

# Nature, fonction et optimisation de la luciférase de la méduse *Periphylla periphylla*

## Thèmes de recherche : bioinspiration marine

### 1. Etat de l'art

La bioluminescence, la production de lumière par un organisme vivant, est générée par des enzymes appelées luciférases qui catalysent l'oxydation de substrats appelés luciférines. La bioluminescence joue un rôle crucial dans la vie de nombreux organismes, en particulier ceux des profondeurs marines. Elle est utilisée pour des fonctions diverses : dissuader la prédation, attirer les proies, se camoufler, communiquer ou encore pour l'attraction de partenaires<sup>1</sup>. La bioluminescence est un phénomène répandu qui a évolué de manière indépendante à de multiples reprises chez les animaux, les champignons, les dinoflagellés et les bactéries<sup>1,2,3</sup>. Un aspect remarquable de la bioluminescence est que de nombreux organismes marins utilisent le même substrat, la coérentérazine, alors que de nombreuses luciférases ont des origines indépendantes, mettant en lumière un cas remarquable de convergence évolutive<sup>3</sup>. En étudiant les différents systèmes de bioluminescence chez les Cnidaires, l'équipe d'Osamu Shimomura, pionnier de la recherche sur la bioluminescence, a isolé une luciférase aux propriétés biochimiques exceptionnelles provenant de la méduse casquée *Periphylla periphylla*<sup>4,5,6</sup> (**Pluc**). Elle s'avère avoir une très grande stabilité structurale et fonctionnelle. En effet, elle n'est pas dénaturée en présence d'agents dénaturant (SDS) et réducteur (2-mercaptoéthanol), elle peut être soumise à des conditions acides (pH 1) ou basique (pH 11) pendant au moins 30 minutes sans perdre son activité bioluminescente<sup>4,5</sup>. Son activité enzymatique est également peu sensible aux variations de pH (de 1 à 11) et de température (de 10 à 50°C), et elle est conservée à plus de 50% après avoir été chauffée à 95°C pendant 2 minutes<sup>4,5</sup>. Les propriétés biochimiques et catalytiques uniques de **Pluc** pourraient permettre à terme de développer un nouveau système rapporteur lumineux bio-inspiré, enrichissant ainsi les outils disponibles pour la recherche scientifique et le monde médical, notamment pour le criblage, l'imagerie et le diagnostic, d'autant plus que **Pluc** est reportée comme l'enzyme avec la plus forte intensité lumineuse parmi les luciférases sauvages<sup>4,5</sup>. Aujourd'hui, seule un petit nombre de luciférases sont disponibles dans le commerce : celles dérivées de *Renilla reniformis*, de *Gaussia princeps*, et de *Oplophorus gracilirostris*, ainsi que la photoprotéine (luciférase Ca<sup>2+</sup> dépendante) de *Aequorea victoria*. La luciférase de *P. periphylla*, par sa stabilité et son intensité lumineuse intrinsèque, présente un grand potentiel de valorisation qui fera de cette luciférase un excellent outil moléculaire à ajouter au répertoire des rapporteurs bioluminescents. Nos recherches sur cette luciférase ont débuté par un travail approfondi d'analyses génomiques, basé sur un vaste jeu de données de transcriptomique<sup>7</sup> afin d'identifier le gène codant pour cette enzyme. En nous appuyant sur les caractéristiques physico-chimiques décrites par Shimomura et ses collègues<sup>4,5</sup>, telles que la taille de la protéine, sa lipophilie, sa capacité à former des multimères et son abondance, nous avons pu sélectionner 75 candidats prometteurs. Il est maintenant nécessaire de procéder à une validation fonctionnelle des séquences candidates en exprimant les cDNA candidats dans un système cell-free pour produire les protéines et tester leur bioluminescence. Enfin, ce projet s'inscrit dans une démarche plus large d'exploration et de valorisation de la biodiversité des océans profonds. Construit autour d'une forte synergie et complémentarité des spécialités des trois co-encadrants (génomique, biochimie et biologie structurale), ce projet peut contribuer au développement d'un nouveau système rapporteur lumineux bio-inspiré et ainsi participer à la valorisation de la richesse du vivant.

### 2. Objectifs de la thèse

Le projet de thèse s'articule autour de trois objectifs. Le premier objectif est **d'identifier les bases moléculaires de la luciférase **Pluc** produite par *P. periphylla***. Les séquences codantes candidates seront identifiées par analyses bioinformatiques et envoyées à un prestataire extérieur pour une production et un test de bioluminescence. Le second objectif de ce projet est de **comprendre le mécanisme physico-chimique de production de luminescence par la luciférase **Pluc****. Cela se fera à travers la détermination de sa structure tridimensionnelle, de son activité enzymatique (affinité et spécificité pour son substrat, vitesse de réaction) et du signal lumineux produit (intensité, durée et longueur d'onde) en présence de son substrat, la coérentérazine, ou d'un ensemble de dérivés synthétisés au laboratoire<sup>8</sup>. Enfin le troisième objectif est **d'améliorer les propriétés biochimiques de **Pluc****, notamment la solubilité et le rendement de production en système recombinant, puis d'augmenter

l'activité enzymatique de la luciférase. Cela se fera par une stratégie de mutations ciblées, combinant des analyses *in silico* et des mesures biochimiques et enzymatiques sur les mutants, afin de réduire la lipophilie de **Pluc** et d'augmenter son activité enzymatique.

### 3. Méthodologie (dont verrous et faisabilité).

La première année de la thèse sera dédiée à déterminer la nature de la luciférase produite par la méduse *P. periphylla* (O1). Pour y parvenir, une approche multidisciplinaire sera employée, combinant génomique, prédiction computationnelle de la structure tridimensionnelle, biologie moléculaire et biochimie. Les séquences candidates seront testées dans des systèmes cell-free (*E. coli*). Ces systèmes offrent d'excellentes performances pour produire des protéines liposolubles, ce qui est le cas de la luciférase **Pluc**, car il est possible de rajouter dans le milieu réactionnel des détergents qui permettent de les solubiliser<sup>9</sup>. Cette étape sera sous-traitée par la société AdaptatvBio (Lausanne, Suisse). Cette dernière propose non seulement la production *ex vitro* de ces séquences, mais aussi leur évaluation pour une éventuelle activité bioluminescente. Leurs essais préliminaires récents, basés sur trois autres luciférases (*Gaussia*, *Renilla* et *Oplophorus*), ont démontré la validité de leur technologie. En cas d'échec avec les premières séquences candidates, nous utiliserons le génome qui sera produit par l'DTOL/ATLSea<sup>10</sup> pour réduire considérablement le nombre de séquences candidates (les transcriptomes ont toujours plus de gènes et isoformes que les génomes annotés). Cela nous permettra de proposer une liste affinée des candidats. Cette première étape a déjà démarré avec l'envoi de 50 séquences candidates. Les deuxième et troisième années de thèse seront consacrées à la caractérisation biochimique et enzymatique de la luciférase, et à l'analyse de sa structure tridimensionnelle (O2). La caractérisation biochimique et enzymatique de la luciférase sera réalisée au sein de l'unité STRING UMR 7196 qui possède l'environnement idéal pour la réalisation de ce projet, avec ses équipements de pointe pour la production et la purification de protéines recombinantes (FPLC AKTA Purifier 10), et une forte expertise dans ce domaine. Les études enzymatiques seront réalisées au sein du Laboratoire de Biologie Computationnelle, Quantitative et Synthétique (LBCQS) à l'aide d'un lecteur de plaques BMG Labtech Clariostar qui permet de détecter la luminescence en condition cinétique. L'analyse de la structure tridimensionnelle sera effectuée par cristallisation de la protéine recombinante purifiée, sur des cribles de diffusion de vapeur en goutte assise. Les criblages de cristallisation seront automatisés à haut débit sur la plateforme de l'Institut de Biologie Physico-Chimique (FR 505 CNRS), à laquelle le partenaire LCQSB a accès en routine. Les monocristaux obtenus seront soumis au rayonnement synchrotron sur les lignes de lumière Proxima à SOLEIL (CEA Saclay) et à l'ESRF (Grenoble) pour l'enregistrement des jeux de données de diffraction des rayons-X et la résolution de la structure cristallographique à résolution atomique. En particulier, l'apport du travail expérimental sera de déterminer le mode de liaison du substrat cœlentérazine dans la poche catalytique de **Pluc**, par comparaison des structures cristallographiques apo et liées. Les cristaux de **Pluc** serviront en outre à des caractérisations spectroscopiques combinées (spectroscopie élargie 60-700 nm, dichroïsme circulaire) sur les lignes de lumière DISCO et SMIS de SOLEIL. En parallèle, une stratégie de mutations ciblées de la luciférase (O3) sera mise en place afin de réduire sa lipophilie et ainsi optimiser sa production et dans un second temps augmenter son activité enzymatique. La modification des propriétés biochimiques de **Pluc** sera réalisée par des prédictions *in silico* en utilisant des *protein language model*<sup>11</sup> intégrées par exemple dans les outils EvolvePRO<sup>12</sup> et ProteinMPNN<sup>13</sup> puis testés sur des systèmes *ex vivo* (sous-traité). Plusieurs plateformes de calculs intensifs sont accessibles aux membres du laboratoire et permettront de réaliser les prédictions *in silico* : le PCIA du MNHN, la plateforme MeSU à Sorbonne Université et le cluster de l'IFB. Le financement du fonctionnement de la thèse s'appuiera pour moitié sur des crédits déjà sécurisés (vente de luciférines et budget commun de l'unité) et en partie sur des demandes de financement dans le cadre d'appels à projet annuel du MNHN (AAP fédérateur 1,5k - 8k€ et ATM 3k - 15k€).

### Références

1. Haddock et al. 2010 doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-081028;
2. Delroisse et al. 2021 doi.org/10.3389/fmars.2021.673620;
3. Lau & Oakley 2021 doi.org/10.1111/brv.12672;
4. Shimomura & Flood 1998 doi.org/10.2307/1543094;
5. Shimomura et al. 2001 doi.org/10.2307/1543612;
6. Péron & Lesueur, 1810 biodiversitylibrary.org/page/3498981;
7. Stenvers et al. 2023 doi.org/10.1038/s41467-023-43023-6;
8. Coutant et al. 2020 doi.org/10.1002/chem.201904844.
9. Chen et al. 2025 doi.org/10.1016/j.micres.2025.128079;
10. <https://goat.genomehubs.org/record?recordId=880221&result=taxon>;
11. Lin et al doi.org/10.1126/science.ade2574;
12. Jiang et al. 2024 doi.org/10.1126/science.adr6006;
13. Dauparas et al., 2022 doi.org/10.1126/science.add2187.