

Interactions entre l'Orange Carotenoid Protein et les phycobilisomes dans un mécanisme photoprotectif chez les cyanobactéries

Denis Jallet, CEA Saclay, iBiTeC-s/SB2SM/LMB

Directeur de these: Dr. Diana Kirilovsky

Résumé en français

INTRODUCTION

Les cyanobactéries sont des organismes procaryotes uniques de par leur capacité à réaliser la photosynthèse oxygénique. Cela sous-entend utiliser la lumière comme source d'énergie et l'eau comme source d'électrons afin de réduire le carbone inorganique (CO_2) en sucre ($\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_n$), de l'énergie chimique (ATP) et de l'oxygène (O_2) étant simultanément produits. Certains fossiles ont démontré leur existence il y a déjà 2.5 milliards d'années, attestant un rôle primordial dans l'oxygénation de l'atmosphère (Rasmussen et al., 2008). De nos jours les cyanobactéries forment un très vaste phylum, comptant 7500 espèces réparties en 150 genres. Elles présentent en conséquence des morphologies très variées, même si certaines caractéristiques sont conservées : existence d'une paroi entourant les cellules (bactéries gram-négatives), absence d'organelles (noyau, mitochondries, reticulum endoplasmique, plastes) et présence de replis membranaires siège de la photosynthèse appelés thylakoïdes. Les niches colonisées sont également extrêmement diverses – allant des milieux marins aux glaces polaires – certaines espèces vivant en symbiose, dans le lichen par exemple ; la théorie endosymbiotique suggère d'ailleurs que les chloroplastes, lieu de la photosynthèse chez les plantes et algues, dérivent d'une cyanobactérie endosymbiotique (revue : McFadden, 2001).

De fait, les plantes, algues et cyanobactéries présentent une chaîne de transport des électrons quasiment identique au niveau de leur membrane thylakoïdale. Cela comprend 2 photosystèmes (PSII, PSI), 1 cytochrome b_6f (cyt_{b_6f}) et divers transporteurs mobiles (plastoquinone, PQ ; plastocyanine, PC ; ferredoxine, Fd ; NADP) (revue : Witt, 1996). Les photosystèmes sont composés d'une antenne interne qui capte la lumière et la transmet vers un centre réactionnel, où les chlorophylles spéciales (P680 pour PSII, P70 pour PSI) réalisent des séparations de charge. Au niveau du PSII, l'électron relargué après excitation passe par divers accepteurs avant d'atteindre la PQ ; 2 séparations de charge successives permettent l'obtention de plastoquinol (PQH_2). Les chlorophylles spéciales (P680) sont ensuite re-réduites suivant oxydation de l'eau au niveau du complexe manganèse, de l' O_2 étant simultanément émis. Le cyt_{b_6f} constitue un pont, recevant 2 électrons de PQH_2 et en transmettant un à la PC. Au niveau du PSI, l'électron relargué suivant excitation passe par plusieurs accepteurs avant d'atteindre le NADP ; 2 séparations de charge successives permettent l'obtention de NADPH. Les chlorophylles spéciales (P700) sont ensuite re-réduites via la PC. Les PS fonctionnent donc en série, permettant transfert d'électrons de l'eau vers le NADP. Le NADPH ainsi formé constitue une forme de pouvoir réducteur ensuite utilisée par le cycle de Calvin-Benson. De plus, un gradient de proton apparaît lors du transport d'électrons ce qui permet à l'ATP synthase de fonctionner ; l'ATP ainsi générée constitue une source d'énergie chimique pour le cycle de Calvin-Benson.

Bien que les plantes, algues et cyanobactéries présentent la même chaîne photosynthétique de transport des électrons, des différences majeures apparaissent quant à la manière dont la lumière

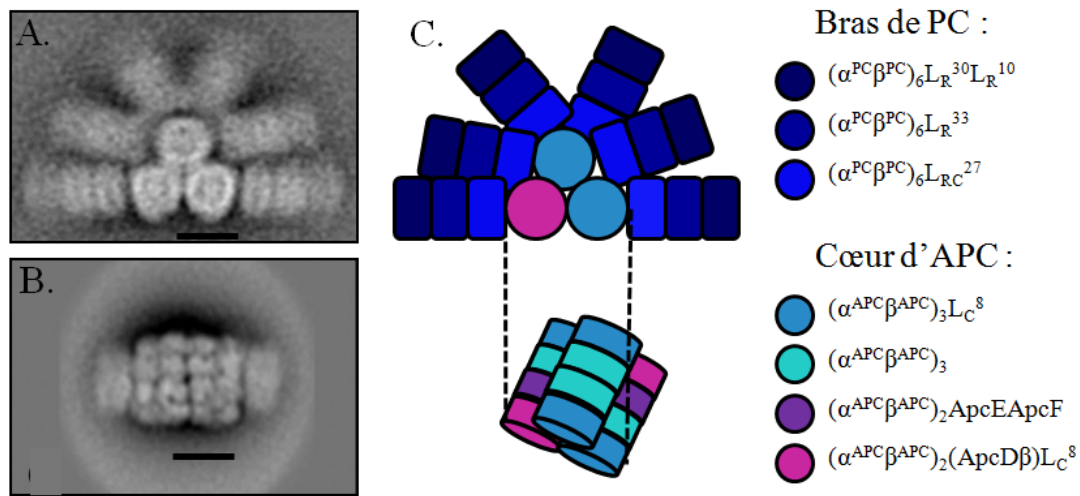


Figure 2. Les phycobilisomes de l'espèce modèle *Synechocystis* PCC 6803. A et B. Images en microscopie électronique montrant une vue du face (A) ou de dessus (B) d'un phycobilisome de *Synechocystis*. L'échelle indique 10 nm (adapté de Arteni et al., 2009). C. Représentation schématique du même phycobilisome et projection orthogonale du cœur d'allophycocyanine. PC: phycocyanine. APC: allophycocyanine.

est récoltée. Les plantes et algues utilisent des antennes transmembranaires appelées Light Harvesting Complexes (LHC), constituées de protéines hydrophobes attachant non-covalamment de la chlorophylle. Les cyanobactéries emploient à la place de gigantesques complexes appelés phycobilisomes (PBs), situés sur la membrane thylakoïdale du côté cytoplasmique (revue : MacColl, 1998; Watanabe and Ikeuchi, 2013). Les PBs comprennent des protéines solubles attachant covalamment un ou plusieurs tétrapyrrole(s) linéaire(s) (famille des bilines) et nommées phycobiliprotéines. Une fois purifiées, ces phycobiliprotéines apparaissent bleues ou rouges en solution ; elles émettent une très forte fluorescence. Il en existe plusieurs types, divergeant de par leurs propriétés optiques (maximum d'absorbance, maximum de fluorescence). Chez la cyanobactérie modèle sujet de cette étude, *Synechocystis* PCC 6803 (ci-après *Synechocystis*), on en trouve 2 formes principales : phycocyanine (PC ; $\lambda_{Amax}=620nm$, $\lambda_{Fmax}=645nm$) et allophycocyanine (APC ; $\lambda_{Amax}=650nm$, $\lambda_{Fmax}=660nm$) (Figure 1). Observés au microscope électronique, les PBs de *Synechocystis* isolés apparaissent hémidiscoïdaux ; ils sont formés de 6 bras entourant un cœur (Figure 1 ; Arteni et al., 2009). Chaque bras inclut en réalité 3 hexamères de PC associés entre eux par des linkers incolores (Figure 1). Le cœur inclut 3 cylindres, chacun formé par 4 trimères d'APC. Les PBs sont donc organisés tels que les phycobiliprotéines de haute énergie – PC – entourent celles de moindre énergie – APC ; cela permet un transfert unidirectionnel de l'énergie lumineuse collectée vers le cœur (Figure 1).

Le cœur des PBs établit un équilibre énergétique avec les antennes internes des PSs. Cela est lié à la présence de formes mineures d'APC en son sein, qualifiées d'émetteurs terminaux car constituant les phycobiliprotéines de plus basse énergie (ApcD, ApcF, ApcE ; $\lambda_{Amax}=670\text{nm}$, $\lambda_{Fmax}=680\text{nm}$) ; elles transmettent l'énergie reçue à la Chlorophylle *a* (Chl*a*). Ainsi, l'énergie lumineuse collectée par les PBs est transférée très efficacement en direction des 2 photosystèmes (rendement quantique >90%). La présence de phycobiliprotéines absorbant dans le vert et l'orange constitue un énorme avantage en milieu aquatique où la lumière est appauvrie en rouge (absorbé très efficacement par la Chl).

Grâce aux PBs, un maximum d'énergie lumineuse est collecté et arrive aux PSs où la photochimie opère. Sous de faibles intensités lumineuses cela permet d'alimenter le cycle de Calvin-Benson en pouvoir réducteur et énergie chimique. Sous de fortes intensités lumineuses, la capacité des cellules à fixer le carbone inorganique (CO₂) devient limitante ; cela conduit à des situations où la chaîne de transport des électrons se trouve fortement réduite. Dans ce cas, l'énergie collectée ne permet plus de réaliser la photochimie. Des recombinaisons de charge ont alors lieu, notamment au niveau du PSII, conduisant à l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). En particulier, l'oxygène singulet (¹O₂) induit une perte d'activité du PSII dans un processus irréversible appelé photoinhibition (revue : Vass, 2012). Récupérer un appareil photosynthétique fonctionnel nécessite la néosynthèse de protéines et s'avère énergétiquement coûteux pour les cellules.

Les cyanobactéries ont développé diverses stratégies photoprotectives pour contrer cet effet délétère. Elles possèdent entre autres un système antioxydant complet, reposant aussi bien sur des enzymes (chez certaines espèces uniquement : catalase, superoxyde dismutase, peroxydases, peroxyredoxines) que sur des composés non enzymatiques (α -tocophérol, caroténoïdes) (revue : Latifi et al., 2009). Sous de fortes illuminations, les pigments photosynthétiques voient leur concentration diminuer et le PSII devient moins prône aux recombinaisons de charge (isoformes de la protéine D1 incorporées au niveau du centre réactionnel). Des voies alternatives pour le transport électronique se mettent également en place, reposant sur certaines flavoprotéines (Flv2/Flv4 pour *Synechocystis*: Zhang et al., 2012) ou sur les Plastid Terminal Oxidases (PTOX, chez certaines espèces uniquement : McDonald et al., 2011). Un transfert cyclique peut apparaître autour du PSI, entraînant synthèse d'ATP sans production de pouvoir réducteur, mais le mécanisme sous-jacent reste très mal compris.

Notre équipe a découvert en 2000 un nouveau mécanisme photoprotectif chez *Synechocystis* ; il repose sur l'Orange Carotenoid Protein (OCP), protéine soluble de 35 kDa attachant non covalamment un kéto-caroténoïde (hydroxyechinenone, hECN) (voir El Bissati et al., 2000; Wilson et al., 2006). Cela lui confère la capacité d'absorber la lumière bleu-verte, se voyant ainsi photoconvertie d'une forme orange/inactive (OCP^o) vers une forme rouge/active (OCP^r) (Wilson et al.,

2008). En tant normal, les PBs transfèrent très efficacement l'énergie lumineuse qu'ils collectent aux PSs ; cela s'accompagne de faibles pertes, sous forme de chaleur ou de fluorescence (rendement quantique <10%). L'OCP, une fois photoactivée (OCP^r), interagit avec les PBs ; l'énergie récoltée par ces derniers est alors dissipée sous forme de chaleur (quenching non photochimique), ce qui est accompagné d'une baisse dans l'émission de fluorescence et dans le transfert aux PSs (Wilson et al., 2006). En d'autres termes, l'OCP est un « interrupteur moléculaire » capable de réduire la pression d'excitation sur les PSs donc la génération d'EROs sous forte illumination. A l'obscurité, une autre protéine baptisée Fluorescence Recovery Protein (FRP) interagit avec l'OCP^r et induit son détachement des PBs ainsi que sa reconversion en OCP^o (Boulay et al., 2010). Le mécanisme de photoprotection lié à l'OCP est donc réversible.

L'OCP^r, une fois attachée, diminue l'émission de fluorescence au niveau des PBs . Cela peut être visualisé in vivo chez *Synechocystis* en se basant sur des spectres obtenus avec un fluorimètre classique ou sur des traces obtenues avec un fluorimètre PAM (pour Pulse Amplitude Modulation). Des cellules traitées avec une faible lumière bleu-verte – insuffisante pour photoactiver l'OCP – présentent un important rendement de fluorescence quand les PBs sont excités (lumière orange, 590 nm). Lorsque ces mêmes cellules sont traitées avec une forte lumière bleu-verte, l'OCP^o se voit progressivement convertie en OCP^r et on observe une diminution progressive du rendement de fluorescence (PBs excités, 590 nm). Expérimentalement, on peut donc estimer le degré de photoprotection en se basant sur les niveaux de fluorescence observés.

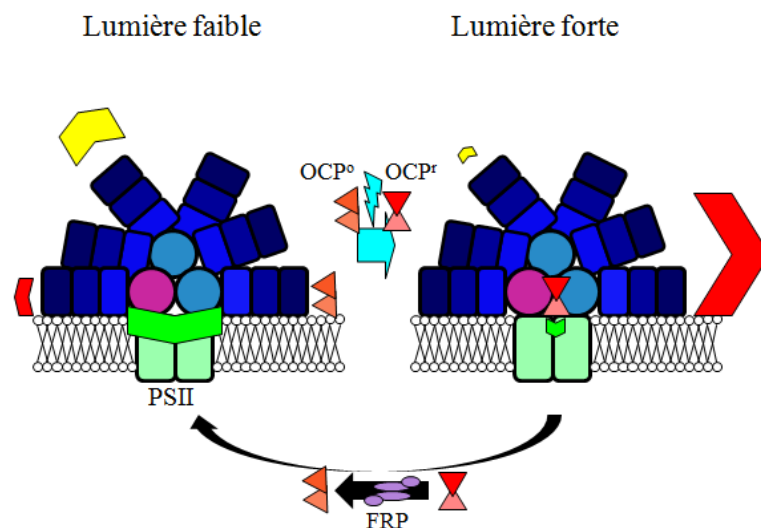


Figure 2. Modèle schématique du mécanisme photoprotectif lié à l'OCP chez *Synechocystis*. Sous de faibles intensités lumineuses (gauche), un grande partie de l'énergie récoltée par les phycobilisomes est transférée aux centres réactionnels des PSs où la photochimie a lieu (flèche verte). Une faible partie de l'énergie est perdue sous forme de chaleur (flèche rouge) ou de fluorescence (flèche jaune). Sous de fortes intensités de lumière blanche ou bleu-verte, l'OCP^o est convertie en OCP^r qui interagit avec le cœur des phycobilisomes et augmente la dissipation sous forme de chaleur, déclenchant une baisse à la fois dans l'émission de fluorescence et dans le transfert aux PSs. Finalement, la FRP induit la reconversion de l'OCP^r en OCP^o et permet de remettre le système à zéro (bas).

En 10 ans, notre équipe a obtenu une vue d'ensemble du mécanisme photoprotectif lié à l'OCP grâce à diverses mesures in vivo (*Synechocystis* sauvage et mutants: Wilson et al., 2006; Wilson et al., 2007). Les OCP isolées d'*Arthrospira maxima* (Kerfeld et al., 2003) ainsi que de *Synechocystis* (Wilson et al., 2008; Wilson et al., 2010) ont été cristallisées puis leur structure aux rayons X déterminée ; cela a permis d'engager une étude structure/fonction pour comprendre le rôle d'acides aminés conservés (Wilson et al., 2011 ; Wilson et al., 2012). Juste avant mon arrivée au laboratoire, un système de reconstitution in vitro a également été développé (Gwizdala et al., 2011). Il a permis de démontrer que 3 acteurs uniquement sont requis : l'OCP, les PBs et la FRP (Gwizdala et al., 2011). L'OCP s'attache directement au cœur des PBs pour induire la dissipation thermique ; le complexe OCP^r-PB comprend 1 à 2 OCP^r (Gwizdala et al., 2011). Un modèle résumant ces informations est présenté Fig.2.

Bien que le modèle ait été disponible au début de cette thèse, plusieurs questions restaient alors à résoudre auxquelles j'ai voulu répondre.

Quel est le site d'attachement de l'OCP au niveau des PBs ? Le cœur des PBs contient des formes majeures d'APC (α^{APC} , β^{APC} ; $\lambda_{Fmax}=660$ nm) ainsi que des formes mineures, appelées émetteurs terminaux (ApcD, ApcF, ApcE ; $\lambda_{Fmax}=680$ nm). J'ai employé une approche de génétique directe chez *Synechocystis* pour déterminer l'importance de ces émetteurs terminaux dans la mise en place du mécanisme photoprotectif lié à l'OCP. **Publication associée (chapitre 1 du manuscrit) : D.Jallet, M.Gwizdala, D.Kirilovsky. 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 – Bioenergetics, volume 1427, issue 8, 2012, pp 1418-1427.**

Comment l'architecture des PBs influence l'attachement de l'OCP? Chez *Synechocystis* le cœur des PBs contient 3 cylindres d'APC. J'ai isolé les PBs d'autres souches cyanobactériennes contenant respectivement 2, 3 ou 5 cylindres d'APC et testé leur interaction avec l'OCP de *Synechocystis* in vitro. Mon but était déterminer si un plus petit (plus grand) nombre de cylindres d'APC conduit à une plus faible (plus forte) affinité pour l'OCP. **Publication associée (chapitre 2 du manuscrit) : D.Jallet, A.Thurotte, R.Leverenz, F.Perreau, C.Kerfeld, D.Kirilovsky Specificity of the Orange Carotenoid Protein : influences of OCP and phycobilisome structures. Plant Physiology, doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.113.229997>.**

Quels types d'interactions permettent la formation du complexe OCP^r-PB ? Après avoir purifié les OCP de 2 cyanobactéries, j'ai comparé leur interaction avec divers PBs in vitro (chapitre 2 du manuscrit ; Jallet et al., 2013). Cela a permis d'identifier divers acides aminés chargés potentiellement importants pour l'attachement aux PBs. De plus, j'ai travaillé en collaboration avec le groupe du Pr. C.A. Kerfeld (Michigan State University) pour étudier les rôles des domaines N-terminaux et C-terminaux de l'OCP. **Publication associée (chapitre 3 du manuscrit) : R.Leverenz,**

D.Jallet, R.Mathies, M.Li, D.Kirilovsky, C.Kerfeld. Structural and functional modularity of the Orange Carotenoid Protein: distinct roles for the N- and C- terminal domains in cyanobacterial photoprotection. *Plant Cell*, doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.118588>.

RESULTATS

Partie I (tirée de Jallet et al., 2012) : Quel est le site d'attachement de l'OCP au niveau des PBs ?

Quand ce projet a commencé, on savait déjà que l'OCP et les PBs isolés chez *Synechocystis* interagissent directement sous forte lumière bleu-verte ; cela se traduit par une diminution de l'émission de fluorescence. Le système de reconstitution in vitro a été utile pour le démontrer et pour tirer plusieurs conclusions associées. En particulier, il a été prouvé qu'1 ou 2 OCP^f seulement sont présentes dans le complexe OCP-PB (Gwizdala et al., 2011). L'OCP^f s'attache au niveau du cœur des PBs (Gwizdala et al., 2011). Considérant la complexité de ce dernier, contenant 72 sous-unités d'APC, plusieurs questions émergent : quels composants du cœur attachent l'OCP^f ? A quel niveau se fait la dissipation sous forme de chaleur ?

Pour y répondre, j'ai construit des mutants de *Synechocystis* affectés dans leurs émetteurs terminaux (souches Δ ApcD, Δ ApcF, Δ ApcDF, ApcEC190S). J'ai évalué l'effet d'une forte lumière bleu-verte sur les cellules mutantes ou sauvages grâce à un fluorimètre PAM (Fig. 3A). J'ai ensuite isolé les PBs des différentes souches pour tester leur interaction avec l'OCP in vitro (Fig. 3B).

Mes résultats ont démontré qu'aucun des émetteurs terminaux n'est absolument requis pour le mécanisme de photoprotection lié à l'OCP. Par élimination, l'OCP s'attache probablement à une forme majeure d'APC (α^{APC} ou β^{APC}) suivant photoactivation.

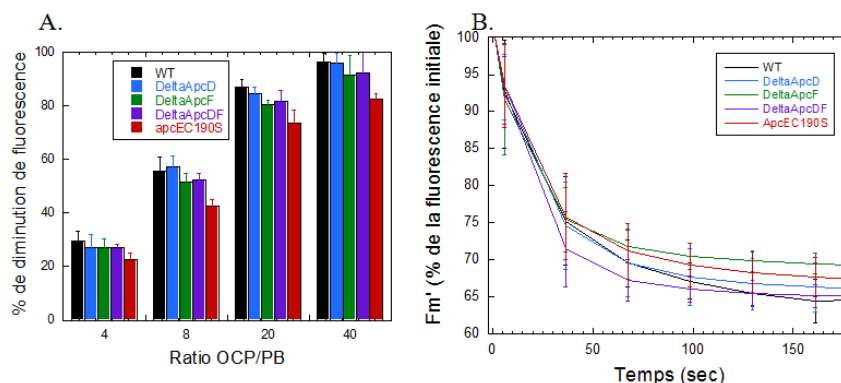


Figure 3. Mécanisme photoprotectif lié à l'OCP chez des mutants de *Synechocystis* affectés dans leurs émetteurs terminaux. A. Pourcentage de diminution de fluorescence observé in vitro après 5 min d'illumination avec 900 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$ de lumière bleu-verte. Les PBs isolés de cellules WT (noir), Δ ApcD (bleu), Δ ApcF (vert), Δ ApcDF (violet) et ApcEC190S (rouge) ont été mélangés avec différentes quantités d'OCP, donnant respectivement un ratio OCP/PB de 40, 20, 8 ou 4. B. Evolution du niveau maximal de fluorescence observée en illuminant les cellules WT (noir), Δ ApcD (bleu), Δ ApcF (vert), Δ ApcDF (violet) ou ApcEC190S avec 1400 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$ de lumière bleu-verte. Ces données montrent les moyennes (\pm écart-type) d'au moins 3 répétitions. Tiré de Jallet et al., 2012.

Partie II (tirée de Jallet et al., 2013) : Spécificité de l'Orange Carotenoid Protein – influences des structures de l'OCP et des phycobilisomes.

Dans la nature, on trouve des cyanobactéries à PBs hémidiscoïdaux présentant 2 (ex *Synechococcus elongatus* PCC 7942, ci-après *Synechococcus*), 3 (ex *Synechocystis*) ou 5 (ex *Anabaena variabilis*, ci-après *Anabaena*) cylindres dans leur cœur d'APC. Parmi elles, certaines souches n'ont aucun gène codant pour l'OCP (ex *Synechococcus*). Après avoir montré que l'OCP s'attache à une forme majeure d'APC (α^{APC} ou β^{APC}), je me suis demandé comment l'architecture du cœur des PBs peut influencer cet attachement.

J'ai donc réalisé une étude in vitro pour évaluer les interactions entre 4 types de PBs – représentatifs de la diversité décrite ci-dessus – et 2 OCP différentes (Fig.4). Des protocoles ont été développés pour obtenir les PBs intacts chez plusieurs cyanobactéries (*Synechococcus*, *Arthrospira platensis* PCC 7345 – ci-après *Arthrospira*, *Anabaena variabilis*). Des mutants de *Synechocystis* ont été construits, sur-accumulant l'OCP de *Synechocystis* ou d'*Arthrospira*, et les protéines correspondantes isolées. J'ai ensuite testé diverses combinaisons OCP-PB en considérant le degré de diminution de fluorescence induit in vitro et en jouant sur la composition du tampon, particulièrement sur la quantité de phosphate précédemment décrite comme critique pour stabiliser le complexe OCP-PB (Gwizdala et al., 2011).

Les résultats obtenus suggèrent que 1) 2 OCPs avec une forte homologie de séquence (acides aminés) et des structures cristallines très proches peuvent montrer des affinités très différentes pour les PBs in vitro 2) le nombre de cylindres d'APC dans le cœur n'a aucune influence sur l'attachement de l'OCP 3) d'autres critères concernant l'architecture du cœur des PBs, par exemple la distance entre trimères d'APC dans chaque cylindre, influencent probablement la capacité d'un PB donné à lier une OCP donnée.

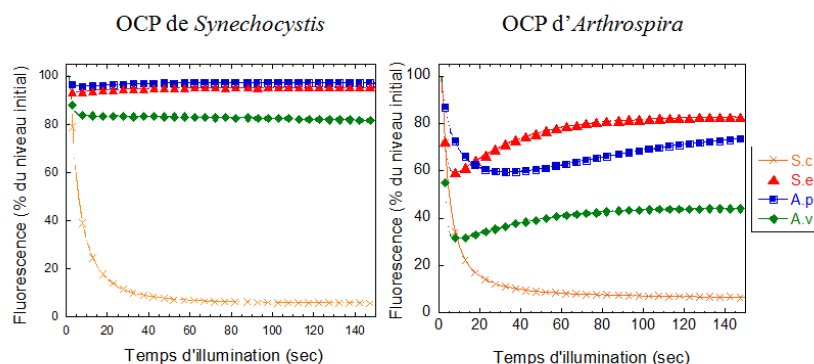


Figure 4. Diminution de fluorescence induite par les OCPs de *Synechocystis* (gauche) ou *Arthrospira* (droite) in vitro. Les PBs (0.012 μ M) ont été illuminés avec une forte lumière bleu-verte (900 μ mol.m⁻².s⁻¹) en présence d'un excès d'OCP^r (0.48 μ M; 40 per PB) à 23°C et en utilisant 0.8M de tampon K-Phosphate. L'évolution de la fluorescence a été enregistrée avec un fluorimètre PAM. PBs de *Synechocystis* (croix oranges), *Arthrospira* (carrés bleus), *Synechococcus* (triangles rouges) et *Anabaena* PBs (losanges verts). Tiré de Jallet et al., 2013.

Partie III (tirée de Leverenz et al., 2014) : Etude structurelle et fonctionnelle de l'Orange Carotenoid Protein – rôles distincts des domaines N- et C-terminaux dans la photoprotection chez les cyanobactéries.

Il a été démontré dans notre laboratoire qu'un pont salin établi entre Arg155 (domaine N-ter, Fig.5A) et Glu244 (domaine C-ter, Fig.5A) maintient l'OCP^o dans sa conformation « fermée »; ce pont salin est rompu chez l'OCP^f, qui présente donc une conformation « ouverte » (Wilson et al., 2012). De plus, l'Arg155 apparaît comme absolument requise pour l'attachement de l'OCP aux PBs (Wilson et al., 2012).

Afin de tester les rôles respectifs des domaines N- et C-terminaux de l'OCP dans l'attachement aux PBs, R. Leverenz (Michigan State University) a réalisé une digestion trypsique de l'OCP d'*Arthrospira* et récupéré 2 fragments protéolytiques. L'un d'entre eux a été identifié comme le domaine N-terminal isolé (incluant l'Arg155), avec un caroténoïde (hECN) attaché; il a été baptisé Red Carotenoid Protein (RCP). L'autre fragment apparaissait incolore et correspondait au domaine C-terminal isolé (incluant le Glu244). Des spectres d'absorbance et RAMAN ont démontré que le caroténoïde avait une conformation similaire entre OCP^f et RCP.

J'ai ensuite testé la capacité de la RCP à interagir avec les PBs in vitro. Avec ou sans photoactivation, une baisse très importante et très rapide de la fluorescence a pu être observée (Fig.5B). Ainsi, le domaine N-terminal de l'OCP interagit constitutivement avec les PBs et induit dissipation sous forme de chaleur. Le domaine C-terminal seul, quant à lui, n'avait aucun effet in vitro; il régule probablement l'activité du domaine N-terminal dans l'OCP entière (voir aussi Sutter et al., 2013). A l'obscurité, en interagissant avec le domaine N-terminal, le domaine C-terminal empêche que l'Arg155 et les acides aminés l'entourant soit exposés ce qui permettrait formation du complexe OCP-PB.

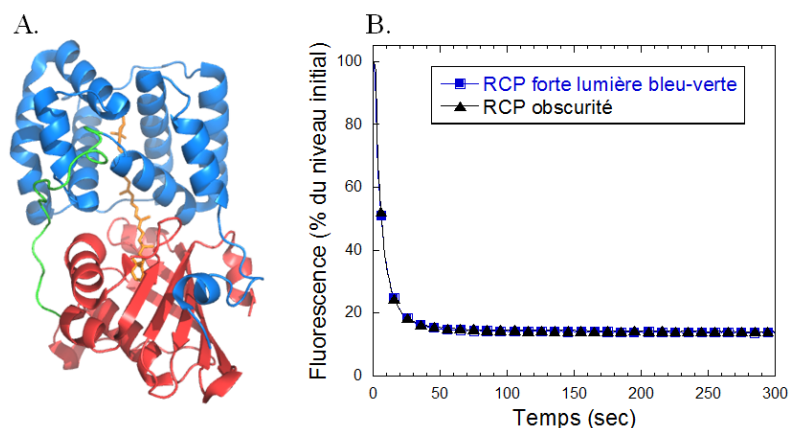


Figure 5. Diminution de fluorescence induite par la RCP d'*Arthrospira* in vitro. A. Structure de l'OCP d'*Arthrospira* visualisée avec le logiciel PyMol (fichier PDB 1M98; Kerfeld et al., 2003). Le domaine N-terminal est représenté en bleu, le domaine C-terminal en rouge et la partie flexible les liant en vert. Le caroténoïde attaché (hydroxy-échinonone) apparaît sous la forme de bâtonnets oranges. B. Diminution de fluorescence induite par l'ajout de la RCP d'*Arthrospira* aux PBs de *Synechocystis* (20/PB), à 0.8M de tampon K-Phosphate et 23°C, en présence de 900 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de lumière bleu-verte (trace bleue) ou à l'obscurité (trace noire). Tiré de Leverenz et al., 2014.

CONCLUSION

Le travail réalisé au cours de ma thèse s'est focalisé sur les interactions entre OCP et PBs. Grâce aux diverses études menées, j'ai ainsi pu déterminer que 1) l'OCP^r induit la dissipation sous forme de chaleur au niveau d'une forme majeure d'APC (α^{APC} ou β^{APC} ; Jallet et al., 2012) 2) cette APC est située dans un des cylindres basaux du cœur, en contact avec la membrane thylakoïdale (Jallet et al., 2013) 3) la présence de cylindres d'APC supplémentaires chez certaines cyanobactéries n'augmente pas l'affinité pour l'OCP (Jallet et al., 2013) 4) des PBs issus de différentes souches ont plus ou moins d'affinité pour une OCP donnée, peut-être à cause de légères différences structurales au niveau du cœur (Jallet et al., 2013) 5) des OCPs issues de différentes souches ont plus ou moins d'affinité pour un PB donné, probablement en fonction du nombre de charges exposées en surface du domaine N-terminal (Jallet et al., 2013) 6) le domaine N-terminal de l'OCP seul peut interagir avec les PBs et induire une diminution importante de fluorescence (Wilson et al., 2012; Leverenz et al., 2014) et 7) le domaine C-terminal de l'OCP a une fonction régulatrice, assurant que le domaine N-terminal ne peut interagir avec les PBs qu'après photoactivation (i.e. sous de fortes intensités lumineuses). La Figure 6 résume tous ces points.

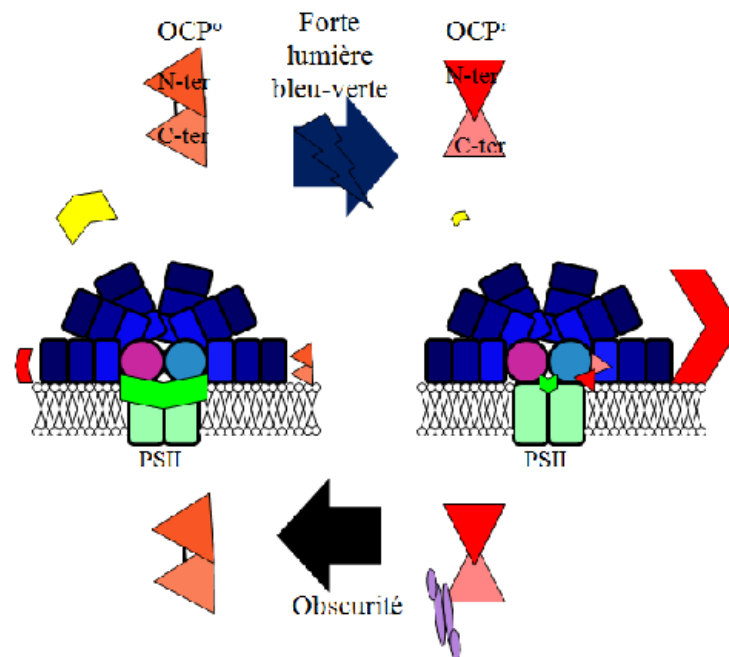


Figure 6. Représentation schématique du mécanisme de photoprotection lié à l'OCP tel que nous le comprenons à ce jour. L'OCP^o est une forme fermée présentant plusieurs ponts salins à l'interface entre domaines N- et C-terminaux, particulièrement entre l'Arg155 et le Glu244 (numérotation de *Synechocystis*, représenté sous la forme d'un trait noir; Wilson et al., 2012). Lors de la photoactivation, ces liaisons sont rompues et la protéine s'ouvre, ce qui permet l'apparition de l'OCP^r. Celle-ci établit des contacts électrostatiques avec une sous-unité d'APC dans le cœur des phycobilisomes, via son domaine N-terminal (Leverenz et al., 2014). L'Arg155 semble jouer un rôle particulièrement important pour l'attachement aux phycobilisomes, ainsi que d'autres résidus chargés dans son entourage (Wilson et al., 2012; Jallet et al., 2013). Une fois attachée, l'OCP^r induit directement le mécanisme de photoprotection au niveau d'une forme majeure d'APC (Gwizdala et al., 2011; Jallet et al., 2012). À l'obscurité, la FRP agit sous forme dimérique et interagit avec le domaine C-terminal de l'OCP^r, cela permet la reconversion de l'OCP^r en OCP^o. Le système revient à son état de départ (Sutter et al., 2013).

- Arteni AA, Ajlani G, Boekema EJ** (2009) Structural organisation of phycobilisomes from *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and their interaction with the membrane. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* **1787**: 272–279
- 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* **107**: 11620–11625
- El Bissati K, Delphin E, Murata N, Etienne A-L, Kirilovsky D** (2000) Photosystem II fluorescence quenching in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: involvement of two different mechanisms. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* **1457**: 229–242
- 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 Online* **23**: 2631–2643
- Jallet D, Gwizdala M, 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* **1817**: 1418–1427
- Jallet D, Thurotte A, Leverenz RL, Perreau F, Kerfeld CA, Kirilovsky D** (2013) Specificity of the cyanobacterial Orange Carotenoid Protein: Influences of OCP and phycobilisome structures. *Plant Physiol* pp.113.229997
- 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
- Latifi A, Ruiz M, Zhang C-C** (2009) Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 258–278
- Leverenz RL, Jallet D, Li M-D, 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 Online* tpc.113.118588
- MacColl R** (1998) Cyanobacterial Phycobilisomes. *J Struct Biol* **124**: 311–334
- McDonald AE, Ivanov AG, Bode R, Maxwell DP, Rodermeier SR, Hüner NPA** (2011) Flexibility in photosynthetic electron transport: The physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX). *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* **1807**: 954–967
- McFadden GI** (2001) Primary and Secondary Endosymbiosis and the Origin of Plastids. *J Phycol* **37**: 951–959
- Rasmussen B, Fletcher IR, Brocks JJ, Kilburn MR** (2008) Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. *Nature* **455**: 1101–1104
- Vass I** (2012) Molecular mechanisms of photodamage in the Photosystem II complex. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* **1817**: 209–217
- Watanabe M, Ikeuchi M** (2013) Phycobilisome: architecture of a light-harvesting supercomplex. *Photosynth Res* **116**: 265–276

- Wilson A, Ajlani G, Verbavatz J-M, Vass I, Kerfeld CA, Kirilovsky D** (2006) A Soluble Carotenoid Protein Involved in Phycobilisome-Related Energy Dissipation in Cyanobacteria. *Plant Cell Online* **18**: 992–1007
- Wilson A, Boulay C, Wilde A, Kerfeld CA, Kirilovsky D** (2007) Light-Induced Energy Dissipation in Iron-Starved Cyanobacteria: Roles of OCP and IsiA Proteins. *Plant Cell Online* **19**: 656–672
- 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 Online* **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, Perreau F, Kirilovsky D** (2011) Essential role of two tyrosines and two tryptophans on the photoprotection activity of the Orange Carotenoid Protein. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* **1807**: 293–301
- Wilson A, Punginelli C, Gall A, Bonetti C, Alexandre M, Routaboul J-M, Kerfeld CA, Grondelle R van, Robert B, Kennis JTM, et al** (2008) A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 12075–12080
- Witt HT** (1996) Primary reactions of oxygenic photosynthesis. *Berichte Bunsenges Für Phys Chem* **100**: 1923–1942
- Zhang P, Eisenhut M, Brandt A-M, Carmel D, Silén HM, Vass I, Allahverdiyeva Y, Salminen TA, Aro E-M** (2012) Operon flv4-flv2 Provides Cyanobacterial Photosystem II with Flexibility of Electron Transfer. *Plant Cell Online* **24**: 1952–1971