanobacterial Photoprotection. *Plant Cell*, (2014).
18. **Wilson A, Gwizdala M, Mezzetti A, Alexandre M, Kerfeld CA, Kirilovsky D.** 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 (2012).

19. **Bhosale P, Bernstein PS.** Microbial xanthophylls. *Applied microbiology and biotechnology* **68**, 445-455 (2005).
20. **Bhosale P, Larson AJ, Frederick JM, Southwick K, Thulin CD, Bernstein PS.** Identification and characterization of a Pi isoform of glutathione S-transferase (GSTP1) as a zeaxanthin-binding protein in the macula of the human eye. *J Biol Chem* **279**, 49447-49454 (2004).
21. **Das A, Yoon SH, Lee SH, Kim JY, Oh DK, Kim SW.** An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Applied microbiology and biotechnology* **77**, 505-512 (2007).
22. **Ye VM, Bhatia SK.** Pathway engineering strategies for production of beneficial carotenoids in microbial hosts. *Biotechnol Lett* **34**, 1405-1414 (2012).
23. **Bhosale P, Bernstein PS.** Synergistic effects of zeaxanthin and its binding protein in the prevention of lipid membrane oxidation. *Biochim Biophys Acta* **1740**, 116-121 (2005).
24. **Giuffra E, Cugini D, Croce R, Bassi R.** Reconstitution and pigment-binding properties of recombinant CP29. *Eur J Biochem* **238**, 112-120 (1996).
25. **Paulsen H, Rudiger W.** Reconstitution of Chlorophyll-Ab-Containing Complexes from Lhcp Overproduced in Bacteria. *Current Research in Photosynthesis, Vols 1-4*, C727-C730 (1990).
26. **Stadnichuk IN, et al.** Site of non-photochemical quenching of the phycobilisome by orange carotenoid protein in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* **1917**, 1436-1445 (2012).
27. **Wilson A, et al.** Structural determinants underlying photoprotection in the photoactive orange carotenoid protein of cyanobacteria. *J Biol Chem* **285**, 18364-18375 (2010).

28. **Zhang H, et al.** Molecular mechanism of photoactivation and structural location of the cyanobacterial orange carotenoid protein. *Biochemistry* **53**, 13-19 (2013).
29. **Lemuth K, Steuer K, Albermann C.** Engineering of a plasmid-free Escherichia coli strain for improved in vivo biosynthesis of astaxanthin. *Microbial Cell Factories* **10**, (2011).
30. **Makino T, et al.** Characterization of cyanobacterial carotenoid ketolase CrtW and hydroxylase CrtR by complementation analysis in Escherichia coli. *Plant & cell physiology* **49**, 1867-1878 (2008).
31. **Jallet D, Thurotte A, Leverenz RL, Perreau F, Kerfeld CA, Kirilovsky D.** Specificity of the cyanobacterial orange carotenoid protein: influences of orange carotenoid protein and phycobilisome structures. *Plant Physiol* **164**, 790-804 (2014).
32. **Cunningham FX, Jr., Pogson B, Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D, Gantt E.** Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of Arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* **8**, 1613-1626 (1996).
33. **Misawa N, et al.** 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 (1995).
34. **Fernandez-Gonzalez B, Sandmann G, Vioque A.** A new type of asymmetrically acting beta-carotene ketolase is required for the synthesis of echinenone in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. *J Biol Chem* **272**, 9728-9733 (1997).
35. **Fraser PD, Miura Y, Misawa N.** In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *J Biol Chem* **272**, 6128-6135 (1997).

Brevet déposé le 25 juillet 2014

Traduction en français des revendications du brevet

Production hétérologue d'un complexe protéine-caroténoïde *in vivo*

1. Procédé de production d'un complexe protéine-caroténoïde *in vivo* comprenant les étapes consistant à:

- a) la transformation de cellules procaryotes avec des gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse de caroténoïdes et un gène codant pour une apo-protéine à caroténoïde ;
- b) la culture des cellules procaryotes transformées dans l'étape a) dans des conditions permettant l'expression séquentielle des gènes : l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des caroténoïdes doit être induite avant l'expression du gène codant l'apo-protéine à caroténoïde;
- c) l'isolement et la purification du complexe protéine-caroténoïde exprimé par les cellules procaryotes.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la cellule procaryote dans l'étape a) est transformée avec au moins un plasmide contenant les gènes impliqués dans la synthèse des caroténoïdes et avec un plasmide contenant un gène codant pour l'apo-protéine à caroténoïde, dans lequel lesdits plasmides contiennent différentes origines de répllication et une pression de sélection différente.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel au moins l'un des plasmides contient les gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse des caroténoïdes dans l'étape a) est un plasmide contenant les gènes impliqués dans la synthèse du β -carotène.

4. Procédé selon les revendications 1 à 3, dans lequel la transformation de l'étape a) comprend en outre un second plasmide contenant le gène codant une enzyme β -carotène céto-lase et / ou le gènes codant pour une enzyme β -carotène hydroxylase.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel le plasmide contenant les gènes impliqués dans la synthèse du β -carotène contient en outre le gène codant pour une enzyme β -carotène cétolase et / ou le gène codant pour une enzyme β -carotène hydroxylase sous le contrôle d'un promoteur inductible, de préférence le promoteur *araBAD*, inductible à l'arabinose.

6. Procédé selon la revendication 1, dans lequel, au sein de l'étape a) la cellule procaryote est transformée par un plasmide contenant les gènes impliqués dans la synthèse du β -carotène, le gène codant pour une enzyme β -carotène cétolase et / ou le gène codant pour une enzyme β -carotène hydroxylase et le gène codant pour l'apo-protéine à caroténoïde.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, dans lequel l'étape b) de la culture des cellules procaryotes comprenant les étapes suivantes:

b1) l'expression constitutive des gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse du β -carotène;

b2) l'induction du gène codant une enzyme β -carotène cétolase et / ou β -une enzyme β -carotène hydroxylase dans des plages de température de 33 à 40°C, de préférence de 35 à 38°C et plus préférentiellement à 37°C;

b3) l'induction du gène de l'apo-protéine à caroténoïde à des plages de températures de 20 à 30°C, de préférence de 22 à 28°C et de manière préférée de 24 à 26°C.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel la séquence du gène de l'apo-protéine à caroténoïde est modifiée par l'introduction ou la suppression de 9 à 45 nucléotides de préférence de 24 à 30 nucléotides après le codon start « ATG » en position 5' ou avant le codon stop du gène, en position 3'.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, dans lequel les gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse des caroténoïdes sont obtenus à partir de toutes les bactéries, les algues ou les plantes contenant des caroténoïdes, de préférence de cyanobactéries et d'eubactéries non-photosynthétiques et le gène codant une apo-protéine à caroténoïde est isolé de tout organisme, de préférence de cyanobactéries.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel les cellules procaryotes sont sélectionnées dans le groupe des cellules procaryotes non-photosynthétiques, de préférence *E.coli* ou *Lactococcus lactis*.

11. Un complexe protéine-caroténoïde obtenu par le procédé évoqué dans les revendications 1 à 10.

12. Le complexe protéine-caroténoïde selon la revendication 11, qui est une protéine choisie dans le groupe des protéines solubles, de préférence la protéine à caroténoïde orange (OCP), la protéine à caroténoïde rouge (RCP), l'AstaP, la crustacyanine, la glutathion s-transférase (GSTP1).

13. Selon les revendications 1 à 8, la séquence du gène *ocp* ou *rcp* est modifiée par l'introduction de 9 à 45 nucléotides, de préférence 24 à 30 nucléotides après le codon start « ATG » en position 5' du gène et / ou avant le codon stop, en position 3' du gène.

Certificat du dépôt du Brevet



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

| | | |
|---|---|---|
| Submission number | 1000250439 | |
| Application number | EP14306207.3 | |
| File No. to be used for priority declarations | EP14306207 | |
| Date of receipt | 25 July 2014 | |
| Your reference | 71302D33757 | |
| Applicant | PHYCOSOURCE | |
| Country | FR | |
| Title | IN VIVO PRODUCTION OF A RECOMBINANT CAROTENOID-PROTEIN COMPLEX | |
| Documents submitted | package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdf\71302 Specification.pdf (37 p.) SEQLTXT.txt\71302D33757_Seq listing_ST25 (3).txt f1002-2.pdf (1 p.) f1002-4.pdf (1 p.) f1002-6.pdf (1 p.) | ep-request.xml ep-request.pdf (5 p.) SPECEPO-2.pdf\71302 Drawings.pdf (11 p.) f1002-1.pdf (1 p.) f1002-3.pdf (1 p.) f1002-5.pdf (1 p.) |
| Submitted by | EMAIL=favrepetit@regimbeau.eu,CN=Frederique FAIVRE PETIT,O=CABINET REGIMBEAU,C=FR | |
| Method of submission | Online | |
| Date and time receipt generated | 25 July 2014, 15:26:07 (CEST) | |

Traité de coopération en matière de brevets (PCT)
Obtention de la protection du brevet au niveau international

PCT

POWER OF ATTORNEY

(for an international application filed under the Patent Corporation Treaty)
(PCT Rule 90.4)

The undersigned applicant(s) (Names should be indicated as they appear in the request):

PHYCOSOURCE
13 Boulevard de l'Hautil
95000 CERGY
FRANCE

Hereby appoint(s) the following person as: agent common representative

Name and address

(Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country)

REGIMBEAU

Agent's registration N° 463

20, rue de Chazelles, 75847 PARIS CEDEX 17, FRANCE

to represent the undersigned before all the competent International Authorities
 the International Searching Authority only
 the International Preliminary Examining Authority only

in connection with the international application identified below:

Title of the invention: **IN VIVO PRODUCTION OF A RECOMBINANT CAROTENOID-PROTEIN COMPLEX**

Applicant's or agent's file reference: **B368090 / D33757**

International application number (if already available) **PCT/EP2015/067071**

Filed with the following Office: European Patent Office
as receiving Office and to make or receive payments on behalf of the undersigned

Signature of the applicant(s) (where there are several applicants, each of them must sign next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs, if such capacity is not obvious from reading the request or this power).

Date:

Form PCT/Model of power of attorney (for a given international application) (July 1992)

Chapitre III

Optimisation du système de production de l'OCP
chez *Escherichia coli*

1^{ère} sous-partie

Création des souches *Escherichia coli* produisant l'OCP avec deux puis un plasmide(s)

Suite à la réussite de la production hétérologue de l'OCP (Bourcier de Carbon C., et al., 2015) et de son rendement obtenu, nous avons décidé d'aller plus loin dans son optimisation.

Jusqu'alors, en seulement 4 jours, nous obtenions 30mg d'holo-OCP de *Synechocystis* à partir de 1L de culture de *E.coli* possédant les 3 plasmides, incluant la construction Syn-3aaNtag. Nous obtenions 200 fois plus d'holo-OCP dans un temps de culture réduit de 5 fois par rapport à ce qui était précédemment établi lors de la surexpression de l'OCP dans les cyanobactéries (A. Wilson, D.Kirilovsky et C.Bourcier de Carbon, données non publiées).

Afin d'optimiser la production de l'OCP, nous avons choisi de réduire le nombre de plasmides du système jusqu'à n'en obtenir plus qu'un, sans changer les conditions de culture ni inductions des gènes, préétablies avec le système 3 plasmides.

Notre hypothèse fut que, chaque gène cloné dans un plasmide et exprimé dans la cellule est un coût énergétique pour elle-même. Il faut que la cellule exprime le produit du gène de résistance à l'antibiotique afin d'être maintenu, puis, qu'elle exprime le ou les produit(s) de(s) gène(s) cloné(s) et enfin, qu'elle réplique celui-ci à chacune des divisions cellulaires. Tous ces événements sont coûteux énergétiquement pour la cellule. Avec la stratégie de réduire le nombre de plasmides, nous espérons obtenir une quantité d'holo-OCP récoltée supérieure. Comme la cellule va gagner en énergie, elle devrait donc en utiliser davantage pour produire notre protéine. Avec ce nouveau système, nous souhaitons conserver les inductions, les températures et les temps de culture. Si aucune condition de culture ne doit changer, il faut donc cloner les phases codantes des gènes *crt* et *ocp* avec les séquences Shine-Dalgarno apportées par le plasmide dans lequel ils sont clonés dans le système 3 plasmides.

Nous avons décidé de nous affranchir du plasmide permettant la synthèse du β -carotène dans les cellules sachant que les plasmides le permettant sont des dons de deux laboratoires: pAC-BETA (Cunningham et al., 1996) et pACCAR16 Δ CrtX (Misawa et al., 1995). Nous avons cloné, dans le plasmide construit dans notre travail, pBAD-CrtO, l'opéron de gènes *Crt*. Ce clonage est délicat car chacun des deux opérons (celui de pAC-BETA ou celui de pACCAR16 Δ CrtX) est de grande taille (> 6kb). Avec le système 3 plasmides, nous utilisons

le plasmide pAC-BETA afin de synthétiser le β -carotène dans les cellules, mais son opéron a une taille égale à 7 kb. Nous avons donc décidé de cloner l'opéron de gènes *Crt* du plasmide pACCAR16 Δ CrtX qui, lui, a une taille inférieure, égale à 6,1 kb. Le clonage de l'opéron de gènes *Crt* dans le plasmide pBAD-CrtO a été délicat, en effet, le plasmide pBAD-CrtO a une taille de 5.7 kb tandis que le fragment *Crt* à insérer est de taille supérieur, soit 6.1 kb. Pour cloner cet opéron avec le promoteur constitutif du premier gène: *crtE*, il a fallut se plonger dans la genèse du clonage initial, dans l'article de Misawa et al., 1995, en suivant toutes les étapes de clonage qu'ils avaient réalisées.

La première étape fut alors de construire le système de production de l'OCP sur deux plasmides : (pBAD-CrtO-Crt^(pACCAR16 Δ CrtX) et pCDF-OCP-Syn-3aaNtag) et de s'assurer qu'avec ce nouveau système la production de l'OCP de *Synechocystis* était toujours viable et robuste et pourquoi pas, selon notre hypothèse initiale, augmentée.

Afin de construire le système de production de l'OCP sur 1 seul et unique plasmide, il fallait cloner le gène *ocp* sous le contrôle du promoteur *T7lac*, inductible à l'IPTG, présent sur le plasmide pCDF-Duet1, dans le plasmide pBAD-CrtO-Crt^(pACCAR16 Δ CrtX) afin de créer l'unique plasmide pBAD-CrtO-Crt^(pACCAR16 Δ CrtX)-OCP-Syn-3aaNtag. Une fois le plasmide réalisé, nous nous sommes à nouveau assurés de la robustesse de la production de l'OCP et pourquoi pas, selon notre hypothèse initiale, une augmentation de la quantité d'holo-OCP récoltée par rapport aux systèmes 3 et 2 plasmides.

Pour une meilleure compréhension de la mise au point de l'expression hétérologue des gènes portés sur deux puis un plasmide(s), je vais détailler les constructions de biologie moléculaire pour y parvenir.

L'amélioration de la production d'holo-OCP de *Synechocystis* nous a permis de recueillir 120mg d'holo-OCP récoltée à partir de 1L grâce au système 1 plasmide. Je tiens à préciser que, que ce soit avec le système 3, 2 ou 1 plasmide(s) et la construction OCP-Syn-3aaNtag, 100% d'holo-OCP est, à chaque fois, obtenue, ce n'est que la quantité totale d'holo-OCP récoltée qui change. Notre hypothèse initiale de réduire le coût énergétique d'*E.coli* afin d'obtenir d'avantage d'holo-OCP s'est avérée juste.

1-1 Création de la souche *Escherichia coli* produisant l'OCP avec les gènes portés sur deux plasmides

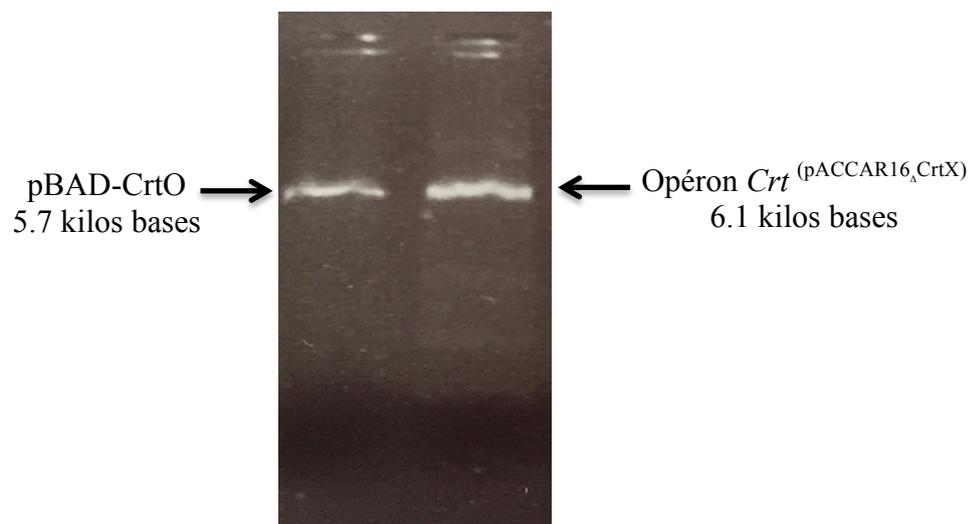
Construction du plasmide contenant les gènes codant les enzymes nécessaires à la synthèse du β -carotène et à la conversion du β -carotène en échinénone sur un même et unique plasmide.

Construction du plasmide pBAD-CrtO-Crt^(pACCAR16 Δ CrtX) (Conversion du β -carotène en échinénone porté par un seul plasmide)

L'amplification de l'opéron de gènes *Crt* a été réalisée à partir du plasmide pACCAR16 Δ CrtX comme matrice, avec le couple d'oligonucléotides pBAD-CrtO-Crt :

| | |
|---|-------------|
| F-pBAD-CrtO-Crt: AACAGAGTTTAAACCGGTACCGCACGGTCTGCCAATCCGACGGAG | <i>PmeI</i> |
| R-pBAD-CrtO-Crt: GCCGTTTCTAGAACGCTCCGGGAAAGACATGGCGCTAGAGCG | <i>XbaI</i> |

L'amplicon obtenu a ensuite été cloné dans les plasmides pBAD-CrtO aux sites de restriction *PmeI* et *XbaI*.



Sur gel d'ADN 1% : amplicon de l'opéron *Crt* (6.1 kb) et plasmide pBAD-CrtO linéarisé avec *PmeI/XbaI* (5.7 kb) pour le clonage du plasmide pBAD-CrtO-Crt^(pACCAR16 Δ CrtX)

Le plasmide ainsi créé se nomme pBAD-CrtO-Crt^(pACCAR16_ΔCrtX) et permet la synthèse de l'échinenone.

Afin que les cellules produisent l'OCP de *Synechocystis* avec la construction OCP-Syn-3aaNtag, qui permet d'obtenir 100% d'holo-OCP, elles doivent être transformées avec les 2 plasmides requis (Figure 37) : celui nécessaire à la synthèse de l'échinenone pBAD-CrtO-Crt^(pACCAR16_ΔCrtX) et celui nécessaire à la production de l'apo-OCP (pCDF-OCP-Syn-3aaNtag). Les conditions de culture de cette souche restent inchangées par rapport au système 3 plasmides. **Grâce au système d'expression porté par 2 plasmides, 60mg d'holo-OCP de *Synechocystis* a été récolté, après 1L de culture *E.coli*, soit 2 fois plus qu'avec le système 3 plasmides.**

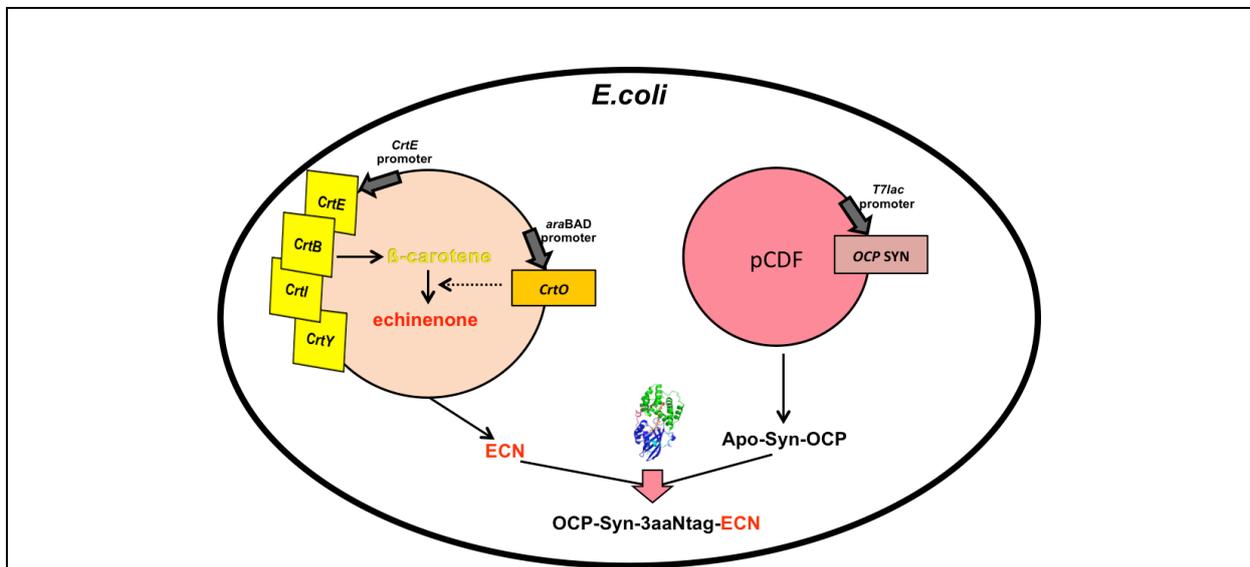


Figure 37

Représentation schématique de la production de l'OCP dans *E. coli* avec le système 2 plasmides

E. coli produisant l'OCP avec deux plasmides: le plasmide pBAD-CrtO-Crt^(pACCAR16_ΔCrtX) (orange), portant les gènes impliqués dans la synthèse du β -carotène (*crtE*, *crtB*, *crtI* et *crtY*) sous le contrôle du promoteur constitutif *crtE*, et le gène de la CrtO pour convertir le β -carotène en ECN sous le contrôle du promoteur *araBAD* (arabinose inductible); le plasmide pCDF-OCP-Syn-3aaNtag (rouge) portant le gène de l'OCP de *Synechocystis*, sous le contrôle du promoteur *T7lac*, IPTG inductible.

1-2 Création de la souche *Escherichia coli* produisant l'OCP avec les gènes portés sur un plasmide

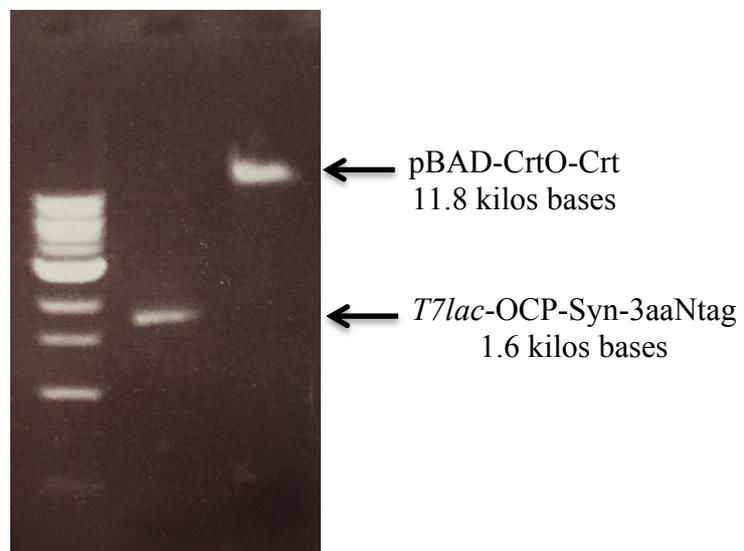
Construction du plasmide contenant les gènes codant les enzymes nécessaires à la synthèse du β -carotène, à la conversion du β -carotène en échinénone ainsi que le gène de l'OCP avec la construction 3aaNtag sur un même et unique plasmide.

Construction du plasmide pBAD-CrtO-Crt^(pACCAR16_ACrtX)-OCPsyn3aaNtag

L'amplification du gène de l'OCP de *Synechocystis* PCC 6803 avec le promoteur *T7lac*, a été réalisée à partir du plasmide pCDF-OCP-Syn-3aaNtag comme matrice, avec le couple d'oligonucléotides pBAD-full:

| | |
|---|-------------|
| pBAD-full-F: AACAGAA ACATG TGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCA | PciI |
| pBAD-full-R: AACAGAA ACATG TCAAGACCCGTTTAGAGGCCCCAAGGG | PciI |

L'amplicon obtenu a ensuite été cloné dans le plasmide pBAD-CrtO-Crt^(pACCAR16_ACrtX) au site de restriction *PciI*.



Sur gel d'ADN 1% : amplicon *T7lac*-OCP-Syn-3aaNtag (1.6 kb) et plasmide pBAD-CrtO-Crt^(pACCAR16_ACrtX) (11.8 kb) linéarisé avec l'enzyme de restriction *PciI* pour le clonage du plasmide pBAD-CrtO-Crt^(pACCAR16_ACrtX)-OCP-Syn-3aaNtag.

Le plasmide ainsi créé se nomme pBAD-CrtO-Crt^(pACCAR16_ΔCrtX)-OCP-Syn-3aaNtag (13.4 kb). Si *E.coli* est transformée avec ce seul et unique plasmide, elle produit l'OCP-Syn-3aaNtag liant l'échinénone (Figure 38). Les conditions de culture de cette souche restent inchangées par rapport au système 3 plasmides.

Grâce au système de production hétérologue porté par 1 seul plasmide, 120mg d'holo-OCP de *Synechocystis* a été récolté, après 1L de culture *E.coli*, soit 4 fois plus qu'avec le système 3 plasmides. Nous avons donc réussi l'optimisation de la production de l'OCP en réduisant la quantité de plasmide dans la cellule.

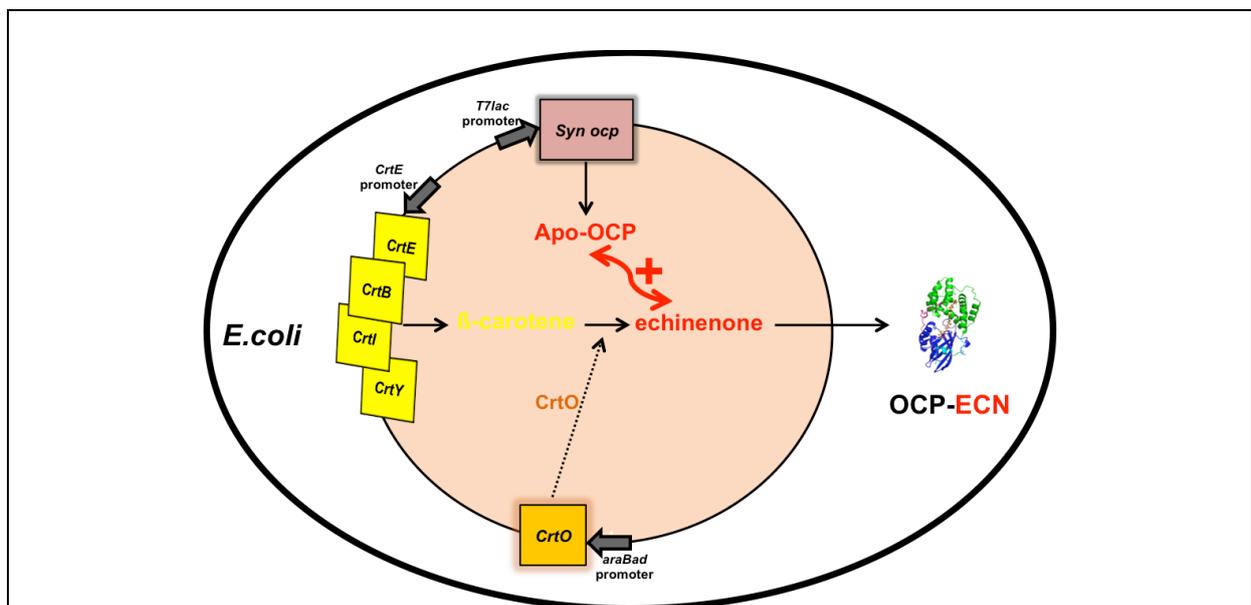


Figure 38

Représentation schématique de la production de l'OCP dans *E. coli* avec le système 1 plasmide

E. coli produisant l'OCP avec un seul et unique plasmide: le plasmide pBAD-CrtO-Crt^(pACCAR16_ΔCrtX)-OCP-Syn-3aaNtag (orange), portant tous les gènes impliqués dans la production de l'OCP liant l'échinénone. L'opéron de gènes *Crt* (*crtE*, *crtB*, *crtI* et *crtY*) est sous le contrôle de son promoteur constitutif *crtE*, le gène de l'enzyme *CrtO* est sous le contrôle du promoteur *araBAD* (arabinose inductible) et le gène de l'OCP-Syn-3aaNtag est sous le contrôle du promoteur *T7lac*, IPTG inductible.

2^{ème} sous-partie

Création des souches *Escherichia coli* produisant l'OCP avec le caroténoïde 3'hydroxy-échinénone

La production hétérologue de l'OCP liant l'échinénone, la canthaxanthine ou encore la zéaxanthine a été achevée avec réussite et les rendements en protéines obtenus ont été satisfaisants pour une potentielle production industrielle de l'OCP. De plus, ce système a déjà permis au laboratoire d'étudier des mutations du gène de l'OCP, et ce, rapidement et quantitativement ; en effet, à chaque purification d'OCP à partir d'1L de culture *E.coli*, de grandes quantités d'OCP sont récoltées, ce qui est très avantageux pour pouvoir l'expérimenter et pour reproduire ces expérimentations à partir de la même préparation d'OCP.

Rappelons que chez *Synechocystis* PCC 6803 et *Arthrospira* PCC 7345, l'OCP lie le caroténoïde 3'hydroxyéchinénone (hECN). Afin de pouvoir recréer l'OCP native dans l'organisme *E.coli*, il serait intéressant de pouvoir la produire avec ce caroténoïde. Mais des études ont démontré qu'il est très difficile d'obtenir ce caroténoïde chez *E.coli* puisque les gènes impliqués dans sa synthèse sont aussi impliqués dans d'autres voies de synthèse de caroténoïdes (K Lemuth et al., 2011 et T Makino et al., 2008). Nous avons tout de même essayé de relever le défi et de construire une souche *E.coli* permettant la production de l'OCP avec le hECN, et ce, de plusieurs façons.

Malheureusement, malgré tous les efforts que nous avons déployés afin de pouvoir créer cette souche, aucune de nos constructions ne nous ont permis de l'obtenir. Je vais malgré tout vous présenter les constructions de biologie moléculaire pour y parvenir.

2-1 1^{ère} Création : *Escherichia coli* produisant l'OCP liant l'hydroxy-echinenone

Construction du plasmide contenant le gène de l'OCP de *Synechocystis* et celui codant l'enzyme CrtR de *Synechocystis*, permettant la conversion de l'ECN en hECN mais aussi du β -carotène en ZEA, sur le plasmide pCDF-OCPsyn-pDuet.

Construction du plasmide pCDF-OCPsyn-pDuet-CrtRsyn

L'amplification du gène de la CrtR de *Synechocystis* PCC 6803, a été réalisée à partir de l'ADN génomique de *Synechocystis* PCC 6803 comme matrice, avec le couple d'oligonucléotides pCDF-OCP-CrtR:

| | |
|---|--------------|
| F- pCDF-OCP-CrtR: AACAGAGATATCATGCCAGGAGTCCGTCATA | <i>EcoRV</i> |
| R- pCDF-OCP-CrtR: TCTGTTCTCGAGCAATAACTTACCCGATT | <i>XhoI</i> |

L'amplicon obtenu a ensuite été cloné dans le plasmide pCDF-OCP-Syn-pDuet, dans le MSC2, aux sites de restriction *EcoRV* et *XhoI*. Le plasmide ainsi créé se nomme pCDF-OCPsyn-pDuet-CrtRsyn. Si *E.coli* est transformée avec pAC-BETA, pBAD-CrtO et pCDF-OCPsyn-pDuet-CrtRsyn, elle produira l'OCP de *Synechocystis* avec, peut être, de l'hECN (Figure 39). Les conditions de culture de cette souche sont équivalentes à celles du système 3 plasmides.

Les caroténoïdes synthétisés dans cette souche ont été analysés par CCM (Figure 40). Malheureusement, l'enzyme CrtR de *Synechocystis* n'a pas fait qu'uniquement convertir le ECN en hECN, mais a majoritairement convertit le β -carotène en ZEA. Nous avons obtenu un mélange de caroténoïdes : du β -carotène synthétisé constitutivement par la plasmide pAC-BETA, de l'ECN et des traces de CAN convertis à partir du β -carotène grâce au plasmide pBAD-CrtO puis de la ZEA et de l'hECN convertis à partir du β -carotène et de l'ECN respectivement par l'enzyme CrtR cloné dans le plasmide pCDF-OCPsyn-pDuet-CrtRsyn (Figure 40 : CCM). Comme dans la littérature, nous n'avons pas réussi à obtenir une quantité majoritaire d'hECN dans *E.coli*. L'OCP récoltée de cette souche contenant un mélange de caroténoïdes avec une majorité de ZEA.

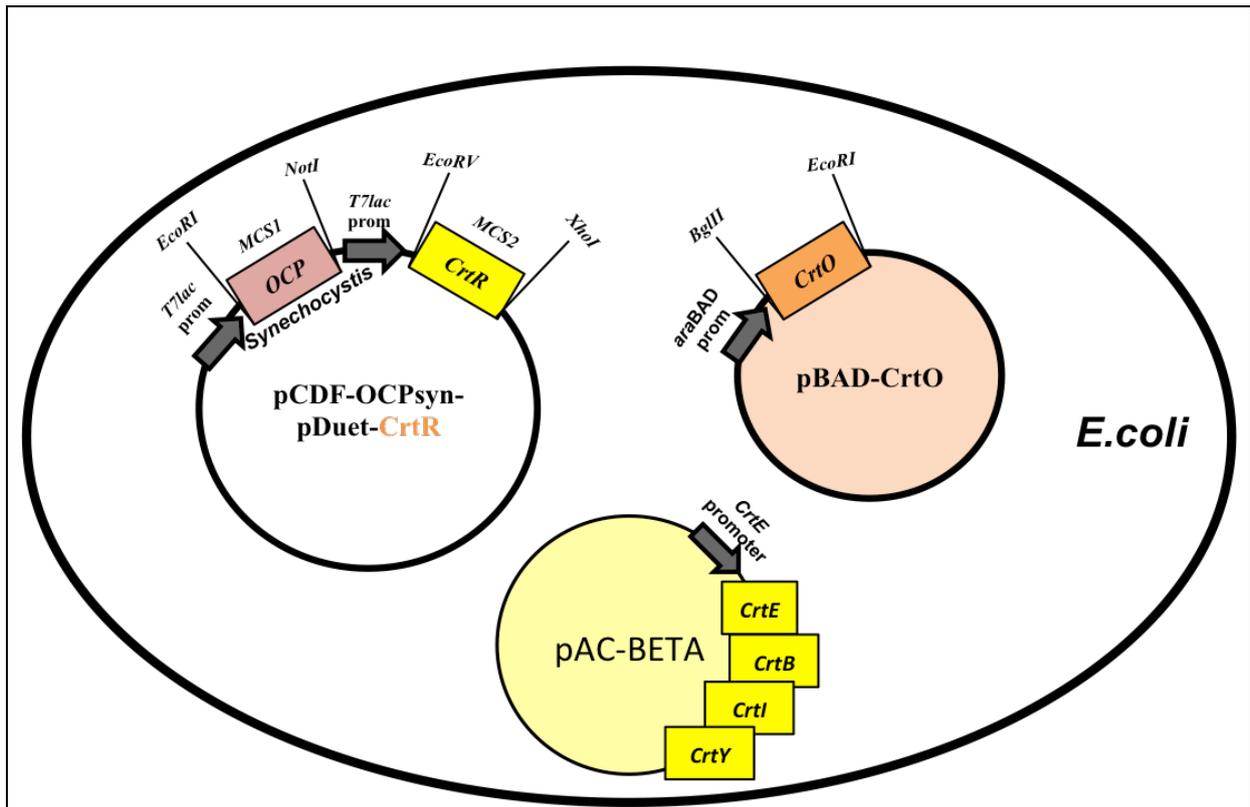


Figure 39

Représentation schématique de la souche *E.coli* potentielle productrice d'OCP-hECN N°1

E. coli produisant l'OCP-hECN avec 3 plasmides: le plasmide pAC-BETA (jaune) portant les gènes impliqués dans la synthèse du β -carotène (*crtE*, *crtB*, *crtI* et *crtY*) sous le contrôle du promoteur *crtE*; le plasmide pBAD-CrtO (orange), portant le gène de l'enzyme CrtO permettant la conversion du β -carotène en ECN sous le contrôle du promoteur *araBAD* (arabinose inductible); le plasmide pCDF-OCP-CrtR (blanc) portant le gène de l'OCP de *Synechocystis* sous le contrôle du promoteur *T7lac*, IPTG inductible au sein du MCS1 et le gène de l'enzyme CrtR de *Synechocystis* PCC 6803 sous le contrôle du promoteur *T7lac*, IPTG inductible au sein du MCS2.

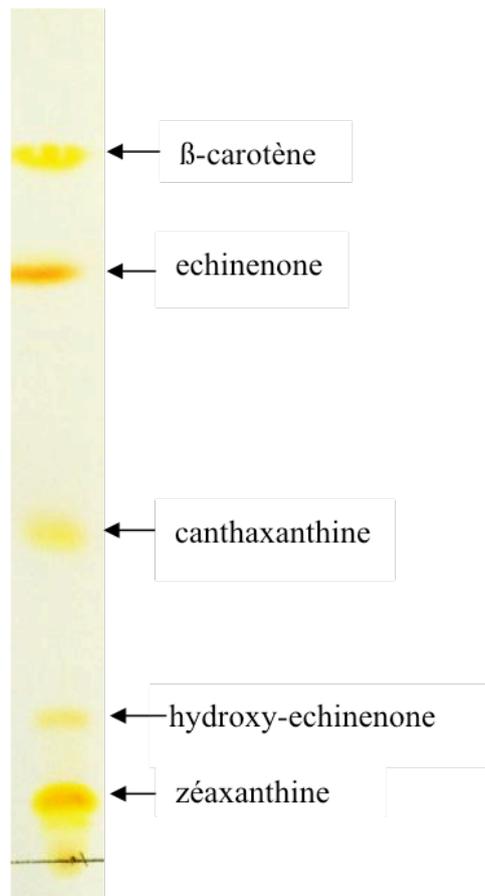


Figure 40

CCM de l'extrait des caroténoïdes totaux synthétisés par *E.coli* possédant les plasmides pAC-BETA, pBAD-CrtO, pCDF-OCPsyn-CrtRsyn

Les cellules transformées avec les plasmides pAC-BETA, pBAD-CrtO et pCDF-OCPsyn-CrtRsyn ont été cultivées suivant le protocole de production de l'OCP dans *E.coli* avec les inductions arabinose et IPTG. Avec cette construction, l'IPTG va induire en même temps le gène de l'OCP ainsi que celui codant l'enzyme CrtR qui va convertir le ECN en hECN mais aussi le β -carotène en zéaxanthine. Le contenu de ces cellules a été analysé en CCM pour identifier les caroténoïdes présents. Elles synthétisent un mélange de caroténoïdes : efficacement l'echinenone et la zéaxanthine avec un pool constant et constitutif de β -carotène, des traces de canthaxanthine et de hECN.

2-2 2^{ème} Création : *Escherichia coli* produisant l'OCP liant l'hydroxy-echinenone

Construction du plasmide pBAD-OCP-SynCtag permettant la production de l'OCP de *Synechocystis* avec l'induction de son gène avec l'arabinose. Création du plasmide pCDF-CrtO-CrtRsyn permettant la conversion du β -carotène en ECN par la CrtO, puis de l'ECN en hECN, mais aussi du β -carotène en ZEA par la CrtR, sur un même plasmide pCDF, avec induction IPTG de ces gènes (*crtO* et *crtR*).

Construction du plasmide pBAD-OCP-SynCtag

L'amplification du gène de l'OCP de *Synechocystis* PCC 6803 His6 Taggée en position C-terminal, a été réalisée à partir du plasmide pSK-OCpsyn-CterHisTag Δ FRP-A73A (Wilson et al., 2008) comme matrice, avec le couple d'oligonucléotides pBAD-OCP:

| | |
|---|--------------|
| F- pBAD-OCP : AACAGACCATGGCCGCATTCACCATTGACTCTGCC | <i>NcoI</i> |
| R- pBAD-OCP: TCTGTTAGATCTTCTAACATTA ACTTATGA | <i>BglII</i> |

L'amplicon obtenu a ensuite été cloné dans le plasmide pBAD aux sites de restriction *NcoI* et *BglII*. Le plasmide ainsi créé se nomme pBAD-OCpsyn.

Construction du plasmide pCDF-CrtO-CrtRsyn

Les amplifications des gènes *crtO* et *crtR* de *Synechocystis* PCC 6803 ont été réalisées à partir de l'ADN génomique de *Synechocystis* PCC 6803 comme matrice, avec le couple d'oligonucléotides pCDF-CrtO et pCDF-CrtO-CrtR:

| | |
|--|--------------|
| F- pCDF-CrtO : AACAGAAGATCTTATCACCACCGATGTTGTC | <i>BglII</i> |
| R- pCDF-CrtO : TCTGTTCTCGAGGCTTCACTTGCCATACAC | <i>XhoI</i> |
| F- pCDF-CrtO-CrtR: AACAGAGAATTCTGTGTGCCAGGAGTCCGTCATAGTA | <i>EcoRI</i> |
| R- pCDF-CrtO-CrtR: TCTGTTGCGGCCGCCAATTA CTACCCGATTT | <i>NotI</i> |

Les amplicons obtenus ont ensuite été clonés dans le plasmide pCDF aux sites de restriction *BglII* et *XhoI* dans le MCS2 pour *crtO* puis aux sites de restriction *EcoRI* et *NotI* dans le MCS1 pour *crtR*. Le plasmide ainsi créé se nomme pCDF-CrtO-CrtRsyn.

Si *E.coli* est transformée avec pAC-BETA, pCDF-CrtO-CrtRsyn et pBAD-OCPSynCtag, elle produira l'OCP de *Synechocystis* avec, peut être, de l'hECN (Figure 41). Les conditions de culture de cette souche sont équivalentes à celles du système 3 plasmides.

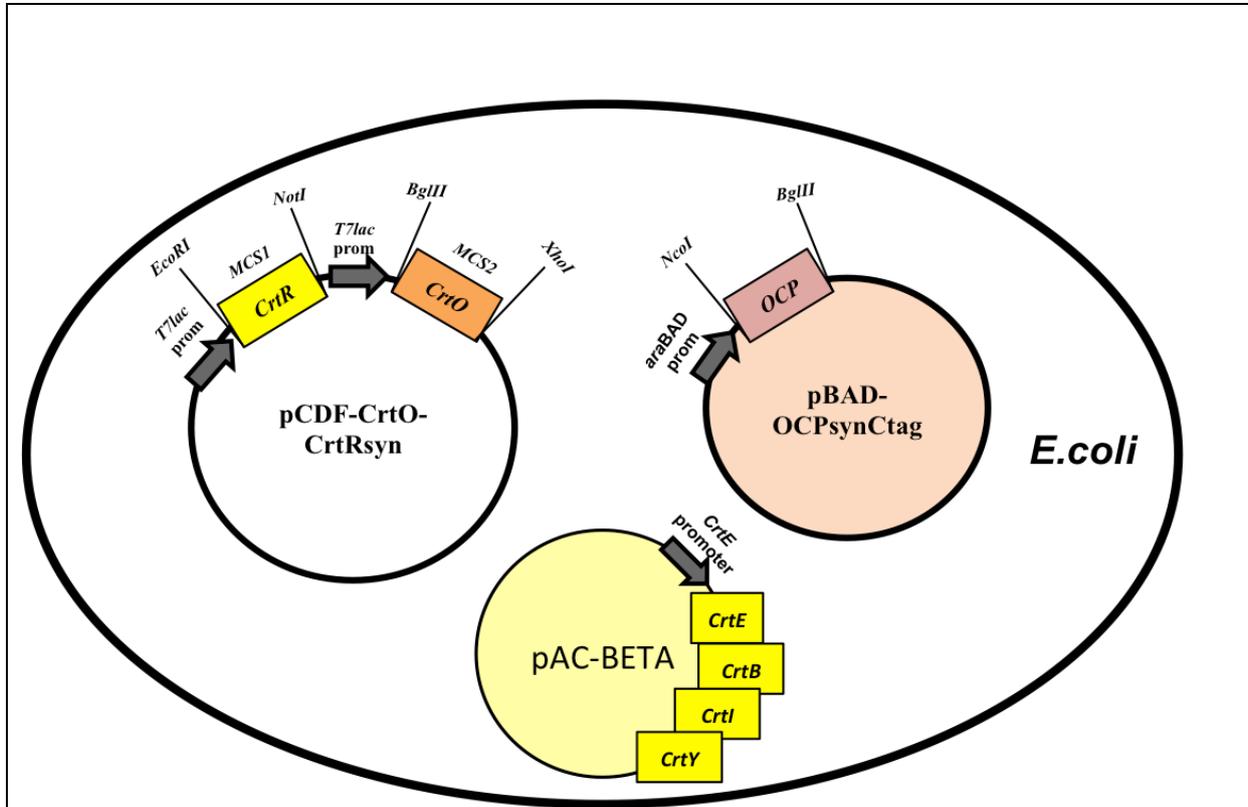


Figure 41

Représentation schématique de la souche *E.coli* potentielle productrice d'OCP-hECN N°2

E. coli produisant l'OCP-hECN avec 3 plasmides: le plasmide pAC-BETA (jaune) portant les gènes impliqués dans la synthèse du β -carotène (*crtE*, *crtB*, *crtI* et *crtY*) sous le contrôle du promoteur *crtE*; le plasmide pCDF-CrtO-CrtRsyn (blanc), portant le gène de la CrtO permettant la conversion du β -carotène en ECN dans le MCS2 et le gène de la CrtR permettant la conversion de l'ECN en hECN mais aussi du β -carotène en ZEA dans le MSC1, sous le contrôle du promoteur *T7lac* (IPTG inductible); le plasmide pBAD-OCPSynCtag (orange) portant le gène de l'OCP de *Synechocystis* sous le contrôle du promoteur *araBAD*, arabinose inductible.

Au sein de cette souche, la première induction du gène *crtO* était réalisée avec l'IPTG pour convertir le β -carotène, synthétisé par pAC-BETA, en ECN par la CrtO puis en hECN par la CrtR ; car les gènes *crtO* et *crtR* étaient clonés sur le même plasmide pCDFDuet-1, et leur expression était induite en même temps, avec l'ajout d'IPTG. La seconde induction était réalisée avec l'arabinose pour induire l'expression du gène de l'OCP de *Synechocystis*, cloné dans le plasmide pBAD.

Les caroténoïdes synthétisés par cette souche ont été analysés par CCM et malheureusement le caroténoïde majoritaire retrouvé était la ZEA. Cette construction allouait l'expression des gènes *crtO* et *crtR* en même temps par l'induction IPTG. Le caroténoïde synthétisé majoritairement était la ZEA, nous avons donc supposé que la CrtR, synthétisée en même temps que la CrtO, avait une plus forte affinité pour le β -carotène. La conversion de l'ECN à partir du β -carotène par la CrtO était alors très minoritaire. Les cellules synthétisaient majoritairement la ZEA par l'activité de la CrtR, la CrtR n'avait donc pas de substrat ECN pour produire de l'hECN.

Cette 2^{ème} création ne nous a pas permis d'obtenir de l'hECN dans *E.coli*. Contrairement à cette création, la 1^{ère} création nous a permis d'obtenir des traces d'hECN avec un mélange d'ECN et de ZEA en majorité, car le gène *crtR*, présent sur le plasmide pCDF-OCPsyn-pDuet-CrtRsyn était induit par l'IPTG, après le gène *crtO* présent sur le plasmide pBAD-CrtO, induit avec l'arabinose.

Pour obtenir de l'hECN dans *E.coli*, il est primordial d'induire le gène de la CrtO avant celui de la CrtR afin que les cellules puissent produire de l'ECN avant que la CrtR soit synthétisée. Si la CrtR est exprimée en même temps que la CrtO, elle va convertir tout le β -carotène présent dans la cellule en ZEA, avec plus d'affinité que la CrtO pour le β -carotène.

2-3 3^{ème} Création : *Escherichia coli* produisant l'OCP liant l'hydroxy-echinenone

Construction du plasmide contenant le gène de l'OCP de *Synechocystis* et celui codant l'enzyme CrtR d'*Anabaena* PCC 7120 sur le plasmide pCDF-OCPSyn-pDuet.

Il a été démontré que l'enzyme CrtR d'*Anabaena* est incapable de convertir le β -carotène en ZEA et que cette enzyme est impliquée dans la voie des myxol 2'-fucoside (T Makino et al., 2008). Mais cette enzyme n'a jamais été étudiée pour sa capacité à convertir l'ECN en hECN. C'est pourquoi j'ai voulu expérimenter l'activité de l'enzyme CrtR d'*Anabaena* sur l'ECN synthétisé par la CrtO de *Synechocystis* grâce au plasmide pBAD-CrtO.

Construction du plasmide pCDF-OCPSyn-pDuet-CrtRana

L'amplification du gène de la CrtR d'*Anabaena* PCC 7120 (*alr4009* : 840 nt), a été réalisée à partir de l'ADN génomique d'*Anabaena* PCC 7120 comme matrice, avec le couple d'oligonucléotides pCDF-OCP-CrtRana:

| | |
|---|---------------|
| F- pCDF-OCP-CrtRana: AACAGAAGATCTTCTTTTATTTTCGGCATCGGTG | <i>BglIII</i> |
| R- pCDF-OCP-CrtRana: GTTTCTCTCGAGCTATGCCTCTAGATTATTACT | <i>XhoI</i> |

L'amplicon obtenu a ensuite été cloné dans le plasmide pCDF-OCP-Syn-pDuet, dans le MSC2, aux sites de restriction *BglIII* et *XhoI*. Le plasmide ainsi créé se nomme pCDF-OCPSyn-pDuet-CrtRana. Si *E.coli* est transformée avec pAC-BETA, pBAD-CrtO et pCDF-OCPSyn-pDuet-CrtRana, elle produira l'OCP de *Synechocystis* avec, peut être, de l'hECN (Figure 42). Les conditions de culture de cette souche sont équivalentes à celles du système 3 plasmides.

Les caroténoïdes synthétisés dans cette souche ont été analysés par CCM (Figure 43). Malheureusement, l'enzyme CrtR d'*Anabaena* n'a aucune activité sur l'ECN car aucune trace d'hECN n'est retrouvée dans l'extraction de caroténoïdes de cette souche (Figure 43 : CCM). Comme démontré, elle ne convertit pas non plus le β -carotène en ZEA car aucune trace de ZEA n'est retrouvée dans les cellules. L'enzyme CrtR d'*Anabaena* PCC 7120 joue uniquement un rôle dans la voie des myxols et non pas dans la voie des xanthophylles (T Makino et al., 2008).

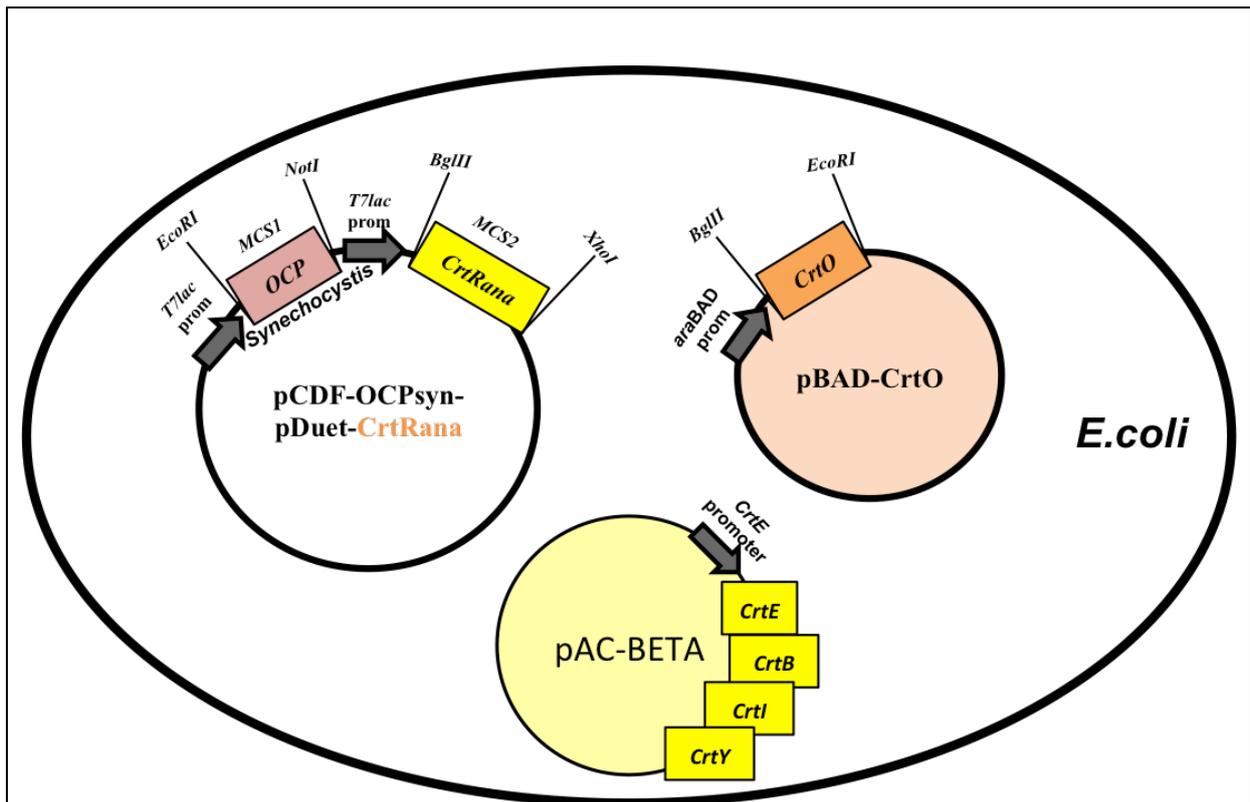


Figure 42

Représentation schématique de la souche *E.coli* potentielle productrice d'OCP-hECN N°3

E. coli produisant l'OCP-hECN avec 3 plasmides: le plasmide pAC-BETA (jaune) portant les gènes impliqués dans la synthèse du β -carotène (*crtE*, *crtB*, *crtI* et *crtY*) sous le contrôle du promoteur *crtE*; le plasmide pBAD-CrtO (orange), portant le gène de la CrtO permettant la conversion du β -carotène en ECN sous le contrôle du promoteur *araBAD* (arabinose inductible); le plasmide pCDF-OCP-CrtRana (blanc) portant le gène de l'OCP de *Synechocystis* sous le contrôle du promoteur *T7lac*, IPTG inductible au sein du MCS1 et le gène de l'enzyme CrtR d'*Anabaena* PCC 7120 sous le contrôle du promoteur *T7lac*, IPTG inductible au sein du MCS2.

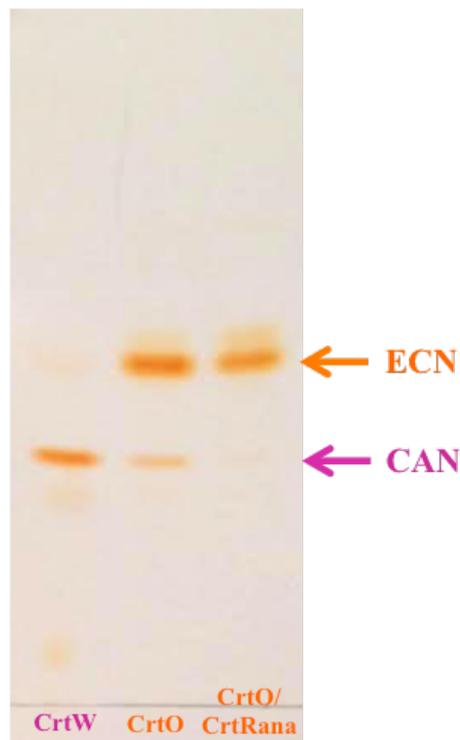


Figure 43

CCM de l'extrait des caroténoïdes totaux synthétisés par *E.coli* possédant les plasmides pAC-BETA, pBAD-CrtO et pCDF-OCPsyn-CrtRana

Les deux premières pistes sur la CCM sont les contrôles de l'expérience. La première piste montre les caroténoïdes synthétisés puis extraits de la souche possédant les plasmides pAC-BETA et pBAD-CrtW, souche qui synthétise la CAN. La deuxième piste montre les caroténoïdes synthétisés puis extraits de la souche possédant les plasmides pAC-BETA et pBAD-CrtO, souche qui synthétise l'ECN majoritairement avec des traces de CAN.

Les cellules transformées avec les plasmides pAC-BETA, pBAD-CrtO et pCDF-OCPsyn-CrtRana ont été cultivées suivant le protocole de production de l'OCP dans *E.coli* (inductions arabinose et IPTG). Ces cellules possèdent un profil d'extraction de caroténoïdes équivalent à celui de la deuxième piste sur la CCM. L'enzyme CrtR d'*Anabaena* n'a eu aucune activité, ni sur le β -carotène ni sur l'ECN, synthétisé par la CrtO de *Synechocystis*.

2-4 4^{ème} Création : *Escherichia coli* produisant l'OCP liant l'hydroxy-echinenone

Cette dernière construction testée est différente des trois précédentes. Cette fois-ci, au lieu de cloner le gène codant l'enzyme CrtR de *Synechocystis*, capable de convertir l'ECN en hECN sur un plasmide, j'ai essayé d'insérer le gène codant cette enzyme dans le génome d' *E.coli*, grâce au site de transposition *Tn7*, selon la méthode de GJ McKenzie et NL Craig (McKenzie and Craig, 2006b).

La souche ainsi créée porte le gène codant l'enzyme CrtR de *Synechocystis* dans son génome, puis est rendue compétente afin de la transformer avec les plasmides pAC-BETA, pBAD-CrtO et pCDF-OCPSyn-3aaNtag.

L'hypothèse justifiant l'insertion du gène *CrtR* dans le génome est que, comme l'enzyme CrtR possède une forte affinité avec le β -carotène, elle a donc tendance à convertir le β -carotène en ZEA au lieu de convertir l'ECN formé par la CrtO, en hECN. En insérant son gène dans le génome au site unique *Tn7*, le nombre de copies de son gène sera largement inférieur que lorsque son gène était cloné sur un plasmide multi-copie. En diminuant le nombre de copie du gène *CrtR* par rapport au nombre de copie du gène *CrtO*, porté par le plasmide pBAD-CrtO, nous espérons établir un équilibre pour tirer la voie de synthèse des caroténoïdes de cette souche vers l'hECN. Si la CrtO est majoritaire, elle convertira tout le β -carotène en ECN. La CrtR qui elle, sera minoritaire car codée par le génome au site *Tn7*, convertira alors le ECN présent en majorité en hECN.

Malheureusement, après tous les efforts mis en œuvre pour créer cette souche qui demanda de nombreuses expériences et manipulations délicates, le fait d'avoir inséré le gène codant l'enzyme CrtR dans le génome ne permis pas d'obtenir de l'hECN. Les caroténoïdes extraits de cette souche étaient majoritairement β -carotène et ECN, comme si la CrtR, codée par le génome avec une seule copie, n'était pas ou trop peu exprimée.

Pour conclure ce troisième chapitre, nous pouvons affirmer que l'optimisation du système d'expression hétérologue permettant la production de l'OCP dans *E.coli* a été un succès.

La construction initiale, évoquée dans le premier chapitre de résultats, portée par la plasmide pCDF-OCP-pDuet au sein du système d'expression 3 plasmides nous permettait d'obtenir environ 30 à 45% d'OCP liant le caroténoïde, soit 30 à 45% d'holo-OCP.

Cette observation nous avait donc donné l'envie d'optimiser ce rendement de production en réalisant des modifications de séquence du gène de l'OCP en N-terminal. Parmi les nombreuses modifications testées, l'une d'entre elles nous a permis l'obtention d'une récolte avec 100% d'holo-OCP, la construction OCP-Syn-3aaNtag. Grâce à cette construction, nous obtenions 30mg d'holo-OCP de *Synechocystis* à partir de 1L de culture *E.coli*.

Suite à la réussite de l'optimisation du rendement en holo-OCP, nous voulions aller plus loin, soit augmenter la quantité totale d'holo-OCP récoltée. Pour cela, nous avons optimisé le système d'expression en passant de 3 à 2 puis 1 plasmide. La diminution du nombre de plasmide à répliquer puis exprimer par la cellule lui a permis de gagner de l'énergie pour exprimer d'avantage la protéine. Grâce à cette optimisation en quantité totale d'OCP récoltée, nous sommes passés de 30mg d'holo-OCP récoltée avec 3 plasmides à 120mg d'holo-OCP avec 1 plasmide.

Une fois le système d'expression de l'OCP optimisée, nous souhaitions revenir sur une démarche initiale : exprimer l'OCP avec son caroténoïde naturellement lié chez *Synechocystis* PCC 6803 ou chez *Arthrospira* PCC 7345 : le 3'hydroxy echinenone (Wilson et al., 2010 et Kerfeld et al., 2003). Pour ce faire, nous avons essayé de synthétiser majoritairement ce caroténoïde dans *E.coli*. Malheureusement, aucune combinaison de biologie moléculaire ne nous a permis d'obtenir ce caroténoïde en majorité. Comme déjà évoqué dans la littérature, ce caroténoïde, synthétisé par une enzyme impliquée dans plusieurs voies de biosynthèse de caroténoïdes, est difficile à obtenir en grande quantité de façon hétérologue (K Lemuth et al., 2011 et T Makino et al., 2008).

Chapitre IV

Applications du système d'expression hétérologue afin
d'élucider la photo-activation de l'OCP au sein de deux
travaux de recherche

Rôle du bras N-terminal de l'OCP dans sa photo-activation

Résumé de la publication

Avant d'introduire le travail des auteurs dans cet article, je souhaite contextualiser leur recherche afin de mieux comprendre leur attrait à étudier le rôle du bras N-terminal au sein de la protéine OCP.

Sous une forte illumination bleue verte, les cellules de *Synechocystis* PCC 6803 qui possédaient une OCP His6 taggée en N-terminal induisaient un quenching de fluorescence plus faible que les cellules qui possédaient une OCP His6 taggée en C-terminal (A. Wilson et D. Kirilovsky, données non publiées). Ce fut la première preuve de l'importance du bras N-terminale pour la photoactivité de l'OCP. Suite à cette observation, toutes les OCP étudiées et isolées des cellules de *Synechocystis* PCC 6803 étaient His6 taggées en extrémité C-terminale. En revanche, lorsque nous avons créé le système d'expression hétérologue de l'OCP dans *E.coli*, nous avons observé que les cellules qui produisaient le plus haut rendement en holo-OCP était obtenu lorsque le His6 tag était ajouté à l'extrémité N-terminale de la protéine. Nous avons supposé que cet ajout déstabilise le bras N-terminal et facilite donc l'incorporation du caroténoïde dans la protéine (Bourcier de Carbon et al., 2015). Toutefois, nous avons aussi montré que chez *E.coli*, comme chez *Synechocystis*, l'OCP His6 taggée en N-terminale induit un quenching de fluorescence des phycobilisomes plus faible qu'avec l'OCP His6 taggée en C-terminale. Une fois le complexe phycobilisome-OCP plongé dans l'obscurité, l'OCP His6 taggée en N-terminale reste attachée au phycobilisome et continue de quencher sa fluorescence tandis que l'OCP His6 taggée en N-terminale se détache rapidement du phycobilisome, qui récupère alors sa fluorescence. Cette observation indique que l'OCP His6 taggée en N-terminal, en plus d'induire un quenching de fluorescence faible, possède une faible interaction avec le phycobilisome (Bourcier de Carbon et al, 2015;. Fig. 5).

Suite à ces observations expérimentales, Nous avons étudié le rôle du bras N-terminal de l'OCP dans sa photoactivité. Pour ce faire, de nombreux mutants de la protéine ont été créés avec des modifications de leur extrémité N-terminale. Des acides aminés potentiellement impliqués dans la mobilité du bras N-terminal ont été mutés afin de déterminer leur rôle, mais une OCP dépourvue de ce bras a aussi été créée par mutagenèse dirigée pour caractériser son implication.

Ce travail a permis de démontrer que ce bras N-terminal est un élément clé, une sorte de levier régulateur, pour les deux formes de la protéine, qu'elle soit en forme inactive ou en forme active. Au sein de l'OCP inactive, l'interaction du bras N-terminal avec le domaine C-terminal évite que l'OCP se photoactive à l'obscurité ou à faible éclairage. C'est pour cette raison que le quenching d'énergie ne se produit pas à faible intensité lumineuse. Si cela était le cas, le taux de photosynthèse serait diminué et, par conséquent, l'énergie disponible pour le métabolisme cellulaire. Ce travail laisse supposer que l'énergie lumineuse est nécessaire pour casser, successivement, les liaisons hydrogènes et les interactions de Van der Waals qui stabilisent la conformation fermée de la protéine. Comme le processus d'activation de l'OCP nécessite une grande énergie, l'accumulation de sa forme active et le quenching d'énergie ne s'établissent que sous de fortes intensités lumineuses. Au sein de la forme active de l'OCP, la position du bras N-terminal contrôle le taux de reconversion de la protéine vers sa forme inactive, et sa présence ralentit l'action de FRP, permettant un quenching d'énergie plus important dans des conditions de stress lumineux.

Contribution à ce travail

Ma contribution au sein de ce travail fut de réaliser la biologie moléculaire pour créer les mutants de la protéine OCP, dépourvue du bras N-terminal, avec l'étiquette 6-Histidines en position N ou C-terminale. Ma contribution plus large fut d'apporter le système de production hétérologue de l'OCP dans *E.coli*, impliquant les plasmides portant les gènes permettant la synthèse des caroténoïdes, le plasmide portant le gène de l'OCP de *Synechocystis* PCC 6803 afin de réaliser les diverses mutagénèses dirigées pour la création des mutants ainsi que les conditions de culture.

Ce travail se réfère à la publication :

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

Regulation of Orange Carotenoid Protein activity in cyanobacterial photoprotection

Adrien Thurotte*^{1,2}, Rocio Lopez Igual*^{1,2,4}, Adjélé Wilson^{1,2}, Léa Comolet^{1,2}, Céline Bourcier de Carbon^{1,2}, Fugui Xiao³ and Diana Kirilovsky^{1,2}

¹Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), I2BC, UMR 9198, 91191 Gif sur Yvette, France

²Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut de Biologie et Technologies de Saclay (iBiTec-S), 91191 Gif sur Yvette, France

³Laboratory of Biophysics, Wageningen University, P.O. Box 8128, Wageningen, The Netherlands

*AT and R LI contributed equally to this work

In cyanobacterial photoprotection, the N-terminal arm of the Orange Carotenoid Protein is important for the regulation of its photoactivation and its interaction with the antenna, the phycobilisome.

Corresponding author:

Diana Kirilovsky, iBiTec-S, Bât 532, CEA Saclay, 91191 Gif sur Yvette, FRANCE; E-mail:

diana.kirilovsky@cea.fr

Abstract

Plants, algae and cyanobacteria have developed mechanisms to decrease the energy arriving at reaction centers to protect themselves from high irradiance. The photoactive Orange Carotenoid Protein (OCP) and the Fluorescence Recovery Protein (FRP) are essential elements in cyanobacterial photoprotection. Strong blue-green light absorption by the OCP induces carotenoid and protein conformational changes converting the orange (inactive) OCP (OCP^o) into a red (active) OCP. Only the red OCP (OCP^r) is able to bind to phycobilisomes, the cyanobacterial antenna, and to quench excess energy. In this work, we focus on the role of the OCP N-terminal arm, in photoactivation and excitation energy dissipation. We constructed and characterized several OCP mutants. Our results demonstrate that the N-terminal arm largely stabilizes the closed OCP^o structure by interacting with the C-terminal domain of the OCP. This avoids photoactivation at low irradiance. In addition, it slows down the OCP detachment from phycobilisomes by hindering FRP interaction with bound OCP^r. This is useful to maintain longer time high thermal dissipation of excess energy. Pro22, at the beginning of the N-terminal arm, has a key role in the correct positioning of the arm in OCP^r, enabling strong OCP binding to phycobilisomes but it is not essential for photoactivation. Finally, our results show that the opening of the OCP during photoactivation is caused only by the movement of the C-terminal domain of the protein.

Introduction

Full sunlight is dangerous for plants, algae and cyanobacteria; it can lead to the destruction of the photosynthetic apparatus and cell death due to oxidative damage induced by excessive excitation. A short-term photoprotective mechanism developed by oxygenic photosynthetic organisms is the reduction of excitation energy being funneled into the photochemical reaction centers by dissipating excess energy as heat at the level of the antennae (Niyogi and Truong, 2013). In plants and green algae this mechanism involves the membrane chlorophyll antennae, the Light-Harvesting-Antennae (LHC) (reviews (Horton et al., 1996; Horton and Ruban, 2005; Jahns and Holzwarth, 2012)) and in cyanobacteria, the extramembrane phycobiliprotein containing antennae, the phycobilisomes (PBs) (reviews (Kirilovsky and Kerfeld, 2012; Kirilovsky, 2014)). Carotenoids have an essential role in this mechanism in plants, algae and cyanobacteria despite the differences in composition and structure of their antennae. In plants, high irradiance, via acidification of the lumen, triggers conformational changes in the LHCs and in their organization in the membrane, switching the light-harvesting complex into an effective energy dissipating form. In cyanobacteria, high irradiance photoactivates a soluble carotenoid protein, the Orange Carotenoid Protein (OCP), that acts as the stress sensor and the energy quencher. In both cases, changes of pigment-pigment interactions (Car-Chl, Car-bilin, Chl-Chl) enable thermal dissipation of excitation energy via different possible mechanisms: excitation energy transfer (Ruban et al., 2007; Berera et al., 2013) or charge transfer (Holt et al., 2005; Tian et al., 2011) between a chlorophyll or bilin molecule and a carotenoid or excitonic interactions between the pigments (Bode et al., 2009).

The study of the photoactivation of the Orange Carotenoid Protein (OCP) and of its interaction with the phycobilisome is essential to elucidate the quenching energy mechanism in cyanobacterial photoprotection. The OCP is a soluble 35 kDa protein constituted by an α -helical N-terminal domain (res. 1-165) and an α helix/ β sheet C-terminal domain (res. 190-317) (Kerfeld et al., 2003; Wilson et al., 2010) (Figure 1 A). A flexible linker of 25 amino acids connects both domains. The ketocarotenoid 3'-hydroxyechinenone (3'-hECN), having a carbonyl (keto) group in one of the rings and a hydroxyl group in the other one, spans both domains of the protein with the carbonyl group residing in a hydrophobic pocket of the C-terminal domain. Tyr201 and Trp288 interact via hydrogen bonds to the carotenoid keto group. In darkness the OCP is orange (OCP^o). Absorption of blue-green light by the

carotenoid induces conformational changes in the carotenoid and in the protein converting the orange form into a metastable active red form (OCP^f) (Wilson et al., 2008) (Figure 1 C). The photoconversion reaction has a very low yield and the rate of OCP^f accumulation largely depends on light intensity (Wilson et al., 2008). Thus, accumulation of the red form occurs only under high irradiance (Wilson et al., 2008). OCP^f is the active form of the protein (Wilson et al., 2008). Both OCP^o and OCP^f are energetically suitable to quench PB fluorescence and excitation energy (Polivka et al., 2013; Niedzwiedzki et al., 2014) but only OCP^f is able to bind to the PBs and to dissipate most of the excess energy as heat (Gwizdala et al., 2011). In OCP^o, strong interactions exist between the N and C-terminal globular domains, including salt (hydrogen) bonds between the residues Trp277-Asn104 and Arg155-Glu244 (Kerfeld et al., 2003; Wilson et al., 2010). Upon photoactivation, these bonds are broken leading to the solvent exposure of Arg155, that plays an essential role in OCP binding to PBs (Wilson et al., 2012) (Figure 1 C). The PBs from *Synechocystis* PCC 6803 (used in this work) are formed by a core of allophycocyanin (APC) trimers organized in three cylinders from which rods containing phycocyanin hexamers irradiate (review (Grossman et al., 1993; MacColl, 1998; Adir, 2005)). OCP^f binds to one APC trimer and its open structure allows the interaction between the OCP carotenoid and one APC bilin (Wilson et al., 2012). The first site of energy and fluorescence quenching is an APC trimer emitting at 660 nm (Tian et al., 2011; Tian et al., 2012; Takahashi et al., 2013; Tian et al., 2013). Once OCP^f is attached to PB there is an increase of thermal dissipation and less energy arrives to both photosystems (Wilson et al., 2006; Rakhimberdieva et al., 2010; Gorbunov et al., 2011).

When the light becomes less intense, the full antenna capacity must be recovered. The Fluorescence Recovery Protein (FRP) is essential for this process. The FRP accelerates the OCP^f to OCP^o dark conversion and induces (or helps) OCP detachment from PBs (Boulay et al., 2010; Gwizdala et al., 2011; Sutter et al., 2013). The active FRP is a non-chromophorylated dimer that interacts with the C-terminal domain of the OCP^f (Sutter et al., 2013).

Previously it was demonstrated that the N-terminal globular domain of the OCP (green in Figures 1A and B) is a constitutively active energy quencher (Leverenz et al., 2014). Thus, its interaction with the C-terminal globular domain is essential to inhibit OCP binding to PB and energy quenching under low irradiance and it must be tightly regulated. Almost nothing is known about this regulation. We hypothesize that the N-terminal arm of the protein (red in Figures 1A and B) that in OCP^o interacts with the C-terminal globular domain could have a role in this regulation.

In this work, we studied the effect of deletion of the N-terminal arm and of the mutations Asp6Leu and Pro22Val in photoactivity, and OCP interaction with PB and FRP (see in Figure 1A and 1B the position of the N-terminal arm in the structure of OCP^o). Asp6 seems to form a hydrogen bond with Arg229, which could stabilize the closed form of OCP^o. Pro22 is located at the bent junction between the N-terminal arm and the N-terminal globular domain. Since prolines can isomerize, we hypothesized that Pro22 isomerization could help the movement of the N-terminal arm and its detachment from the C-terminal domain during OCP photoactivation. Our results indicated that the N-terminal arm stabilizes the closed OCP^o structure and confirmed that during photoactivation the interactions between the N-terminal arm and the C-terminal domain are broken. In addition, the N-terminal arm plays an important role in the regulation of OCP-PB and OCP-FRP interactions. Our results also showed that Pro22 is essential for a correct positioning of the N-terminal arm in OCP^o and OCP^f. On the one hand, replacement of Pro22 by Val destabilizes the OCP^o. On the other hand, it hinders OCP^f binding to PBs. However, this replacement does not avoid photoactivation, strongly suggesting that isomerization of Pro22 is not necessary for opening of the protein. Finally, the presence of the N-terminal arm partially hinders FRP interaction with bound OCP^f, decreasing the rate of OCP detachment from the PBs and fluorescence recovery.

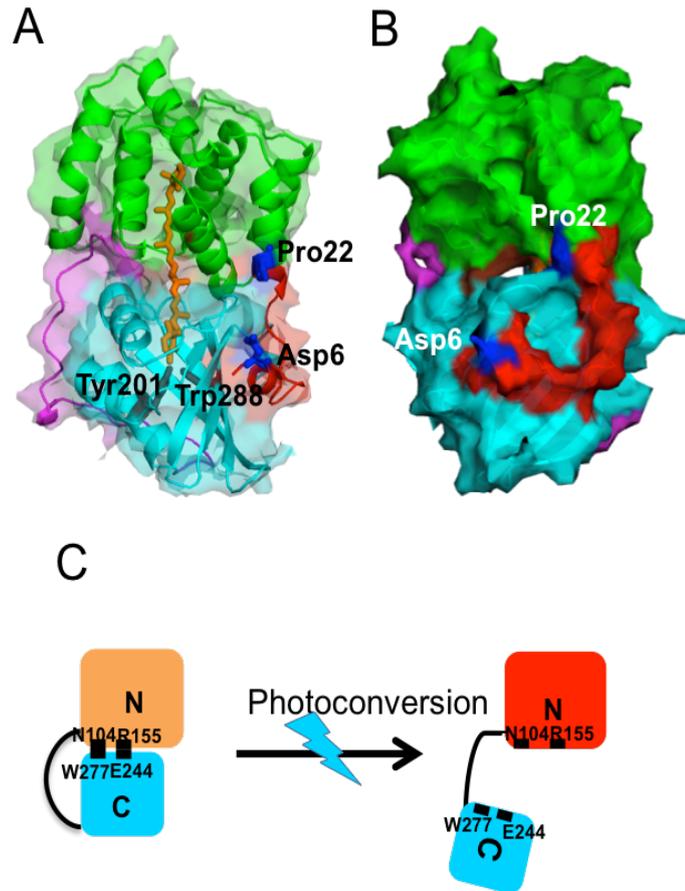


Figure 1

(A and B) Structure of the OCP from *Synechocystis* PCC 6803 (Protein Data Bank ID: 3MG1). The OCP monomer in the OCP⁰ state. The N-terminal arm (residues 1-22) (red) interacts with the C-terminal domain (residues 196 -315) (sky-blue). The Pro22 and the Asp6 are marked in blue. The N-terminal domain (residues 22-165) is green in the figure.

(C) Model of photoactivation. Upon light absorption the orange OCP⁰ is converted into the active red OCP^f. Changes in the carotenoid conformation induce conformational changes in the C-terminal domain leading to the breakage of the interactions between the N-terminal and C-terminal domains and the opening of the protein.

Results

Construction of N-terminal arm OCP mutants

All the OCP mutants that we have characterized in our laboratory were isolated from *Synechocystis* mutants that overexpress modified *ocp* genes in the absence of the native WT *ocp* gene. Thus in order to study the role of the N-terminal arm, we constructed a *Synechocystis* mutant in which a modified *ocp* gene, lacking the nucleotides coding for the first 14 amino acids after the Met, was under the control of the *psbA2* promoter (Figure 2A). Unexpectedly, western-blot analysis using the anti-OCP antibody clearly showed that the OCP was absent in mutant *Synechocystis* cells. The antibody which is able to recognize not only the OCP but also the isolated N-terminal and C-terminal domains (Sutter et al., 2013; Leverenz et al., 2014) even at low concentration, detected the OCP related 35 kDa band only in WT *Synechocystis* cell and not in the extract of total cellular proteins of mutant cells (Figure 2B). Reverse Transcription-PCR experiments demonstrated that although the mutated OCP protein was absent, the corresponding mRNA was present (Figure 2D).

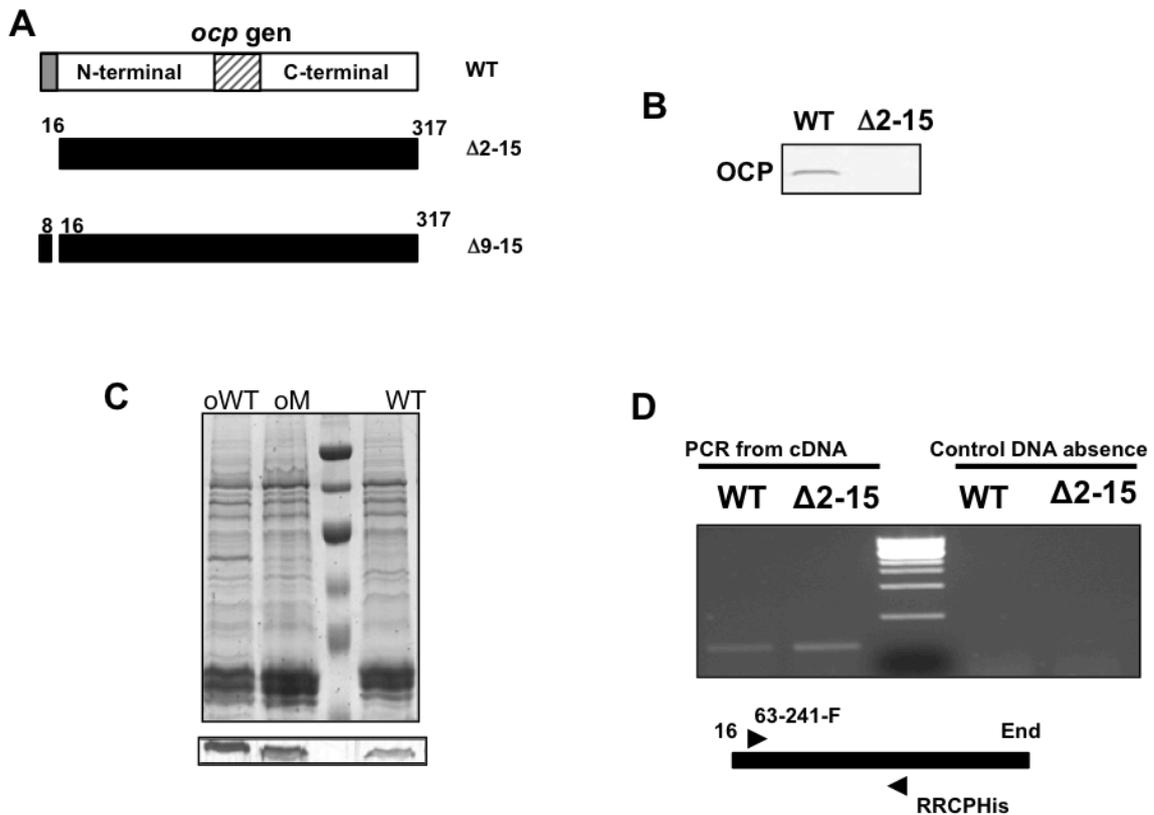


Figure 2

Expression of WT and mutant OCPs in *Synechocystis* cells

(A) Diagram of constructed OCPs; (B) Western blot detection of OCP with anti-*Synechocystis* OCP in total proteins extracted from WT *Synechocystis* and from a *Synechocystis* mutant overexpressing the D2-15 OCP; (C) Gel electrophoresis and western blot analysis with anti-OCP of total proteins extracted from WT *Synechocystis* cells (WT) and from *Synechocystis* strains overexpressing the WT (oWT) and the D9-15 (oM) OCPs; (D) RT-PCR analysis using total RNA isolated from *Synechocystis* cells overexpressing the WT and the D2-15 OCP. The primer RRCPHis was used for the cDNA synthesis, and the same primer with 63-241-F was used for PCR analysis using cDNA as a template in RT-PCR and an equivalent quantity of total RNA as template like control of DNA absence.

In order to understand the absence of the D2-15 OCP protein, the structure of potential mRNA was modeled using the on-line tool mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>). The folding energy was calculated in a window spanning positions -4 to $+37$ relative to the translation start (Kudla et al., 2009). In the absence of the first 42 nucleotides (after the ATG) a very stable hairpin (DG = -9.40 Kcal/mol) is predicted from the first codon AUG sequence to 30 nucleotides downstream (Figure 3). This secondary structure could explain an absence of translation due to a hindering of ribosome binding. Addition of 21 nucleotides after the first AUG seemed to destabilize the hairpin, increasing the DG of the secondary structure to -5.6 Kcal/mol.

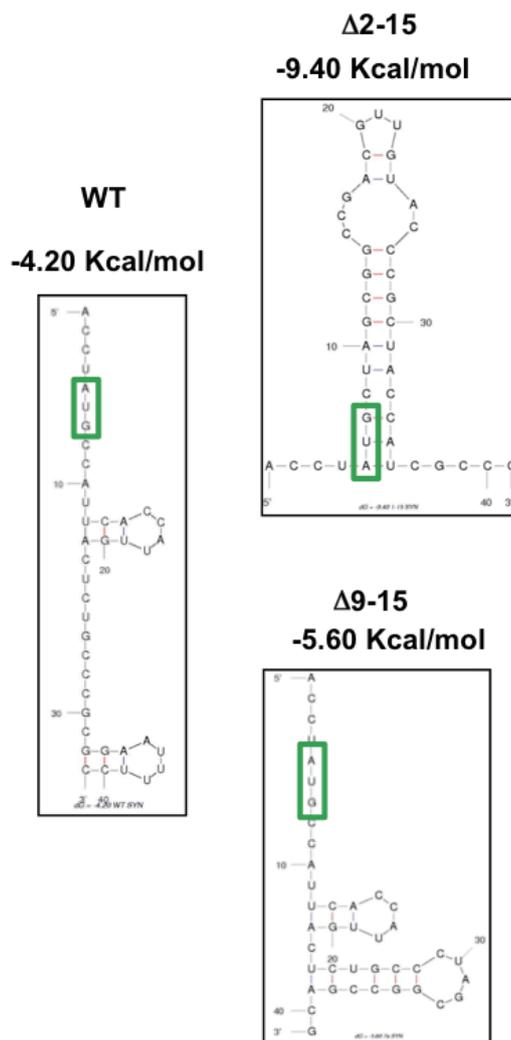


Figure 3

Predictable hairpins in the mRNAs encoding WT and different mutated OCPs

Taking the sequence corresponding to -4 to +37 nucleotide position relative to translation start of WT, D2-15 and D9-15 OCPs, the DG was calculated by a program to fold RNA sequence (see Material and Methods). A higher DG (absolute value) indicates that the mRNA secondary structure is easier to break by the translation machinery. Thus, a very negative DG indicates that the protein synthesis can be hindered or stopped.

The D9-15 OCP mutant was created by directed mutagenesis and the presence of the protein was tested. The D9-15 OCP protein was detected by western-blot analysis (Figure 2C). Although the protein was synthesized in the overexpressing D9-15 OCP *Synechocystis* strain, its concentration was substantially lower than in the overexpressing WT OCP strain and only slightly higher than in WT *Synechocystis* cells (Figure 2C). In addition, while WT OCP binds only echinenone (ECN) and hydroxyl-echinenone (hECN) (Punginelli et al., 2009), the mutated OCP attached several carotenoids: 13% myxoxanthophyll, 8% zeaxanthin, 2% canthaxanthin, 16% ECN and only 61% hECN. Only the OCPs binding ketocarotenoids are photoactive (Punginelli et al., 2009). In *Synechocystis* cells containing the mutated D9-15 OCP, no fluorescence quenching was induced by strong blue light (Supplemental Figure 1).

To overcome the problem of the carotenoids and to accelerate the construction of OCP mutants, we continued this study by synthesizing mutated holo-OCPs (OCP containing carotenoid) in *E. coli* cells using a protocol recently developed by our laboratory (Bourcier de Carbon et al., 2015). The *E. coli* strain used for OCP production contained three plasmids (supplemental Figure 2). The first plasmid carried the operon containing the 4 genes (*crtE*, *crtY*, *crtI* and *crtB*) from *Erwinia herbicola* needed for the synthesis of b-carotene from its precursor, farnesyl-diphosphate. The operon was under the control of the constitutive *crtE* promoter. The second plasmid carried the *Synechocystis crtO* gene coding for a b-carotene ketolase, which is necessary to synthesize ECN. This gene was under the control of the arabinose inducible pBAD promoter. The third plasmid contained the *ocp* gene under the control of the T7 RNA polymerase promoter (induction with IPTG). A sequential induction of the *crtO* and *ocp* genes was essential to obtain holo-OCPs. The *crtO* gene was first induced in *E. coli* containing relative high concentrations of b-carotene. Subsequently, the *ocp* gene was induced. In these cells, containing 15-25% of b-carotene, 70-80% ECN and 4-6% canthaxanthine, OCP attached only ECN (Bourcier de Carbon et al., 2015).

OCP production in *E. coli* cells has been developed with a His-Tag in the N-terminus. Indeed, the position of the His-tag in the N-terminus enabled to obtain 100% WT holo-OCP (protein containing a carotenoid) (Bourcier de Carbon et al., 2015). In contrast, when the His-tag is in the C-terminus only 40% of the isolated protein is holo-OCP (Bourcier de Carbon et al., 2015). This effect is specific for OCP produced in *E. coli*. Nevertheless, since we wondered whether 6 His in the N-terminus of the mutated OCPs could distort the phenotype induced by the absence of the N-terminal arm or mutations in it, we constructed N-terminal and C-terminal His-tagged mutant OCPs .

In order to confirm the hypothesis that the lack of D2-15 OCP protein in *Synechocystis* cells was due to the absence of translation we did two constructions to obtain the mutated protein in *E. coli*: one, with the same *ocp* gene sequence used for *Synechocystis* expression and the other, with two silent changes in the DNA sequence (A to G in position 6 and G to C in position 9) to destabilize the mRNA secondary structure (the DG change from -9.40 Kcal/mol to -2.6 Kcal/mol (supplemental Figure 3)). The sequences of the proteins obtained from these two constructs were identical (Met Leu Ala). However, almost 18 times more protein was obtained from the cells containing the *ocp* mRNA with silent mutations than from the cells containing the mRNA with a very stable hairpin (140 mg versus 8 mg from 1L *E. coli* culture).

A mutated OCP lacking the whole N-terminal arm was also created. When the nucleotides coding for the first 20 amino acids (instead of only 15) were deleted, no stable hairpin was formed in the mRNA (supplemental Figure 3) and translation occurred without hindering in *E. coli* cells. Finally, two single mutants Pro22Val and Asp6Leu were constructed (see Figure 1 for positions of mutations).

OCP photoactivation

The mutated OCPs were isolated from *Synechocystis* or *E. coli* cells (see *Materials and Methods*) and characterized. Large quantities of apo-D2-20 OCPs (around 85%, see *Materials and Methods* for calculations) were present in the preparations of isolated proteins from *E. coli*. We suppose that the lack of the N-terminal arm destabilizes the bound carotenoid that can escape from the mutated protein. The relative low concentration of the D9-15 OCP mutant in *Synechocystis* cells (Figure 2C) could also be related to a destabilization of carotenoid binding. In *Synechocystis*, the apo-protein is never accumulated, it is immediately degraded. However, we cannot discard that changes in the rate of OCP translation can also influence the concentration of holo-proteins. Interestingly, the preparation of D2-15 OCPs isolated from *E. coli* cells with the non-modified gene sequence contained largely more holo-protein (50 %) than that obtained from the modified mRNA (around 4%). Thus, slower translation seems to favor carotenoid binding and stabilization.

All the results obtained with the D2-15 OCP mutant were identical to those observed with the D2-20 OCP mutant related to photoactivity, interaction with PBs and with FRP. For clarity in the figures we show only the results obtained with the D2-20 OCP mutants and the results obtained with the D2-15 OCP mutant are shown in supplemental Figure 4.

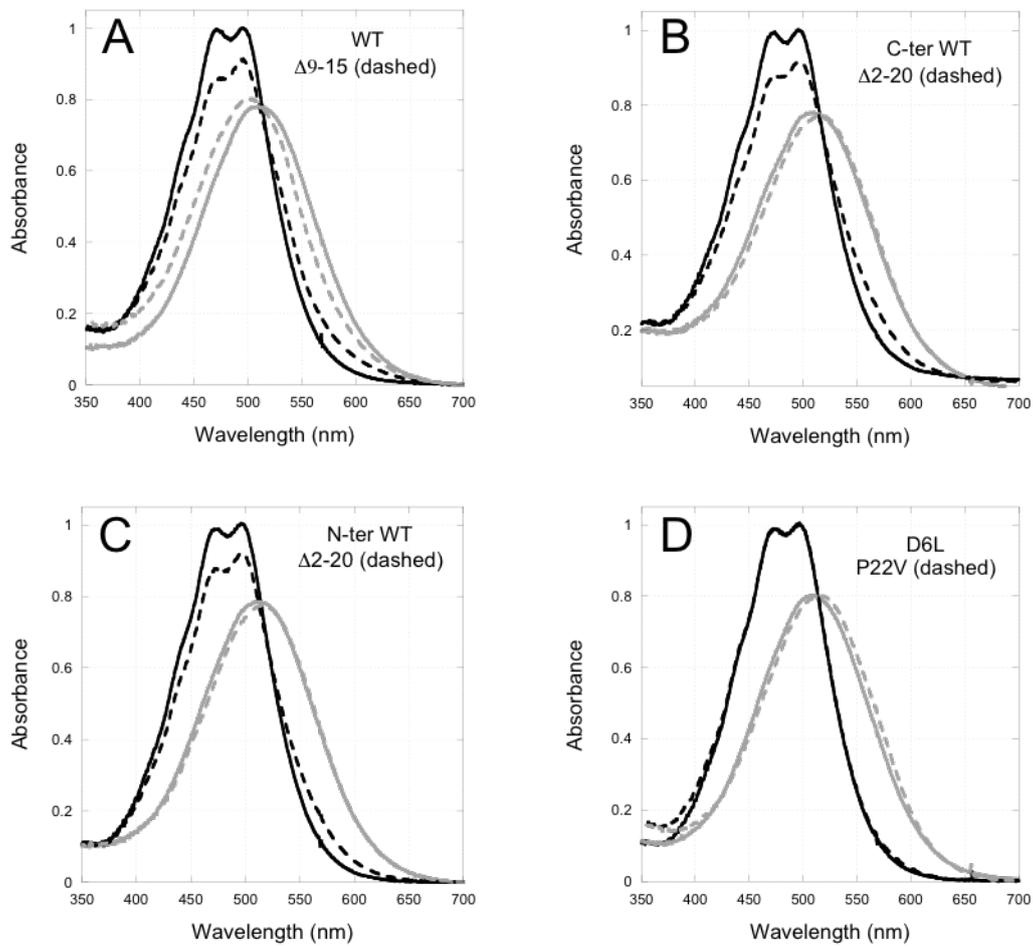


Figure 4

Light and dark absorbance spectra of OCPs

(A) Absorbance spectra of WT (solid line) and D9-15 OCPs (dashed line) isolated from *Synechocystis* cells in darkness (black) and after 5 min illumination with strong white light ($5000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (grey); (B-D) Absorbance spectra of His-tagged WT (solid line) and mutated OCPs (dashed line) isolated from *E. coli* in darkness (black) and after 5 min illumination with strong white light ($5000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (grey).

Figure 4 shows the dark and light spectra of the mutated OCPs compared to the control OCPs. While in darkness the spectra of the single Asp6Leu (D6L) and Pro22Val (P22V) OCP mutants were identical to that of WT OCP^o, the spectra of the D9-15 and D2-20 OCPs indicated a partial conversion of the OCP^o to OCP^f: higher absorbance at 496 nm and lower at 476 nm. We estimate that about 25-30 % of the mutated OCP was in the OCP^f form in darkness (see calculation in Materials and Methods and supplemental Figure 7). Due to the presence of OCP^f in darkness, this mutant is able to induce PBs fluorescence quenching in the absence of strong blue-green light (supplemental Figure 5). After 5 min illumination with strong white light, all the OCP^os were completely converted to OCP^f, indicating that all mutated OCPs are photoactive.

Photoconversion (OCP^o to OCP^f) and recovery (OCP^f to OCP^o) kinetics were followed by measuring optical density changes at 550 nm during 5 min illumination with strong white light and then in darkness (Figure 5 and supplemental Figures 6 and 4A and B). While the rate of photoconversion of the single mutant D6L was slower or similar to that of the WT OCP, those of the D9-15, D2-15 and D2-20 OCP mutants were largely faster and that of the P22V slightly faster. The rate of recovery was similar in WT, D6L and P22V mutants but much slower in the D2-20, D9-15 and D2-15 OCP mutants (Figure 5B and supplemental Figures 6B and 4B).

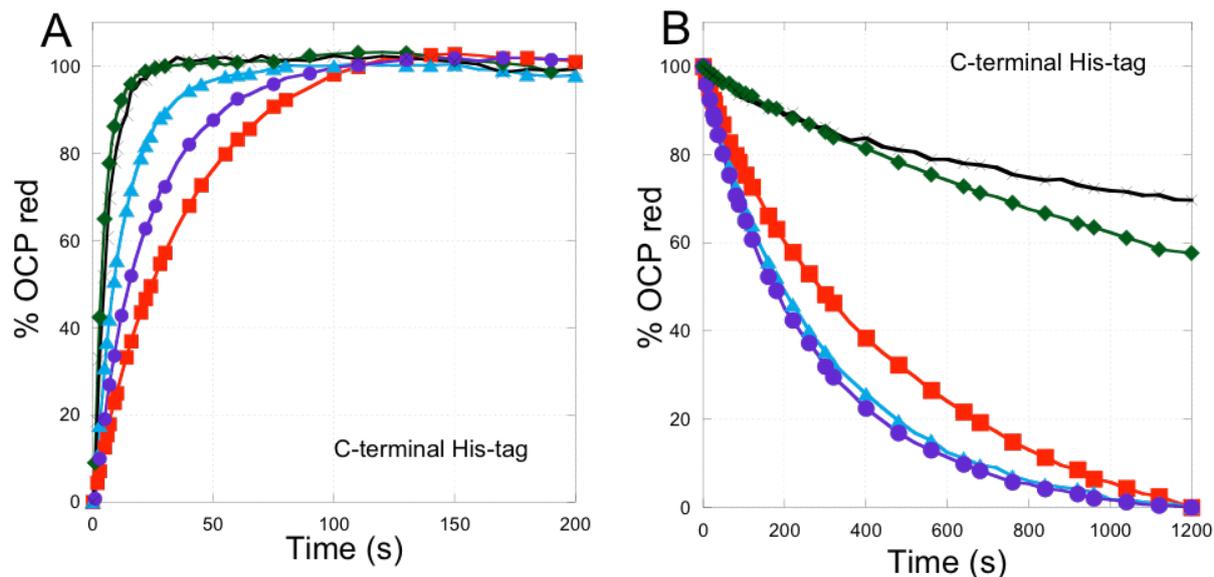


Figure 5

Photoactivation (OCP^0 to OCP^r) (A) and dark OCP^r to OCP^0 (B) kinetics of WT and mutated OCPs

(A) OCP^0 to OCP^r photoconversion during illumination with strong white light ($5000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 18°C of C-terminal His-tagged OCP : WT (circles), D2-20 (diamond), D9-15 (cross), D6L (square) and P22V (triangles) OCPs. (B) Recovery in darkness with the same symbols. The results obtained with the N-terminal His-tagged OCPs are shown in supplemental Figure 6. The figure shows a representative experiment in which all the mutants were measured in the same day. The experiment was repeated 4 independent times and the kinetics showed similar changes.

OCP interaction with PBs: In vitro induced PBs fluorescence quenching

In vitro reconstitution experiments, developed by (Gwizdala et al., 2011), were used to study the interaction between OCPs and PBs to elucidate the role of mutations in this interaction. Isolated *Synechocystis* PBs were incubated with pre-illuminated WT and mutated OCP^fs, in 0.5 M phosphate under strong blue-green light at 23°C. The decrease of PB fluorescence during the light incubation (5 min) and the following fluorescence dark recovery (20 min) were followed by measurements in a PAM fluorometer (Figure 6). The presence of apo-protein does not affect the kinetics of fluorescence quenching (Bourcier de Carbon et al., 2015).

The C-terminal His-tagged WT and D2-20 OCP^fs induced the largest and fastest quenching suggesting that the absence of the N-terminal arm does not affect OCP^f binding to PBs (Figure 6B). The N-terminal His-tagged D6L and WT OCPs induced a slightly slower and smaller fluorescence quenching than the C-terminal His-tagged OCPs (Figure 6A). The addition of 6 His in the N-terminus of the D2-20 OCP or the addition of 8 amino acids to the protein without the arm (D9-15) seems to hinder OCP binding since slower and smaller fluorescence quenching was induced by these mutated OCPs (Figure 6A and B). The most affected mutant was the N-terminal His-tagged P22V one, which induced only 40% of PB fluorescence quenching (Figure 6A).

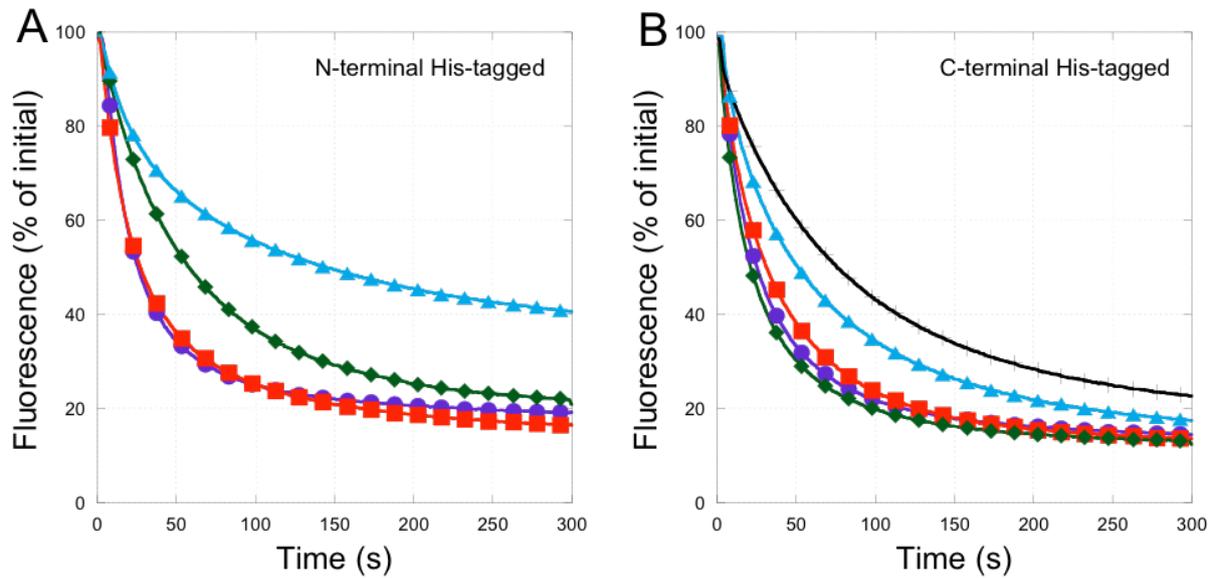


Figure 6

Phycobilisome fluorescence quenching induced by WT and mutated N-terminal (**A**) and C-terminal (**B**) His-tagged OCP^fs. WT (circle), D2-20 (diamond), D6L (square), P22V (triangle) and D9-15 (cross, only in (**B**)). The OCPs were pre-illuminated for 10 min with strong white light ($5000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 4°C . Then the OCP^fs were added to the phycobilisomes in 0.5M phosphate and illuminated with blue-green light ($900 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 23°C . Ratio OCP to PBS= 40. The figure shows a representative experiment in which all the mutants were measured in the same day. The experiment was repeated 3 independent times and the kinetics showed similar changes. The kinetics were repeated twice each day, for each mutant and they were identical.

Effect of mutations on phycobilisome fluorescence recovery and FRP interaction with bound OCP^f

To study the effect of mutations on the FRP interaction with bound OCP, we compared the dark fluorescence recovery kinetics in the absence and presence of FRP. When the quenched PB-OCP complexes were transferred to darkness, an increase of fluorescence was observed related to the detachment of OCP from PBs (Figure 7). As previously described the location of the His-tag affects fluorescence recovery (Bourcier de Carbon et al., 2015). The N-terminal His-tagged WT and mutated OCPs detached largely faster than the C-terminal His-tagged OCPs (Figure 7). Curiously, the N-terminal His-tagged D2-20 OCP recovered largely slower than the N-terminal His-tagged WT OCP (compared figures 7A and B). The fastest fluorescence recovery was observed with the P22V OCP as expected because of its weaker binding to PBs (figure 7C).

The presence of FRP during the dark incubation accelerated the recovery of the lost fluorescence in all the cases. Nevertheless, a big effect of the absence of the N-terminal arm was observed when FRP interacted with bound OCP^f (Figure 7B and D and supplemental Figure 4E). FRP largely increased the rate of dark fluorescence recovery of PB-OCP complexes in the absence of the arm (D2-15, D2-20 and D9-15 mutants). The replacement of Pro22 by a Val slightly decreased the acceleration of fluorescence recovery when the His-tag was in the N-terminus (Figure 7C).

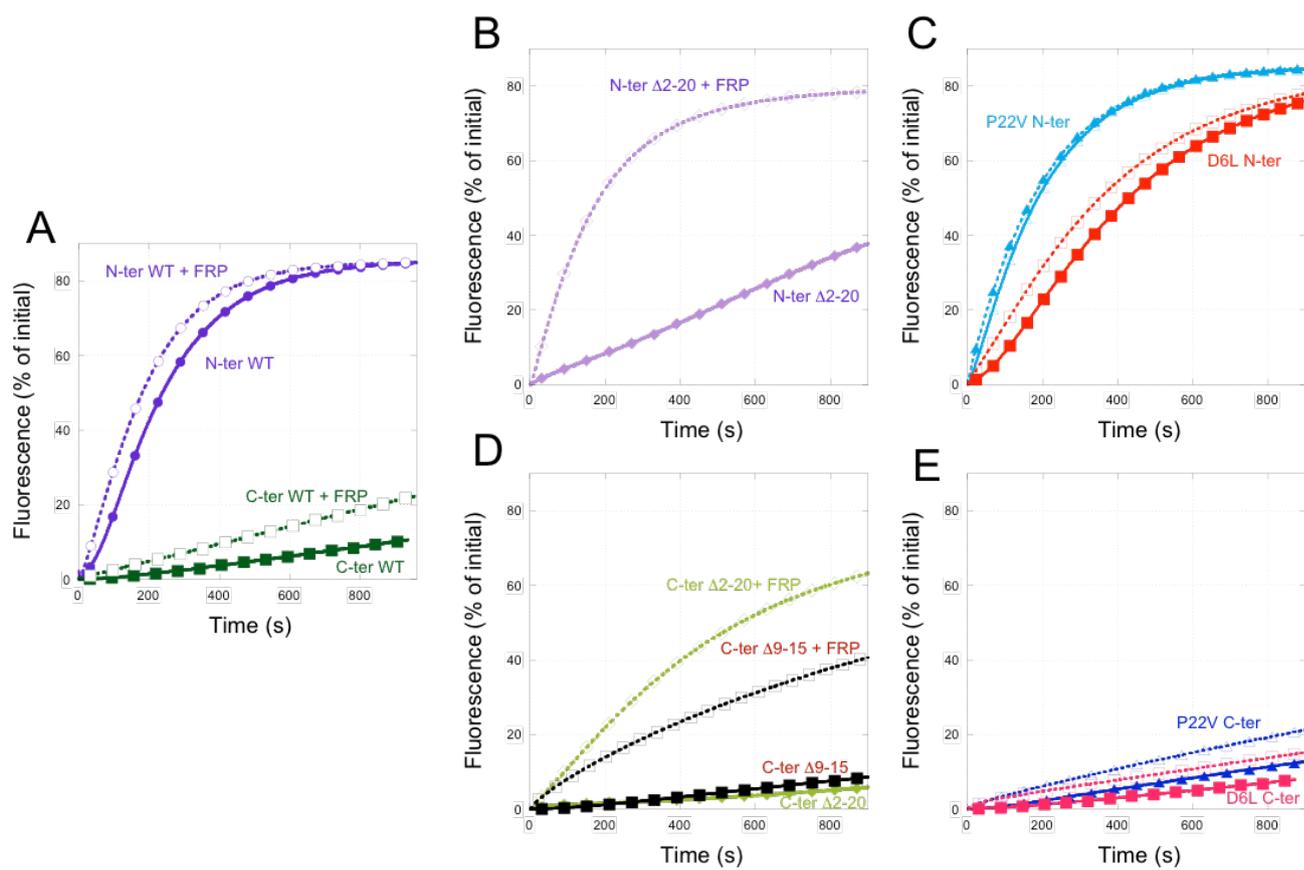


Figure 7

Effect of FRP on dark phycobilisome fluorescence recovery kinetics

Dark phycobilisome fluorescence recovery in quenched OCP-PB complexes in the absence (closed symbols) or in the presence of FRP (open symbols). (A) C-ter WT OCP (square) and N-ter WT OCP (circle); (B) N-ter D2-20 OCP (diamond); (C) N-term D6L OCP (square) and N-term P22V OCP (triangle) (D) C-ter D2-20 OCP (diamond) and C-ter D9-15 (square) and (E) C-term D6L OCP (square) and C-term P22V OCP (triangle) N-ter: N-terminal His-tagged OCP; C-ter: C-terminal His-tagged OCP. The figure shows a representative experiment in which all the mutants were measured in the same day. The experiment was repeated 3 independent times and the kinetics showed similar changes.

Discussion

The first clue about the importance of the N-terminal arm in OCP activity was given by the fact that in *Synechocystis* cells with N-terminal His-tagged OCPs, strong blue-green light was able to induce less fluorescence quenching than in cells carrying C-terminal His-tagged OCPs (Wilson and Kirilovsky 2005, unpublished data). From that time all the OCPs isolated from *Synechocystis* cells contain a His-tag in their C-terminus. In contrast, in order to produce high yields of holo-OCP in *E. coli*, it was necessary to slightly destabilize the N-terminal arm by addition of the His-tag in the N-terminus (Bourcier de Carbon et al., 2015). In *E. coli* cells, although the longer N-terminal arm facilitates the carotenoid binding and stabilization in OCP, it destabilizes its binding to PBS (Bourcier de Carbon et al., 2015). The N-terminal His-tagged OCP induces less PBS fluorescence quenching than the C-terminal His-tagged OCP. Moreover when the quenched PBS attaching the C-terminal His-tagged OCP are transferred to darkness, they remain mostly quenched in the absence of FRP, while those attaching the N-terminal His-tagged OCP recover the initial fluorescence in only several minutes, indicating a weak OCP binding to PBS ((Bourcier de Carbon et al., 2015) and Figure 7A). In the present work we further studied the role of the N-terminal arm in OCP activity using different OCP mutants with modifications in the N-terminus of the protein.

The 5' terminus of the *ocp* gene plays a role in *ocp* translation

When Holt and Krogman isolated for the first time the OCP from *Arthrospira*, they co-isolated a red protein that they called Red Carotenoid Protein (RCP) (Holt and Krogmann, 1981). This protein is in reality a proteolysis product of the OCP, in which the first 15 amino acids and the last 150 amino acids are lacking. Leverenz *et al*, performing a trypsin partial degradation of the OCP were also able to isolate an RCP lacking the first 15 amino acids. This RCP binds the PBS and quench their fluorescence (Leverenz et al., 2014). Thus, when we began this work, the suppression of the 15 aminoacids seemed to us the first logic OCP mutant to construct to study the role of the N-terminal arm. Big was our surprise when we observed that no mutated OCP was present in *Synechocystis* cells: the OCP antibody did not detect the presence of any trace of OCP in the cells (Figure 2). Reverse Transcription-PCR experiments clearly demonstrated that there was no problem in the transcription of the modified *ocp* gene. Thus, the absence of the OCP can be due to a fast protein degradation or

absence of protein translation. In the past, in *Synechocystis* cells containing OCP with mutations that largely destabilize the carotenoid binding like W288S (Wilson et al., 2011) and R155E (Wilson et al., 2012), it was observed that the concentration of OCP was very low. This strongly suggested that the OCP is immediately degraded in the absence of an attached carotenoid. Nevertheless, our anti-OCP antibody always detected the presence of OCP. Modeling of the structure of the potential mRNA strongly suggested that the translation of this mRNA could be hindered by the presence of a very stable secondary structure (Figures 2 and 3). This was lately confirmed by the expression of the D2-15 OCP mutant in *E. coli* cells. A very low amount of the mutated D2-15 OCP was present in *E. coli* cells, but when the sequence of the gene was modified in order to break the secondary mRNA structure to improve translation, large quantities of OCP were present in the transformed *E. coli* cells. These differences in OCP concentration could not be related to different rates of degradation since the mutations in the gene were silent and the sequences of the obtained proteins were identical.

In *Synechocystis* cells, the addition of 21 nucleotides in the mutant D9-15 OCP allowed the recovery of protein translation. However, although the protein was synthesized, its concentration was substantially lower than in the overexpressing WT OCP strain and only slightly higher than in WT *Synechocystis* cells indicating that the partial absence of the N-terminal arm destabilizes the carotenoid binding (Figure 2C). When the D2-20 OCP mutants were expressed in *E. coli* cells, large quantities of apo-mutated OCPs (85-90%) were present in the samples that could be related to a destabilization of the carotenoid binding. This must be compared to 60% apo-protein present in the C-terminal His-tagged WT OCP preparation and less than 10% in the N-terminal His-tagged WT. In *E. coli* cells the apo-OCPs seem to be degraded slower than in *Synechocystis* cells. Nevertheless, the presence of high amounts of apo-OCP in *E. coli* cells could be also related to faster translation. As mentioned in results, the preparation of D2-15 OCPs obtained with the “WT” sequence (slow translation due to the presence of stable hairpin the mRNA) contained largely more holo-protein (50%) than that obtained from the modified mRNA (around 4%). Thus, slower translation seems to favor carotenoid binding and stabilization. Most probably, both carotenoid binding stability and rate of translation affects the concentration of holo-OCP present in the different preparations.

The Role of the N-terminal Arm on OCP Photoactivation

In the past, we proposed that OCP photoactivation involves an opening of the protein breaking the interactions between the N-terminal and C-terminal domains in their central interface (see Figure 1) (Wilson et al., 2012). We observed that photoactivation and opening of the protein occur more easily when one of these interactions is already inexistent or weaker in OCP^o due to mutations. For example, when mutations induced a breakage of the Arg155-Glu244 bond the closed OCP^o conformation was destabilized (Wilson et al., 2012). Then, results from our and other laboratories suggested that the opening of the protein also involves the breakage of interactions between the C-terminal domain and the N-terminal arm. Based on a model obtained by computational analysis, it seems that the FRP which binds only to OCP^f, interacts with a solvent exposed b-sheet region of the C-terminal domain that in the closed OCP^o, is partially masked by the first 15-20 amino acids of the N-terminal domain (N-terminal arm) (Sutter et al., 2013). Thus, OCP photoactivation must involve a breakage of the interactions between the C-terminal domain and the N-terminal arm. Indeed, mass spectrometry footprinting experiments showed that this interaction region is more solvent exposed in OCP^f than in OCP^o (Liu et al., 2014). It was also proposed that the detachment of the N-terminal arm from the C-terminal domain could facilitate putative OCP monomerization, occurring upon photoactivation, at least *in vitro* (Zhang et al., 2013; Liu et al., 2014). In this work, we show that the absence of the N-terminal arm accelerates OCP^f accumulation and stabilizes OCP^f form (Figure 5) like the mutations of Arg155 or Glu244 (Wilson et al., 2012). From these results we can conclude that the interaction of the N-terminal arm with the C-terminal domain that stabilizes the closed OCP^o configuration is indeed broken during photoactivation. The replacement of Asp6 by a Leu has no evident effect on photoactivation (Figure 5A and supplemental Figure 6A), suggesting that the hydrogen bond between Arg229 and Asp6 is not very strong.

As mentioned in the Introduction, Pro22 is located at the bent junction between the N-terminal arm and the N-terminal globular domain (Figure 1A and B). Since prolines can isomerize, Pro22 isomerization could help the movement of the N-terminal arm and its detachment from the C-terminal domain during OCP photoactivation. However, our results clearly indicate that isomerization of Pro22 is not necessary for OCP photoactivation. When Pro22 is replaced by a Val, that cannot isomerize, the mutated OCP is still photoactive (Figure 5). Moreover, this change seems to facilitate the detachment of the N-terminal arm from the C-terminal domain during photoactivation and not to hinder it. P22V OCP^f accumulates faster than WT OCP^f (Figure 5).

The Role of the N-terminal Arm on OCP-PBs Interaction

No significant differences in quenching activity were observed between the C-terminal His-tagged WT and D2-20 OCP^rs from *E. coli*, indicating that the absence of the N-terminal arm does not destabilize OCP-PBS interaction. However, the position and the length of the N-terminal arm play an important role in OCP binding to PBS. When Pro22 was replaced by a Val that most probably hinders the correct position of the N-terminal arm, largely less fluorescence quenching was observed (Figure 6A). We have already demonstrated that a smaller fluorescence quenching induced by the OCP under illumination and a faster fluorescence recovery in darkness are related to a weaker binding of the OCP to PBS (Gwizdala et al., 2011; Wilson et al., 2012). Thus, when the N-terminal arm is in a “wrong” position, OCP^r binds to PBS in a weak way. The N-terminal His-tagged OCP, the D9-15 OCP and the N-terminal His-tagged D2-20 OCP, which contain artificial prolongations in the N-terminus, also induced slower and smaller fluorescence quenching activity than the C-terminal His-tagged WT OCP (Figure 6A). Thus, the artificial prolongations also hinder OCP binding to PBS. Since the N-terminal His-tagged D2-20 OCP induces less fluorescence quenching than the N-terminal His-tagged WT, we expected faster fluorescence recovery in the presence of the later one. However, the opposite was observed. Both D2-20 OCP mutants presented very slow fluorescence recovery. This can be explained by a bigger stability of the mutated OCP^r: in darkness, a large quantity of these OCPs remain red and might re-attach to the PBs creating new PB-OCP quenched complexes, thereby lowering the increase of fluorescence. Nevertheless, we cannot discard the possibility that in the absence of the N-terminal arm the binding is stronger. Detection of OCP bound to PBs by western-blotting will not help to elucidate which of the two hypotheses is the correct one, since in both cases a bigger concentration of bound OCP will be detected (see (Wilson et al., 2012)).

Effect of Mutations on FRP Interaction with Free and Bound OCP^r

FRP by interacting with the C-terminal domain of OCP^r induces or accelerates the recovery of the lost phycobilisome fluorescence in OCP-PBS complexes (Boulay et al., 2010, Sutter et al., 2013). The absence of the N-terminal arm facilitated the action of the FRP and largely accelerated the detachment of the OCP^r from the PBS seen as a largely faster recovery of PBS fluorescence. This result suggests that the absence of the N-terminal arm allows a better access of FRP to the zone of interaction in the bound OCP (Figure 7B and 7D). In conclusion, the N-terminal arm in the WT-OCP partially hinders the FRP-OCP^r interaction and slows down the recovery of fluorescence. The replacement of Pro22 by the Val slightly increases the hindering of the N-terminal arm for FRP binding (Figure 7C).

Model of OCP photoactivation

Based in past and present results we can speculate about the steps in photoactivation. In darkness the OCP is in a closed conformation and the carotenoid span both domains. The OCP tridimensional structure shows hydrogen bonds between the carbonyl of the hECN and Tyr201 and Trp288 of the C-terminal domain (Kerfeld et al., 2003; Wilson et al., 2010). We have demonstrated that only ketocarotenoids render the OCP photoactive, hECN, ECN or cantaxanthine (Punginelli et al., 2009; Bourcier de Carbon et al., 2015). OCP is able to bind zeaxanthin but the ZEA-OCP is not photoactive. Moreover, mutations of Tyr201 and Trp288 render the OCP completely photo-inactive (Wilson et al., 2011). Thus, we concluded that the hydrogen bonds between the carotenoid and the protein are essential for photoactivation and proposed that light absorption by the carotenoid provokes a break of these hydrogen bonds as a first step in photoactivation (Wilson et al., 2011). This most probably induces a subsequent reorganization of the β sheet core involving for example, changes in the hydrogen bonds between Asp304 and Arg289 as proposed by (Liu et al., 2014) leading to the movement of the C-terminal domain. During the opening of the protein the amino acid interactions in the interface between the N-terminal and the C-terminal domains and those between the N-terminal arm and the C-terminal domain that stabilize the closed conformation of OCP^o are broken ((Wilson et al., 2012; Liu et al., 2014) and this work). Moreover, based on the results obtained with the P22V OCP mutant in this work, we propose that the N-terminal arm remains in the same position in OCP^o and OCP^r and that only the C-terminal domain moves relative to the N-terminal domain (Figure 8).

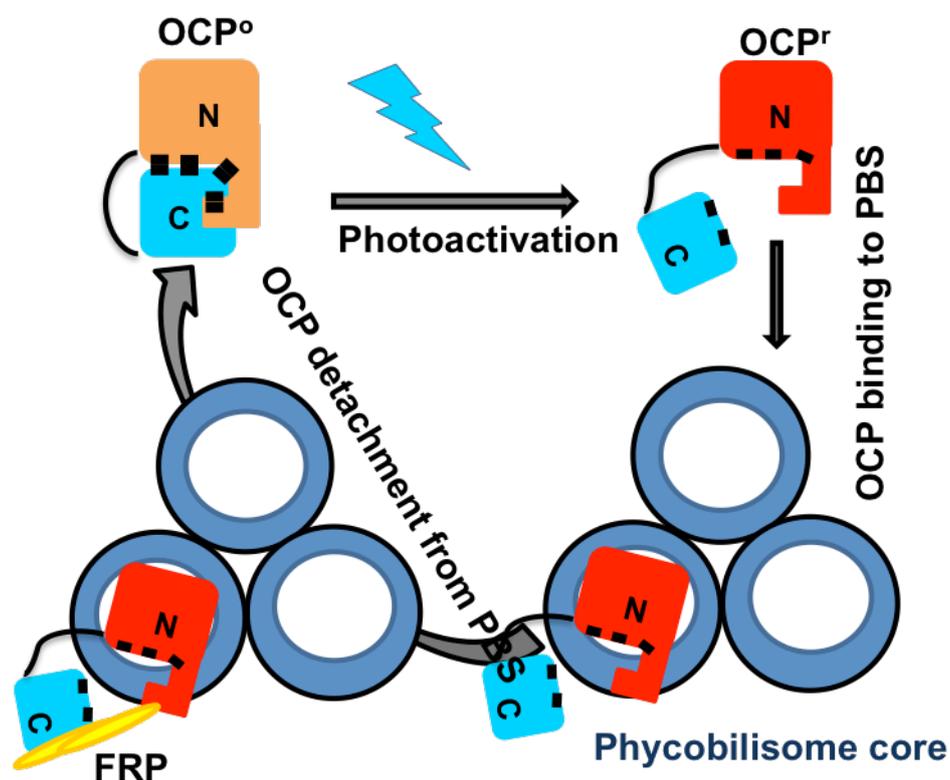


Figure 8

Model of the OCP-related photoprotective mechanism

Strong blue-green light induces conformational changes in the carotenoid provoking conformational changes in the C-terminal domain of the OCP leading to the breakage of the interactions between the two domains including the interactions between the N-terminal arm and the C-terminal domain. This involves the movement of the C-terminal domain but the N-terminal arm seems to remain in the same position than in OCP^o. In the open OCP^r, Arg155 can interact with negative charges in the APC trimer of the PBS core and induces energy and fluorescence quenching. FRP induces (or accelerates) the detachment of OCP^r from the PBS. The presence of the N-terminal arm seems to slow down the FRP action avoiding a rapid OCP detachment.

The presence of a Pro at position 22 seems to be essential to fix the right position of the arm in OCP^o and in OCP^f. Replacement of Pro22 by a Val weakened the interaction between the N-terminal arm and the C-terminal domain (faster photoactivation (Figure 5)) and hinders OCP^f attachment to PBs (less fluorescence quenching (Figure 6)). This phenotype can be attributable to a slight opening of the N-terminal arm in OCP^o and a more free movement of the N-terminal arm in OCP^f which could largely affect OCP^f binding to PBs. Proline confers some rigidity to the secondary structure of the protein hindering a free movement of the N-terminal arm and since Pro isomerization seems not to be involved in photoactivation, most probably the N-terminal arm does not move during the opening of the protein. This seems to be important to OCP binding to the PBS. The replacement of Pro22 by Val, which gives more freedom to the movement of the N-terminal arm, largely inhibits fluorescence quenching (Figure 6).

Conclusions

We conclude that the N-terminal arm is a key element in both OCP^o and OCP^f. In OCP^o, the relatively strong interaction between the N-terminal arm and the C-terminal domain, which requires high energy to break, avoids OCP photoactivation. As a consequence, energy quenching does not occur at low light intensity, which would otherwise decrease the energy available for the metabolism. It can be hypothesized that light energy is mainly needed to successively break hydrogen bonds and Van der Waals interactions that stabilize the closed OCP^o conformation. The fact that this process needs high energy explains that accumulation of OCP^f and as a consequence, energy quenching occurs only under high light intensities. In OCP^f, the position of the N-terminal arm controls the rate of recovery and its presence slows down the action of FRP, allowing larger energy quenching under light stress conditions.

In *Synechocystis* cells containing the mutated D9-15 OCP no fluorescence quenching was induced by strong blue light (Supplemental Figure 1). We can now explain this phenotype by the bigger effect of FRP leading to a fast detachment of OCP from PBs and as a consequence fast fluorescence recovery. The relative low concentration of OCP in this mutant, the weak D9-15 OCP binding to PBs and maybe a slightly faster transition from OCP^f to OCP^o induced by FRP also contribute to the mutant phenotype.

Materials and methods

Strains and culture conditions

The mesophylic freshwater cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803 WT and mutants were grown photoautotrophically in a modified BG11 medium (Herdman et al., 1973), containing double the amount of sodium nitrate. Cells were kept in a rotary shaker (120 rpm) at 30°C, illuminated by fluorescent white lamps giving a total intensity of about 30–40 μ mol photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ under a CO₂-enriched atmosphere. The cells were maintained in the logarithmic phase of growth and were collected at OD₈₀₀=0.6–0.8.

Construction of *Synechocystis* Mutant strains

The nucleotide deletion in the *ocp* gene (*slr1963*) was obtained by site-directed mutagenesis using the Quickchange SL site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and the synthetic primers in each case (Supplemental Figure 6). To obtain the mutant D2-15 OCP, a plasmid previously described (Wilson et al., 2008) containing the *ocp* gene (*slr1963*) under the control of the *psbA2* promoter, and *frp* gene (*slr1964*) was used as a template with the primers Psba2-Rev and F-RCP-15. For the addition of the sequence encoding for the first 8 amino acids (taking into account the Met1) we have used as primers R-PsbA2-8a and F-RCP15-8a, and the plasmid containing the D2-15 construction as template. The plasmids D2-15 OCP and D9-15 OCP were used to transform the WT *Synechocystis* PCC 6803 cells. The endogenous *slr1963* gene was then interrupted using the DOCP plasmid construct bearing a spectinomycin/streptomycin resistance cassette (Wilson et al., 2012). Segregation of the mutants was confirmed by PCR and by DNA sequencing.

DNA and RNA isolation, manipulation and analysis

Total RNA from *Synechocystis* cells (between 3–5 μ g Chl·ml⁻¹) was isolated using the method described by (Ausubel et al., 2006) and treated with DNase-RNase free (Ambion). RT-PCR was carried out using Omniscript reverse transcriptase (Qiagen). The primer used to construct the cDNAs was R-RCP-His. Then, the cDNAs were amplified by PCR using the oligonucleotides R-RCP-His and 63-41-F.

Construction of plasmids for *E. coli* production of WT and mutated OCPs

The *ocp* (*slr1963*) gene from *Synechocystis* 6803 has been cloned and expressed in *E. coli* cells producing echinenone as described in (Bourcier de Carbon, 2015). Construction of the plasmids pCDF-OCPsynCtag and pCDF-OCPsynNtag carrying the *slr1963* sequence with a sequence coding for a His-tag in the C-terminus or the N-terminus, respectively, was described in (Bourcier de Carbon et al, 2015). To obtain the pCDF- Δ 2-20 OCP and pCDF- Δ 2-15 OCP plasmid, the nucleotides coding for the 19 or the 14 first amino acids (after Met 1) of the *ocp* coding sequence were deleted by site-directed mutagenesis using the plasmid pCDF-OCPsyn-Ctag or -OCPsyn-3aaNtag as template and synthetic primers (Supplemental Figure 8). The point mutations P22V and D6L as well as the two silent mutation (ATG CTG GCC instead of ATG CTA GCG) allowing the destabilization of the mRNA hairpin (supplemental figure 3) were introduced by directed mutagenesis, using the pCDF-OCPsyn-Ctag or pCDF-Syn3aa-Ntag plasmid as template and mismatching primers (supplemental Figure 8).

Transformation of *E. coli* cells and induction of gene expression

E. coli BL21-Gold (DE3) cells from Agilent Technologies were used for OCP production. BL21 cells were transformed simultaneously with three plasmids to produce holo-OCPs: pAC-BETA (gift of Prof Cunningham) (Cunningham et al., 1996), pBAD-CrtO (Bourcier de Carbon et al, 2015) and pCDF-OCP plasmids. The transformed *E. coli* cells were grown in the presence of three antibiotics (ampicillin (50 μ g/ml), chloramphenicol (17 μ g/ml) and streptomycin (25 μ g/ml)) to maintain the different plasmids in the *E. coli* cells. For induction of different promoters, transformed *E. coli* cells were grown in TB medium at 37°C for 3-4 hours until OD₆₀₀=0.8. Then arabinose was added (0.02%) and the culture was grown overnight at 37°C. In the morning the cells were diluted with fresh medium and arabinose 0.02% and they were grown at 37°C till OD₆₀₀=1-1.2. Then isopropyl b-D-thiogalactoside (IPTG) (0.2 mM) was added and the cells incubated overnight at 28 °C. In the morning, the cultures were harvested and pellets were stored at -80°C until they were used.

E. coli BL21 cells were transformed with only pCDF-OCP to produce apo-OCP. The cells were grown in the presence of streptomycin (50 μ g/ml). The *ocp* transcription was induced by addition of IPTG (0.2 mM) and the cells were incubated overnight at 28°C.

OCP isolation and holo-OCP concentration calculation

His-tagged D9-15 overexpressed in *Synechocystis* was isolated as described in (Wilson et al., 2008). For isolation of OCP from *E. coli* cells, frozen *E. coli* cells were resuspended in the lysis buffer containing 40 mM Tris-HCl pH 8, 10% glycerol and 300 mM NaCl and were broken in dim light using a “French Press”. The membranes were pelleted and the supernatant was loaded on a nickel column (Ni-Probond resin, Invitrogen). OCP was eluted with 200 mM imidazole and then dialyzed against Tris-HCl 40 mM.

Total OCP was measured using the Bradford method. At least five independent Bradford measurements of each isolated OCP were realized. The concentration in mg/mL obtained by this method was converted to molar concentration using a MW of 35 kDa for the OCP. Holo-OCP concentration was calculated based in the fact that each holo-OCP binds one carotenoid molecule and thus, the molar concentrations of carotenoid and holo-OCP are identical. Carotenoid concentration was first calculated in mg/mL from the carotenoid absorbance at 496 nm and using $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2158$ and then converted to molar concentration. The molar ratio holo-OCP to total OCP gives the percentage of holo-protein. When this ratio is around 1, we considered that the preparation contains 100% holo-protein.

Absorbance spectra and photoactivity kinetics of OCP

Absorbance spectra and the kinetics of photoactivity (illumination with 5000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ of white light) and dark recovery were measured in a Specord S600 (Analyticjena) at 9°C or 18°C in the cuvette. In Figures representative experiments in which all the OCPs were measured in the same day are presented. When the measurements were repeated the same day the curves were identical. In different days, 5% variations were observed due to slight variations in light illumination or temperature. Nevertheless, the changes in the kinetics observed with the OCP mutants remained constant.

PBS isolation

Synechocystis PBS were isolated as described in (Gwizdala et al., 2011). Briefly, after reaching optical density = 1 at 800nm, cyanobacterium cells were pelleted. Cells were broken with glass beads, phycobilisomes solubilized by Triton X-100 treatment and then isolated on a sucrose gradient.

PAM fluorometer

Fluorescence yield quenching was monitored using a pulse amplitude fluorometer (101/102/103-PAM; Walz). Measurements were performed in a 1 cm path-length stirred cuvette. In vitro reconstitution was handled as described in (Gwizdala et al., 2011) with a PB concentration of 0.012 μ M in 0.5M potassium phosphate buffer (pH=7.5) at 23°C. Fluorescence quenching was followed under 900 μ mol.m⁻²s⁻¹ blue-green light (halogen white light filtered by a Corion cut-off 550-nm filter; 400-550nm).

The ratio OCP to PB was 40 in all the experiments. The concentration of OCP for these experiments was calculated from the carotenoid absorbance spectra since only the OCP attaching a carotenoid is able to be photoactivated and to bind to PBs. OCP was previously converted to the red form by 10 min illumination with 5000 μ mol photons m⁻² s⁻¹ of white light at 4°C.

In Figures representative experiments in which all the OCPs were measured in the same day are presented. When the measurements were repeated the same day the curves were identical. In different days, 5% variations were observed due to slight variations in light illumination or temperature or quality of PBS. Nevertheless, the changes in the kinetics observed with the OCP mutants remained constant.

Calculation of percentage of conversion of D2-20 OCP

To estimate the percentage of the red form present in D2-20 OCP in darkness, we fit the dark spectra with a combination of WT OCP^o and OCP^r spectra: we multiply the OCP WT orange absorbance spectrum by a factor a and the OCP red absorbance spectrum by a factor b being a + b = 1. The best fit was obtained using the values a=0.25 and b=0.75 for D2-20 C-terminal His-tagged OCP and a=0.30 and b=0.70 for D2-20 N-terminal His-tagged OCP . See Supplemental Figure 7.

Gel Electrophoresis and Protein Gel Blots

Total cell proteins of the OCP-mutants were analyzed by SDS-PAGE on a 12% polyacrylamide/2M urea gel in a Tris/MES system (Kashino et al., 2001). After electrophoresis, proteins were transferred to a membrane and the OCP was detected using a polyclonal antibody against OCP. Finally, OCP antibody was monitored by an alkaline phosphatase colorimetric reaction.

Acknowledgements

We thank Prof Francis X. Cunningham for the gift of plasmids pAC-BETA. We kindly thank François Perreau for the determination of the carotenoid content in the OCP isolated from *Synechocystis* cells. We thank Dr. Herbert van Amerongen for his critical reading of the article and stimulating and fruitful discussion. We thank Dr. Jose Antonio Escudero for help with *mfold* utilization. We thank Sandrine Cot for technical assistance.

References

- Adir N** (2005) Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant. *Photosynth Res* **85**: 15-32
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K** (2006) *Current proteocols in Molecular Biology*. Geene Publishing and Weley Interscience, New York
- Berera R, Gwizdala M, van Stokkum IH, Kirilovsky D, van Grondelle R** (2013) Excited States of the inactive and active forms of the orange carotenoid protein. *J Phys Chem B* **117**: 9121-9128
- Bode S, Quentmeier CC, Liao PN, Hafi N, Barros T, Wilk L, Bittner F, Walla PJ** (2009) On the regulation of photosynthesis by excitonic interactions between carotenoids and chlorophylls. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 12311-12316
- 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
- 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
- Cunningham FX, Jr., Pogson B, Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D, Gantt E** (1996) Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* **8**: 1613-1626
- Gorbunov MY, Kuzminov FI, Fadeev VV, Kim JD, Falkowski PG** (2011) A kinetic model of non-photochemical quenching in cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta* **1807**: 1591-1599

- Grossman AR, Schaefer MR, Chiang GG, Collier JL** (1993) The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental-conditions. *Microbiol. Rev.* **57**: 725-749
- 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
- Herdman M, Delaney SF, Carr NG** (1973) A new medium for the isolation and growth of auxotrophic mutants of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **79**: 233-237
- Holt NE, Zigmantas D, Valkunas L, Li XP, Niyogi KK, Fleming GR** (2005) Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science* **307**: 433-436
- Holt TK, Krogmann DW** (1981) A carotenoid-protein from cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **637**: 408-414
- Horton P, Ruban A** (2005) Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *J Exp Bot* **56**: 365-373
- Horton P, Ruban AV, Walters RG** (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 655-684
- Jahns P, Holzwarth AR** (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* **1817**: 182-193
- Kashino Y, Koike H, Satoh K** (2001) An improved sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis system for the analysis of membrane protein complexes. *Electrophoresis* **22**: 1004-1007

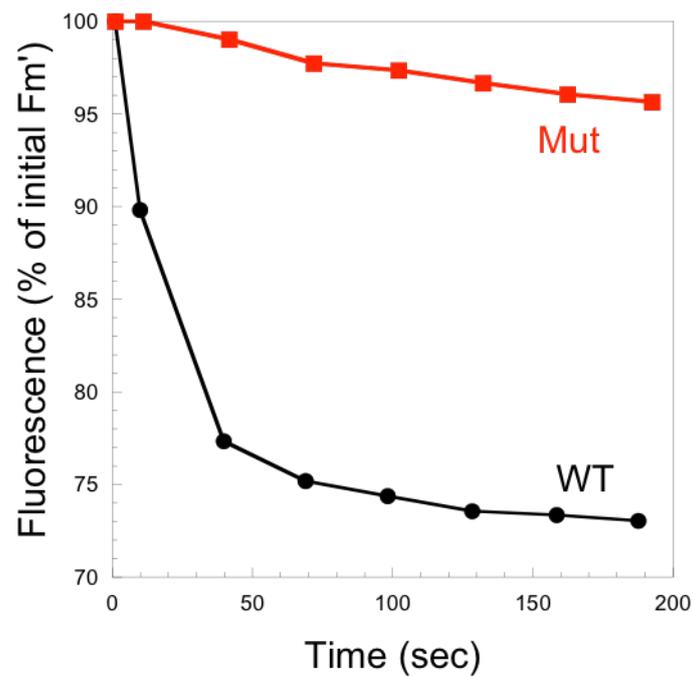
- Kerfeld CA, Sawaya MR, Brahmamdam V, Cascio D, Ho KK, Trevithick-Sutton CC, Krogmann DW, Yeates TO** (2003) The crystal structure of a cyanobacterial water-soluble carotenoid binding protein. *Structure* **11**: 55-65
- Kirilovsky D** (2014) Modulating energy arriving at photochemical reaction centers: orange carotenoid protein-related photoprotection and state transitions. *Photosynth Res*
- Kirilovsky D, Kerfeld CA** (2012) The orange carotenoid protein in photoprotection of photosystem II in cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta* **1817**: 158-166
- Kudla G, Murray AW, Tollervey D, Plotkin JB** (2009) Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science* **324**: 255-258
- Leverenz RL, Jallet D, Li MD, Mathies RA, Kirilovsky D, Kerfeld CA** (2014) Structural and functional modularity of the orange carotenoid protein: distinct roles for the N- and C-terminal domains in cyanobacterial photoprotection. *Plant Cell* **26**: 426-437
- Liu H, Zhang H, King JD, Wolf NR, Prado M, Gross ML, Blankenship RE** (2014) Mass spectrometry footprinting reveals the structural rearrangements of cyanobacterial orange carotenoid protein upon light activation. *Biochim Biophys Acta* **1837**: 1955-1963
- MacColl R** (1998) Cyanobacterial phycobilisomes. *J Struct Biol* **124**: 311-334
- Niedzwiedzki DM, Liu H, Blankenship RE** (2014) Excited state properties of 3'-hydroxyechinenone in solvents and in the orange carotenoid protein from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Phys Chem B* **118**: 6141-6149
- Niyogi KK, Truong TB** (2013) Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* **16**: 307-314

- Polivka T, Chabera P, Kerfeld CA** (2013) Carotenoid-protein interaction alters the S(1) energy of hydroxyechinenone in the Orange Carotenoid Protein. *Biochim Biophys Acta* **1827**: 248-254
- Punginelli C, Wilson A, Routaboul JM, Kirilovsky D** (2009) Influence of zeaxanthin and echinenone binding on the activity of the Orange Carotenoid Protein. *Biochim Biophys Acta* **1787**: 280-288
- Rakhimberdieva MG, Elanskaya IV, Vermaas WFJ, Karapetyan NV** (2010) Carotenoid-triggered energy dissipation in phycobilisomes of *Synechocystis* sp. PCC 6803 diverts excitation away from reaction centers of both photosystems. *Biochim Biophys Acta* **1797**: 241-249
- Ruban AV, Berera R, Iliaia C, van Stokkum IHM, Kennis JTM, Pascal AA, van Amerongen H, Robert B, Horton P, van Grondelle R** (2007) Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature* **450**: 575-582
- 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 U S A* **110**: 10022-10027
- Takahashi H, Clowez S, Wollman FA, Vallon O, Rappaport F** (2013) Cyclic electron flow is redox-controlled but independent of state transition. *Nat Commun* **4**: 1954
- Tian L, Gwizdala M, van Stokkum IH, Koehorst RB, Kirilovsky D, van Amerongen H** (2012) Picosecond kinetics of light harvesting and photoprotective quenching in wild-type and mutant phycobilisomes isolated from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biophys J* **102**: 1692-1700
- Tian L, van Stokkum IH, Koehorst RB, Jongerius A, Kirilovsky D, van Amerongen H** (2011) Site, rate, and mechanism of photoprotective quenching in cyanobacteria. *J Am Chem Soc* **133**: 18304-18311

- Tian L, van Stokkum IH, Koehorst RB, van Amerongen H** (2013) Light harvesting and blue-green light induced non-photochemical quenching in two different C-phycoyanin mutants of *Synechocystis* PCC 6803. *J Phys Chem B* **117**: 11000-11006
- Wilson A, Ajlani G, Verbavatz JM, Vass I, Kerfeld CA, Kirilovsky D** (2006) A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria. *Plant Cell* **18**: 992-1007
- Wilson A, 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
- 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
- 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
- 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
- Zhang H, Liu H, Niedzwiedzki DM, Prado M, Jiang J, Gross ML, Blankenship RE** (2013) Molecular mechanism of photoactivation and structural location of the cyanobacterial orange carotenoid protein. *Biochemistry* **53**: 13-19

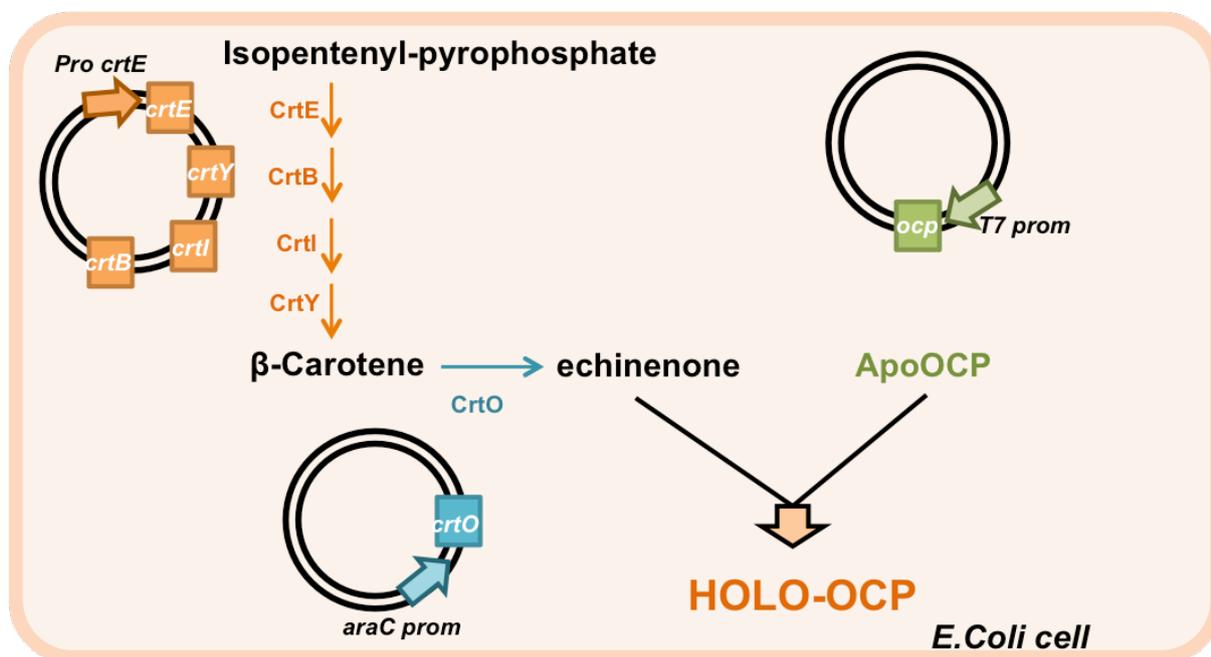
Supplementary Data

Supplementary Figures S1 to S8



Supplementary Figure 1

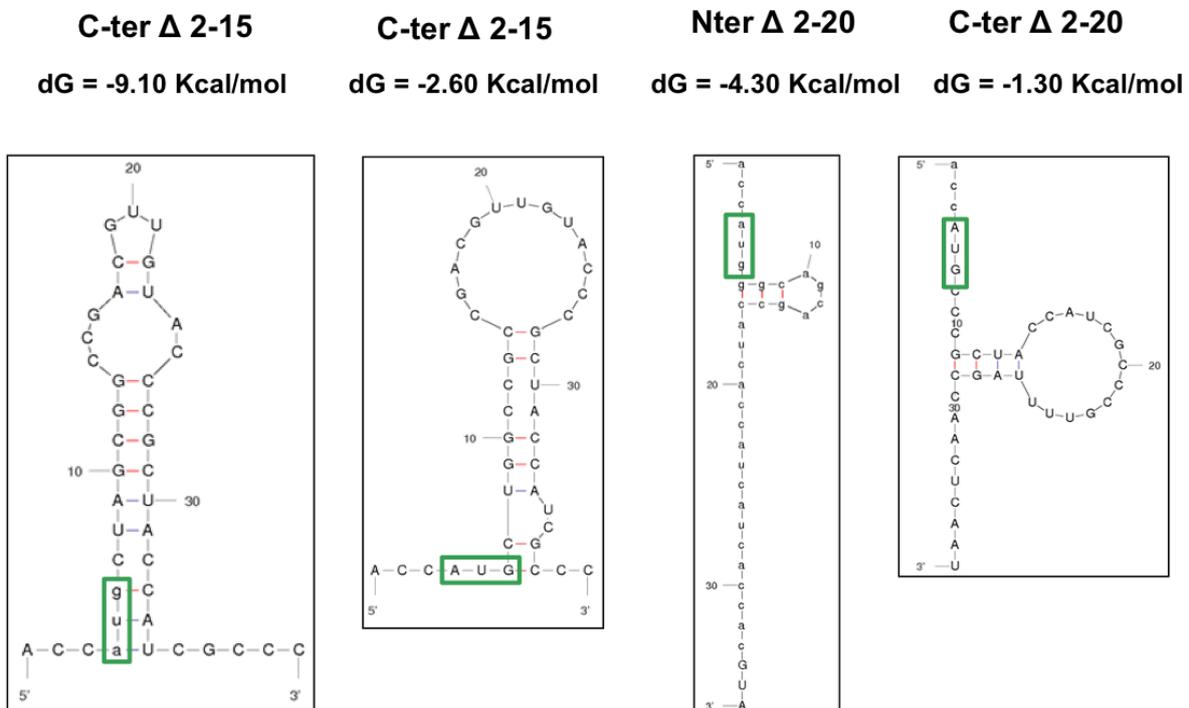
Fluorescence quenching induced in WT (black circles) and in overexpressing D9-15 OCP (red squares) *Synechocystis* cells by strong blue-green light ($750 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).



Supplementary Figure 2

Scheme of the *E. coli* cells producing holo-OCPs.

Enzymatic pathway Isopentenyl-pyrophosphate to echinenone is composed by enzymes CrtE, CrtB, CrtI, CrtY and CrtO. Coding sequences are cloned in two plasmids, pAC-Beta (CrtE, CrtB, CrtI and CrtY) and pBAD (CrtO). The third plasmid (pCDF) contains OCP coding sequence. After induction step, we collect holo-OCP that binds echinenone.

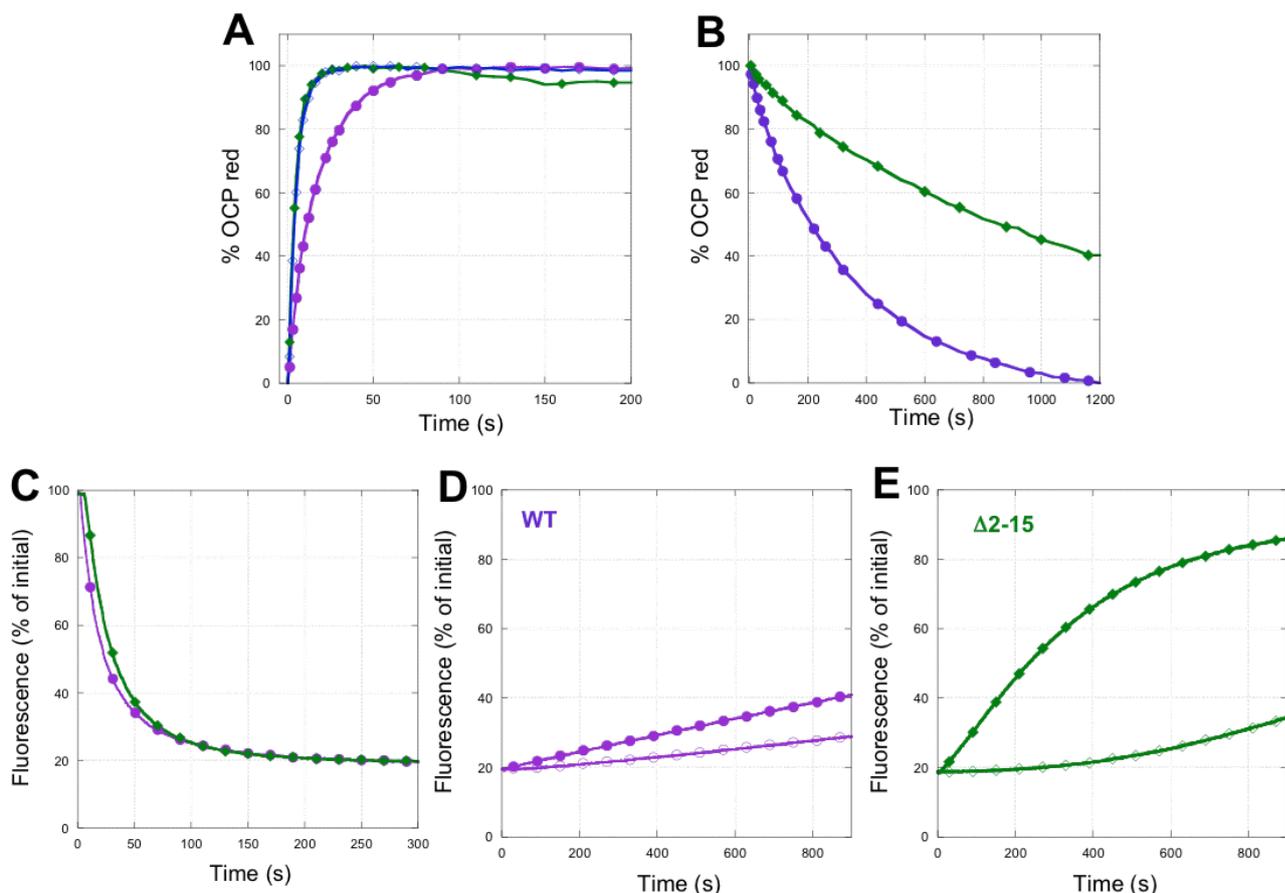


Supplementary Figure 3

Predicted hairpins in the mRNAs encoding N-terminal and C-terminal His-tagged Δ2-20 OCPs and C-terminal His-Tagged OCPs Δ2-15 with and without the stable hairpin.

In order to destabilize the hairpin two silent mutations were realized : A to G in position 6 and G to C in position 9.

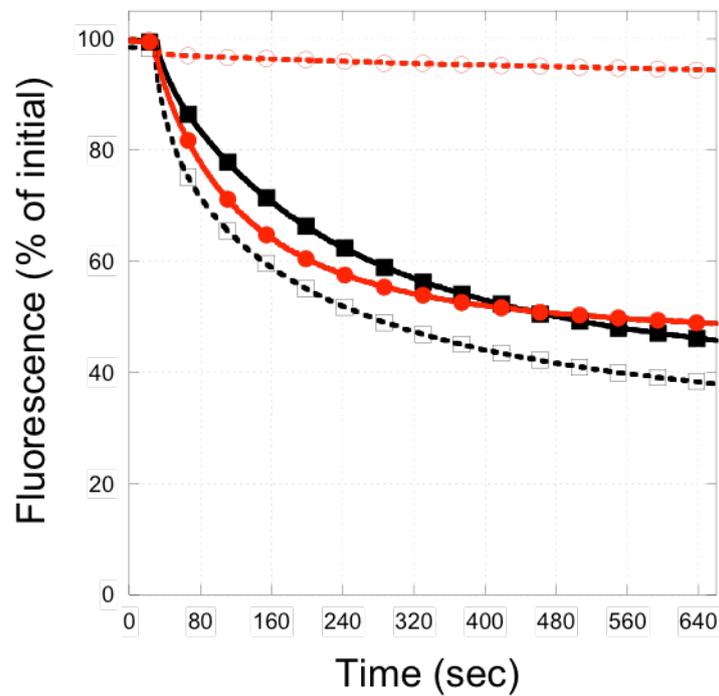
Taking the sequence corresponding to the -4 to +37 nucleotide position relative to the translation start, dG was calculated by a program to fold the RNA sequence (see Material and Methods). A higher DG (less negative) indicates that the mRNA secondary structure is easier to break by the translation machinery. Thus, a very negative DG indicates that the protein synthesis can be hindered or stopped.



Supplementary Figure 4

Photoactivation (OCP⁰ to OCP^f) (A) and dark recovery (OCP^f to OCP⁰) (B) kinetics of WT (circles, violet) and C-terminal His-tagged D2-15 OCP (diamonds, green) isolated from *E.coli*. (A) OCP⁰ to OCP^f photoconversion during illumination with strong white light (5000 μmol photons m⁻² s⁻¹) at 18°C and (B) recovery in darkness.

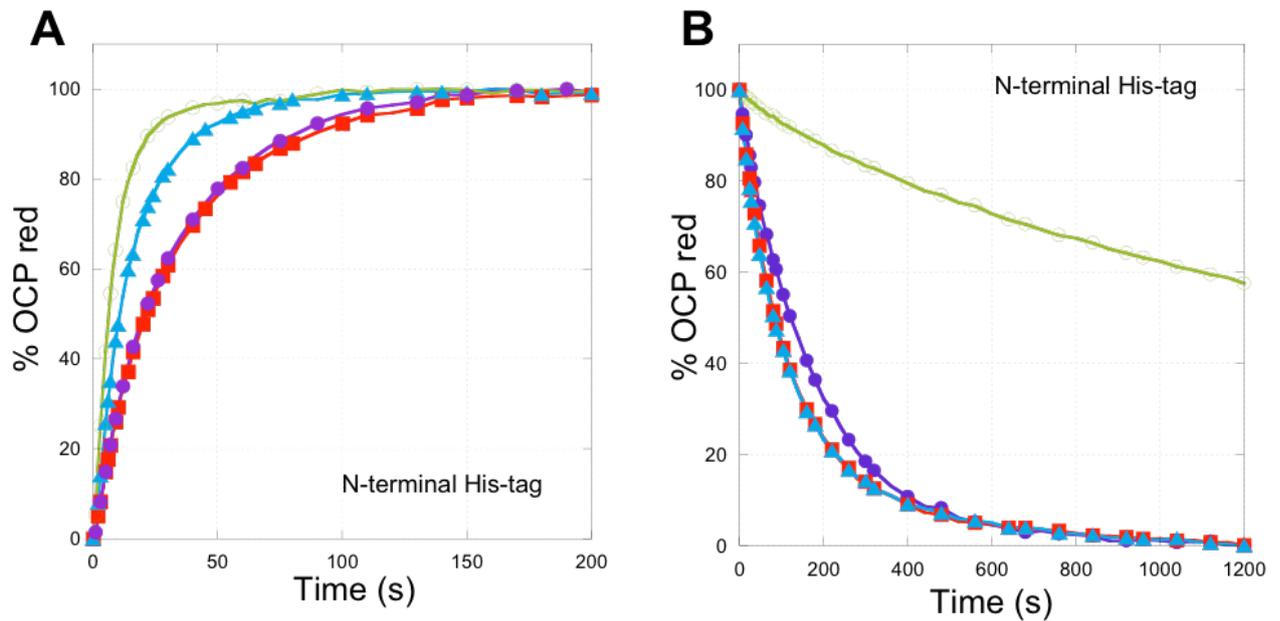
(C) Phycobilisome Fluorescence Quenching induced by C-terminal His-tagged WT (violet circle) and D2-15 (green diamond) OCP^fs during illumination with blue-green light (900 μmol photons m⁻² s⁻¹) at 23°C. The OCPs were pre-illuminated for 10 min with strong white light (5000 μmol photons m⁻² s⁻¹) at 4°C. (D and E) Dark fluorescence recovery in the absence (open symbols) or in the presence of FRP (closed symbols) in quenched PBS-WT OCP (D) and PBS- D2-15 OCP (E) complexes.



Supplementary Figure 5

Phycobilisome fluorescence quenching induced by D2-20 and D9-15 OCPs in darkness

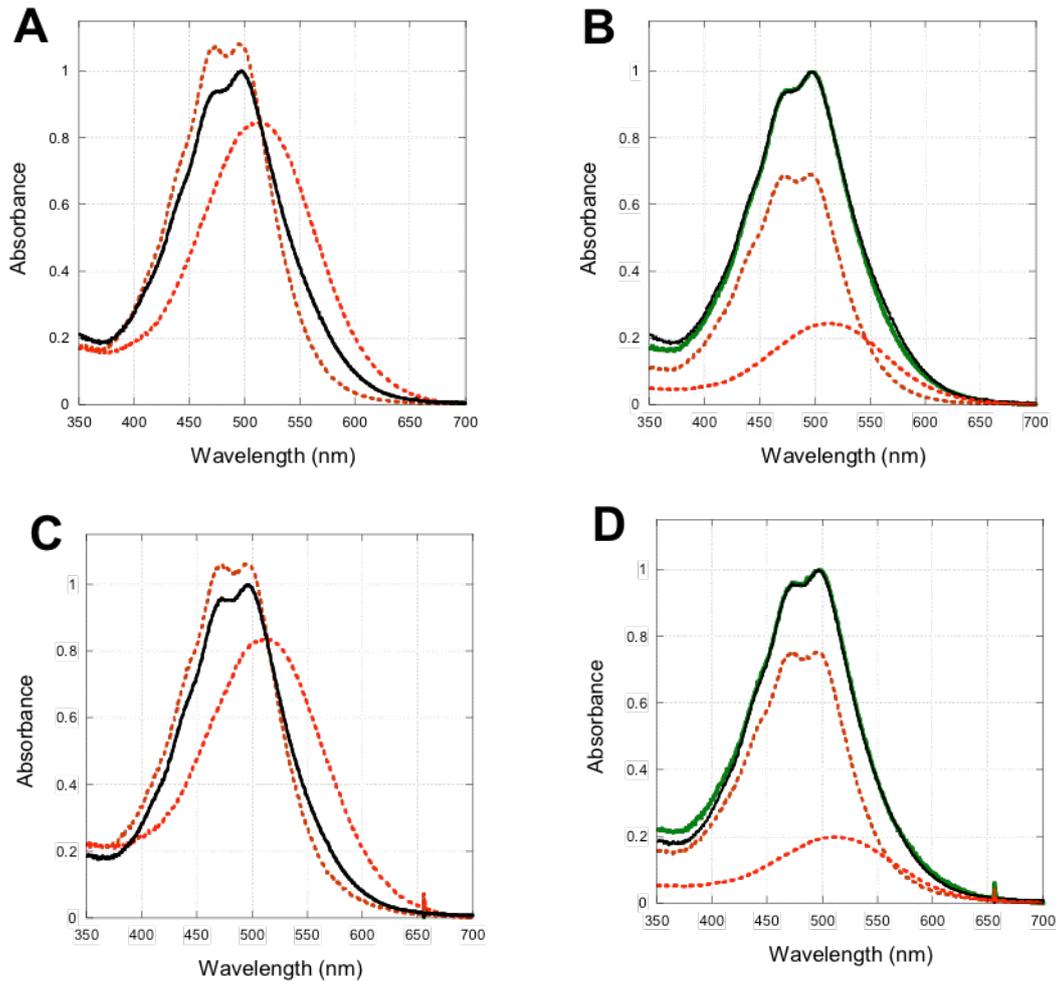
Phycobilisome fluorescence quenching induced by WT (red open circles), N-terminal D2-20 (black close squares), C-terminal D2-20 (black open squares) and C-terminal D9-15 (red close circles) OCPs followed by a PAM fluorimeter in the absence of actinic light at 23°C.



Supplementary Figure 6

Photoactivation (A) and Recovery (B) of WT and mutated OCPs

(A) OCP⁰ to OCP^r photoconversion during illumination with strong white light ($5000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 18°C of N-terminal WT (circles), N-terminal D2-20 (diamond), N-terminal D6L (square) and N-terminal P22V (triangles) OCPs. (B) Recovery in darkness with the same symbols.



Supplementary figure 7

Spectra of N-terminal His-tagged $\Delta 2-20$ OCP (A, B) and C-ter $\Delta 2-20$ C-terminal His-tagged OCP (C,D) and fit of spectra using a combination of OCP^o and OCP^r spectra (B, D)

In (A and B) $\Delta 2-20$ N-terminal His-tagged OCP and in (C and D) $\Delta 2-20$ C-terminal His-tagged OCP are represented with a black line. In all spectra, WT OCP^o (orange dotted line) and WT OCP^r (red dotted line) forms are shown. In (B and D) the green line represents the fit of the spectra of dark $\Delta 2-20$ His-tagged OCPs.

$$\text{Fit } \Delta 2-20 \text{ N-terminal His-tagged OCP} = 0.70 \cdot \text{OCP}^o + 0.30 \cdot \text{OCP}^r$$

$$\text{Fit } \Delta 2-20 \text{ C-terminal His-tagged OCP} = 0.75 \cdot \text{OCP}^o + 0.25 \cdot \text{OCP}^r$$

| Table I | |
|--|--|
| A. Construction of protein lacking N terminal arm in <i>Synechocystis</i> | |
| Deletion of the first aminoacids (15) in OCP sequence, HisTag is in C-terminal. | |
| PsbA2Rev | CATATGGTTATAATTCCTTATGTATTTGTCGATG |
| FRCP15 | CATAAGGAATTATAACCATATGCTAGCGGCCGACGTTGTACCCGCTAC |
| Deletion of the first aminoacids (15) but adding the first 3aa after Met, HisTag is in C-terminal. | |
| RPsbA2 4a | GGTGAATGGCATATGGTTATAATTCCTTATGTA |
| FRCP15 4a | GAATTATAACCATATGCCATTACCCCTAGCGGCCGACG |
| Deletion of the first aminoacids (15) but adding the first 7aa after Met, HisTag is in C-terminal. | |
| RPsbA2 8a | GGCAGAGTCAATGGTGAATGGCATATGGTTATAATTC |
| FRCP15 8a | CCATTCACCATTGACTCTGCCCTAGCGGCCGACGTTGTAC |
| B. Construction of protein lacking N terminal arm in <i>E.coli</i> | |
| Deletion of the first aminoacids (19), Met 1 is conserved, HisTag is in N-terminal | |
| F-OCP-D2-20-Nt | AGCCATCACCATCATCACCACGTACCCGCTACCATCGCCCGT |
| R-OCP-SynNt | GTGGTGATGATGGTGATGGCTGCTGCCCATGGT |
| Deletion of the first aminoacids (19), Met 1 is conserved, HisTag is in C-terminal | |
| F-OCP-D2-20-Ct | TTAATAAGGAGATATACCATGGTACCCGCTACCATCGCCCGT |
| R-OCP-D2-20-Ct | CATGGTATATCTCCTTATTAAGTTAAACAAAATTATTTCTA |
| Deletion of the first aminoacids (14), Met 1 is conserved, HisTag is in C-terminal. | |
| F-OCP-D2-15WTct | TTAATAAGGAGATATACCATGCTAGCGGCCGACGTTGTACCC |
| F-OCP-D2-15Nct | TTAATAAGGAGATATACCATGCTGGCCGCCGACGTTGTACCC |
| C. Primers for directed mutagenesis | |
| P22V-F | GACGTTGTAGTCGCTACCATCGC |
| P22V-R | GCGATGGTAGCGGCTACAACGTC |
| D6L-F | TCACCATTCTCTCTGCCCGCG |
| D6L-R | CGCGGGCAGAGAGAATGGTGA |
| D. Primers for reverse transcription and PCR | |
| 63-241F | CAGGCCATGTGTGACTTGG |
| RRCPHis | ATGATGATGATGATGATGAGCGGTGAAGCCCATGTCCAC |

Supplementary Figure 8

Sequences of primers used in this study

Listed primers include those used for the construction of protein lacking the N-terminal arm (A) in *Synechocystis* and (B) in *E.coli*, (C) those used for site-directed mutagenesis and (D) those used for reverse transcription or PCR as described in the Methods section.

Résolution de la structure de la forme active de l'OCP

Résumé de la publication

Les interactions protéine-pigments et pigment-pigments sont indispensables pour dissiper l'énergie d'excitation de la lumière et photo-protéger les organismes réalisant la photosynthèse oxygénique. L'OCP fonctionne à la fois comme un senseur de l'intensité lumineuse et un dissipateur de l'énergie d'excitation chez les cyanobactéries. Dans ce travail, nous avons déterminé la structure d'une forme active de l'OCP, basée sur le domaine N-terminal, liant de façon non-covalente le caroténoïde. La structure, combinée avec des données structurales, révèle que la photo-activation de l'OCP est accompagnée d'une translocation de 12 angströms de son caroténoïde et d'une reconfiguration des interactions entre la protéine et le caroténoïde. Nous avons déterminé l'origine des changements photochromiques de l'OCP, déclenchés par la lumière, en passant de sa forme inactive, orange, à sa forme active, rouge. Nous avons identifié les déterminants structuraux nécessaires à son interaction avec l'antenne collectrice de lumière, les phycobilisomes, pendant la photo-protection.

Lorsque l'OCP se photo-active, son caroténoïde subit une translocation de 12 angströms qui le pousse dans le domaine N-terminal et les deux domaines N- et C- terminaux se dissocient. Le modèle de photo-activation proposé, qui met en évidence la cascade d'évènements que subit la protéine, est le suivant: l'absorption de la lumière induit des changements structuraux au sein du caroténoïde, perturbant ainsi son interaction avec le domaine C-terminal de la protéine, qui lui aussi, subit des modifications structurelles. La séparation des deux domaines lors de la photo-activation entraîne une exposition au solvant, des deux cycles β du caroténoïde. Une modélisation de l'interaction OCP sous sa forme active avec le phycobilisome suggère qu'il existe une conformation du caroténoïde dans laquelle il se tiendrait à seulement 3,1 Å de la biline du phycobilisome. Cette faible distance inter-pigments concorderait avec l'efficacité de quenching de l'énergie d'excitation par l'OCP. Les résultats obtenus permettent aussi de suggérer que des changements structuraux supplémentaires après la liaison aux phycobilisomes peuvent exister pour réduire la distance qui sépare le caroténoïde de la biline ou bien pour modifier son orientation dans le complexe OCP-phycobilisome formé.

C'est la première fois qu'un tel mécanisme de photo-activation d'une protéine à caroténoïde est mis en lumière. Le changement de la position du caroténoïde et la réorganisation de son interaction au sein de la protéine lors de sa photo-activation est une nouvelle notion pour étudier les autres protéines à pigments et leurs fonctions.

Contribution à ce travail

Ma contribution dans ce travail de recherche fut d'apporter le système d'expression hétérologue de l'OCP dans l'organisme *E.coli*. Cela implique les conditions de culture, les plasmides permettant la synthèse des caroténoïdes (échinénone et canthaxanthine) et le plasmide portant le gène de l'OCP de *Synechocystis* PCC 6803, afin de construire la RCP, par amplification de son domaine N-terminal (2 à 165 acide aminés). J'ai aussi contribué à ce travail en créant et purifiant l'OCP recombinante de *Synechocystis* PCC 6803 liant la canthaxanthine.

Ce travail se réfère à la publication :

Leverenz, R.L., Sutter, M., Wilson, A., Gupta, S., Thurotte, A., Carbon, C.B. de, 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, 1463–1466.

Conclusions & Perspectives

Le but de mon doctorat était d'exprimer de façon hétérologue une protéine soluble à caroténoïde : l'Orange Caroténoïde protéine (OCP). L'OCP intervient dans un mécanisme de photo-protection chez les cyanobactéries pour les protéger des fortes illuminations causant des dommages photo-oxydatifs. Sa production hétérologue a été accomplie avec succès et nous a permis d'étudier et de révéler d'autres de ses caractéristiques. Nous avons mis en évidence des différences d'affinité entre la protéine et différents caroténoïdes et de nouveaux déterminants au sein de son mécanisme de photo-activation.

CONCLUSIONS

Obtention d'une méthode d'expression hétérologue robuste pour produire l'OCP

J'ai développé une méthode de production hétérologue de l'OCP pour obtenir en grande quantité la protéine. Cette méthode optimisée et décrite dans cette thèse, portée par un seul plasmide, nous a permis d'obtenir environ 800 fois plus d'OCP en seulement 20% du temps précédemment nécessaire pour la surexpression de l'OCP dans les cellules de cyanobactéries (Adjélé Wilson, Diana Kirilovsky et Céline Bourcier de Carbon, données non publiées). En seulement quatre jours plus de 120 mg d'holo-OCP (OCP liant son caroténoïde) de *Synechocystis* peut être obtenu à partir de 1L d'*E.coli* avec la construction Syn-3aaNtag. Les éléments clés de cette méthode de production reposaient sur le choix des promoteurs et des inducteurs mais aussi, et surtout, l'induction séquentielle des gènes.

Le β -carotène, substrat de la voie de biosynthèse du caroténoïde lié par l'OCP, doit être présent dans la membrane avant l'induction des gènes codant les enzymes CrtO et CrtW nécessaires à sa conversion en echinenone ou en canthaxanthine, respectivement. Il est aussi primordial que le caroténoïde lié par l'OCP soit présent dans les membranes d'*E.coli* avant l'induction de son gène.

L'IPTG n'est pas un sucre métabolisable par *E.coli*, donc sa concentration en tant qu'inducteur ne varie pas au sein de la culture. La concentration de cet inducteur au sein de la culture est donc stable et constante, ce qui la rend intéressante pour surexprimer une protéine. Mais sa présence dans le milieu de culture a tendance à inhiber la croissance des cellules, même à de faibles concentrations. En revanche, le sucre arabinose est, lui, métabolisable par *E.coli*. Il est donc peu avantageux d'utiliser cet inducteur afin de surproduire une protéine car

sa concentration dans le milieu de culture a tendance à décroître avec le temps. Cependant, son utilisation booste la croissance cellulaire. Nous avons donc choisit d'induire l'expression du gène codant l'enzyme permettant la synthèse du caroténoïde qui doit être lié par l'OCP avec l'arabinose. En effet, l'enzyme permettant la conversion en echinenone ou canthaxanthine n'a pas besoin d'être synthétisée en grande quantité pour convertir tout le β -carotène. Cette induction à 37°C (température optimale pour que les cellules se divisent) permet d'obtenir une concentration élevée de cellules contenant le caroténoïde lié par l'OCP dans leurs membranes. Le gène de l'OCP est ensuite induit par l'IPTG à des températures plus basses, entre 20 et 28°C. Cette induction permet de surexprimer le gène de l'OCP, donc d'obtenir la protéine en grande quantité. La température d'induction à l'IPTG, inférieur à 37°C, permet de ralentir le métabolisme de la cellule afin de ralentir par la même occasion la synthèse protéique. En ralentissant la synthèse de l'OCP, elle a tendance à mieux se replier et à lier avec plus d'efficacité le caroténoïde logé dans la membrane.

Le système de production hétérologue de l'OCP mis en œuvre est fiable, efficace et robuste.

Caractérisation des OCPs recombinantes de *Synechocystis*, d'*Arthrospira* et d'*Anabaena* liant différents caroténoïdes

Grâce à ce système, nous avons démontré que les OCPs de *Synechocystis* PCC 6803, d'*Arthrospira* PCC 7345 et d'*Anabaena* PCC 7120 sont capables de lier l'échinenone mais aussi la canthaxanthine. Ces OCPs liant la canthaxanthine sont aussi photo-actives et capables d'induire le quenching de la fluorescence des phycobilisomes, comme l'OCP native de *Synechocystis* PCC 6803. Nous n'aurions pas pu le démontrer auparavant, lorsque l'OCP était isolée des cellules de *Synechocystis* la surexprimant, car ces cellules ne synthétisent pas la canthaxanthine.

Toutes ces OCPs produites de façon hétérologue sont capables de jouer les mêmes rôles que l'OCP endogène, produite chez les cyanobactéries. Elles sont capables d'induire le quenching de fluorescence des phycobilisomes, caractéristique directement corrélée avec leur aptitude à quencher l'énergie d'excitation absorbée en excès au niveau des phycobilisomes. Elles sont également toutes capables d'induire le quenching de l'oxygène singulet afin de protéger l'appareil photosynthétique contre le stress photo-oxydatif.

Mise en évidence de différences insolites des OCPs recombinantes vis-à-vis de leur affinité avec les caroténoïdes et hypothèse sur le mécanisme d'entrée de celui-ci dans la protéine

Le système nous a aussi permis de montrer que les OCPs d'*Arthrospira*, d'*Anabaena* ou de *Synechocystis* ne possèdent pas les mêmes affinités vis à vis des caroténoïdes, et que pour un même caroténoïde lié, leur phénotype de photo-activité diffère. L'OCP de *Synechocystis* lie et stabilise mieux l'échinenone que la canthaxanthine. En revanche, les OCPs d'*Arthrospira* et d'*Anabaena* lient préférentiellement la canthaxanthine mais elles ont tout de même une faible affinité pour ces deux caroténoïdes. Malheureusement, les structures cristallines des OCPs d'*Arthrospira* et de *Synechocystis* ne nous permettent pas d'expliquer ces différences observées. Ces deux protéines possèdent en effet une forte homologie de leurs acides aminés formant la poche hydrophobe où le caroténoïde est logé. De plus, l'orientation du caroténoïde dans ces deux protéines est similaire (Bourcier de Carbon et al., 2015). Jusqu'à ce jour, nous ignorons la façon dont le caroténoïde rentre dans l'apo-protéine. Notre hypothèse est que l'OCP est synthétisée par les ribosomes liés à la membrane d' *E.coli* et que le caroténoïde, déjà logé dans celle-ci, est introduit lors de la synthèse du domaine N-terminal de la protéine. Or, les premiers acides aminés constituant les OCPs de *Synechocystis* et d'*Arthrospira* diffèrent, contrairement à ceux impliqués dans la poche hydrophobe où se loge le caroténoïde. Nous supposons alors que les acides aminés impliqués dans la fixation primaire du caroténoïde, lors de la synthèse précoce du domaine N-terminal de l'OCP, influencent l'affinité de liaison du caroténoïde. Cette observation expliquerait pourquoi, en modifiant la partie N-terminale de l'OCP de *Synechocystis*, nous avons réussi à obtenir un meilleur rendement en holo-OCP.

Nous avons donc, en modifiant la séquence du gène de l'OCP en position 5', pu produire de façon hétérologue, des OCPs capables de lier avec une forte affinité le caroténoïde lors de sa synthèse précoce.

Applications du système de production hétérologue pour élucider le mécanisme de photo-activation de l'OCP

La possibilité d'isoler l'OCP à partir d' *E.coli* constitue une avancée majeure pour élucider le mécanisme moléculaire de sa photo-activation. Cette production hétérologue robuste, nous a permis de purifier des OCPs mutées présentant de nouvelles caractéristiques. En effet, il nous a permis de caractériser des OCPs difficiles à obtenir lors de la surexpression de leur gène chez les cyanobactéries. Ces OCPs se révèlent instables et attachent avec peu d'efficacité le caroténoïde. Comme *E.coli* produit en grande quantité la protéine recombinante, sans discriminer sa nature et ses fonctions, même si l'OCP mutée est instable, la quantité totale obtenue permet de l'étudier.

Nous avons donc pu produire l'OCP de *Synechosystis*, délétaée de son bras N-terminal, qui forme une sorte de loquet sur le domaine C-terminal. Nous supposons qu'il était potentiellement impliqué dans l'ouverture de la protéine lors de sa photo-activation. Chez *E.coli*, la délétion du bras avec la création des mutants $\Delta 2-20$ et $\Delta 2-15$ a été réalisée. Ces deux mutants possèdent les mêmes phénotypes et lient l'echinenone. Le mutant $\Delta 2-15$ réalisé chez *Synechocystis* n'a pas été obtenu ; son ARN_m a été détecté mais la protéine n'a pas été synthétisée. Le mutant $\Delta 9-15$ réalisé chez *Synechocystis* a, lui, pu être purifié, mais en faible quantité et liant différents caroténoïdes dont la myxoxanthophylle, ce qui prouvait que cette OCP était très instable. Grâce à la production hétérologue de ces mutants chez *E.coli*, de nombreuses expériences ont pu être réalisées afin d'étayer les bonnes conditions et les plus pertinentes. Les expériences les plus probantes ont alors été reproduites chez le mutant $\Delta 9-15$ obtenu chez *Synechocystis* en faible quantité. Les mutants du bras N-terminal, obtenus chez *E.coli* ou chez *Synechocystis*, ont démontré que ce bras possède un rôle fondamental dans la photo-activation de l'OCP. Il est un élément clé, une sorte de levier régulateur, pour les deux formes de la protéine, qu'elle soit en forme inactive ou en forme active. Au sein de l'OCP inactive sans le bras, l'OCP est déjà en partie photo-activée. L'interaction du bras N-terminal avec le domaine C-terminal évite donc que l'OCP se photoactive à l'obscurité ou à faible éclairage. C'est pour cette raison que le quenching d'énergie par l'OCP ne se produit pas à faible intensité lumineuse. Au sein de la forme active de l'OCP, la position du bras N-terminal contrôle le taux de reconversion de la protéine vers sa forme inactive, et sa présence ralentit l'action de FRP, permettant un quenching d'énergie plus important dans des conditions de stress lumineux (Thurotte et al., 2015).

Nous avons aussi pu produire le domaine N-terminal de l'OCP, appelé RCP pour Red Carotenoid protein dans *E.coli*. Cette protéine est toujours sous forme active, rouge et est capable d'induire le quenching de fluorescence des phycobilisomes à l'obscurité. Son obtention dans *Synechocystis* n'a pas été possible. Cette protéine nous a permis de déterminer la structure de la forme active de l'OCP, basée sur la structure de ce domaine N-terminal toujours photo-actif. La structure a révélée que la photo-activation de l'OCP est accompagnée d'une translocation de 12 angströms de son caroténoïde et d'une reconfiguration des interactions entre la protéine et le caroténoïde. Ce travail a aussi permis d'identifier les déterminants structurels nécessaires à son interaction avec l'antenne collectrice de lumière, les phycobilisomes, pendant la photo-protection. C'est la première fois qu'un tel mécanisme de photo-activation d'une protéine à caroténoïde est mis en lumière. Le changement de la position du caroténoïde et la réorganisation de son interaction au sein de la protéine lors de sa photo-activation est une nouvelle notion pour étudier les autres protéines à pigments et leurs fonctions (Leverenz et al.,2015).

PERSPECTIVES

Obtention d'une souche stable produisant une protéine à caroténoïde

Grâce à l'optimisation du système pour obtenir le meilleur des rendements en holo-OCP, nous avons pu regrouper tous les gènes impliqués dans l'expression de l'holo-OCP sur un seul et même plasmide, qui étaient au préalable portés sur trois plasmides distincts. Six gènes et trois inductions différentes de ces gènes sont impliqués dans la production de l'OCP. Cette optimisation nous a permis d'obtenir un meilleur rendement en protéines, mais nous permet aussi d'entrevoir la construction d'une souche stable produisant la protéine anti-oxydante. En effet, posséder tous les gènes sur un seul et unique plasmide nous offre la possibilité de remplacer le système de pression antibiotique pour maintenir le plasmide dans la cellule, par un système de pression toxine/anti-toxine. Grâce à ce système de pression de sélection, l'expression des gènes nécessaires à la production de la protéine sera auto-maintenue dans la cellule. Le gène de la toxine est inséré dans le génome d'*E.coli* tandis que celui de l'anti-toxine est localisé sur le plasmide. La bactérie ne peut donc pas expulser le plasmide sinon elle s'affranchira de son antidote afin de neutraliser la toxine codée par le génome. Cette construction toxine/anti-toxine permettrait d'obtenir une souche stable permettant de produire la protéine sans ajout d'antibiotique dans le milieu de culture, qui s'avère être aussi un frein pour une production industrielle.

Obtention d'une souche produisant une protéine à caroténoïde non-étiquetée

Les industries de la santé et plus particulièrement les industries pharmaceutiques ont de plus en plus recours à la bio-production de molécules actives. La force de cette production est qu'elle permet de produire des molécules ou protéines actives à partir du vivant.

Citons pour exemples les vaccins créés à partir de souches ou protéines virales atténuées (Arthur et al., 1992; Vignuzzi et al., 2008); les anticorps monoclonaux pour aller cibler directement et traiter avec efficacité des pathologies humaines de santé publique comme le cancer, la maladie de Crohn, l'asthme, etc (Melero et al., 2007; Targan et al., 1997 ; Busse et al., 2001). L'anticorps est une protéine produite par le système immunitaire, dont son rôle est de détecter et neutraliser un agent pathogène en se fixant sur un site spécifiquement reconnu nommé antigène. Le pathogène est ensuite éliminé ou évacué par le système immunitaire. Les

anticorps sont spécialisés, en effet, ils ne se fixent que sur un type d'antigène, sur un seul motif protéique du pathogène. Les anticorps monoclonaux sont des anticorps produits à partir d'un clone de cellule, d'où le terme monoclonal. En cancérologie, ces anticorps ont la capacité de repérer et de bloquer des processus spécifiques des cellules cancéreuses afin de les neutraliser et de l'éliminer. Le nombre d'antigènes potentiels cibles est infini sur les molécules du vivant. Les anticorps monoclonaux bioproducts devraient devenir incontournables pour la thérapie ciblée du futur. Citons aussi pour exemples divers produits d'extraction cellulaire comme les enzymes ayant un mode d'action ciblé dans des processus métaboliques cellulaires. Ces exemples ont un point en commun : ce sont des molécules ou protéines actives que la chimie fine classique, par synthèse chimique ou hémisynthèse, ne peut pas produire, c'est pourquoi l'industrie a recours à la bio-production de ces molécules par l'utilisation de bactéries, levures, animaux ou végétaux transgéniques. La bio-production consiste en une phase upstream où la molécule/ protéine est produite par un organisme exogène dans un bioréacteur, puis une phase downstream pour l'isoler et la purifier.

Dans notre cas, l'OCP a toujours été isolée au sein du laboratoire avec des volumes n'excédant pas cinq litres de culture. Le système de production hétérologue de l'OCP est donc robuste dans nos conditions au sein du laboratoire, où il a été développé. Je suis consciente qu'il va falloir étudier si, lors de l'upstream du système, il sera toujours fiable. Il faudra certainement réajuster les conditions de culture et d'induction des gènes au sein du système avec ce scale-up dans des bioréacteurs à volume important, pouvant dépasser plusieurs centaines de litres. Au sein de notre système d'expression hétérologue, l'OCP bio-produite par *E.coli* possède une étiquette 6-Histidines en position N- ou C-terminale. Notre phase downstream est une « immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) » avec la purification de l'OCP sur colonne de nickel. L'étiquette histidine est largement utilisée car elle est petite (six acides aminés histidines) et interfère rarement avec la fonction, l'activité ou la structure de la protéine. La purification avec un His-Tag offre un rendement en protéines pures et actives, élevé.

Or, dans le cadre de la réglementation des protéines recombinantes en santé humaine et en cosmétique, il ne saurait être question d'utiliser des molécules recombinantes qui ne soient pas identiques aux molécules d'origine. Il ne faut donc pas que l'OCP recombinante bio-produite possède une étiquette 6-Histidines ou autres en position N- ou C- terminale. Sans aucune étiquette, le procédé de purification d'une protéine soluble, exprimée dans le cytoplasme cellulaire est long et couteux. En effet, ces protéines exigent un protocole de purification multi-étapes afin d'obtenir une pureté suffisante. Pour purifier l'OCP de façon

rapide, il y a un autre moyen que de s'affranchir totalement d'une étiquette. En effet, en prévoyant d'introduire une séquence de clivage spécifique reconnue par une enzyme protéase, comme la séquence reconnue par la thrombine ou la trypsine, entre l'étiquette (ex : 6-Histidines) et la séquence de la protéine, cela permettrait de purifier la protéine avec l'étiquette (ex : sur colonne de nickel), puis d'éliminer l'étiquette suite à la purification avec l'action de l'enzyme protéase. Toutefois l'action d'une enzyme protéase n'est jamais efficace à 100% et des molécules étiquetées, même en faible quantité seront présentes dans la préparation. Il faudra donc ajouter une étape de purification supplémentaire, comme par exemple, une seconde purification sur colonne de nickel, pour absorber/ retenir les contaminants encore étiquetés.

Application du système d'expression hétérologue pour produire d'autres protéines à caroténoïdes comme antioxydants

La production de molécules et de protéines antioxydantes est un sujet d'intérêt considérable pour les biologistes qui étudie le phénomène de stress oxydant, impliqué dans de nombreux processus conduisant à des lésions cellulaires parfois irréversibles. Mon travail a permis de démontrer qu'il était possible d'obtenir une protéine à caroténoïde de façon hétérologue ayant une excellente activité de quencher d'oxygène singulet. Ce travail ouvre la voie de la production à d'autres protéines solubles à caroténoïdes qui ont également d'excellentes propriétés antioxydantes comme la protéine liant l'astaxanthine, l'AstaP (Kawasaki et al., 2013), qui pourraient aussi être valorisées dans l'industrie de la santé. La possibilité de réaliser de l'ingénierie des bactéries non-photosynthétiques et non-caroténogènes pour leur faire produire des protéines solubles à caroténoïdes, comme l'OCP, qui sont présentes à de faibles concentrations dans les organismes endogènes, constitue une avancée majeure pour se procurer de grandes quantités de molécules à caroténoïdes comme antioxydants pour favoriser la santé humaine.

Biologie synthétique - Utilisation de l'OCP bio-produite par *Escherichia coli* pour la production de biocarburants

La biologie synthétique implique une ingénierie de la biologie. Son but est de concevoir de nouveaux systèmes biologiques optimisés. La biologie de synthèse pourrait générer des thérapies plus efficaces, des biocarburants, des bactéries capables de dégrader des substances toxiques et dangereuses pour l'environnement et de créer de nouveaux matériaux recyclables peu polluants. La dynamique de la biologie de synthèse est fondée sur la bio-production hétérologue, le génie génétique et la chimie des matériaux avec pour objectif de diminuer l'impact de l'humain sur l'environnement et par la même occasion, d'améliorer sa santé. C'est un domaine en pleine émergence qui va faire progresser les connaissances du monde du vivant et permettra de développer de nombreuses applications industrielles dans les domaines de la santé, de l'énergie, des matériaux, de l'environnement et de l'agriculture. Depuis quelques années, cette biologie synthétique pousse certains biologistes et biophysiciens à créer des organismes simplifiés pour produire des biocarburants. Pour ce faire, ils sont en cours de générer des entités biologiques minimales avec de nouveaux centres réactionnels photosynthétiques contenant le minimum de composants nécessaires pour transporter les électrons. Des protéines d'antenne sont fonctionnalisées et attachées à ces centres en cours de génération, pour élargir la gamme spectrale d'absorption de la lumière afin d'optimiser au maximum ces entités bio-construites (Johnson and Schmidt-Dannert, 2008 ; Claassens et al., 2013; Farid et al., 2013 ; Ross Anderson et al., 2014).

L'OCP recombinante pourrait être utilisée pour photo-protéger ces entités minimales photosynthétiques pour générer des biocarburants en utilisant la lumière solaire comme source d'énergie. Etant un excellent quencher d'énergie d'excitation et d'oxygène singulet, l'OCP est un futur excellent candidat pour cette fonction (Wilson et al., 2006 ; Sedoud et al., 2014 et Bourcier de Carbon et al., 2015). Elle pourrait réguler l'énergie d'excitation arrivant au niveau des centres réactionnels de ces organismes simplifiés et quencher l'oxygène singulet formé par les réactions secondaires inévitables sous de fortes illuminations.

Matériels & Méthodes

Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique a été extrait selon la méthode initialement décrite par Cai et Wolk (Cai et Wolk 1990). Les cellules de *Synechocystis* poussées sur boîte ont été resuspendues dans 200µl de tampon Tris-HCl 50mM pH 8, 0.1M EDTA. 50 à 100µl de billes de verre (Invitrogen), 20µl de SDS à 10% et 200µl de phénol pH 6.9 (Sigma) ont été ajoutés et les cellules ont été cassées en vortexant pendant 1 minute. Afin d'ôter les cellules non cassées, le mélange a été centrifugé 2min/10000xg /4°C. La phase aqueuse contenant l'ADN a été prélevée puis 200µl de phénol : chloroforme : alcool isoamyle (25 : 24 : 1, Sigma) y ont été ajoutés et, après agitation, le mélange a été centrifugé 2min/10000xg/4°C. Afin d'ôter les traces de phénol de la phase aqueuse, cette opération a été répétée une deuxième fois. L'ADN génomique a ensuite été précipité en ajoutant 0.7 volume d'isopropanol à la solution aqueuse obtenue, le mélange a été agité, puis centrifugé 20min/10000xg/4°C. Le culot contenant l'ADN génomique a été rincé avec 200µl d'éthanol 70% glacé et re-centrifugé 15min/10000xg/4°C. Et pour finir le culot a été séché 30 minutes à 37°C et l'ADN génomique resuspendu dans 50µl d'eau distillée. La qualité de l'ADN obtenu a été vérifiée en faisant migrer 2µl dilué au 50^{ème} sur un gel d'agarose 1%.

Constructions pour reconstituer la voie de biosynthèse dans *E.coli*

La reconstitution de la voie de biosynthèse des caroténoïdes dans *E.coli*, pour arriver jusqu'à la synthèse du caroténoïde lié par l'OCP, nécessite 5 gènes codant pour 5 enzymes distinctes. Les plasmides pAC-BETA (Cunningham et al., 1996) et pACCAR16ΔcrtX (Misawa et al., 1995) contiennent l'opéron de gènes *Crt* : *crtB*, *crtE*, *crtI* et *crtY* sous le contrôle du promoteur constitutif du gène *crtE* de *Erwinia herbicola* et *Erwinia uredovora* respectivement. L'origine de répllication est p15A, le gène de résistance est le chloramphénicol (Cm). Toutes les constructions obtenues avec le système d'expression 3 plasmides ont été réalisées avec le plasmide pAC-BETA. Toutes les constructions obtenues avec les systèmes d'expression 2 ou 1 plasmide(s) ont été réalisées avec l'opéron de gènes *Crt* du plasmide pACCAR16ΔcrtX.

Les séquences correspondant aux cadres ouverts de lecture des gènes *crtO*, *crtW* et *crtR* ont été clonées dans le plasmide pBAD sous le contrôle du promoteur *araBad*. Dans toutes ces constructions, la séquence Shine Dalgarno est apportée par le plasmide pBAD. Les gènes *crtO* et *crtW* ont été clonés dans un plasmide pBAD/gIIIa (Invitrogen, Figure 44) qui a été modifié au préalable pour créer le plasmide pBAD. Ce plasmide contient l'origine de

replication pBR322, son promoteur est inductible par l'arabinose (araBAD) et son gène de résistance est l'ampicilline. Le plasmide pBAD/gIII A a d'abord été modifié pour abolir l'exportation de la protéine recombinante dans l'espace périplasmique des cellules. La région codant le "gene III signal sequence" a été supprimée par PCR mutagénèse (Figure 30- Résultats Chapitre I). Les oligonucléotides utilisés étaient pBAD/gIII A mut (F et R) (Figure 32- Résultats Chapitre I et Sup Fig 7- Résultats Chapitre II). Le plasmide modifié pBAD/gIII A a été nommé pBAD. Le plasmide pBAD a été digéré avec les enzymes de restriction *BglII* et *EcoRI* pour cloner le gène *crtO* (*slr0088*) de *Synechocystis* PCC 6803 ou avec les enzymes de restriction *NcoI* et *EcoRI* pour cloner le gène *crtW* (*alr3189*) de *Anabaena* PCC 7120. Les oligonucléotides CrtO (F et R) et CrtW (F et R) ont été utilisées pour amplifier les gènes *crtO* et *crtW* respectivement (Figure 32- Résultats Chapitre I et Sup Fig 7- Résultats Chapitre II). Les plasmides résultants ont été nommés pBAD-CrtO et pBAD-CrtW.

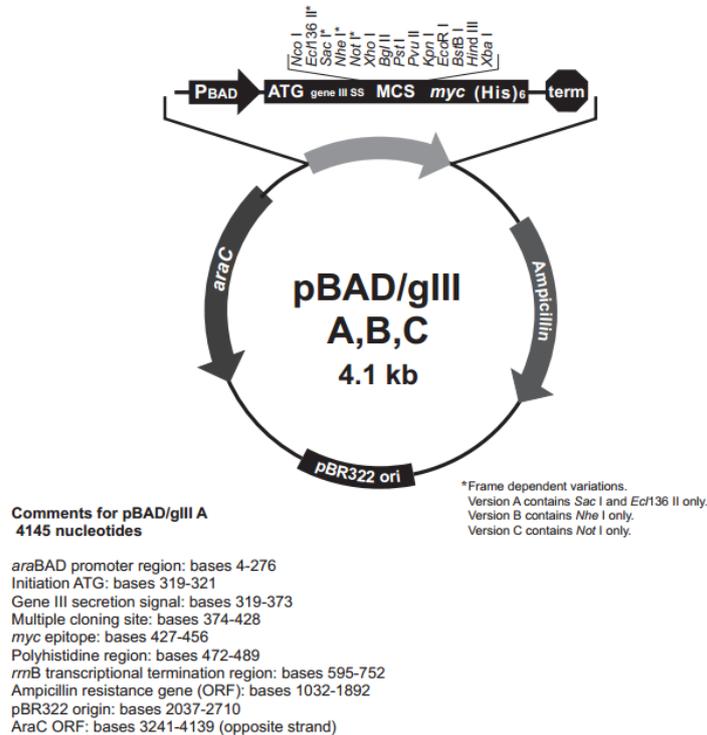


Figure 44

Schéma représentatif du plasmide pBAD/gIII A

Plasmide utilisé pour le clonage des gènes *Crt* (kétolases et hydroxylase)

Le plasmide pBAD/gIII A possède l'origine de répliquée dérivée de pBR322, le promoteur inductible à l'arabinose (*araBAD*), le gène de résistance à l'ampicilline et un site de clonage multiple avec de nombreux sites de restriction. Il a été utilisé pour cloner les gènes codant les enzymes impliquées dans la conversion du β -carotène. Au préalable, la "séquence de signal du gène III" a été supprimée par PCR mutagénèse afin d'abolir l'exportation des protéines recombinantes exprimées dans l'espace périplasmique cellulaire. Trois gènes codant pour des enzymes impliquées dans la conversion du β -carotène ont été clonés dans le plasmide pBAD: *crtO* (échinonone), *crtW* (canthaxanthine) et *CrtR* (zéaxanthine). Le plasmide a été digéré avec les enzymes de restriction *Bgl*III et *Eco*RI pour cloner le gène *crtO* de *Synechocystis* PCC 6803 ; avec *Nco*I et *Eco*RI pour cloner le gène *crtW* d'*Anabaena* PCC 7120 ; ou avec *Nco*I et *Xho*I pour cloner le gène *crtR* de *Synechocystis* PCC 6803.

Séquences des gènes codant les enzymes CrtO, CrtR et CrtW

Séquence, en nucléotides, du gène *crtO* de *Synechocystis* PCC 6803, *slr0088* (1629 nucléotides), cloné dans le plasmide pBAD (en gras)

**ATGATCACCACCGATGTTGTCATTATTGGGGCGGGGCACAATGGCTTAGTCTGTGCAGCCTATTTGCTC
CAACGGGGCTTGGGGGTGACGTTACTAGAAAAGCGGGAAGTACCAGGGGGGGCGGCCACCACAGAAGC
TCTCATGCCGGAGCTATCCCCCAGTTTCGCTTTAACCGCTGTGCCATTGACCACGAATTTATCTTTC
TGGGGCCGGTGTTCAGGAGCTAAATTTAGCCCAGTATGGTTTGGGAATATTTATTTTGTGACCCCAGT
GTTTTTTGTCCGGGGCTGGATGGCCAAGCTTTTATGAGCTACCGTTCCCTAGAAAAAACCTGTGCCCA
CATTGCCACCTATAGCCCCGAGATGCGGAAAAATATCGGCAATTTGTCAATTATTGGACGGATTTGC
TCAACGCTGTCCAGCCTGCTTTTAATGCTCCGCCCCAGGCTTTACTAGATTTAGCCCTGAACATATGGT
TGGGAAAACCTTAAAATCCGTGCTGGCGATCGCCGGGTGCGAAAACCAAGGCGTTGGATTTTATCCGCAC
TATGATCGGCTCCCCGGAAGATGTGCTCAATGAATGGTTTCGACAGCGAACGGGTTAAAGCTCCTTTAG
CTAGACTATGTTTCGGAAATTGGCGCTCCCCATCCCAAAGGGTAGTAGCTCCGGCATGATGATGGTG
GCCATGCGGCATTTGGAGGGAATTGCCAGACCAAAGGAGGCACCTGGAGCCCTCACAGAAGCCTTGGT
GAAGTTAGTGCAAGCCCAAGGGGAAAAATCCTCACTGACCAAACCGTCAAACGGGTATTGGTGGAAA
ACAACCAGGCGATCGGGGTGGAGGTAGCTAACGGAGAACAGTACCGGGCCAAAAAGGCGTGATTTCT
AACATCGATGCCCGCGTTTATTTTTGCAATTGGTGGAAACCGGGGGCCCTAGCCAAGGTGAATCAAAA
CCTAGGGGAACGACTGGAACGGCGCACTGTGAACAATAACGAAGCCATTTTAAAAATCGATTGTGCC
TCTCCGGTTTACCCCACTTCACTGCCATGGCCGGGCGGAGGATCTAACGGGAACATTTTTGATTGCC
GACTCGGTACGCCATGTTCGAGGAAGCCACGCCCTCATTGCCCTGGGGCAAATTCCTCGATGCTAATCC
GTCTTTATATTTGGATATTCCCACTGTATTGGACCCACCATGGCCCCCTGGGCAGCACACCCTCT
GGATCGAATTTTTTGGCCCCCTACCGCATCGCCGGGTGGAAAGGACAGGGTTAATGGGCACAGGTTGG
ACCGATGAGTTAAAGGAAAAAGTGGCGGATCGGGTGATTGATAAATTAACGGACTATGCCCTAACCT
AAAATCTCTGATCATTTGGTCGCCGAGTGGAAAAGTCCCGCCGAACCTGGCCCAACGGCTGGGAAGTTACA
ACGGCAATGTCTATCATCTGGATATGAGTTTGGACCAAATGATGTTTCTCCGGCCTCTACCGGAAATT
GCCAACTACCAAACCCCATCAAAAATCTTTACTTAAACAGGGGCGGGTACCCATCCCGGTGGCTCCAT
ATCAGGTATGCCCGGTAGAAATTGCGCTCGGGTCTTTTTTAAAACAACAACGTCGTTTTTTGGTAA**

Séquence, en nucléotides, du gène *crtR* de *Synechocystis* PCC 6803, *sll1468* (939 nucléotides), cloné dans le plasmide pBAD (en gras)

**GTGTGCCAGGAGTCCGTCATAGTAATGCAGGCGACCCAACCGCTGCAAACCGTTTCCCAAGCTGTCCC
AAAAGAGTTTTTACAGGCGGACGGCGGCTTCAATCCCAACGTGGCCATGTTCCGGGATAGCTATTCTCT
TAATGCTCGCTAACGTTTTTGGCTACTGGCAATGGGGGCTGCCCACTGGCTTTGTTTTAGTTGTTCCG
GTGCTGGCGCTGCACCTGTCAGGCACAGTGATCCATGATGCATCCACAATGCGGCCCATCGGAACAC
CATTATTAATGCAGTGCTTGGCCACGGTAGTGCTTAATGTTGGGCTTTGCTTTTCCCGTCTTTACCC
GGGTTCACTCCAACACCACGCCAACGTCAATGACCCTGAAAATGACCCAGACCATTTTGTTCACC
GGCGGTCCCCTCTTCTCATTGCCGCCGGTCTTCTACCATGAGATCTTTTCTTTAAACGGCGGTT
ATGGCGCAAATATGAGCTACTAGAGTGGTTCTTAAGTCGGCTTGTGTTGTTACGATCGTTTTTCTCG
GCATTCATTACGGCTTTATCGGCTTTGTGATGAATTACTGGTTTGTGCCTGCTTTAATTGTTGGCATT
GCCCTGGGACTGTTTTTTGATTACCTGCCCATCGACCTTTCCAAGAACGCAACCGTTGGAAAAATGC
CAGGGTTTATCCCAGCCCCATTTTAAATTGGCTCATTTTTCGGGCAAATTAACCACCTGATCCACCACC
TTTGGCCTTCTATTCTTGGTATCAGTACAAAACACCTATCACATACCAAGCCATTTTGGATGAG
AAGGGTTGTGATCAATCCCTGGGATTAAGGAAAGGAAAAATTTCTGGAGCTTCTCTATGATGTTTT
CCTTGGTATTGTTTTTACGGCCATAATAATCTCAATCATCTGACAAGCCCTAGCTAGGTTGTTTTG
TTTCCAGAGCTAGAGTTTGGGTGAAAATCGGGTAAGTAATTG**

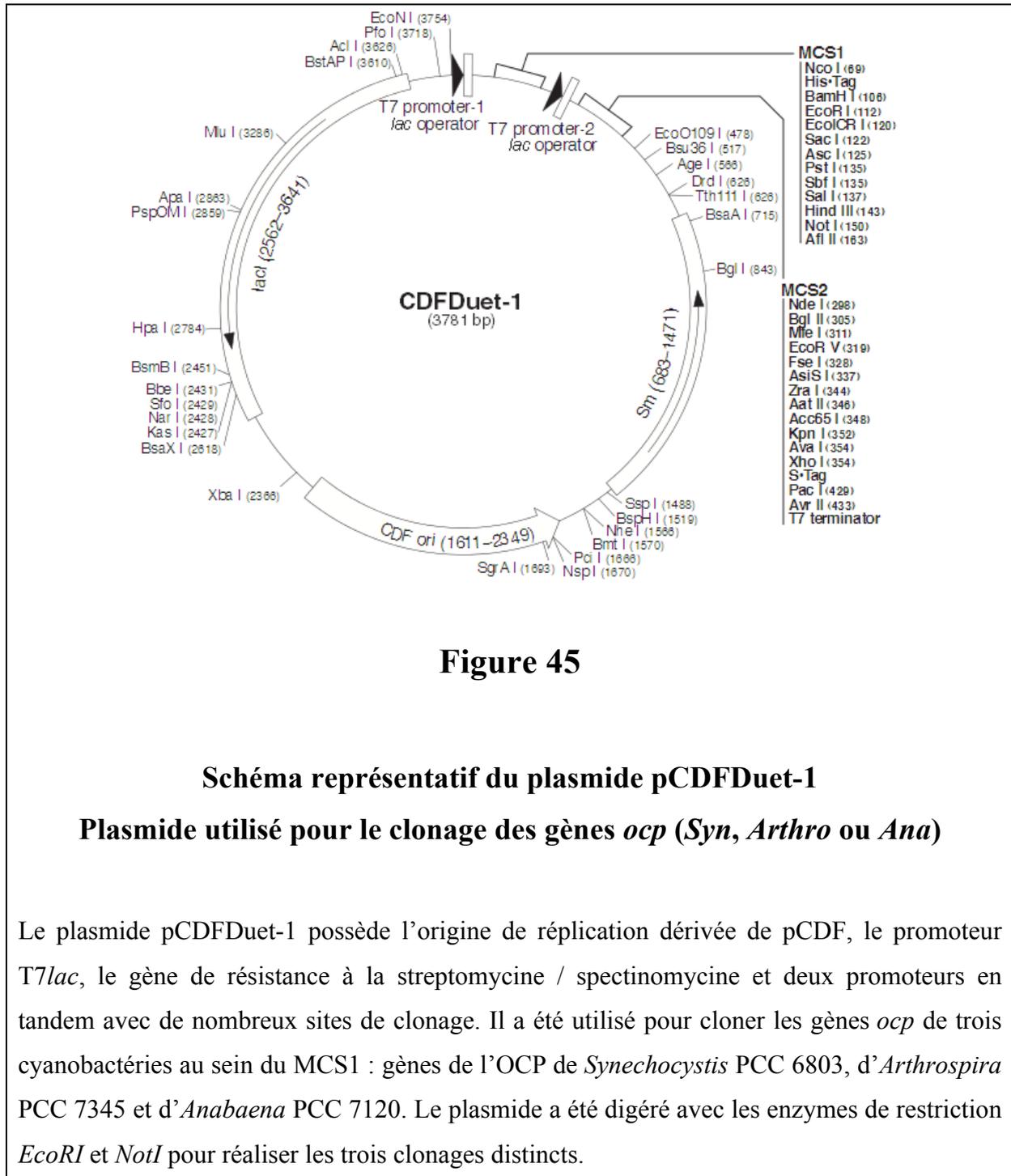
Séquence, en nucléotides, du gène *crtW* d'*Anabaena* PCC 7120, *alr3189* (777 nucléotides), cloné dans le plasmide pBAD (en gras)

**ATGGTTCAGTGTCAACCATCATCTCTGCATTCAGAAAACTGGTGTTATTGTCATCGACAATCAGAGAT
GATAAAATATTAATAAGGGTATATTTATTGCCTGCTTTATCTTATTTTTATGGGCAATTAGTTTAAT
CTTATTACTCTCAATAGATACATCCATAATTCATAAGAGCTTATTAGGTATAGCCATGCTTTGGCAGA
CCTTCTTATATACAGGTTTATTTATTACTGCTCATGATGCCATGCACGGCGTAGTTTATCCAAAAAT
CCCAGAATAAATAATTTTATAGGTAAGCTCACTCTAATCTTGTATGGACTACTCCCTTATAAAGATTT
ATTGAAAAACATTGGTTACACCACGGACATCCTGGTACTGATTTAGACCCCTGATTATTACAATGGTC
ATCCCCAAAACCTTCTTTCTTTGGTATCTACATTTTATGAAGTCTTATTGGCGATGGACGCAAATTTTC
GGATTAGTGATGATTTTTTCATGGACTTAAAAATCTGGTGCATATACCAGAAAATAATTTAATTATATT
TTGGATGATACCTTCTATTTTAAGTTCAGTACAACATTTTTATTTTGGTACATTTTTGCCTCATAAAA
AGCTAGAAGGTGGTTATACTAACCCCATTTGTGCGCGCAGTATCCATTACCTTTTTTTGGTCTTTT
GTTACTTGTTATCACTTCGGCTACCACAAGGAACATCACGAATACCCTCAACTTCCTTGGTGGAATT
ACCTGAAGCTCACAAAATATCTTTATAA**

Constructions pour exprimer les gènes *ocp* dans *E.coli*

Les séquences correspondant aux cadres ouverts de lecture des gènes *ocp* ont été clonées dans le plasmide pCDFDuet-1 sous le contrôle du promoteur *T7lac*. Dans toutes ces constructions, la séquence Shine Dalgarno est apportée par le plasmide pCDFDuet-1.

Les gènes *ocp* ont été clonés dans le plasmide pCDFDuet-1 (Novagen, Figure 45). Les séquences des oligonucléotides utilisées dans l'amplification et les modifications de toutes les séquences des gènes *ocp* sont décrites dans la Table Sup Fig 7 – Résultats Chapitre II.



N-terminal HisTag OCP

Le plasmide pCDFduet-1 (Figure 45) a été digéré avec *EcoRI* et *NotI* pour le clonage des différents gènes *ocp* (*slr1963* de *Synechosystis* PCC 6803, *NIES39_N00720* d'*Arthrospira platensis* PCC 7345 et *all3149* d'*Anabaena* PCC 7120). Les oligonucléotides OCPSyn-pDuet (F et R) ont été utilisés pour amplifier le gène *ocp* de *Synechocystis* (1104 nucléotides) en utilisant l'ADN génomique de *Synechocystis* PCC 6803 comme matrice. Les oligonucléotides OCPAna-pDuet (F et R) ont été utilisés pour amplifier le gène *ocp* d'*Anabaena* (1076 nucleotides) en utilisant l'ADN génomique de *Anabaena* PCC 7120 comme matrice. Les oligonucléotides OCPArthro-pDuet (F et R) ont été utilisés pour amplifier le gène *ocp* d'*Arthrospira* (1355 nucléotides) en utilisant le plasmide pOF7345 comme matrice (D Jallet et al., 2014). Les produits de PCR résultants ont été introduits dans pCDFDuet-1 pour créer les plasmides pCDF-OCPSyn-pDuet, pCDF-OCPArthro-pDuet et pCDF-OCPAna-pDuet. Au sein de la protéine OCP isolée à partir des souches *E.coli* portant ces plasmides, une extension de 15 acides aminés est présente dans l'extrémité N-terminale de la protéine. Cette extension contient un marqueur His-Tag comprenant 6 résidus histidines (His).

Séquences des gènes codant les OCPs

Séquence, en nucléotides, du gène *ocp* de *Synechocystis* PCC 6803 : *slr1963* (1102 nucléotides), cloné dans le plasmide pCDFDuet-1 (en gras)

```
ATGCCATTACCACTTGACTCTGCCCGCGGAATTTTCCCTAACACCCTAGCGGCCGACGTTGTACCCGCT
ACCATCGCCCGTTTTAGCCAACCTCAATGCCGAAGATCAATTAGCTCTGATTTGGTTTGCTTACCTAGA
AATGGGTAAAACCCCTTACGATCGCCGCCCTGGGGCCGCCAGCATGCAACTGGCCGAAAATGCCCTCA
AGGAAATTCAAGCCATGGGGCCCC'TCCAACAAACCAGGCCATGTGTGACTTGGCCAACCGAGCTGAC
ACTCCCCTGTGCCGCACCTACGCCAGTTGGTCCCCAACATTAACCTTGGCTTCTGGTACCGTTTTAGG
CGAACTGATGGAGCAGGGCTTTGTGCCCCCATTCGCTGGTTACCAACTTTCTGCCAATGCCAATG
CAGTGCTAGCTACGATCCAAGGCC'TAGAATCCGGTCAACAAATTACCGTATTGCGTAATGCCGTGGTG
GACATGGGCTTCACCGCTGGTAAGGACGGCAAACGCATCGCTGAGCCGTAAGTTCTCCCAAGATAC
CGCCAGCCGCACCAAAGTTTTCCATTGAAGGGGTGACCAATGCCACTGTCTCAACTACATGGACAACC
TCAATGCCAATGACTTCGACACCTTAATCGAATTGTTACCTCCGACGGTGCCCTCCAACCGCCCTTC
CAACGGCCCATTTGTCGGTAAAGAAAATGTGCTCCGCTTTTTCCGGGAAGAGTGCCAAAACCTGAAATT
GATCCCGGAACGGGGGGTTACTGAACCCGCTGAAGATGGTTTACCCAAATTAAGTTACCGGTAAGG
TGCAAACCCCTTGGTTTGGTGGCAACGTGGGCATGAATATCGCCTGGCGCTTCTCCTCAACCCCGAG
GGCAAATTTTCTTTGTGGCGATCGACCTCCTTGCTTCCCCAAAGAATTACTCAACTTTGCTCGCTA
GAATAACTCCCTTCAGAGTTTTGTCTTTGCCATAGTCGGTCGGACAAGCAGCCAAAATACTAATAACT
GTGGGCTTCTCGTTGCAGAGCAGGCTCACTTTTTTTATTATGGTAATGATAATTACAAATCAATATCA
TAAGTTAATGTTACA
```

Séquence, en nucléotides, du gène *ocp* d'*Arthrospira* PCC 7345: *NIES39-N00720* (1349 nucléotides), cloné dans le plasmide pCDFDuet-1 (en gras)

**ATGCCATTACCACTGACTCGGCTCGTAGCATTTTTCCAGAAACCCTAGCGGCTGACGTAGTTCCGGCG
ACGATCGCTCGGTTCAAGCAGCTTAGTGCCGAAGATCAACTGGCTCTCATTGGTTTTCGTATCTGGA
AATGGGTAAAACCATCACCATTGCTGCTCCTGGGGCTGCGAATATGCAGTTGCTGAAAACACCCTAC
AGGAAATTCGGCAGATGACCCCCCTACAGCAAACCAGGCTATGTGTGACCTGGCGAACCGGACAGAT
ACTCCATTTGTCGTACCTATGCTAGTTGGTCTCCTAATATCAAGCTGGGTTTCTGGTATGAACTAGG
GCGTTTCATGGATCAAGGACTTGTGCGCCCATTCCCGAAGGCTACAAACTCTCAGCTAACGCCAACG
CTATCCTAGTGACTATTCAAGGTATTGATCCAGGTCAACAAATCACGGTGTGCGTAATTGTGTTGTT
GATATGGGGTTCGATACCAGCAAATTAGGCAGCTATCAACGGGTAGCAGAACCCTGTTGTACCTCCTCA
AGAGATGTCCCAACGGACTAAAAGTTCAAATCGAAGGTGTGACCAATTCCACAGTCCTGCAATACATGG
ACAACTTGAATGCTAACGATTTTGATAACTTAATTAGTCTGTTTGCAGAAAGATGGAGCTTTACAACCT
CCTTTCCAAAACCAATTGTTGGTAAAGAGAAATGTGCTGCGGTTCTTCCGGGAAGAATGCCAGAACCT
GAAGTTAATCCAGAACGAGGTGTTTCTGAACCGACGGAAGATGGCTATACTCAGATTAAGGTTACTG
GTAAAGTGCAAACTCCCTGGTTTGGTGGTAATGTGGGGATGAATATTGCTTGGCGCTTCTTGCTGAAC
CCAGAAAATAAGGTTTTCTTTGTGGCGATCGATTTGTTAGCATCTCCAAAGAGTTGTTGAACTTGGT
GCGCTAGAATAGAGTTACCTAGAAATTATATAGGCGAGCGTTTTCTAAGCAAAGCGCTCCCTTTTC
TGCTGGGGATAAAGTCGATTCCCCATCGATTGAATGTGGCGATCATTGTAGTGCTACGGGCAGTAAAA
AGTTACTTGAGGGTAAGTTAAGTAGGTAGGTAGGTAAAGACAGTGTTTAATATAGCATTATGAAATGA
TTTGTGAACAACCAGCGGTTTCAGATAAAATTACAACCACAGGATAGAAAGTTCATAATGATTTATCGG
ATATTTATGATGGCTATATTATGATGATTAATAGCACCTATTTATTGCCTAGATATATTCTACGGTAC
TCGCGCACTAATATCGAGCAAATATCGGCTGTGGTAATGCTCAATTAGGTAATGATAA**

Séquence, en nucléotides, du gène *ocp* d'*Anabaena* PCC 7120: *all3149* (1073 nucléotides), cloné dans le plasmide pCDFDuet-1 (en gras)

**ATGGCAATTACTATCGATTCCGCCCGTCGTATCTTCCCTAACACATTACAGGCTGATGCAGTGCCAGCG
CTGACTGCACGATTCAACCAACTCAGTGCAGAAGATCAACTGGCATGGACATGGTTTCGCTTTCTTAGA
GATGGGCAAACTATTACTGTTGCAGCGCCTGGTGCAGCTAGTATGCAGTTTGCAGGAAAGTATCCTCA
AGCAAATCAAGGAAATGACCTTTGAGGAACAACTCAGGTTATGTGCGACCTGGCAAACCACACAGAT
ACGCCATTTGCCGCACCTATGCTACTTGGTCGCCTAATATCAAGTTAGGTTTTTGGAACTCAACTGGG
AGAATGGATGGAGCAAGGTGCCGTTGCGCCAATTCCTGCTGGCTATCAGCTTTCAGCCAATGCTAATG
CAGTATTGGAAACCTGAAAAGTCTGGATCAAGGACAACAGATTACCGTCCCTCCGCAGTTCGTTGTA
GATATGGGATTTGATGCAGCTAACTAGACGGCTACACAAGAGTTGCTGAACCATTAGTTGCACCTAA
AGATATTTCCAGCGTGTTCAGTCAAGTCACTTGGAGGAATTAATAATTCCACTGTGTTGAATTACATGA
ACAACTTGAACGCCAATGACTTTGATGAACTGATCAAGTTGTTGCTGGAGGATGGAGCTTTGCAGCCT
CCCTTCCAAAGACCAATCGTTGGTAAGGATGCAATTCTGCGGTTCTTCCGTGAAGAATGCCAGAACCT
CAACTTGCTTCCAGAGCGCGGTGTGGCTGAACCCGCAGACGATGGCTATACTCAGGTGAAAGTGACAG
GTAAAGTTCAGACCCCTTGGTTTGGTGCAGCAGTAGGGATGAACATGGCTTGGCGCTTCTTGCTCAAC
CCCCAAGGTAATAATCTTCTTCGTAGCTATTGACTTGTAGCCTCTCCAAAGAACCTTTGAACTTGGT
TCGCTAAAGGAAAATAACAAAACAACTAAATAGCTGATTATCGCGGTGAGCGCTCTCTTAACGAAGGG
CGCTCAATTATTCTGAGCAAACGCAATTAATTAATACAAGTTAAGATTGAGTC**

C-terminal HisTag OCP

Pour obtenir l'OCP de *Synechocystis* taggée en C-terminal, il a d'abord fallu supprimer le site *NcoI* dans la séquence du gène *ocp* de *Synechocystis* ; la séquence codant pour l'alanine en position 73 (Ala73) a été modifiée silencieusement de GCC en GCG (codant aussi pour une alanine) en utilisant le plasmide pSK-OCPSyn-CterHisTagΔFRP (Wilson et al., 2008). Ensuite, le plasmide pCDFDuet-1 a été digéré avec *NcoI* et *NotI* pour s'affranchir de l'extension N-terminale contenant le His-Tag initialement présent dans ce plasmide. Les gènes *ocp* contenant un His-Tag en C-terminal de *Synechosystis* PCC 6803, d'*Arthrospira platensis* PCC 7345 et d'*Anabaena* PCC 7120 ont été clonés dans le plasmide pCDFDuet 1. Les oligonucléotides OCPsyn-Ctag (F et R) ont été utilisés pour amplifier le gène *ocp* déjà His-taggué en C-terminal à partir du plasmide pSK-OCPSyn-CterHisTagΔFRP-A73A (Wilson et al., 2008). Les oligonucléotides OCParthro-Ctag (F et R) ont été utilisés pour amplifier le gène *ocp* d'*Arthrospira* PCC 7345 provenant du plasmide p2A7345His (D Jallet et al., 2014). Les oligonucléotides OCPana-Ctag (F et R) ont été utilisés pour amplifier le gène *ocp* partir de l'ADN génomique de la cyanobactérie *Anabaena* PCC 7120, le His-Tag en position C-terminal a ensuite été ajouté par PCR mutagenèse. Les produits de PCR résultants ont été introduits dans le plasmide pCDFDuet-1 pour créer les plasmides pCDF-OCPSyn Ctag, pCDF-OCParthro-Ctag et pCDF-OCPana-Ctag.

Modifications des plasmides possédant les gènes des *ocp* His-Tag

Les séquences ajoutées après le codon start (ATG) du gène *ocp* de *Synechocystis* sont décrites dans la Sup Fig 2- Résultats Chapitre II. Les modifications (NC15, NC10, NC8, NC6, NC3, Mix15 et C8, Table I- Résultats Chapitre II) ont été introduites par mutagenèse dirigée, en utilisant le plasmide PCDF-OCPSyn-Ctag comme matrice. Les oligonucléotides utilisés pour créer ces nouveaux plasmides modifiés sont décrits dans la Sup Fig 7 – Résultats Chapitre II. La modification 3aaNtag (Sup Fig 2) a été créée par mutagenèse dirigée en utilisant le plasmide pCDF-OCPSyn-pDuet comme matrice et les oligonucleotides sont décrits dans la Sup Fig 7. Cette mutation entraîne la suppression d'une partie de l'extension en position N-terminale du gène *ocp*, extension présente dans le plasmide pCDF-OCPSyn-pDuet. La modification 3aaNtag a aussi été créée dans les gènes *ocp* d'*Arthrospira* et d'*Anabaena* utilisant le plasmide pCDF-OCParthro-pDuet et pCDF-OCPana-pDuet. Les oligonucléotides utilisés sont décrits dans la Sup Fig 7.

Transformation des cellules *E. coli*

La transformation est réalisée par choc thermique. Les cellules *E.coli* XL10 Golds Ultracompetentes (Stratagene) et *E.coli* BL21 (Stratagene): 25µl de cellules compétentes + 1µl de β-mercaptoéthanol ont été incubées 10 minutes dans un tube Ependorf de 1mL sur la glace. Entre 1 et 6µl de matériel plasmidique (MiniPrep de plasmide versus ligation ou produit PCR mutagénèse respectivement) y ont ensuite été ajoutés. Le mélange est réalisé très délicatement et l'ensemble a été incubé 20 minutes sur la glace. Le choc thermique a été réalisé par l'immersion du tube dans un bain-marie à 42°C pendant 1 minute. Le tube a ensuite été replacé 2 minutes sur la glace, puis son contenu a été mélangé avec 0.5mL de milieu NZY+ (LB +12.5mM MgCl₂-MgSO₄ + 40mM Glucose) et incubé 1 heure à 37°C sous agitation. Enfin, le contenu du tube est étalé sur une boîte LB Agar avec le ou les antibiotique(s) approprié(s) en fonction de la transformation réalisée (résistance(s) sur le/les plasmide(s)). Les boîtes ont été incubées une nuit à 37°C.

Les cellules *E. coli* BL21-Gold (DE3) de Agilent Technologies (F- ompT hsdS (RB - MB-) dcm + Tetr gal λ (DE3) endA Hte) ont été utilisées pour la production de l'OCP. Les cellules BL21 ont été transformées simultanément avec les trois plasmides nécessaires à la production de l'OCP: pAC-BETA, pBAD-CrtO (ou pBAD-crtW) et pCDF-OCP. Le plasmide pCDF-OCP contient soit le gène sauvage de l'OCP, soit une séquence modifiée au sein du gène de l'OCP. Les cellules *E. coli* transformées ont été cultivées en présence de trois antibiotiques (ampicilline (50 µg / ml), le chloramphenicol (17 µg / ml) et streptomycine (25 µg / ml)) pour maintenir les trois plasmides au sein de la même cellule *E.coli*.

Induction des gènes au sein de la culture, gènes portés par les trois plasmides nécessaires à la production de l'OCP dans *E.coli*.

Pour l'induction des différents gènes portés par les trois plasmides, les cellules *E.coli* transformées ont été cultivées dans du milieu TB à 37°C pendant 3-4 heures jusqu'à DO₆₀₀ = 0,6. Ensuite, on ajoute de l'arabinose (0,02%) et la culture est alors cultivée pendant une nuit à 37°C. Le matin, les cellules sont diluées avec du milieu frais en ajoutant de l'arabinose à 0,02% puis elles sont cultivées à 37°C jusqu'à DO₆₀₀=1 à 1,2. Ensuite, l'isopropyle-βD-thiogalactoside (IPTG) (0,2 mM) est ajouté et les cellules sont incubées pendant une nuit à 28°C. Le matin, les cultures sont récoltées et les échantillons cellulaires sont stockés à -80°C.

Isolement de l'OCP sur colonne de Nickel

Les cellules, une fois décongelées pour la conservation, sont resuspendues dans le tampon de lyse contenant du Tris 40mM à pH8, 10% de glycerol et 300mM de NaCl. Les cellules sont cassées à l'obscurité avec une « Presse de French ». Après cassage, les cellules sont centrifugées à 20 000 rpm pendant 30 minutes. Les membranes précipitent et forment un culot et le surnageant, contenant l'OCP soluble, est lui, chargé sur la colonne de nickel en vue de sa purification (Ni-résine Probond, Invitrogen). L'OCP est éluée avec 200mM d'Imidazol, deux lavages préalables sont utilisés pour séparer les protéines non souhaitées de l'OCP (à 15 et 60mM d'Imidazol).

Pour l'isolement des OCPs de *Synechocystis*, d'*Arthrospira* et d'*Anabaena* surexprimées dans *Synechocystis*, une pré-culture de 50ml de *Synechocystis* a été diluée chaque jour pendant deux semaines jusqu'à atteindre 30L de culture à $DO_{800} = 0,8$. Les cellules ont été précipitées et cassées à l'obscurité avec la « Presse de French ». L'OCP a été isolée à partir du surnageant en utilisant deux colonnes décrites dans (Wilson et al., 2008). L'isolement de l'OCP exprimée chez *Synechocystis* est complet au bout de trois semaines.

Calcul de la concentration en holo-OCP (OCP + caroténoïde attaché)

La concentration totale en OCP a été mesurée en utilisant la méthode de Bradford. Au moins cinq mesures Bradford indépendants de chaque OCP isolée ont été réalisées. La concentration en mg/ml obtenue par ce procédé a été convertie en concentration molaire en utilisant un poids moléculaire de 35kDa de l'OCP. La concentration en Holo-OCP a été calculée en se basant sur le fait que chaque holo-OCP lie une molécule de caroténoïde et par conséquent, les concentrations molaires des caroténoïdes et holo-OCP sont identiques. La concentration en caroténoïdes a été calculé en mg/ml grâce à l'absorbance à 496 nm des caroténoïdes et en utilisant $A^{1\%}_{1cm} = 2158$ et ensuite convertit en concentration molaire. Le rapport entre la concentration molaire de l'holo-OCP et de l'OCP totale donne le pourcentage de l'holo-protéine décrit dans la table 1- Chapitre II. Lorsque ce rapport est d'environ 1, nous avons estimé que la préparation contient 100% d'holo-protéine.

Spectres d'absorption et photoactivité cinétique de l'OCP

Les spectres d'absorption et les cinétiques de photoactivité sont mesurés avec un spectrophotomètre SPECORD S600 (Analyticjena) à 18°C. Les cinétiques de conversion de

l'OCP de sa forme inactive, orange vers sa forme active, rouge, sont réalisées avec un éclairage de $5000\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de lumière blanche, pendant 5 minutes. La reconversion de l'OCP active, rouge, vers sa forme inactive, orange, s'établit à l'obscurité pendant 20 minutes.

Mesures du quenching de la fluorescence des phycobilisomes de *Synechocystis* par l'OCP

Les phycobilisomes (PBs) de *Synechocystis* sont maintenus intègres dans du tampon phosphate 0,5 ou 0,8M. Ils sont incubés en présence d'OCP^rs en condition de forte lumière bleue-verte. Le phosphate présent dans le tampon des PBs influence la force de liaison entre l'OCP et les PBs; la liaison est plus forte à 0,8M phosphate qu'à 0,5M phosphate (Gwizdala et al., 2011). Le rapport OCP/PBs est de 40 dans toutes les expériences comme établi précédemment (Gwizdala et al., 2011 ; Wilson et al., 2012). La concentration de l'OCP pour ces expériences a été calculée à partir des spectres d'absorption des caroténoïdes puisque seule l'holo-OCP (OCP+caroténoïde) est photoactive et peut se lier au PB.

Le quenching de la fluorescence et la récupération de la fluorescence des PBs sont suivis avec un fluorimètre à modulation d'amplitude d'impulsion, fluorimètre PAM (101/102/103-PAM; Walz, Effelrich, Allemagne). Le quenching de la fluorescence est induit par $900\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de lumière bleue-verte (400-550 nm). Toutes les mesures ont été effectuées à 23°C dans un tampon 0,5M phosphate ou 0,8M phosphate. L'OCP est pré-convertie en sa forme rouge, active, après 10 minutes d'illumination préalable avec $5000\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de lumière blanche à 4°C.

Détection de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) spin trapping

La résonance paramagnétique électronique (RPE) spin trapping est appliquée pour la détection de $^1\text{O}_2$ en utilisant le TEMP₆-HCl à 100mM (2,2,6,6-tétraméthyl-4-pipéridone). Lorsque cette nitrone réagit avec $^1\text{O}_2$, elle est convertie en un radical nitroxyde stable, qui est paramagnétique et détectable par spectroscopie RPE. La production de $^1\text{O}_2$ est induite par l'illumination du bleu de méthylène à 10 μM qui est le photosensibilisateur. Les mesures ont été effectuées dans un tampon de Tris-HCl à 100mM et à pH8, en l'absence (contrôles) ou en présence de différentes concentrations d'OCPs purifiées. Les échantillons sont illuminés pendant 3 minutes avec la lumière blanche ($1000\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Les réglages RPE ont

été les suivants: hall center field=3467.270 G, microwave frequency=9,74 Ghz, power=4.450 mV and number of scans=12.

Identification des caroténoïdes liés par les OCPs par Chromatographie en Couche Mince (CCM)

Je tiens à rappeler ici que la CCM est une méthode qualitative et non quantitative. Elle permet d'identifier les caroténoïdes mais pas de les quantifier.

2 ml de cellules *E.coli* synthétisant les caroténoïdes sont récupérées dans un tube eppendorf 2ml. Les cellules sont centrifugées pendant 3 minutes à 14000 rpm. Le surnageant contenant le milieu de culture est jeté et les cellules sont re-suspendues et vortexées dans 2 ml d'eau afin de les laver, puis sont à nouveau centrifugées pendant 3 minutes à 14000 rpm. Le surnageant contenant l'eau est jeté et les cellules sont resuspendues avec 500 µl d'acétone afin de les casser et d'extraire les caroténoïdes hydrophobes. Les cellules sont laissées à agiter gentiment avec l'acétone pendant 20 minutes à température ambiante puis la mixture est centrifugée pendant 5 minutes à 14000rpm. Le surnageant contenant l'acétone et les caroténoïdes est récupéré dans un nouveau tube propre eppendorf 1.5ml.

Le surnageant acétone + caroténoïde est séché à l'air pulsé sous hotte pendant environ 10 minutes. La poudre de caroténoïdes obtenue, collée à la paroi du tube eppendorf est re-suspendue dans 50 µl de diéthyléther.

La solution dans laquelle la plaque CCM va tremper est composée de 10% acétone + 90% d'éther de pétrole.

Les caroténoïdes contenus dans les 50 µl de diéthyléther sont déposés délicatement sur la plaque CCM avec un capillaire de verre et la migration a lieu pendant environ 15 minutes.

Mesure de la teneur en caroténoïdes liés par les OCPs par Chromatographie Liquide Haute Performance et Spectrométrie de Masse (HPLS-MS) (réalisation par François Perreau, INRA Versailles)

La teneur en caroténoïdes des cellules et des OCPs isolées a été analysée par HPLC et spectrométrie de masse comme décrit chez (Punginelli et al., 2009 et Sedoud et al., 2014).

Les échantillons contenant les différentes OCPs purifiées ont été extraits avec de l'acétone à -

20°C durant 30 minutes. Après centrifugation, le surnageant a été incubé à -20°C pendant 30 minutes, puis centrifugé. Cette procédure a été répétée cinq fois. Le surnageant a été évaporé totalement, puis le culot obtenu contenant les caroténoïdes a été dissous dans du méthanol contenant 0,1% de NH₄OH puis il a été filtré. Les caroténoïdes synthétisés par les cellules de cyanobactéries ou *E.coli* ont été extraits avec du méthanol contenant du NH₄OH comme décrit (Punginelli et al., 2009). L'analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée sur des aliquots d'extraits secs, dissous dans 400 µl d'acétonitrile/eau (90:10, v:v) en utilisant l'instrument Quattro LC avec l'interface ESI «Z-spray» (Micromass, Manchester, Royaume-Uni), le logiciel MassLynx, le module de séparation Alliance 2695 (Waters, Milford, MA), et le double détecteur Waters 2487-dual UV réglé à 450 nm. La séparation a été réalisée sur deux colonnes en séries en phase inverse : 100 x 4,6 mm et 150 x 4,6 mm, Adsorbosphere HS C18 3 mm (Alltech, Templemars, France) en utilisant un gradient de 20 minutes linéaire d'acétate d'éthyle (0 à 95%) dans acétonitrile/eau/triéthylamine (9: 1: 0,01, v: v: v) à un débit de 0,5 ml/ min et à une température de 30°C. Les pigments ont été détectés avec un détecteur photodiode-array (Beckman Coulter, <http://www.beckmancoulter.com>). L'identification des pics obtenus par le détecteur est basée sur la comparaison des temps de rétention et des spectres d'absorption des standards commerciaux disponibles (Extrasynthèse <http://www.extrasynthese.com>), ou des valeurs déjà publiées (Wilson et al., 2008, 2011) ou de la littérature (Britton, 1995). La Quantification relative a été calculée comme décrit (Punginelli et al., 2009).

Représentations graphiques

L'ensemble des graphiques est réalisé avec le logiciel KaleidaGraph (Synergy Software).

Bibliographie

Alboresi, A., Dall'Osto, L., Aprile, A., Carillo, P., Roncaglia, E., Cattivelli, L., and Bassi, R. (2011). Reactive oxygen species and transcript analysis upon excess light treatment in wild-type *Arabidopsis thaliana* vs a photosensitive mutant lacking zeaxanthin and lutein. *BMC Plant Biol.* *11*, 62.

Amat, J.A., Rendón, M.A., Garrido-Fernández, J., Garrido, A., Rendón-Martos, M., and Pérez-Gálvez, A. (2010). Greater flamingos *Phoenicopterus roseus* use uropygial secretions as make-up. *Behav. Ecol. Sociobiol.* *65*, 665–673.

Aro, E.-M., Virgin, I., and Andersson, B. (1993). Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1143*, 113–134.

Arthur, L.O., Bess Jr, J.W., Sowder 2nd, R.C., Benveniste, R.E., Mann, D.L., Chermann, J.C. and Henderson, L.E. (1992). Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science*. Vol. 258, Issue 5090, pp. 1935-1938.

Asada, K. (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. 77–104.

Asada, K. (1999). THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *50*, 601–639.

Asada, K. (2006). Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiol.* *141*, 391–396.

Bailey, S., and Grossman, A. (2008). Photoprotection in Cyanobacteria: Regulation of Light Harvesting†. *Photochem. Photobiol.* *84*, 1410–1420.

Baneyx, F., and Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* *22*, 1399–1408.

Baron, M., Davies, S., Alexander, L., Snellgrove, D., and Sloman, K.A. (2008). The effect of dietary pigments on the coloration and behaviour of flame-red dwarf gourami, *Colisa lalia*. *Anim. Behav.* *75*, 1041–1051.

B Demple, and Harrison, L. (1994). Repair of Oxidative Damage to DNA: Enzymology and Biology. *Annu. Rev. Biochem.* *63*, 915–948.

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

Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., et al. (1997). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. *277*, 1453–1462.

Blokhina, O., Virolainen, E., and Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Ann. Bot.* *91*, 179–194.

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. *Biochim. Biophys. Acta* *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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 11620–11625.

Boyer, P.D. (1997). The Atp Synthase—a Splendid Molecular Machine. *Annu. Rev. Biochem.* *66*, 717–749.

Busse, W., Corren, J., Lanier, B.Q., McAlary, M., Fowler-Taylor, A., Della Cioppa, G., Van As, A., Gupta, N. (2001). Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Vol 108, Issue 2, 184–190.

Cadenas, E. (1989). Biochemistry of Oxygen Toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* *58*, 79–110.

Cardona, T. (2014). A fresh look at the evolution and diversification of photochemical reaction centers. *Photosynth. Res.* 1–24.

Cardona, T., Sedoud, A., Cox, N., and Rutherford, A.W. (2012). Charge separation in Photosystem II: A comparative and evolutionary overview. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1817*, 26–43.

Cavalier-Smith, T. (2000). Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* *5*, 174–182.

Cazzonelli, C.I. (2011). Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Funct. Plant Biol.* *38*, 833–847.

Claassens, N.J., Volpers, M., Martins dos Santos, V.A.P., Van der Oost, J., de Vos, W.M. (2013). Potential of proton-pumping rhodopsins: engineering photosystems into microorganisms. *Trends in Biotechnology*. Vol 31, Issue 11, 633–642.

Chesshyre, J.A., and Hipkiss, A.R. (1989). Low temperatures stabilize interferon α -2 against proteolysis in *Methylophilus methylotrophus* and *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *31*, 158–162.

Chiancone, E., Ceci, P., Ilari, A., Ribacchi, F., and Stefanini, S. (2004). Iron and proteins for iron storage and detoxification. *Biometals* *17*, 197–202.

Ck, S. (1995). Oxygen toxicity and antioxidants: state of the art. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* *39*, 177–196.

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. *Plant Cell* *8*, 1613–1626.

Demmig-Adams, B., and Adams, W.W. (2006). Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol.* *172*, 11–21.

Derynck, R., Roberts, A.B., Winkler, M.E., Chen, E.Y., and Goeddel, D.V. (1984). Human transforming growth factor- α : Precursor structure and expression in *E. coli*. *Cell* *38*, 287–297.

Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J., and Lithgow, T. (2006). Evolution of the Molecular Machines for Protein Import into Mitochondria. *Science* *313*, 314–318.

Dong, C., and Zhao, J. (2008). ApcD is required for state transition but not involved in blue-light induced quenching in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Chin. Sci. Bull.* *53*, 3422–3424.

Elmorjani, K., Thomas, J.-C., and Sebban, P. (1986). Phycobilisomes of wild type and pigment mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Arch. Microbiol.* *146*, 186–191.

Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J.A., Schofield, O., and Taylor, F.J.R. (2004). The Evolution of Modern Eukaryotic Phytoplankton. *Science* *305*, 354–360.

Farid, T.A., Kodali, G., Solomon, L.A., Lichtenstein, B.R., Sheehan, M.M., Fry, B.A., Bialas, C., Ennist, N.M., Siedlecki, J.A., Zhao, Z., Stetz, M.A., Valentine, K.G., Ross Anderson, J.L., Wand, A.J., Discher, B.M., Moser, C.C., and Dutton, P.L. (2013). Elementary tetrahelical protein design for diverse oxidoreductase functions. *Nature Chemical Biology* *9*, 826–833.

Fernández-González, B., Sandmann, G., and Vioque, A. (1997). A New Type of Asymmetrically Acting β -Carotene Ketolase Is Required for the Synthesis of Echinenone in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* *272*, 9728–9733.

Foyer, C.H., and Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* *133*, 21–25.

Foyer, C.H., and Noctor, G. (2008). Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxid. Redox Signal.* *11*, 861–905.

Foyer, C.H., and Noctor, G. (2011). Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiol.* *155*, 2–18.

Foyer, C.H., Lelandais, M., and Kunert, K.J. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* *92*, 696–717.

Frank, H.A., and Cogdell, R.J. (1996). Carotenoids in Photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* *63*, 257–264.

Frank, H.A., Das, S.K., Bautista, J.A., Bruce, D., Crimi, M., Croce, R., and Bassi, R. (2001). Photochemical Behavior of Xanthophylls in the Recombinant Photosystem II Antenna Complex, CP26†. *Biochemistry (Mosc.)* 40, 1220–1225.

Frear, D.S., and Swanson, H.R. (1970). Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazino) glutathione: Partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn. *Phytochemistry* 9, 2123–2132.

Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 436–442.

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. (1975). Phycobilisomes: Light-Harvesting Pigment Complexes. *BioScience* 25, 781–788.

Gantt, E., and Conti, S.F. (1966). Granules Associated with the Chloroplast Lamellae of *Porphyridium Cruentum*. *J. Cell Biol.* 29, 423–434.

Gerschman, R. (1981). Historical Introduction to the “Free Radical Theory” of Oxygen Toxicity. In *Oxygen and Living Processes*, D.L. Gilbert, ed. (Springer New York), pp. 44–46.

Gest, H. (2002). History of the word photosynthesis and evolution of its definition. *Photosynth. Res.* 73, 7–10.

Giovannoni, S.J., DeLong, E.F., Olsen, G.J., and Pace, N.R. (1988). Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* 170, 720–726.

Glazer, A.N. (1984). Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Bioenerg.* 768, 29–51.

Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., and Riggs, A.D. (1979). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *76*, 106–110.

Gopal, G.J., and Kumar, A. (2013). Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *Protein J.* *32*, 419–425.

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. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1807*, 1591–1599.

Gray, B.H., and Gantt, E. (1975). Spectral Properties of Phycobilisomes and Phycobiliproteins from the Blue-Green Alga-Nostoc Sp.*. *Photochem. Photobiol.* *21*, 121–128.

Gray, M.W., Burger, G., and Lang, B.F. (1999). Mitochondrial Evolution. *Science* *283*, 1476–1481.

Grotjohann, I., and Fromme, P. (2005). Structure of cyanobacterial Photosystem I. *Photosynth. Res.* *85*, 51–72.

Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., and Saenger, W. (2009). Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 334–342.

Gutteridge, J.M.C., and Halliwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* *15*, 129–135.

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. *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. *Biochim. Biophys. Acta* *1827*, 348–354.

Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet* *344*, 721–724.

Halliwell, B., and Foyer, C.H. (1978). Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta* *139*, 9–17.

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* *219*, 1–14.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* *166*, 557–580.

Hendrickson, L., Förster, B., Pogson, B.J., and Chow, W.S. (2005). A simple chlorophyll fluorescence parameter that correlates with the rate coefficient of photoinactivation of Photosystem II. *Photosynth. Res.* *84*, 43–49.

Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A., and Ikeuchi, M. (2001). DNA Microarray Analysis of Cyanobacterial Gene Expression during Acclimation to High Light. *Plant Cell* *13*, 793–806.

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. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1817*, 1418–1427.

Jallet, D., Thurotte, A., Leverenz, R.L., Perreau, F., Kerfeld, C.A., and Kirilovsky, D. (2013). Specificity of the cyanobacterial Orange Carotenoid Protein: Influences of OCP and phycobilisome structures. *Plant Physiol.*

Johnson, E.T., Schmidt-Dannert, C. (2008). Light-energy conversion in engineered microorganisms. *Trends in Biotechnology.* Vol 26, Issue 12, 682–689.

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.

Kane, J.F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* *6*, 494–500.

Kasting, J.F. (1993). Earth's early atmosphere. *Science* 259, 920–926.

Kawasaki, S., Mizuguchi, K., Sato, M., Kono, T., and Shimizu, H. (2013) A Novel Astaxanthin Binding Photooxidative Stress Inducible Aqueous Carotenoprotein from a Eukaryotic Microalga Isolated from Asphalt at Midsummer. *Plant & cell physiology* 54, 1027-1040.

Kay Holt, T., and Krogmann, D.W. (1981). A carotenoid-protein from cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 637, 408–414.

Kerfeld, C.A. (2004). Water-soluble carotenoid proteins of cyanobacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 430, 2–9.

Kerfeld, C.A., Sawaya, M.R., Brahmamdam, 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. *Struct. Lond. Engl.* 1993 11, 55–65.

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

Kirilovsky, D. (2014). Modulating energy arriving at photochemical reaction centers: orange carotenoid protein-related photoprotection and state transitions. *Photosynth. Res.* 1–15.

Kirilovsky, D., and Kerfeld, C.A. (2012). The orange carotenoid protein in photoprotection of photosystem II in cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 158–166.

Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D., and Rehrauer, W.M. (1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 58, 401–465.

Krawczyk, S., and Britton, G. (2001). A study of protein–carotenoid interactions in the astaxanthin-protein crustacyanin by absorption and Stark spectroscopy; evidence for the presence of three spectrally distinct species. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1544, 301–310.

Krieger-Liszkay, A. (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *J. Exp. Bot.* *56*, 337–346.

Krieger-Liszkay, A., Fufezan, C., and Trebst, A. (2008). Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynth. Res.* *98*, 551–564.

Krinsky, N.I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic. Biol. Med.* *7*, 617–635.

Kurusu, G., Zhang, H., Smith, J.L., and Cramer, W.A. (2003). Structure of the Cytochrome b6f Complex of Oxygenic Photosynthesis: Tuning the Cavity. *Science* *302*, 1009–1014.

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. *Plant Cell*.

Leverenz, R.L., Sutter, M., Wilson, A., Gupta, S., Thurotte, A., Carbon, C.B. de, 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*, 1463–1466.

Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., and Biesiadka, J. (2005). Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* *438*, 1040–1044.

MacColl, R. (1998). Cyanobacterial Phycobilisomes. *J. Struct. Biol.* *124*, 311–334.

MacColl, R. (2004). Allophycocyanin and energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1657*, 73–81.

Makino, T., Harada, H., Ikenaga, H., Matsuda, S., Takaichi, S., Shindo, K., Sandmann, G., Ogata, T., and Misawa, N. (2008). Characterization of Cyanobacterial Carotenoid Ketolase CrtW and Hydroxylase CrtR by Complementation Analysis in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* *49*, 1867–1878.

Margulis, L. (1996). Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 1071–1076.

Marsac, N.T. de, and Cohen-bazire, G. (1977). Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *74*, 1635–1639.

McCord, J.M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN). *J. Biol. Chem.* *244*, 6049–6055.

McFadden, G.I., Gilson, P.R., Hofmann, C.J., Adcock, G.J., and Maier, U.G. (1994). Evidence that an amoeba acquired a chloroplast by retaining part of an engulfed eukaryotic alga. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *91*, 3690–3694.

McGraw, K.J. (2006). *Bird Coloration: Mechanisms and measurements* (Harvard University Press).

McKenzie, G.J., and Craig, N.L. (2006). Fast, easy and efficient: site-specific insertion of transgenes into Enterobacterial chromosomes using Tn7 without need for selection of the insertion event. *BMC Microbiol.* *6*, 39.

Melero, I., Hervas-Stubbs, S., Glennie, M., Pardoll, D.M. and Chen, L. (2007). Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer.* *7*, 95–106.

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. *J. Bacteriol.* *177*, 6575–6584.

Monaghan, B.R., and Schmitt, F.O. (1932). The Effects of Carotene and of Vitamin a on the Oxidation of Linoleic Acid. *J. Biol. Chem.* *96*, 387–395.

Mujacic, M., Cooper, K.W., and Baneyx, F. (1999). Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. *Gene* *238*, 325–332.

Müller, P., Li, X.-P., and Niyogi, K.K. (2001). Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiol.* *125*, 1558–1566.

Mullineaux, C.W. (1992). Excitation energy transfer from phycobilisomes to Photosystem I in a cyanobacterium. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1100*, 285–292.

Munné-Bosch, S. (2005). The role of -tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant Physiol.* *162*, 743–748.

Nanba, O., and Satoh, K. (1987). Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *84*, 109–112.

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

Nishizaki, T., Tsuge, K., Itaya, M., Doi, N., and Yanagawa, H. (2007). Metabolic Engineering of Carotenoid Biosynthesis in *Escherichia coli* by Ordered Gene Assembly in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 1355–1361.

Niyogi, K.K. (1999). PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *50*, 333–359.

Noctor, G., and Foyer, C.H. (1998). ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *49*, 249–279.

Dall'Osto, L., Cazzaniga, S., Havaux, M., and Bassi, R. (2010). Enhanced Photoprotection by Protein-Bound vs Free Xanthophyll Pools: A Comparative Analysis of Chlorophyll b and Xanthophyll Biosynthesis Mutants. *Mol. Plant* *3*, 576–593.

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

Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., et al. (2003). Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *J. Am. Coll. Nutr.* *22*, 18–35.

Pagano, A., Cinque, G., and Bassi, R. (1998). In Vitro Reconstitution of the Recombinant Photosystem II Light-harvesting Complex CP24 and Its Spectroscopic Characterization. *J. Biol. Chem.* *273*, 17154–17165.

Plaxton, W.C., and Podestá, F.E. (2006). The Functional Organization and Control of Plant Respiration. *Crit. Rev. Plant Sci.* *25*, 159–198.

Polívka, T., and Frank, H.A. (2010). Molecular Factors Controlling Photosynthetic Light Harvesting by Carotenoids. *Acc. Chem. Res.* *43*, 1125–1134.

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 (Mosc.)* *44*, 3994–4003.

Powles, S.B. (1984). Photoinhibition of Photosynthesis Induced by Visible Light. *Annu. Rev. Plant Physiol.* *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. *Biochim. Biophys. Acta* *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 (Mosc.)* *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 Lett.* *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 Lett.* *581*, 2429–2433.

Rakhimberdieva, M.G., Vavilin, D.V., Vermaas, W.F.J., Elanskaya, I.V., and Karapetyan, N.V. (2007b). Phycobilin/chlorophyll excitation equilibration upon carotenoid-induced non-photochemical fluorescence quenching in phycobilisomes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* *1767*, 757–765.

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 Lett.* *585*, 585–589.

Rao, A.V., and Rao, L.G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* *55*, 207–216.

Ros, F., Bassi, R., and Paulsen, H. (1998). Pigment-binding properties of the recombinant photosystem II subunit CP26 reconstituted in vitro. *Eur. J. Biochem.* *253*, 653–658.

Ross Anderson, J.L., Armstrong, C.T., Kodali, G., Lichtenstein, B.R., Watkins, D.W., Mancini, J.A., Boyle, A.L., Farid, T.A., Crump, M.P., Moser, C.C., and Dutton, P.L. (2014). Constructing a man-made c-type cytochrome maquette in vivo: electron transfer, oxygen transport and conversion to a photoactive light harvesting maquette. *Chem Sci.* *5*(2): 507–514.

Rutherford, A.W., and Krieger-Liszkay, A. (2001). Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Biochem. Sci.* *26*, 648–653.

Scandalios, J.G. (1993). Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiol.* *101*, 7–12.

Schein, C.H. (1989). Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria. *Nat. Biotechnol.* *7*, 1141–1149.

Scheller, H.V., and Haldrup, A. (2005). Photoinhibition of photosystem I. *Planta* *221*, 5–8.

Schmetterer, G. (1994). Cyanobacterial Respiration. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, D.A. Bryant, ed. (Springer Netherlands), pp. 409–435.

Schmid, V.H.R., Cammarata, K.V., Bruns, B.U., and Schmidt, G.W. (1997). In vitro reconstitution of the photosystem I light-harvesting complex LHCI-730: Heterodimerization is required for antenna pigment organization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 7667–7672.

Schubert, W.-D., Klukas, O., Krauß, N., Saenger, W., Fromme, P., and Witt, H.T. (1997). Photosystem I of *Synechococcus elongatus* at 4 Å resolution: comprehensive structure analysis I. *J. Mol. Biol.* *272*, 741–769.

Scott, M., McCollum, C., Vasil'ev, S., Crozier, C., Espie, G.S., Krol, M., Huner, N.P.A., and Bruce, D. (2006). Mechanism of the down regulation of photosynthesis by blue light in the Cyanobacterium *synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry (Mosc.)* *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. *Plant Cell*.

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., and D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *J. Bacteriol.* *189*, 8746–8749.

Shaw, M.K., and Ingraham, J.L. (1967). Synthesis of Macromolecules by *Escherichia coli* near the Minimal Temperature for Growth. *J. Bacteriol.* *94*, 157–164.

Sidler, W.A. (1994). Phycobilisome and Phycobiliprotein Structures. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, D.A. Bryant, ed. (Springer Netherlands), pp. 139–216.

Sies, H. (1991). Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am. J. Med.* *91*, S31–S38.

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. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1817*, 1436–1445.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 6156–6161.

Storz, G., and Imlay, J.A. (1999). Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* *2*, 188–194.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 10022–10027.

Takaichi, S., and Mochimaru, M. (2007). Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. *Cell. Mol. Life Sci.* *64*, 2607–2619.

Targan, S.R., Stephen B. Hanauer., Sander J.H. van Deventer., Lloyd Mayer., Daniel H. Present., Tanja Braakman., Kimberly L. DeWoody., Thomas F. Schaible., and Paul J. Rutgeerts. (1997). A Short-Term Study of Chimeric Monoclonal Antibody cA2 to Tumor Necrosis Factor α for Crohn's Disease. *N Engl J Med*; 337:1029-1036.

Theissen, U., Hoffmeister, M., Grieshaber, M., and Martin, W. (2003). Single Eubacterial Origin of Eukaryotic Sulfide:Quinone Oxidoreductase, a Mitochondrial Enzyme Conserved from the Early Evolution of Eukaryotes During Anoxic and Sulfidic Times. *Mol. Biol. Evol.* 20, 1564–1574.

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

Tian, L., van Stokkum, I.H.M., Koehorst, R.B.M., Jongerius, A., Kirilovsky, D., and van Amerongen, H. (2011). Site, rate, and mechanism of photoprotective quenching in cyanobacteria. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 18304–18311.

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

Triantaphylidès, C., and Havaux, M. (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci.* 14, 219–228.

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.

Vainshtein, B.K., Melik-Adamyanyan, W.R., Barynin, V.V., Vagin, A.A., and Grebenko, A.I. (1981). Three-dimensional structure of the enzyme catalase. *Nature* 293, 411–412.

Vasina, J.A., and Baneyx, F. (1996). Recombinant protein expression at low temperatures under the transcriptional control of the major *Escherichia coli* cold shock promoter *csfA*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1444–1447.

Vasina, J.A., and Baneyx, F. (1997). Expression of Aggregation-Prone Recombinant Proteins at Low Temperatures: A Comparative Study of the *Escherichia coli* *csfA* and *tac* Promoter Systems. *Protein Expr. Purif.* 9, 211–218.

Vass, I. (2011). Role of charge recombination processes in photodamage and photoprotection of the photosystem II complex. *Physiol. Plant.* *142*, 6–16.

Vass, I. (2012). Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1817*, 209–217.

Vignuzzi, M., Wendt, E. and Andino, R. (2008). Engineering attenuated virus vaccines by controlling replication fidelity. *Nature Medecine.* *14*, 154 - 161.

Vinyard, D.J., Ananyev, G.M., and Charles Dismukes, G. (2013). Photosystem II: The Reaction Center of Oxygenic Photosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* *82*, 577–606.

Vonck, J., and Schäfer, E. (2009). Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1793*, 117–124.

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. *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. *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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *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. *J. Biol. Chem.* *285*, 18364–18375.

- 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. *Plant Cell* *24*, 1972–1983.
- Witkin, E.M.** (1976). Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* *40*, 869–907.
- Witt, H.T.** (1996). Primary reactions of oxygenic photosynthesis. *Berichte Bunsenges. Für Phys. Chem.* *100*, 1923–1942.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L.** (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *87*, 4576–4579.
- Wu, Y.P., and Krogmann, D.W.** (1997). The orange carotenoid protein of *Synechocystis* PCC 68031. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1322*, 1–7.
- Yu, D., Ellis, H.M., Lee, E.-C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Court, D.L.** (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 5978–5983.
- Zhang, H., Liu, H., Niedzwiedzki, D.M., Prado, M., Jiang, J., Gross, M.L., and Blankenship, R.E.** (2014). Molecular Mechanism of Photoactivation and Structural Location of the Cyanobacterial Orange Carotenoid Protein. *Biochemistry (Mosc.)* *53*, 13–19.
- Zouni, A., Witt, H.-T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., and Orth, P.** (2001). Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* *409*, 739–743.

Titre: Biosynthèse hétérologue de l'Orange Caroténoïde Protéine chez *Escherichia coli*

Mots clés : Cyanobactéries, photosynthèse, photoprotection, caroténoïdes, expression hétérologue, *Escherichia coli*.

Résumé : Les cyanobactéries ont développé des mécanismes de photo-protection pour se prémunir des dommages causés par un excès de lumière. L'un d'eux repose sur l'activité de l'Orange Caroténoïde Protéine (OCP), protéine soluble qui attache un kéto-caroténoïde, l'hydroxy-echinenone. Sous illumination, l'OCP se photo-convertit en forme active et interagit avec les phycobilisomes pour dissiper l'énergie collectée sous forme de chaleur. En conséquence, l'énergie d'excitation reçue par les centres réactionnels et la fluorescence du complexe photosynthétique diminuent. L'OCP a aussi la faculté de neutraliser l'oxygène singulet pour lutter contre la photo-oxydation.

J'ai développé un système d'expression hétérologue pour reconstituer la voie de biosynthèse de cette protéine dans *Escherichia coli*. Ce système permet l'obtention d'une grande quantité d'OCP liant son caroténoïde *in vivo*. Grâce à ce système robuste et rapide, les OCPs de trois cyanobactéries : *Synechocystis*, *Arthrospira* et *Anabaena* ont été produites, liant différents caroténoïdes. Toutes les OCPs recombinantes sont photo-actives et capables de quencher la fluorescence des phycobilisomes *in vitro*. Elles possèdent toutes la faculté de neutraliser l'oxygène singulet quel que soit le caroténoïde lié. Ce système d'expression hétérologue nous a permis d'élucider les déterminants structurels impliqués dans la photo-activation et la structure de la forme active de l'OCP. Il constitue une avancée fondamentale dans l'étude des protéines à caroténoïde et dans la production d'antioxydants solubles qui présentent un grand intérêt pour l'industrie de la santé.

Title: Heterologous biosynthesis of the Orange Carotenoid Protein in *Escherichia coli*

Keywords: Cyanobacteria, photosynthesis, photoprotection, carotenoids, heterologous expression, *Escherichia coli*.

Abstract: Cyanobacteria have developed some photo-protective mechanisms to protect themselves from stress caused by excess light. One of them relies on the activity of the soluble Orange Carotenoid Protein (OCP) that binds a keto-carotenoid, the hydroxyechinenone. Under illumination, the OCP gets photo-converted to an active form and can interact with phycobilisomes to dissipate the collected energy as heat. Consequently, the excitation energy arriving at the photosynthetic reaction centers and the phycobilisome fluorescence emission decrease. The OCP can also quench the singlet oxygen to fight against photo-oxidation.

I developed a heterologous expression system in which the biosynthetic pathway of the OCP is built in *Escherichia coli*. The expression system allows the production of a large amount of OCP binding its carotenoid *in vivo*. Thanks to this robust and fast expression system, OCPs from three different cyanobacteria: *Synechocystis*, *Anabaena* and *Arthrospira* were produced, binding different carotenoids. All recombinant OCPs are photoactive and able to induce a large phycobilisome fluorescence quenching. Moreover, they all have the ability to quench the singlet oxygen, whatever the bound carotenoid. This heterologous expression system allowed us to elucidate the structural determinants involved in the photo-activation and structure of the active form of the OCP. This work represents a fundamental advance in the study of caroteno-proteins and in the production of others soluble antioxidants that are of great interest to the health industry.

Université Paris-Saclay

Espace Technologique / Immeuble Discovery

Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France