

## Proposition de stage

### Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

#### 1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé : I2BC/B3S/MROP

Adresse : I2BC, CEA Saclay, Bât 532

Responsable du Laboratoire: Thierry Meinel ; Responsable de l'équipe : Diana Kirilovsky

Responsable de l'encadrement : Diana Kirilovsky

Téléphone : 0169089571

E-mail : diana.kirilovsky@cea.fr

Co-encadrant éventuel : Adjélé Wilson

#### 2. Description du stage (2 pages maximum) :

##### Titre :

**L'Orange Carotenoid Protein, une protéine modulaire et photoactive chez les cyanobactéries**

##### Mots clés :

**Cyanobacteria, photoprotection, photorecepteur, photoactivation, carotenoid**

##### Contexte et objectifs généraux :

La lumière est essentielle aux organismes photosynthétiques, qui, tout en produisant de l'oxygène, convertissent l'énergie solaire en énergie chimique lors de la synthèse de molécules carbonées organiques. Cependant la lumière devient nocive lorsque l'excitation atteignant les centres réactionnels photosynthétiques excède les capacités de l'organisme à utiliser cette énergie par différents processus cellulaires. Pour répondre aux différents stress, les plantes, algues et cyanobactéries ont développé des mécanismes de réponse rapide qui utilisent les machineries enzymatique et photosynthétique existantes. Ces réponses visent à équilibrer les quantités d'énergie absorbée et utilisée et à diminuer la formation des ROS. Un de ces mécanismes est la dissipation de l'énergie d'excitation au niveau d'antennes collectrices de lumière. Chez les cyanobactéries, le détecteur du stress et le déclencheur du mécanisme de défense est une protéine pigmentée soluble (« Orange Carotenoid Protein » OCP). **L'OCP, fait partie d'une nouvelle famille des photorécepteurs, éléments essentiels pour détecter les changements environnementaux afin de s'y adapter rapidement.** L'absorption d'une lumière bleu-vert induit des changements conformationnels dans le caroténoïde et dans la protéine transformant la forme inactive (orange) en une forme active (rouge). L'OCP est composée par deux domaines (NTD et CTD) qu'ont des fortes interactions dans sa forme orange inactive. Les domaines sont reliés par un « loop » et le caroténoïde traverse les deux domaines. Les interactions entre les domaines sont rompues pendant la photoactivation et la protéine active adopte une conformation ouverte. Ils existent trois familles d'OCP dans lesquelles l'interaction entre les domaines est différente. Ces caractéristiques permettent d'envisager l'utilisation de l'OCP et des nouvelles OCPs pour le développement de nouveaux photoswitches pour utiliser en optogénétique (activation des enzymes par la lumière) ou visant à réguler la captation de lumière dans les systèmes

photosynthétiques artificiels. Un prérequis est cependant de comprendre le mécanisme de photoactivation de l'OCP et des interactions entre les domaines. **L'objectif de nos recherches est de d'élucider le mécanisme photoactivation de l'OCP et des construire par biologie synthétique des nouvelles OCPs photoactives.** Nos études sont également importantes pour d'autres applications biotechnologiques dans la mesure où plantes et cyanobactéries sont au centre de nombreux programmes de bioénergie. Nos études aideront à la détermination des meilleures espèces et des meilleures conditions pour cette production.

### Projet de stage :

Notre équipe collabore avec une équipe de structuralistes (Jean-Jacques Colletier, CEA Grenoble) et une équipe de spectroscopistes (Michel Sliwa, Université de Lille) pour pouvoir élucider les différentes étapes du photocycle de l'OCP. Dans ce projet notre équipe a comme mission de créer des OCPs avec a meilleur rendement de photoactivation et une récupération rapide. Ces caractéristiques sont importantes aussi bien pour l'élucidation des étapes de photoactivation que pour l'utilisation de l'OCP pour l'activation (désactivation) par la lumière d'autres enzymes. Et aussi comme une efficace régulatrice de la captation de la lumière par les antennes.

Nous avons récemment développé un système à 3 ou 2 plasmides pour synthétiser d'holo-OCPs (protéine+ caroténoïde) chez *E coli*. L'étudiant utilisera ce système pour produire les OCPs mutées. L'étudiant construira premièrement des OCP mutants par mutagenèse dirigé. La structure tridimensionnelle de l'OCP est connue. De plus, des manip SAXS, WAXS, X-ray and X-FEL ont été réalisés par le groupe de Grenoble en 2019 et basées sur toutes ses expériences nous avons des hypothèses pour les aminoacides à changer. L'étudiant cherchera aussi de mutants « figés » dans une étape intermédiaire de la photoactivation.

Les protéines seront isolées et leur photoactivité et récupération seront testées. Les relations entre CTD et NTD seront étudiés ainsi que l'incorporation du caroténoïde. Des OCP-like pourront être créé. Les OCPs mutées et les OCP-like vont être étudiés aussi dans les deux autres laboratoires.

L'étudiant fera des expériences en biologie moléculaire, biochimie et biophysique. Elle/Il travaillera avec une jeune chercheuse et une post-doc dans ce sujet.

### Les objectifs de ce stage M2 sont :

- Créer d'OCPs avec un fort rendement de photoactivation et une récupération rapide.
- Etudier les étapes de la photoactivation et la récupération.

### Bibliographie :

#### Sélection d'autres publications de l'équipe sur le sujet:

**Kirilovsky D** and Kerfeld CAK (2016) Cyanobacterial photoprotection by the orange carotenoid protein. **Nature Plants**, vol 2, 2 december 2016, doi: 10.1038/NPLANTS.2016.180

Wilson A, Ajlani G, Verbavatz J-M, Vass I, Kerfeld C and **Kirilovsky D** (2006)

A soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related thermal energy dissipation in cyanobacteria **Plant Cell** **18**, 992-1007

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

Leverenz R, Sutter M, Wilson A, Gupta S, Thurotte A, Bourcier de Carbon C, Petzold C, Ralston C, Perreau F, **Kirilovsky D\***, Kerfeld C (2015) A carotenoid translocation activates photoprotection in cyanobacteria. **Science** **348**, 1463-1466

Muzzopappa F, Wilson A, Yogarajah V, Cot S, Perreau F, Mongtigny C, Bourcier de Carbon C and **Kirilovsky D** (2017) The paralogs to the C-terminal domain of the cyanobacterial OCP are carotenoid donors to HCPs. **Plant Physiol** **175**, 1283-1303 doi: 10.1104/pp.17.01040

Djediati C , Feilke K, Brochard A , Caramelle L , Kim Tiam S , Sétif P , Gauvrit T , Yéprémian C , Wilson A , Talbot L , Marie B , **Kirilovsky D\***, Bernard C\* (2019) Light stress in green and red *Planktothrix* strains: The orange carotenoid protein and its related photoprotective mechanism. **BBA Bioenergetics** doi: 10.1016/j.bbabi.2019.06.009

Ce stage peut-il se poursuivre par une thèse ? : Non