



Conséquences Fonctionnelles de l'Organisation Supramoléculaire de la Chaîne Photosynthétique et Commutation Entre Transferts d'Electrons Cyclique et Linéaire

Sophie Clowez

► To cite this version:

Sophie Clowez. Conséquences Fonctionnelles de l'Organisation Supramoléculaire de la Chaîne Photosynthétique et Commutation Entre Transferts d'Electrons Cyclique et Linéaire. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. ⟨NNT : 2014PA066525⟩. ⟨tel-01146950⟩

HAL Id: tel-01146950

<https://theses.hal.science/tel-01146950v1>

Submitted on 29 Apr 2015

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.



HAL Authorization

Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI-Pierre et Marie Curie
Ecole Doctorale Interdisciplinaire pour le Vivant (ED 387 - Paris VI-VII)
Ecole Doctorale Complexité du Vivant (ED 515) - Paris VI

Thèse présentée pour obtenir

Le **GRADE** de **DOCTEUR EN BIOPHYSIQUE**

Par

Sophie Clowez

Conséquences Fonctionnelles de l'Organisation Supramoléculaire de la Chaîne Photosynthétique et Commutation Entre Transferts d'Electrons Cyclique et Linéaire

Sous la direction de **Fabrice Rappaport**

Membres du jury :

Prof. Sophie Cribier ----- En qualité de présidente
du jury

(Université Pierre et Marie Curie, Paris 6)

Dr. Pierre Cardol ----- En qualité de rapporteur
(Institut de Botanique de l'université de Liège, Belgique)

Dr. Prof. Michael Hippler ----- En qualité de rapporteur
(Institut für Biologie und Biotechnologie des Pflanzen, Allemagne, Münster)



Ecole Doctorale "Complexité du Vivant"
Génomique, Cellule, Développement, Microbiologie





Résumé des travaux de thèse

Le processus photosynthétique se traduit par un flux d'électrons impliquant différents complexes de la membrane thylacoïdale. Ce flux peut adopter deux chemins différents : le transfert d'électrons linéaire (Merchant, Prochnik et al. 2007) à travers lequel les électrons sont transférés de l'eau oxydée au niveau du Photosystème II (PSII), au NADPH réduit par le PSI ; et le transfert d'électrons cyclique autour du Photosystème I (PSI) et du complexe cytochrome *b₆f*. Ces flux d'électrons sont couplés à un pompage de protons du stroma vers le lumen générant une différence de potentiel transmembranaire, permettant la synthèse d'ATP (Allen 2002). La coexistence de ces deux flux est considéré comme nécessaire à la fixation et la métabolisation des molécules de dioxyde de carbone (Seelert, Poetsch et al. 2000 ; Munekage, Hashimoto et al. 2004) dans un rapport stricte ATP / NADPH.

Cette coexistence qui semble essentielle soulève la question des mécanismes qui prévalent à l'implication des mêmes acteurs photosynthétiques, dans une même membrane, dans l'un ou l'autre mode de transfert d'électrons. Chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, nous avons démontré que la commutation entre les deux transferts était dépendante de l'état redox des cellules, mais contrairement à ce qui avait été suggéré dans les études précédentes (Bulté, Rebeillé et al. 1990 ; Finazzi, Rappaport et al. 2002) indépendante du phénomène de transition d'états (Takahashi, Clowe et al. 2013), qui implique la migration latérale des complexes antennaires au sein de la membrane.

L'association de ces antennes au Photosystème I conduirait à la séquestration, dans une même entité biochimique, des différents acteurs du mode cyclique. Cette formation de supercomplexe dans les conditions anoxiques, à fait l'objet d'une étude fonctionnelle *in vitro*, laissant quelques questions ouvertes sur leurs capacités fonctionnelles.

Ce travail de thèse présente aussi la caractérisation d'une limitation transitoire des accepteurs du Photosystème I, en début d'anoxie pendant laquelle il n'est pas possible d'observer d'oxydation de P₇₀₀, à 705 nm. Ce phénomène dû à la recombinaison de charge est créé par un engorgement du pool de NADPH.

L'oxydation spontanée du PSI au bout d'un certain temps d'anoxie implique l'induction de l'hydrogénase, acceptant les électrons du PSI. Il reste possible d'induire cette évolution de l'oxydation de P₇₀₀ lorsque les cellules sont constamment sous illumination dans les conditions anoxiques, impliquant cette fois ci, la voie de l'ATP chloroplastique. L'ATP synthétisé à la lumière permettrait la consommation de NADPH via le cycle de Benson Calvin.



Abstract

The photosynthetic process relies on an electron flow involving several complexes in the thylakoid membranes of photosynthetic organisms. This flux can follow two possibly competing pathways: the linear electron transfer through which electrons are transferred from water (which is oxidized) to NADP⁺ (which is reduced), which is coupled to the generation of a transmembrane potential difference allowing the synthesis of ATP (Allen 2002); the cyclic pathway (around PSI and Cytochrome *b₆f* complex) which only allows the production of ATP. These two pathways are thought to be essential for the reduction of CO₂ and must likely coexist to allow the photosynthetic ATP/NADPH ratio to meet the requirement of the reduction of CO₂ into carbohydrates (Seelert, Poetsch et al. 2000 ; Munekage, Hashimoto et al. 2004).

This mere statement raises the question of the mechanisms that prevail in the implication of the same actors, within the same membrane, in either one of the two functional modes. In the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*, our results show that the regulation of cyclic electron transfer is controlled by the redox poise and not by the lateral migration of antennae (Takahashi, Clowez et al. 2013), and disprove with the conclusion drawn from previous studies (Bulté, Rebeillé et al. 1990 ; Finazzi, Rappaport et al. 2002) according to which state transition would determine this switch.

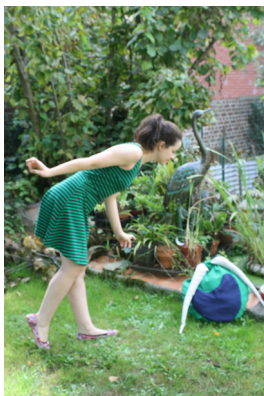
The association of these antennae to Photosystem I would promote the sequestration, within a single unit, of all the actors of the cyclic mode. Functional studies, *in vitro*, of supercomplex formation under anoxic conditions, questions on their functional capacities.

This PhD work presents also the characterization of transient “acceptor side limitation” of PSI, upon the onset of anoxia where it is not possible to observe an oxidation of P₇₀₀ in 705 nm. This phenomenon due to the charge recombination is created by an accumulation of NADPH.

The spontaneous oxidation of the PSI acceptor pool, after some time under anoxia, involves the hydrogenase induction, accepting the electrons from NADPH. It's also possible to induce this PSI oxidation as soon as cells are constantly under illumination, involving chloroplast ATP pathway. ATP synthesised in the light, allow the consumption of NADPH through Benson-Calvin cycle.







Remerciements

C'est par quelques hasards et opportunités que je me suis retrouvée au sein de l'Institut de Biologie Physico-Chimique, il y a maintenant plus de trois ans. Et j'ai très vite apprécié la chance qu'il m'ait été donné d'y être.

J'ai commencé cette aventure en stage, plongée dès la première semaine à étudier les plantes avec Pierre Joliot. A essayer de comprendre les raisonnements qu'il pouvait soutirer de ces cinétiques...

Et j'ai adoré. D'une certaine complexité en est sortie une envie de comprendre ces systèmes et de savoir les manipuler à mon tour.

Tout cela n'aurait jamais été possible si on ne m'en avait pas donné les moyens et l'envie. Il est important que les personnes ayant participé à ce grand moment de ma vie, puissent se retrouver dans ces quelques lignes.

Pour cela je tiens à remercier :

Fabrice Rappaport qui m'a encadré durant mon stage et cette thèse. J'ai toujours su mesurer la chance d'avoir eu un encadrement de cette qualité. J'ai beaucoup appris auprès de toi, non seulement sur l'interprétation de mon travail expérimental mais aussi sur mes capacités et mes lacunes qu'il me reste à corriger. Je pense que le contexte de l'encadrement est très important pour ne pas perdre espoir d'apprendre plus de ces échecs. Et cela a pu être le cas durant ma thèse.

Francis-André Wollman, pour son soucis perpétuel sur le bon déroulement de mon stage et de ma thèse. Merci de m'avoir accueilli dans ce laboratoire où j'ai pu m'épanouir et progresser tout en sentant qu'il était possible de le faire à mon rythme.

Pierre Joliot, dont les anecdotes et techniques de travail resteront gravées dans ma mémoire. Cela a été un plaisir d'avoir pu travailler avec vous et d'avoir partagé vos connaissances.

Comme vous l'avez souvent lu, la thèse est aussi construite avec les amis qui nous entourent. Et la mienne m'a donné beaucoup de bonheur dans ce domaine.

Tout d'abord, Sophie Landier, qui dès les premiers jours est venue vers moi et m'a mise en confiance. Tu es devenue une très grande amie, une confidente. J'ai toujours pu être moi-même, avec mes doutes, mes contradictions, mes peines et mes joies. Nous avons partagé des moments cruciaux qui sont arrivés dans nos vies ; Et pour cela et plein d'autres choses, tu gardes pour toujours une partie spéciale dans mon cœur.

Wojciech Nawrocki, merci d'être venu renforcer les rangs de la biophysique. D'avoir partagé cette mousse au chocolat et de partager ma vie depuis plus de deux



ans et demi maintenant. Tu es mon compagnon et mon ami de tous les jours et tu me rends très heureuse. Grâce à toi, j'ai beaucoup appris sur moi-même et que la vie peut être très belle.

C'est un grand bonheur que de vous avoir tous deux dans ma vie.

Wojciech Wietrzynski, pour ta gentillesse et ta prévenance. Je suis contente d'avoir pu faire ta connaissance. Et merci pour ton aide dans le développement de mes connaissances biochimique.

Sandrine Bujaldon, pour nos fous rires, nos conversations "philosophiques" et nos avis partagés. Cela va me manquer... Loreto Suay, merci pour nos belles conversations et tes bons conseils. Dominique Drapier, qui a toujours eu de très bonnes paroles d'une grande douceur. Je suis très heureuse de t'avoir rencontré. Katia Wostrikoff, pour ta compréhension et l'intérêt que tu as porté sur l'avancement de ma thèse. Anne Joliot, pour toutes ces paroles de gentillesse dans ces rares moments de rencontre.

Janina Steinbeck, nos discussions m'ont beaucoup apporté et rassuré sur de nombreux points, mais plus que cela tu es devenue une grande amie. Philipp Gäbelein, qui est devenu aussi un très bon ami. J'ai été ravie de travailler avec toi, je garde en tête nos discussions et nos bons moments de rigolades.

Alix Boulouis, qui a partagé avec moi quelques conseils pour aborder sereinement ma dernière année. Martin Trouillard, pour ces airs d'opéra dans les couloirs pendant mon stage de M2. Benjamin Bailleul, pour m'avoir fait réaliser (sans doute sans t'en rendre compte), tout l'intérêt et le plaisir que je porte à mon travail. Ce dernier point peut faire sourire, mais je pense qu'il n'est jamais facile d'en prendre clairement conscience. Alizée Malnoë, sur laquelle j'ai pu compter pour de précieux conseils. Fei Wang, merci pour tes petites attentions durant notre voyage, j'ai apprécié ton entrain permanent. Han yi Fu, pour avoir partagé ce voyage de dernière année et ta patience pour comprendre l'humour français et de Wojciech... Damien Godaux, pour m'avoir appris de nouvelles techniques et d'avoir partagé, lors de nos petites conversations, nos inquiétudes mais aussi les bienfaits de la thèse.

Merci à Hiroko Takahashi qui m'a permis de "faire le petit canard" afin de m'initier à la Biochimie. Olivier Vallon, pour notre collaboration mais aussi pour ta patience en m'expliquant à toutes mes présentations, les différentes topologies existantes entre gènes, nom commun, protéines... (Toujours pas sûre d'avoir bien retenu !). Danielle Basclé d'avoir toujours eu de bonnes attentions envers moi. Richard Kuras pour ces petits conseils et aides en informatique. Ainsi, que pour des anecdotes bien rigolotes ! Stefan Eberhard, pour nos grandes discussions sur la vie. Yves Choquet, pour ta jovialité et ton âme d'enfant toujours intacte. Catherine de Vitry, pour m'avoir donné un plan B qui m'aurait permis de continuer en thèse si mon plan A avait été un échec. Merci pour cette confiance et nos petites discussions.



Jean-François Berret et Adrian Daerr, qui m'ont donné l'occasion de faire des stages exceptionnels dans leurs unités et mes premiers goûts pour la science expérimentale. Je tiens aussi à remercier Anne Fillipe, avec qui j'ai eu le plaisir de faire mon enseignement, qui a pris jusqu'à la fin des nouvelles de mon moral et de mon avancement.

Luna d'avoir était mon amie et d'une aide formidable dans des moments plus que difficiles. Ainsi que Guillaume Winisdorffer, vous avez été tous les deux très importants dans ma vie. Nadine Valade et Alexis Duchesne, que j'ai eu la chance de rencontrer pendant mon tout premier stage, "les-stagiaires-dépriment@yahoo.fr" reste une très bonne expérience, et de bons fous rire ! Yara Abidine, une grande amie, qui a toujours su trouver les mots justes et les paroles réconfortantes.

Je tiens aussi à remercier ma maman et mon papa (Marie-Frédérique et Eric), ainsi que mes grands parents (Mes mamies, Dina et Jacqueline et mes papis, Eugène et Bernard) pour leurs présences continues et leurs soutiens, et en espérant qu'ils seront fiers de moi. Mais aussi de façon plus générale toute ma famille, pour leurs soucis du bon déroulement de mes études et de ma thèse.

Camille, Jean-Baptiste et Patsie, mes trois trésors. Vous avez illuminé ma vie depuis que j'ai eu le bonheur de vous avoir près de moi.

Je vous aime très fort.

Et je ne pouvais finir mes remerciements autrement que par celles sans qui la vie serait un peu moins sucrée,

Merci aux abeilles...





Sommaire

	INTRODUCTION	
I	La photosynthèse : outil énergétique	16
II	Organisme : <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17
III	Le chloroplaste	18
1	Complexes photo-réactionnels et leurs complexes pigmentaires associés	20
2	Le flux d'électron : une implication de divers complexes	22
IV	Transfert d'électrons : deux types	24
1	Flux d'électron linéaire	25
1.1	Le Photosystème II	25
1.2	Vers le complexe cytochrome b_6f	25
1.3	Vers le Photosystème I	26
1.4	Formation de NADPH et ATP	26
1.5	Production d' O_2	28
2	Flux d'électron cyclique	28
2.1	Réinjection des électrons	29
V	Changements métaboliques dans le système	31
1	Conditions oxiques	31
2	Conditions anoxiques	31
2.1	Limitation côté accepteur du PSI	32
2.2	Etudes du processus métabolique	33
VI	Formation des supercomplexes	34
1	Analyse moléculaire	34
2	Analyse fonctionnelle	35
VII	Migration des antennes mobiles collectrices de lumière (LHC II)	36
1	Commutation entre les flux d'électrons linéaire et cyclique	36
2	Les transitions d'état	36

	PROBLEMATIQUE	
	Etude de la corrélation entre la commutation LEF - CEF et la transition des antennes	
	Et contradictions bibliographiques	
		
I	Etudes de corrélation transitions d'antennes - CEF	42
1	Descriptions des résultats	43



II Constats expérimentaux – Discussion	44
III Constats contradictoires théoriques	46
1 Migration d'antenne chez les plantes	46
1.1 Transfert d'électron cyclique chez les plantes	46
2 CEF à l'état 1 chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	47



MATERIELS ET METHODES

I Mutants	51
1 Chapitre 1	51
1.1 Mutant <i>stt7-9</i>	51
1.2 Mutant <i>ptox2</i>	52
1.3 Nos études des deux mutants – Publication	53
2 Chapitre 2	54
2.1 Mutants d'hydrogénase	54
II Inhibiteurs	54
1 Le glycol aldéhyde	54
III Techniques de culture de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	56
1 Souches et conditions de cultures	56
2 Préparation des échantillons – Etudes biophysiques	56
2.1 Inhibiteurs	57
2.2 Conditions d'études	57
IV Techniques Physiques	57
1 Utilisation du JTS-10 (Joliot Type Spectrometer)	57
2 Champ électrique transmembranaire – 520 nm	58
2.1 Programmes	58
3 Oxydation de P ₇₀₀ – (705 et 735) nm	58
3.1 Programme	58
V Techniques biochimiques	58
1 Gradient de sucrose	59
2 Solutions tampons – étapes précédents l'isolation des membranes	59
2.1 Préparation des solutions tampons	59
2.2 Cultures de l'algue verte	59
2.3 Etudes en conditions anoxiques	60
3 Isolation des membranes thylacoïdales	60
3.1 Préparation	60
3.2 Casser les cellules	60
3.3 Flottaison des membranes...	60
3.4 Quantité de chlorophylle	60
3.5 Solubilisation des membranes thylacoïdales	61



3.6 Dépôts des membranes isolées sur les gradients de sucrose -----	61
4 Etudes <i>in vitro</i> - spectrophotomètre -----	61
4.1 Précision sur l'étude -----	61
VI Etude "physiologique" des algues -----	62
1 Temps de re-suspension -----	62
2 Adaptation à l'obscurité ou à la lumière -----	62
3 Etude de la concentration des cellules - test de croissance -----	64

CHAPITRE 1 : COMMUTATION CEF INDEPENDANTE DES TRANSITIONS DES ANTENNES



Mesures Biophysique et Etudes Biochimique.

I Objectifs -----	66
1 Souches utilisées -----	66
II Méthodes physiques et résultats graphiques -----	66
1 Vitesse photochimique - Mesure à 520 nm -----	66
2 Oxydation du dimère de chlorophylle, P_{700} du PSI - Mesure à (705 et 735) nm ---	71
3 Vitesse d'électron cyclique -----	73
III Conditions expérimentales -----	73
1 Conditions oxiques -----	73
2 Conditions anoxiques -----	73
IV Résultats cycliques -----	75
V Intérêt biochimique -----	78

CHAPITRE 2 : ETUDE ANOXIQUE

Partie 1 - Etude de la recombinaison de charge.



I La recombinaison de charge - Introduction bibliographique -----	84
II Observations de la recombinaison de charge -----	85
1 Variations d'absorptions -----	85
1.1 Selon l'oxydation de P_{700} -----	85
1.2 Selon les mesures ECS -----	86
2 Conditions d'études anoxiques -----	90
3 forte réduction de P_{700} en début d'anoxie - Caractérisation -----	90
III Etudes de la recombinaison de charge -----	92
1 Processus de fermentation -----	93



1.1 Introduction de l'étude de la voie de fermentation pour la ré-oxydation du NADPH -----	93
1.2 Mutant fermentatif - Analyses spectroscopiques -----	94
2 Synthèse d'ATP - Contrôle de l'oxydation par l'application de la lumière -----	96
2.1 Utilisation de l'ATP synthétisé pour la ré-oxydation du pool de NADPH --	
-----	96
2.1.1 Application de la lumière - Méthode -----	97
2.1.2 Souche mutante d'ATP synthase à la lumière -----	101
2.2 Implication d'une nouvelle voie métabolique -----	102
2.2.1 Nouveau transporteur, accepteur d'électron - l'hydrogénase ---	102
2.2.2 Application de la lumière - Mutant d'hydrogénase -----	103
2.3 Etude du temps d'oxydation de P ₇₀₀ dans les conditions anoxiques, sous illumination -----	105
3 Retour sur l'évolution spontanée d'oxydation photo-induite, des cellules à l'obscurité -----	106
3.1 Mutant d'ATP synthase - Analyses spectroscopiques -----	106
3.2 Etude du rôle de l'hydrogénase - Mutant -----	108
3.2.1 Induction de la protéine -----	108
3.2.2 Inhibition de l'hydrogénase - Cycloheximide -----	108
3.2.3 Mutant d'hydrogénase - Analyses spectroscopiques -----	111
4 Cycle de Benson-Calvin -----	113
4.1 Etude de la Rubisco -----	113
4.2 Analyses spectroscopiques - Mutant Rubisco $\Delta RbcL$ 1-7.5 -----	114
4.2.1 Evolution d'oxydation P ₇₀₀ photo-induite spontanée -----	114
IV Conclusion - Suppression de la limitation côté accepteur du PSI -----	119

CHAPITRE 3 : ETUDE ANOXIQUE

Partie 2 - Etude moléculaire et fonctionnelle des Supercomplexes



I <u>Rappel de la problématique</u> -----	122
II <u>études précédentes - Supercomplexes</u> -----	122
1 Description moléculaire -----	122
2 Etudes fonctionnelles in vitro -----	124
III <u>Protocole biochimique</u> -----	126
IV <u>Etudes des supercomplexes - vérification moléculaire</u> -----	129
1 Gradient de sucrose -----	129
2 Western blots -----	130
V <u>Etude des supercomplexes - vérification fonctionnelle</u> -----	132
1 Fluorescence à froid - 77 K -----	132



2	<i>Etude de flash – Mesures à 705 nm</i>	134
3	<i>Etude en lumière continue – Mesures à 705 nm</i>	137
4	<i>Etude en lumière continue du Cyt b₆f</i>	139
4.1	<i>Spectre de la plastocyanine – Etude</i>	141
VI	Conclusion	141
1	<i>La chaîne mitochondriale</i>	141

DISCUSSION

I	CEF-transition d'état	144
1	<i>Mécanisme de commutation vers le mode cyclique</i>	145
2	<i>Mesures du transfert d'électron cyclique</i>	145
2.1	<i>Méthode dite de la pente</i>	145
2.2	<i>Application de pulses intermédiaires – oxydation de P₇₀₀</i>	146
2.3	<i>Autres résultats - Etude bibliographique</i>	147
3	<i>Etude des mutants sans antennes LHCII</i>	147
4	<i>Migration d'antenne chez Chlamydomonas reinhardtii</i>	150
4.1	<i>Etude de la migration d'antenne</i>	150
4.2	<i>LHC II libres ?</i>	151
4.2.1	<i>Antennes quenchées – études bibliographiques</i>	151
II	Etude anoxique – Recombinaison de charge	152
1	<i>Inhibition du transfert d'électron cyclique</i>	152
2	<i>Influence de la lumière sur le mutant ATP synthase – précédent bibliographique</i>	156
III	Supercomplexes	158
1	<i>Co-migration ? – Activité ?</i>	158
1.1	<i>Transfert d'électron cyclique au sein du CEF-supercomplexe</i>	159
2	<i>Mutants de diffusion des transporteurs d'électron – formation des CEF-supercomplexes</i>	159
2.1	<i>Mutant T26 – Limitation de la diffusion entre PC et PSI</i>	159
2.2	<i>Mutant PsaC – Limitation de la diffusion entre PSI et Fd</i>	160
2.2.1	<i>Analyses spectroscopiques – Résultats préliminaires</i>	161
3	<i>Imagerie-supercomplexes</i>	162

REFERENCES

-- 166 --





Introduction

'La nature a trouvé un moyen de stocker l'énergie contenue dans les rayons du soleil atteignant la Terre. Elle a couvert l'écorce terrestre d'organismes vivants qui utilisent la lumière du soleil pour la stocker sous forme chimique'

1842, R. von Mayer, Physicien et Médecin allemand.

I La photosynthèse : outil énergétique

Cette citation évoque le processus de photosynthèse développé par un type d'organismes vivants, qui regroupe les plantes, les algues mais aussi des bactéries. Comme la représentation phylogénétique suivante le montre,

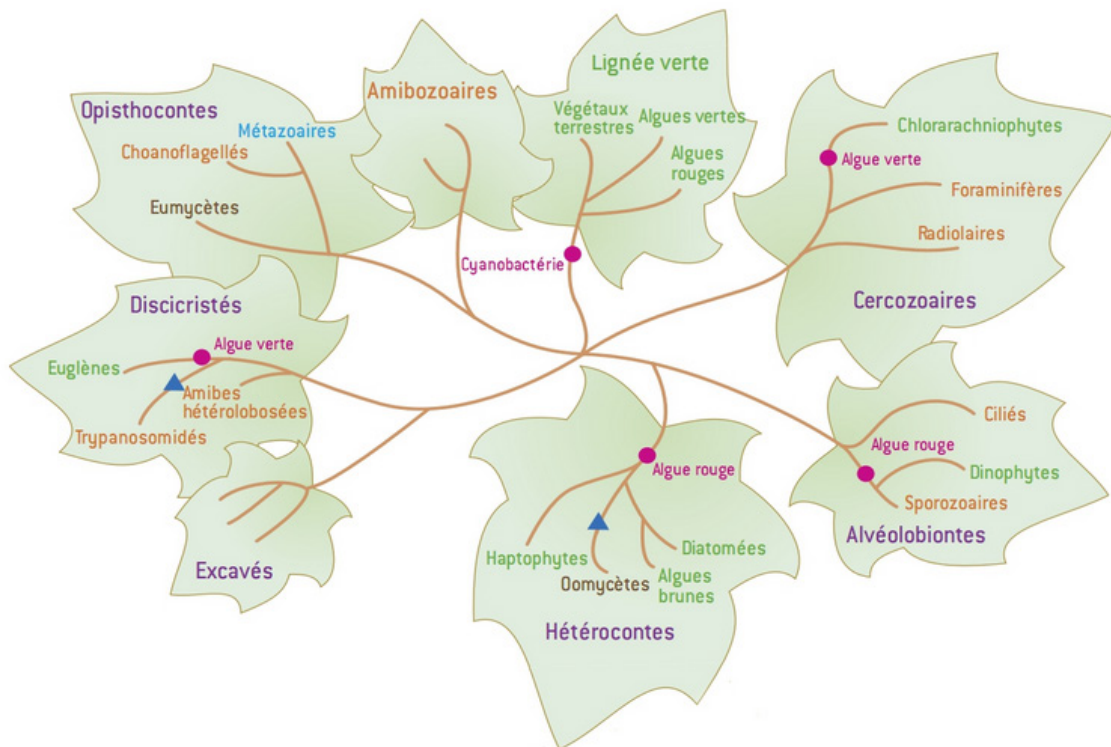


Figure 1 : Arbre phylogénétique pour les eucaryotes issue de la revue [Pour la Sciences](#) – « Animal ou végétal ? Une distinction obsolète » (2006) 350, 66-72.

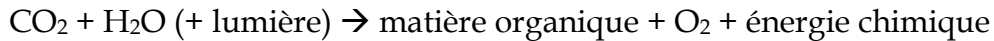
En **vert**, les lignées qui exploitent le processus photosynthétique, en **bleu** les métazoaires et en **marron** les protozoaires. Les **ronds roses** ainsi que les noms correspondant, indiquent les endosymbioses de ces derniers avec un être vivant unicellulaire photosynthétique. Et les **triangles bleus**, représentent les lignées qui sont issues d'un ancêtre commun ayant perdu leur chloroplaste.

La photosynthèse consiste à réduire le dioxyde de carbone de l'atmosphère ou du milieu ambiant par l'eau, absorbée par les racines pour les végétaux, à l'aide de

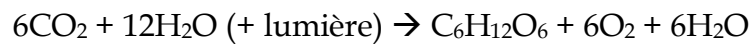


l'énergie solaire captée avec libération d'oxygène et cela dans le but de produire entre autre des glucides.

La première équation pour définir la photosynthèse a été établie en 1864 par R. von Mayer, comme :



Elle traduit un échange gazeux entre les milieux externe et interne des organismes dits photosynthétiques. Cette équation s'est affinée dans sa définition, tel que le bilan de la photosynthèse oxygénique s'écrit :



Où $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ est une molécule de glucide, énergie stockée sous forme chimique utilisable par les mécanismes cellulaires.

L'étude de la fonction et de la mise en place de l'appareil photosynthétique, se fait au sein de notre laboratoire, dans une dynamique pluridisciplinaire, soit abordant les domaines physique, chimique et biologique, et cela dans le but d'étudier les questions que posent les diverses fonctions physiologiques.

II Organisme : *Chlamydomonas reinhardtii*

L'organisme de prédilection de notre laboratoire est *Chlamydomonas reinhardtii*, qui est un modèle d'un grand intérêt : conditions de culture simples, croissance rapide (cycle de 8 à 12 heures) et grande palette d'outils génétiques mise à la disposition des chercheurs.

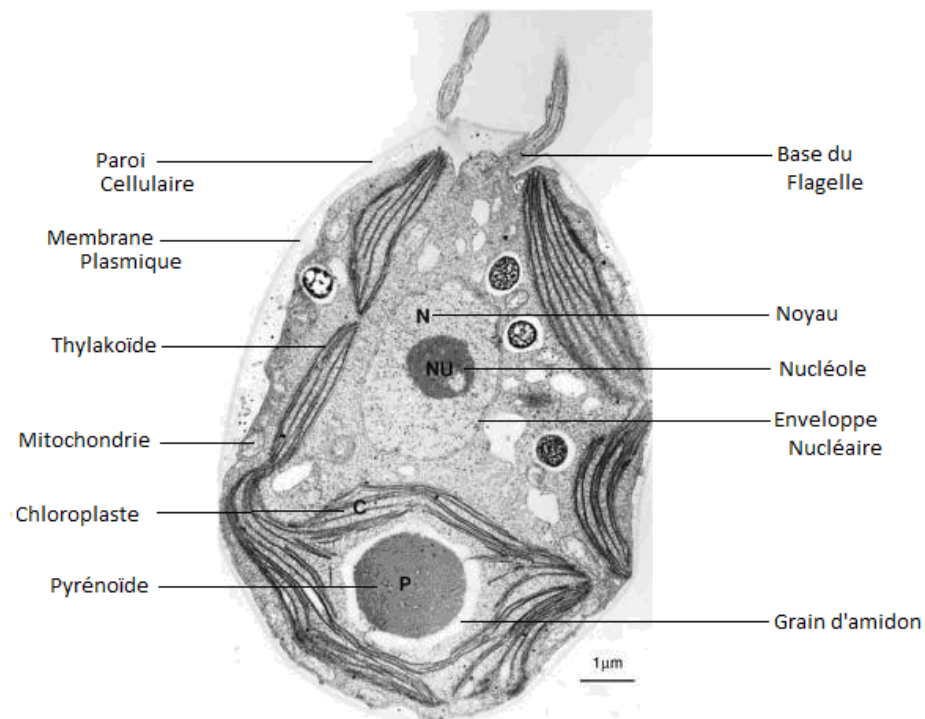


Figure 2 : Section médiane montrant la structure d'une cellule mature de *Chlamydomonas reinhardtii*. Issue du livre [The Chlamydomonas Sourcebook, volume 1: Introduction to Chlamydomonas and its Laboratory Use](#) (E.H. Harris, 2009, seconde édition Harris).

Chlamydomonas reinhardtii est une algue verte unicellulaire d'eau douce, eucaryote, d'environ 10 μm de diamètre, dont le volume typique observé varie entre 50 et 80 μm^3 . Mobile grâce à ses deux flagelles qui lui permettent d'évoluer dans son milieu. Sur la coupe de la figure 2, il est possible d'observer le noyau et les différents organites de la cellule photosynthétique. Nous trouvons dans le chloroplaste, les membranes thylacoïdales mais aussi le pyrénoïde, qui est une structure protéique entourée de grain d'amidon ce qui constituerait une réserve alimentaire pour la cellule. Il concentre les enzymes responsables de la photosynthèse, notamment la Rubisco, enzyme permettant la fixation du dioxyde de carbone. Elle contient aussi quelques mitochondries, qui comme le chloroplaste, a une origine endosymbiotique, et vient d'anciennes bactéries phagocytées par l'organisme. Leurs rôles est très important puisqu'elles font parties des organites qui produisent l'énergie, sous forme d'ATP, nécessaire au fonctionnement de la cellule, comme le mouvement des flagelles de *Chlamydomonas*.

Il s'agit d'une algue verte dite photo-autotrophe, c'est-à-dire qu'elle est capable de transformer le carbone minéral présent dans le milieu environnant et cela en utilisant la lumière comme seule source d'énergie. Mais l'avantage de cet organisme et sa facilité d'utilisation réside dans sa capacité d'être autotrophe facultatif, dans la mesure où, en l'absence de lumière, *C. reinhardtii* peut assimiler des molécules organiques. Elle peut donc croître à la fois par le biais de la photosynthèse par la fixation de dioxyde de carbone mais aussi sans utiliser celle-ci, en présence d'acétate comme seule source de carbone réduit, rendant possible l'étude des mutants affectés dans la fonction photosynthétique.

III Le chloroplaste

Nous pouvons voir sur la figure 2 (précédente) que du point de vue photosynthétique, *Chlamydomonas reinhardtii* ne possède qu'un unique chloroplaste qui occupe la plus grande partie de la cellule, soit de 39 % à plus de 42 % environ du volume total. Les chloroplastes possèdent leur propre matériel génétique et sont entourés par une enveloppe constituée de deux membranes, externe et interne.



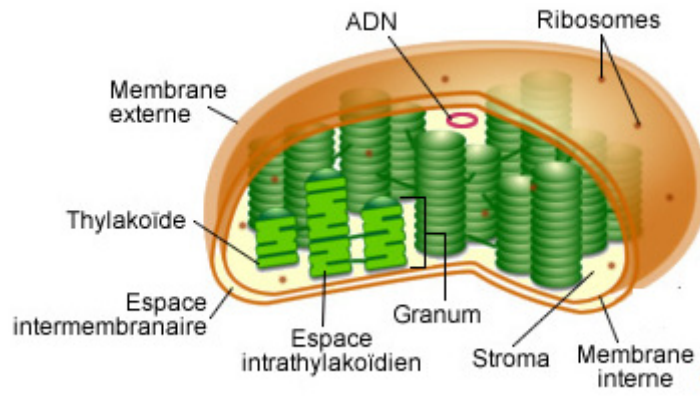


Figure 3 : Représentation schématique des chloroplastes dans les organismes photosynthétiques, issue du site internet <http://www.cours-pharmacie.com/biologie-vegetale/la-photosynthese.html>, production de Chantal Proulx.

A l'intérieur de ces chloroplastes, nous trouvons les thylacoïdes (en vert sur la figure 3) : sortes de vésicules aplaties composées d'empilement de disques eux-mêmes composés de feuilletts lipidiques, dont le milieu interne est appelé le lumen et externe le stroma.

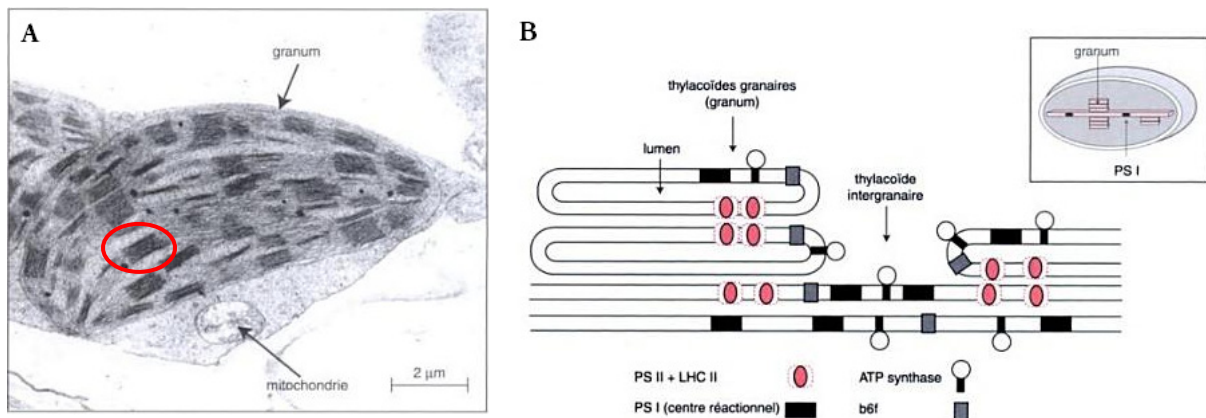


Figure 4 : **A**, structure d'un chloroplaste entier par microscopie électronique chez une plante, présentation des grana dans le **cercle rouge**. **B**, Structure d'un thylakoïde avec localisation des divers complexes protéiques impliqués dans le processus photosynthétique. Issue du livre *La photosynthèse, Processus physiques, moléculaires et physiologiques*, de J. Farineau, J.-F. Morot-Gaudry, (éditions Quae 2001) ; (Schliephake, Junge et al. 1968).

Chez *Chlamydomonas*, les thylacoïdes peuvent être arrangés en piles de 2 à 10 disques mais non sous forme de grana (i.e. multidisques) comme chez les plantes supérieures, (figure 4A dans le cercle rouge).

Les membranes thylacoïdales des chloroplastes sont le siège des deux étapes essentielles de la photosynthèse : la conversion de l'énergie par le transfert



d'électrons dans des chaînes de cofacteurs d'oxydoréduction et la phase métabolique où il y a assimilation de CO₂.

1 Complexes photo-réactionnels et leurs complexes pigmentaires associés

Deux types de Photosystèmes sont distingués dans cette chaîne photosynthétique, dit respectivement PSI et PSII. Ils sont tous les deux responsables de la capture de l'énergie lumineuse et de sa conversion en énergie électrochimique. Ces deux Photosystèmes réalisent la photosynthèse par le transport d'électrons en série, de l'eau au NADP⁺ (Duysens, Ames et al. 1961, Kok 1961, Witt, Mueller et al. 1961). De façon importante, il a été montré que les organismes photosynthétiques présentent une hétérogénéité dans la distribution latérale de ces deux Photosystèmes, cette dernière est schématisée à la figure 4B.

Le PSII est localisé principalement dans les régions où les membranes sont accolées. Contrairement, le PSI se trouve exclusivement présent dans les régions non accolées des membranes thylacoïdales, c'est-à-dire dans les zones exposées aux stromas (Andersson and Anderson 1980, Vallon, Bulte et al. 1991).

Les membranes thylacoïdales n'absorbent que très faiblement les radiations vertes (vers 520-550 nm). Elles sont composées entre autre, de systèmes LHC (Light Harvesting Complex) qui renferment des pigments, comme la chlorophylle, enchâssés dans des protéines membranaires (LHCI ou LCHII). Ces systèmes constituent des antennes collectrices de l'énergie lumineuse et elles se retrouvent autour des deux Photosystèmes.

La figure 5 suivante montre le fonctionnement d'une unité photosynthétique. Lorsque la chaîne photosynthétique est exposée à l'énergie lumineuse véhiculée par les photons, particules élémentaires sans masse, ce dernier se trouve absorbé par une molécule de pigment photosynthétique. Cette dernière passe dans son état excité, et cette énergie excitonique va migrer à travers le complexe pigmentaire antennaire avant d'arriver au centre réactionnel lui-même. Celui-ci constitue une structure pigmentaire particulière de deux molécules de chlorophylle qui a la propriété de céder un électron, par le fait qu'elle a dans son voisinage un cofacteur redox capable de prendre les électrons, c'est la définition de la séparation de charge.

Ainsi l'énergie du photon est convertie en énergie électrochimique et c'est la répétition de cette séquence d'événement qui engendre un flux d'électrons à travers la chaîne photosynthétique. L'électron va donc pouvoir être transféré à différents complexes composant la chaîne d'oxydoréduction et permettre, en bout de chaîne, l'accumulation de pouvoir réducteur sous forme de NADPH.



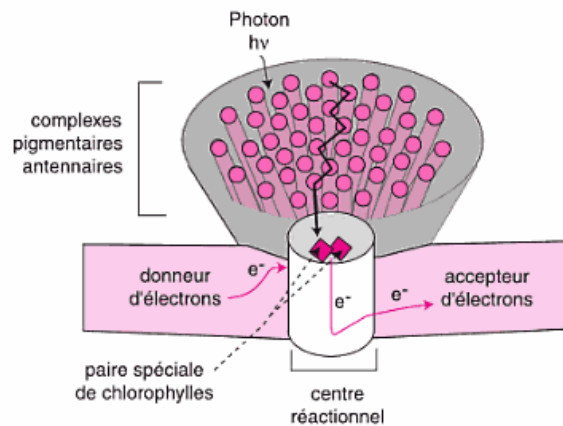


Figure 5 : Fonctionnement d'une unité photosynthétique. Représentation du fonctionnement des complexes antennaires : conversion de l'énergie d'un photon capté en énergie électrochimique, issue du livre [La photosynthèse, Processus physiques, moléculaires et physiologiques](#), de J. Farineau, J.-F. Morot-Gaudry, (éditions Quae 2001).

Le PSII est composé de trois domaines protéiques : Les antennes LHCII, associées à des molécules de chlorophylle a et b et des carotènes. Mais aussi des protéines (CP43 et 47) qui composent les antennes « internes » associées aux cœurs du PSII. Et enfin, le centre réactionnel composé de deux sous-unités majeures protéiques D1 et D2, ainsi que la structure permettant la conversion photochimique, appelé P_{680} . Alors que le PSI est composé d'une antenne et d'un centre réactionnel dont le donneur primaire d'électron est appelé P_{700} .

Les structures résolues de ces deux complexes révèlent une composition de multiple sous-unités, pigments et de cofacteurs redox, dont ces derniers présentent une hétérogénéité dans leurs milieux de synthèse : nucléaire ou chloroplastique (voir pour une revue ([Eberhard et al. 2008](#))). L'absence de certaines de ces sous-unités, dans le cas du PSI, peut interférer dans l'attachement des antennes LHCI, mais aussi de celles mobiles LHCII ([Ozawa, Onishi et al. 2010](#)).

Comme nous l'avons vu, l'absorption d'un photon permet la formation d'un état excité et l'énergie ainsi transitoirement stockée correspond à la longueur d'onde du photon absorbé. De façon encore plus importante du point de vue de la photochimie, elle diminue l'énergie de liaison de l'électron ayant changé d'orbitale et génère donc ainsi une espèce puissamment réductrice, l'état excité noté P^* . Son oxydation produit la forme oxydée, notée P^+ , si bien que le pigment ayant absorbé un photon présente trois états différents : l'état fondamental P , l'état excité P^* et l'état oxydé P^+ . Ces trois états correspondent à deux couples redox P^*/P^+ et P/P^+ , et la différence entre les potentiels de demi réduction de ces deux couples est l'énergie du photon absorbé.



Ainsi pour le Photosystème II, le couple P_{680}^*/P_{680} est un réducteur puissant de potentiel estimé entre -600 et -700 mV et le couple P_{680}/P_{680}^+ est un oxydant puissant de potentiel 1100 et 1300 mV. Pour le Photosystème I le potentiel du couple P_{700}^*/P_{700} est entre -1250 et 1350 mV, et se situe entre +430 et +450 mV pour le couple P_{700}/P_{700}^+ (Antal, Kovalenko et al. 2013).

2 Le flux d'électrons : une implication de divers complexes

Il est possible de décrire ce flux d'électrons à travers la chaîne photosynthétique par le transfert des électrons et des photons entre le PSII (structure (Ferreira, Iverson et al. 2004)) qui réalise l'oxydation de l'eau et le PSI (structure (Amunts, Drory et al. 2007)) se fait par l'intermédiaire du complexe cytochrome b_6f (structure (Stroebel, Choquet et al. 2003)) dont la distribution est homogène dans les membranes thylacoïdales. Ce transfert est possible via le pool de plastoquinone noté PQ, transporteur hydrophobe entre le PSII et le cyt b_6f , et la plastocyanine noté PC, transporteur soluble entre le cyt b_6f et le PSI.

Par la suite, l'ATP-synthase (structure (Seelert, Poetsch et al. 2000)) qui est une enzyme qui fonctionne comme un rotor pas à pas mu par la différence de potentiel électrochimique transmembranaire pour les protons, permet la synthèse d'ATP lorsque le système est illuminé (Arnon, Whatley et al. 1955 ; Bishop and Gaffron 1962). Son fonctionnement est réversible, il est en effet possible d'hydrolyser l'ATP formant ainsi de l'ADP et du phosphate inorganique (Pi) en générant, plutôt que consommant, une différence de potentiel transmembranaire.

Ensuite, nous trouvons le cycle de Benson-Calvin qui va permettre la fixation du dioxyde de carbone et sa formation en composés organiques utilisables par l'organisme, et cela en utilisant l'énergie à disposition : l'ATP et le NADPH.



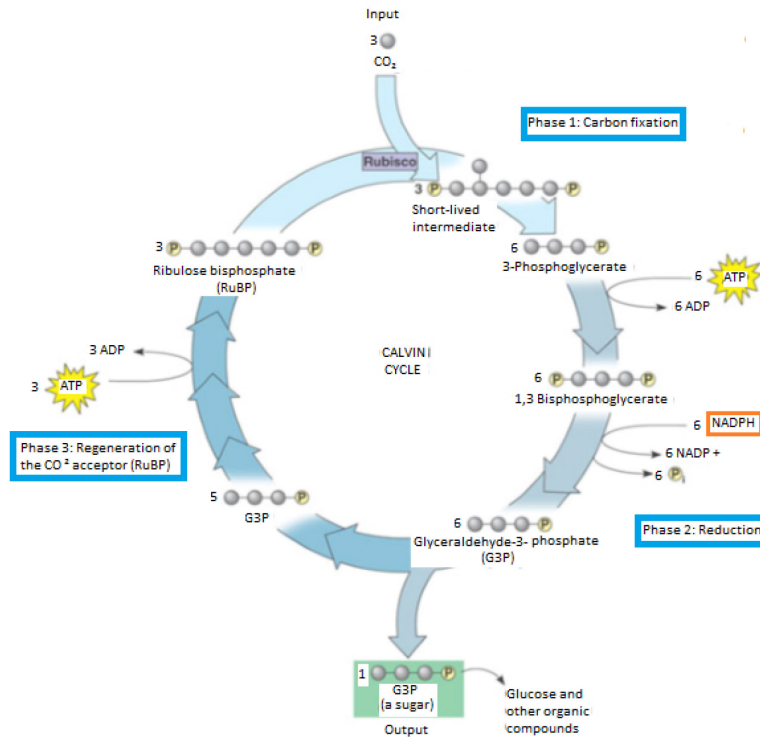


Figure 6 : Schéma des différentes étapes du cycle de Benson-Calvin chez les organismes photosynthétique, dans la consommation d'ATP -NADPH pour la fixation et la métabolisation d'une molécule de carbone en fin de cycle.

Ainsi, par l'intervention de deux réactions photochimiques en séries (aux niveaux des PSII et PSI) qui permettent de 'remonter les potentiels' en sens inverse de celui thermodynamiquement favorable et l'intervention des différents facteurs décrits de la chaîne photosynthétique, les électrons extraits de l'eau peuvent être transférés au NADP⁺ et enfin au CO₂. C'est ce que décrit le schéma dit en Z, suivant, où nous retrouvons le transport énergétique à travers les différents acteurs de la chaîne photosynthétique,



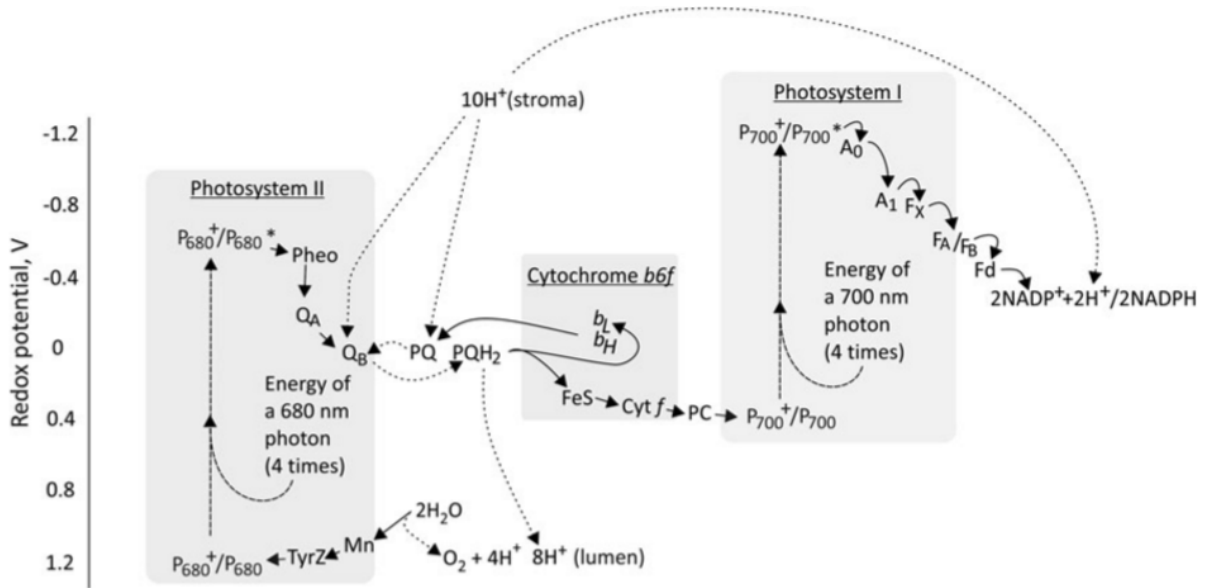


Figure 7 : Transferts d'électrons linéaire et cyclique dont les composés sont présentés sur une échelle de potentiel redox, schéma issu de la référence (Antal, Kovalenko et al. 2013).

IV Transfert d'électrons : deux types

Le processus photosynthétique se traduit par des flux d'électrons à travers les différents complexes qui composent les membranes thylacoïdales des chloroplastes. Ces derniers peuvent fonctionner selon deux modes dits linéaire (LEF) et cyclique (CEF), schématisés sur la figure suivante,

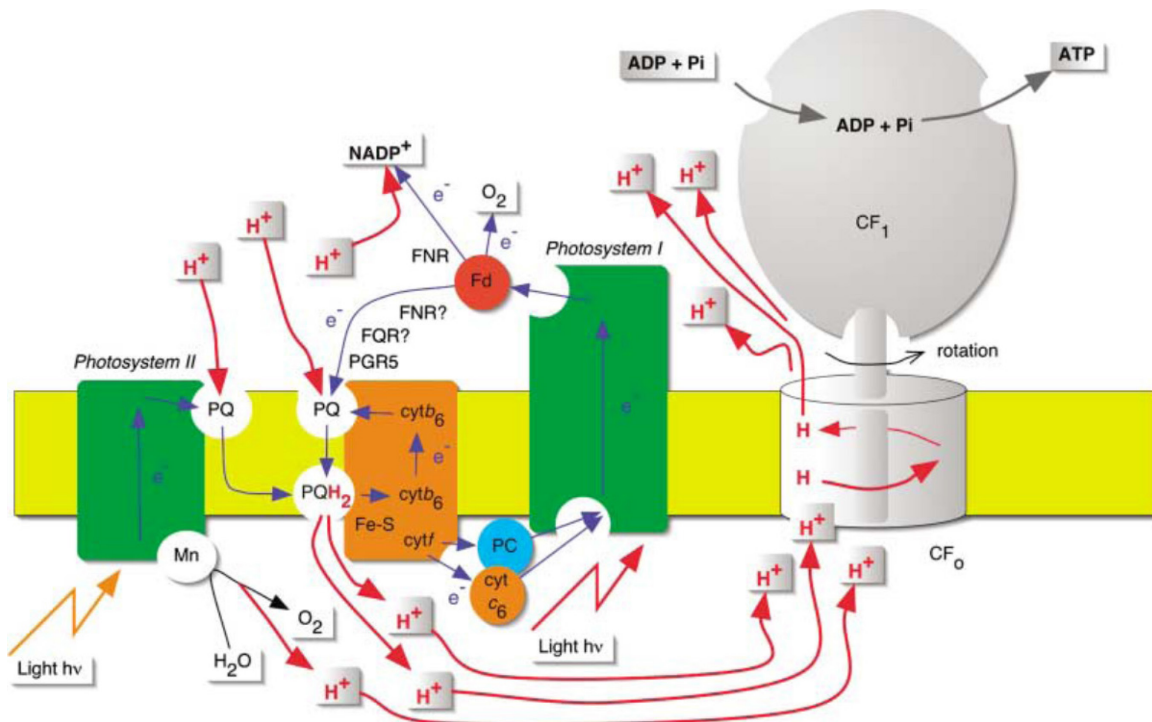


Figure 8 : Schématisation du transfert d'électron linéaire et cyclique après illumination et absorption des photons par les antennes (tracé **éclair orange et rouge**), tracé en **bleu**, à



1 Flux d'électrons linéaire

1.1 Le Photosystème II



Après la photo-oxydation de P₆₈₀, les électrons sont transmis à une phéophytine et enfin aux deux quinones Q_A puis Q_B, accepteur à deux électrons et deux protons (Zouni, Witt et al. 2001 ; Kamiya and Shen 2003), pour être transférés hors du PSII vers le pool de PQ.

1.2 Vers le complexe cytochrome b_6f

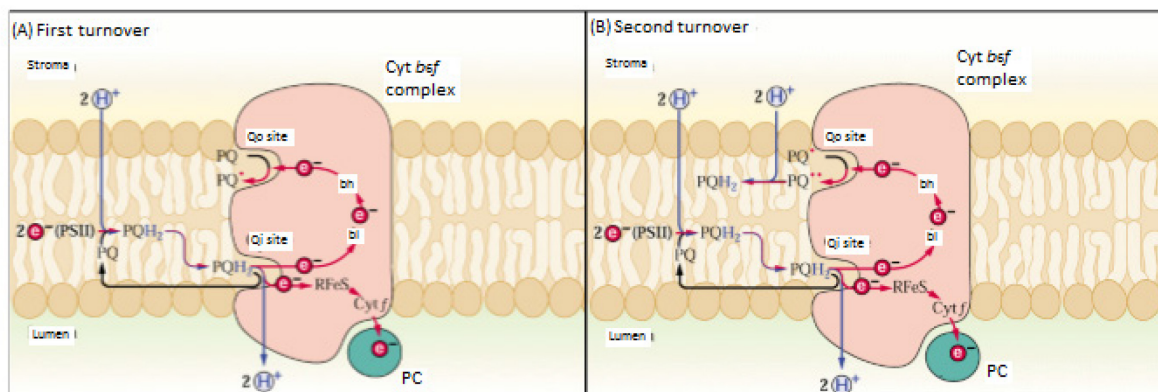


Figure 11 : Schéma représentant le complexe cytochrome b_6f .

Les électrons ainsi transférés au pool de plastoquinones, transporteurs solubles dans la membrane, vont permettre la réduction, sans apport d'énergie, du complexe cytochrome b_6f . En effet le transfert des électrons entre les composés intermédiaires redox s'effectue spontanément, comme le montre le schéma en Z à la figure 7 ; les électrons étant transférés dans le sens des potentiels croissants, ce qui est thermodynamiquement favorable. Une partie de l'énergie libre étant alors utilisée pour le transfert de protons de part et d'autre de la membrane.

Le complexe cyt *b₆f* possède deux sites : l'un côté luménale, noté Qo pour proton output, qui est le site de libération des protons à partir des quinones réduites (quinol QH₂) et l'autre vers le stroma, noté Qi pour proton input (figure 11). Ce processus décrit comme le cycle Q (Mitchell. 1975a ; Mitchell. 1975b ; Cape, Bowman et al. 2006) fait intervenir des sites qui permettent à la fois l'échange d'électron et de proton.

De plus, dû au fait que le temps de transfert des électrons et de protons des plastoquinones réduites au complexe cyt b_6f est lent, soit 10 ms, cette étape est considérée comme étant l'étape limitante de la chaîne photosynthétique.

1.3 Vers le Photosystème I

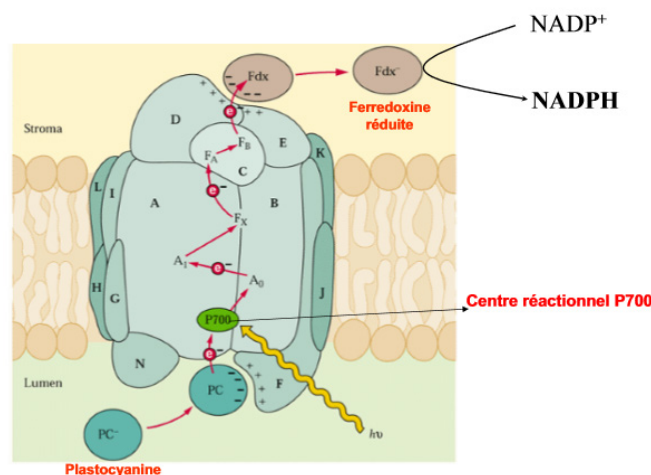


Figure 12 : Schéma simple représentant le Photosystème I.

C'est par un autre transporteur mobile soluble dans le lumen, la plastocyanine, que les électrons sont transférés vers le Photosystème I. Basé sur la figure 12, après l'absorption d'un photon au niveau des antennes LCH du PSI, l'état P_{700}^* est atteint et constitue un puissant réducteur qui va réduire l'accepteur primaire du PSI, nommé A_0 et produire l'oxydant P_{700}^+ . Ensuite, les électrons sont transférés à une paire phylloquinone A_1 , puis aux centres fer-soufre respectivement, F_x , F_A et F_B avant de quitter le Photosystème I pour réduire la ferrédoxine (Tagawa, Tsujimoto et al. 1963).

1.4 Formation de NADPH et ATP

La ferrédoxine, protéine soluble hydrophile à centre fer-soufre, va donc être réduite et va pouvoir à son tour distribuer les électrons à un complexe du stroma, la ferrédoxine-NADP⁺ réductase (FNR) (figure 8). Finalement, l'électron arrive sur le



NADP⁺, qui avec la consommation d'électrons et de protons, donne lieu à la production de NADPH, selon la formule suivante, qui avec l'énergie lumineuse donne : $2e^- + 2H^+ + NADP^+ \rightarrow NADPH + H^+$. Il est notamment montré que le pool de NADPH est un donneur d'électron dans plusieurs processus métaboliques ([Godde and Trebst 1980](#)).

Ce transport d'électrons génère une différence de potentiel électrochimique transmembranaire de protons. Cette force proton-motrice est utilisée pour le fonctionnement de l'ATP synthase, complexe enzymatique intra-membranaire responsable de la synthèse d'ATP.

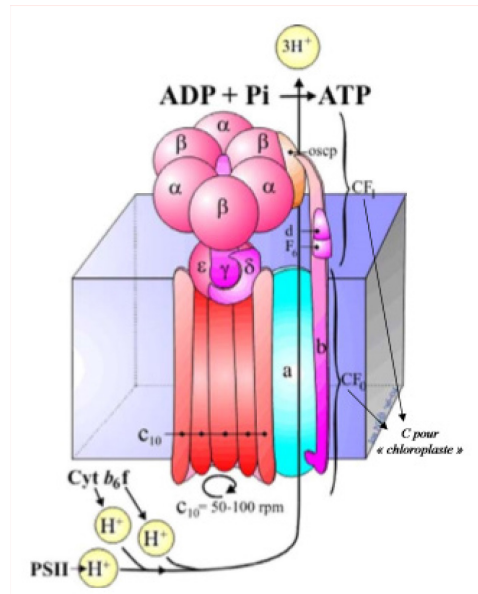


Figure 13 : Schéma représentant le complexe d'ATP synthase.

Selon les données structurales de l'ATP synthase ([Abrahams, Leslie et al. 1994](#)) qui présente une symétrie rotationnelle, les changements conformationnels dans chacun des trois hétérodimères αβ induits par la rotation de l'unité catalytique β, permet par une rotation de 360° de ce dernier la production de trois molécules d'ATP.

Certains complexes impliqués dans le transfert des électrons dans la chaîne participent au pompage de protons. En effet, à chaque réaction d'électrons peut être associée un pompage de proton, dont les mécanismes de translocations diffèrent en fonction des complexes.

Sachant que pour une rotation de 360°, 14 protons sont nécessaires, alors 4,7 protons sont nécessaires pour la synthèse d'une molécule d'ATP, ainsi que 6 protons transférés de part et d'autre de la membrane pour la formation d'une molécule de NADPH.

Selon une estimation du nombre de protons transférés par un électron, le flux d'électron linéaire allant de l'eau au NADP⁺, permet le transfert transmembranaire de douze protons correspondant alors à la formation de 2,55 ATP pour deux NADPH.

1.5 Production d'O₂



Pour finir, la production d'ATP et de NADPH sont utilisées pour le fonctionnement du cycle de Benson-Calvin qui aboutit à la fixation de molécule de carbone. Il a été montré que la métabolisation d'une molécule de dioxyde de carbone requiert au total trois ATP et deux NADPH ([Calvin. 1962](#)). Selon ces calculs il est donc montré qu'avec uniquement le fonctionnement du transfert d'électrons en mode linéaire, il y a un déficit en ATP par rapport au NADPH qui doit être compensé par un autre mécanisme capable de produire de l'ATP avec ou sans consommation de NADPH. Il est possible d'invoquer la respiration mitochondriale : celles-ci présentes dans l'organisme peuvent consommer le NADPH et l'oxygène, permettant ainsi la production d'ATP, selon la formule, $\text{NADH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} + \text{ATP}$. Une autre hypothèse est que les électrons suivent un autre type de transfert, dit cyclique, comme le montre la figure 14, présentée dans la partie suivante, qui résume les deux types de transferts d'électron et leurs applications.

2 Flux d'électrons cyclique

De nombreuses discussions dans la littérature se penchent sur la question de savoir si le ratio ATP / NADPH généré par le transfert d'électrons linéaire satisfait la fixation du carbone, pour une revue sur le sujet voir ([Allen. 2002](#)). Ce qui est certain c'est que ce déficit pourrait être comblé par la respiration puisque les mitochondries sont impliquées dans de nombreux échanges redox entre ces derniers et les chloroplastes. Celles-ci permettent de fournir de l'énergie au(x) chloroplaste(s) par le transport des électrons respiratoire dans les mitochondries ([Marcel, Hoefnagela et al. 1998](#)).

Cependant, il est également possible de produire de l'ATP sans production de NADPH, selon un transfert d'électrons cyclique dans lequel les électrons produits par la séparation de charge reviennent au donneur primaire ; ce retour étant associé à un transfert de protons. Ce flux cyclique a été établi dans les conditions anaérobiques, par Arnon et al. où ils montrent la production d'ATP sous illumination d'un système composé exclusivement de PSI et de complexe cyt b_6f , ([Arnon, Whatley et al. 1955](#)). Dont la participation de la ferrédoxine à ce transfert d'électron est montrée plus tard par Tagawa & al. ([Tagawa, Tsujimoto et al. 1963](#)).



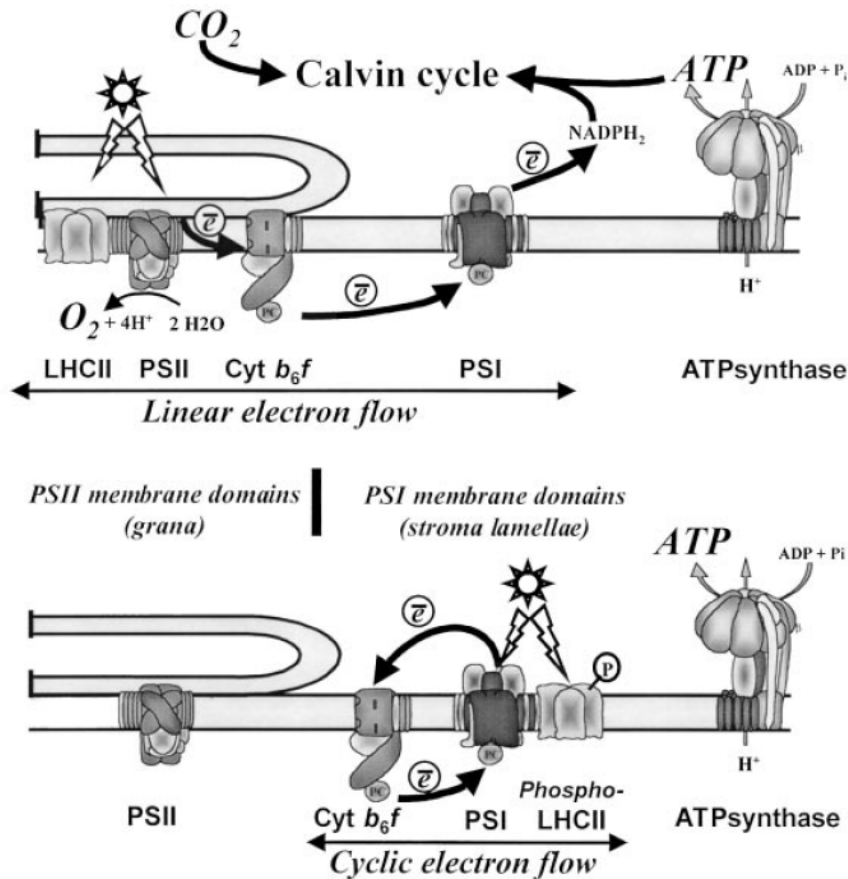


Figure 14 : Représentation des deux types de transferts d'électrons identifiés dans la chaîne photosynthétique, linéaire et cyclique, faisant intervenir les différents complexes photosynthétiques. Les **flèches noires** traduisent les transferts des électrons ; issue de (Wollman, 2001)

2.1 Réinjection des électrons

Au sein de la chaîne photosynthétique, le transfert cyclique se déroule autour du complexe PSI et d'un cytochrome b_6f , comme schématisé sur la seconde représentation de la figure 14. Les chemins empruntés dans ce mode dit cyclique sont décrits par plusieurs hypothèses comme je le discute par la suite.

Une possibilité est que les électrons arrivés et produits par le PSI peuvent être réinjectés par la ferrédoxine dans le cytochrome b_6f (Huber and Edwards, 1976, Malkin and Chain, 1980) avant de revenir par la plastocyanine dans le PSI, provoquant le transfert additionnel de protons dans le lumen et permettant donc la synthèse de nouvelles molécules d'ATP sans accumulation de pouvoir réducteur. D'autres rapports discutent les chemins de réinjections des électrons dans la chaîne après avoir quitté le Photosystème I. Notamment par la démonstration que la Fd et le NADPH peuvent délivrer les électrons au niveau du pool de PQ (Bukhov and Carpentier, 2004). L'idée générale étant que le transfert des électrons se fait de la ferrédoxine au pool de plastoquinone par l'intermédiaire de la FNR (Arnon, Allen et al. 1954).

Une autre hypothèse implique deux protéines de la chaîne respiratoire, dans la membrane thylacoïdale de Chlamydomonas, jouant un rôle dans le contrôle de l'état redox du pool de plastoquinone. Dans un premier temps, PTOX qui est une oxydase



cette optique, le transfert d'électron cyclique reste un processus jouant un rôle important dans le métabolisme cellulaire des cellules végétales, par sa capacité à permettre la synthèse d'ATP et donc à consommer l'excès de pouvoir réducteur produit par le flux linéaire, pour la fixation du carbone.

Cela est discuté dans l'article de Baker, N.R. & al. ([Baker, Harbinson et al. 2007](#)), où est présenté l'importance que les organismes photosynthétiques aient recourt à des mécanismes pouvant modifier la provision d'ATP et de NADPH présents dans le système chloroplastique, pour faire face aux changements des demandes métaboliques.

V Changements métaboliques dans le système

Dans les conditions environnementales naturelles, les organismes photosynthétiques tels que les algues, sont soumis à de fortes variations, notamment dans les quantités d'oxygène ambiant et d'intensité lumineuse. Il est alors évident que pour faire face à ces changements fréquents et souvent brusques, ces organismes aient développé des mécanismes permettant d'y acclimater leur métabolisme. Parmi ceux-ci, des modifications structurales dans leurs chaînes mitochondriale et chloroplastique figurent en bonne position.

1 Conditions oxygènes

Dans la situation où les organismes sont en présence d'oxygène, le fonctionnement de la chaîne respiratoire est optimal. Quant au chloroplaste, le pool de PQ est oxydé, permettant la capture des photons par les antennes LHC II et le transfert des électrons par le Photosystème II, à travers les complexes de la chaîne photosynthétique en mode linéaire et cyclique.

Cette condition peut être considérée comme extrême, puisque dans un environnement naturel il est plus que probable que les algues soient soumises à des situations bien plus fluctuantes, constituant un entre deux intermédiaire entre conditions oxygènes et anoxiques.

2 Conditions anoxiques

La condition que représente la privation d'oxygène, pose des questions au niveau de l'adaptation et de la capacité de survie de *Chlamydomonas reinhardtii* entre autres, dans ces types d'environnements.

Dans les conditions privées d'oxygène, la chaîne respiratoire s'arrête, stoppant les échanges entre les mitochondries et le chloroplaste notamment dans l'apport énergétique en ATP.

2.1 Limitation côté accepteur du PSI



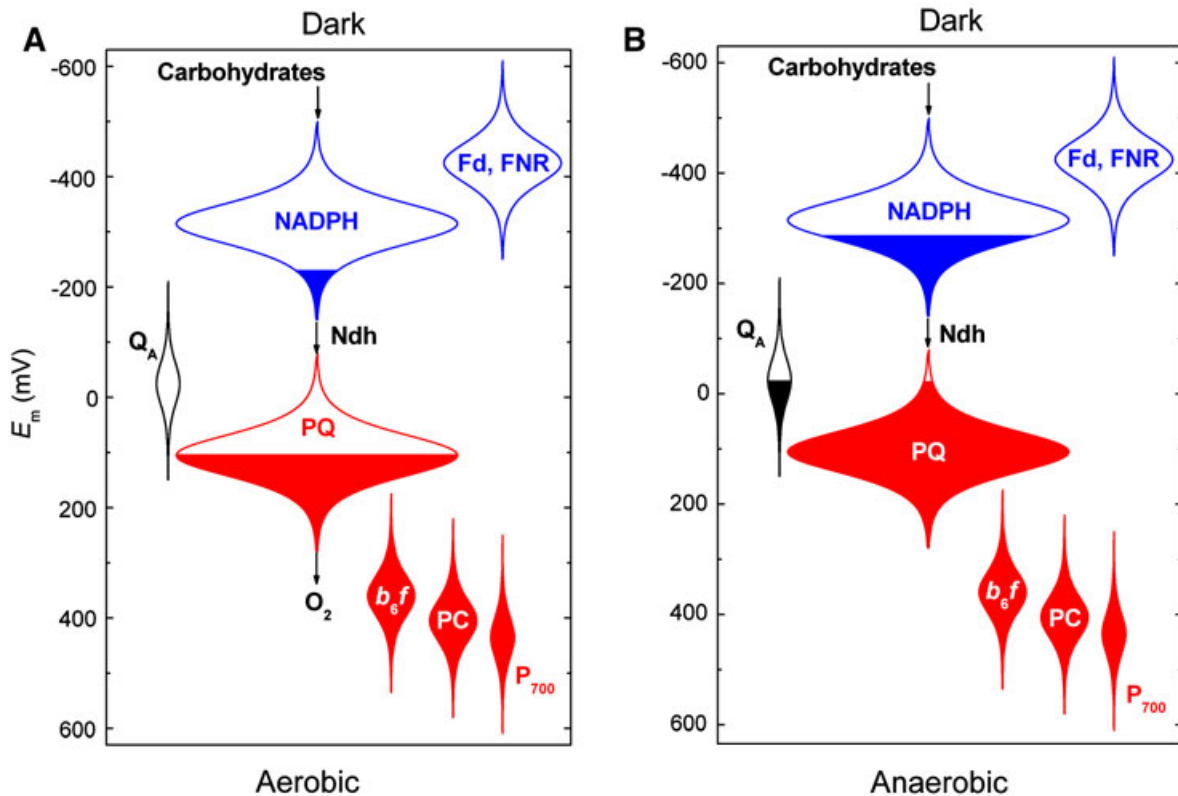


Figure 16 : Schématisation des états redox des différents composants transporteurs d'électrons, dans les deux types de conditions (A) aérobique et (B) anaérobique. L'état réduit est figuré en **rouge** alors que l'état oxydé est figuré en **bleu**. Représentation dans le cas où les organismes sont à l'obscurité. Issue de la référence (Alric. 2010).

De plus, comme le montre la figure 16 ci-dessus, ces événements impactent aussi l'état redox des complexes de la chaîne photosynthétique, et dans une forte mesure la réduction significative du pool de plastoquinones, et donc de Q_A , à l'obscurité. Cette forte réduction tend à augmenter l'accumulation de pouvoir réducteur risquant son engorgement, bien que les accepteurs ne soient pas complètement réduits à l'obscurité (Alric. 2010). Il a été montré que la réduction complète du pool de PQ, chez *Chlamydomonas*, intervenait en seulement 10 minutes d'anoxie (Bennoun. 1982), il en est de même chez les plantes sous les mêmes conditions (Toth, Schansker et al. 2007).

De telles conditions semblent limiter le transport d'électrons linéaire par le fort état réduit des accepteurs d'électrons aux niveaux des Photosystèmes II. De plus, une déficience dans la régulation côté accepteur, limiterait le processus de transport d'électrons cyclique dans le système dominé alors par les back réactions (Heathcote. 1985) au niveau du PSI, si comme souligné ci-dessus un engorgement du pool de NADPH a lieu (figure 16).

De nombreux rapports font état de cette limitation des centres réactionnels du PSI par un petit nombre d'accepteurs d'électrons du côté stromal (Baker, Harbinson et al. 2007 ; Alric. 2010 ; Alric, Lavergne et al. 2010 ; Collins, Redding et al. 2010). C'est d'ailleurs ce que suggère l'étude de Klein, U. & al, indiquant que durant l'anaérobiose, les équivalents réduits sont accumulés plus rapidement qu'ils ne peuvent être consommés (Klein and Betz 1978).



Toutes ces observations précédentes montrent qu'il est difficile d'évaluer l'efficacité du CEF dans les conditions anaérobiques, en utilisant les mesures de P_{700} , puisqu'il ne semble alors pas probable qu'assez de P_{700}^+ soient accumulés sous de telles conditions. Ce dernier point sera discuté de façon plus approfondie dans le présent manuscrit, puisque son étude constitue un des chapitres de cette thèse.

2.2 Etudes du processus métabolique

Au-delà d'une modification des états redox des complexes protéiques composant la chaîne photosynthétique, il se développe un propre état métabolique dans les conditions de variation de l'oxygène. L'inhibition de la respiration mitochondriale comme dans les conditions anaérobiques, amène la dégradation d'amidon ([Gfeller and Gibbs 1984](#)), mais aussi des lipides, dont la destruction produirait la majorité du NAD(P)H, dans les cellules, quand celles-ci sont altérées dans d'autres réserves majeures, comme l'amidon et l'acétate ([Johnson and Alric 2012](#)). Cela en vue, de répondre aux privations en nutriments externes, que les cellules rencontrent dans un environnement qui serait parfois considéré comme hostile à tout organisme vivant.

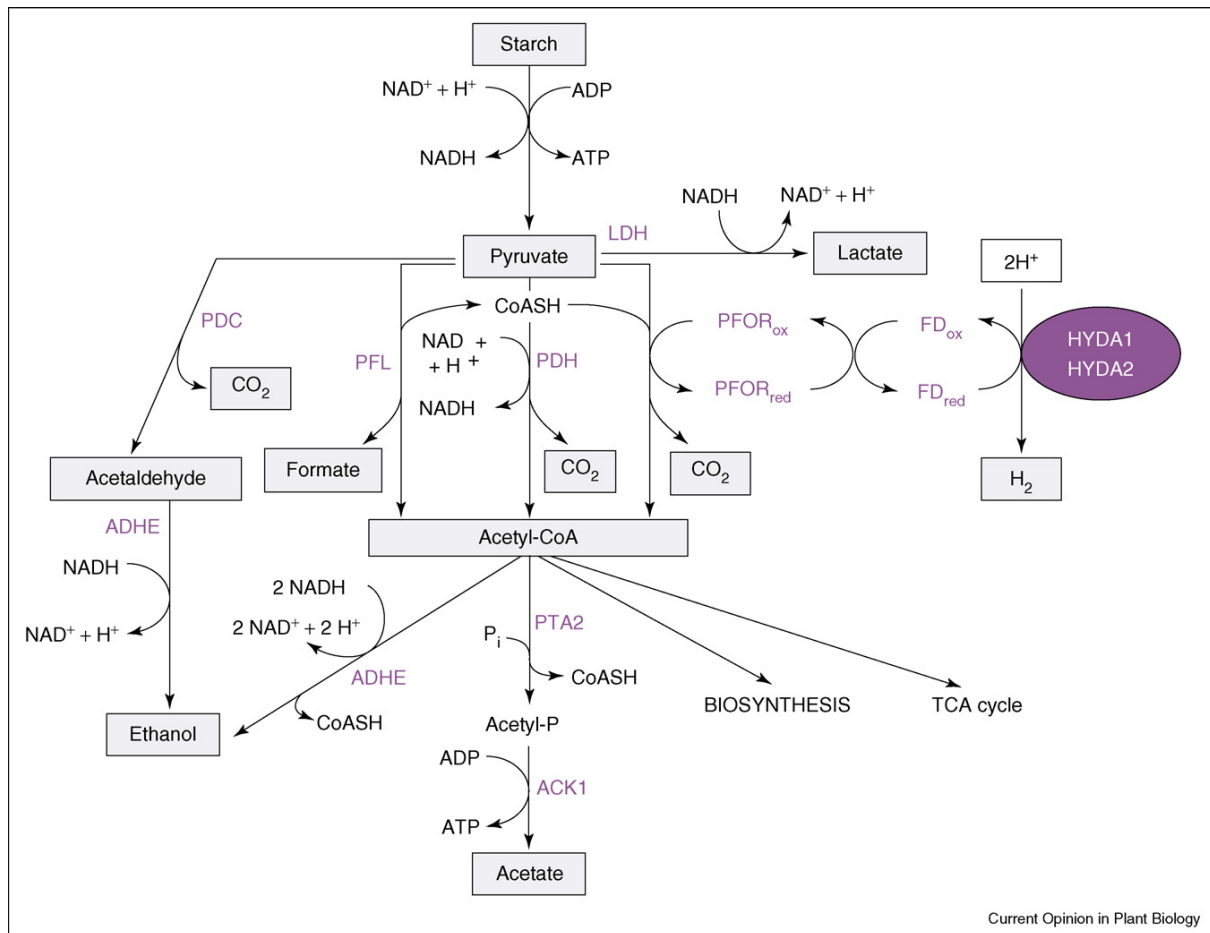


Figure 17 : Schéma représentant différentes voies métaboliques fermentatives existantes chez l'organisme *Chlamydomonas reinhardtii*, ([Grossman, Croft et al. 2007](#)).

Beaucoup de voies métaboliques, comme le montre la figure ci-dessus, sont opérationnelles chez les algues dans les conditions d'anaérobiose ([Atteia, van Lis et](#)



al. 2006 ; Grossman, Croft et al. 2007 ; Terashima, Specht et al. 2010 ; Grossman, Catalanotti et al. 2011 ; Atteia, van Lis et al. 2013), dont découle l'induction d'un assortiment d'enzymes spécifiques. Ces nombreuses études ont apportés des données quantitatives ainsi que des informations sur la localisation chloroplastique ou mitochondriale des protéines.

Chez *Chlamydomonas*, la plus importante gamme de chemin métabolique a été identifiée comme étant celle dépendant de la formation du pyruvate (Hemschemeier and Happe 2005 ; Dubini, Mus et al. 2009). De plus, d'autres analyses biochimiques ont démontré qu'à cette voie, se rajoute les produits fermentatifs majeurs tels que le formate, l'acétate et l'éthanol, formés en parallèle avec l'hydrogène (Gfeller and Gibbs 1984 ; Ohta. 1987).

Ce qui ressort à ce niveau de la discussion, c'est que l'implication de nombreuses enzymes intervenant dans la chaîne photosynthétique et les chemins métaboliques pouvant être empruntés par les électrons semblent dépendre fortement des conditions oxygéniques dans la cellule. Qu'il existe deux modes de transferts et que les acteurs y participant sont, pour l'essentiel, les mêmes, mais qu'il existe tout de même une hétérogénéité dans leurs distributions à travers les membranes thylacoïdales. L'implication de deux types de transferts différents par les complexes majeurs {PSII-Cyt *b₆f*-PSI} pour le linéaire et {Cyt *b₆f*-PSI} pour le cyclique, et cela dans un contexte de localisations différentes amène à penser qu'il doit exister une structuration entre les différents complexes, capable d'optimiser le rendement d'efficacité des deux modes de transports des électrons, en limitant les interférences entre les deux modes de fonctionnement.

Des données fonctionnelles et chimiques vont dans ce sens, en établissant la formation de supercomplexes dans lesquels tous les acteurs du transfert cyclique se retrouveraient.

VI Formation des supercomplexes

1 Analyse moléculaire

Les deux types de transferts des électrons à travers les complexes de la chaîne photosynthétique sont maintenant bien établis. Et l'hétérogénéité de localisation de ces différents complexes aussi. Cette ségrégation suggère la possibilité de regroupements entre les différents complexes impliqués dans l'un ou l'autre des transferts d'électrons permettant l'augmentation de l'efficacité de la chaîne photosynthétique à fixer et métaboliser les molécules de carbone, par le cycle de Benson-Calvin.



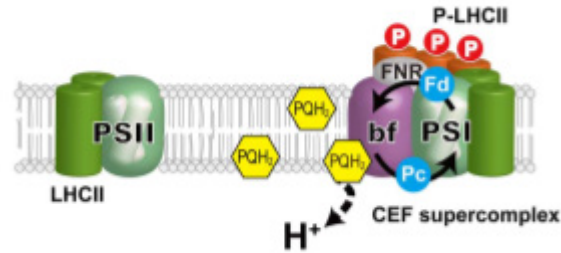


Figure 18 : Représentation schématique du regroupement des différents acteurs de la chaîne photosynthétique, dans la formation des supercomplexes au sein de la membrane thylacoïdale (Minagawa. 2013).

Ces regroupements se traduiraient par la formation de supercomplexes, comme le schématise la figure 18, dans lesquels seraient localisés les acteurs du CEF, comme le Photosystème I, ces antennes associées LHCI (bâtonnets verts), le cytochrome b_6f (en violet) et la Fd-NADPH oxydoréductase (FNR, en gris), mais aussi des antennes mobiles LHCII phosphorylées provenant des Photosystèmes II (en orange). L'intervention des deux transporteurs d'électrons, tels que la ferredoxine et la plastocyanine (en bleu) est vitale pour la réinjection des électrons et l'efficacité du CEF dans les composants regroupés du supercomplexe.

De plus, on retrouve dans ces supercomplexes des composants additionnels présents du côté stromal proche du PSI, dont l'absence diminue l'efficacité du CEF, soit : PGR 5 (Proton Gradient Regulation) (Munekage, Hojo et al. 2002), PGRL 1 (Proton Gradient Regulation Like 1) (DalCorso, Pesaresi et al. 2008), en interaction avec PGR 5 et la Fd. Les protéines CAS (Ca²⁺-Sensor Protein) et ANR 1 (Anaerobic Response Protein 1) sont aussi trouvées dans les supercomplexes. La sous-expression de ces deux protéines n'a cependant pas d'impact fort sur le CEF, ce qui suggère une possible stratégie d'adaptation dans le transfert d'électrons cyclique, pour compenser ces pertes dans ces complexes, et permettre un CEF tout de même efficace (Terashima, Petroustos et al. 2012).

Cette formation s'appuie également sur des données biochimiques permettant la déduction de l'intervention de ces protéines dans la structuration des supercomplexes.

2 Analyse fonctionnelle

Ces supercomplexes ont pu être isolés et identifiés chez le type sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii*, contenant le Photosystème I, ces propres antennes LHCI, les LHCII, le cyt b_6f , la FNR et PGRL 1 mais pas PGR 5 (Iwai, Takizawa et al. 2010). L'isolation de ces supercomplexes a été faite dans les conditions anoxiques et ils sont absents dans les conditions oxiques, suggérant que le transfert d'électrons cyclique intervient de façon plus importante dans les conditions anoxiques, qui nécessite alors une restructuration dans la membrane à travers le regroupement des acteurs inclus dans le CEF.

Sur cette base, il est proposé que la formation de ces CEF-supercomplexes soit contrôlée par les niveaux en concentration d'ATP dans le système. Lorsque celle-ci est basse, le regroupement des complexes en supercomplexes serait commandé afin



de favoriser le transfert d'électrons cyclique et donc la synthèse d'ATP par le pompage de protons à travers la membrane. Cet événement aurait donc lieu dans les conditions anoxiques, où la demande en ATP est forte de part l'arrêt de la synthèse d'ATP mitochondriale. Et inversement, une forte concentration en ATP induirait la dissociation des supercomplexes, augmentant la fraction de PSI disponible pour le transfert d'électrons linéaire (Joliot and Joliot. 2002).

Leur étude fonctionnelle *in vitro*, après leur isolation, a été menée et montrerait une activité compatible avec le transfert d'électrons entre les deux complexes majeurs, le PSI et le cytochrome *b₆f*, après l'ajout des deux transporteurs : la Fd et la PC (Iwai, Takizawa et al. 2010 ; Terashima, Petroustos et al. 2012). Cette partie sera discutée ultérieurement dans un paragraphe, puisque l'étude *in vitro*, dans le cadre d'une collaboration à fait l'objet d'une partie de ma thèse.

Ces deux derniers paragraphes montrent que de nombreux processus mécanistiques ont lieu à travers les membranes thylacoïdales. Ces processus font intervenir les flux d'électrons passant par les différents complexes composant la chaîne photosynthétique et cela selon deux modes de transfert : le linéaire et le cyclique, utilisant donc les mêmes acteurs moléculaires pour leur fonctionnement. Il est légitime de se demander *par quels paramètres deux transferts différents peuvent coexister à partir des mêmes entités ?*

VII Migration des antennes mobiles collectrices de lumière (LHC II)

1 Commutation entres les flux d'électrons linéaire et cyclique

La problématique soulevée ci-dessus peut être posée en d'autres termes, à savoir quels sont les paramètres qui président à l'implication de l'un quelconque de ces acteurs dans l'un ou l'autre de ces deux modes de fonctionnement.

A cette étape de réflexion il est intéressant de soulever le fait que la ségrégation des deux Photosystèmes discutée précédemment, présente un intérêt du point de vue de la régulation des deux types de transferts d'électron. Ce point est discuté dans l'article de Albertson, P. (Albertson. 2001).

Cette dernière remarque suggère l'hypothèse d'une structuration, comme il l'a déjà été spécifié, qui permettrait d'isoler certains des maillons de ces deux chaînes, comme par la formation des supercomplexes. Ces différents maillons, regroupant les différents acteurs impliqués dans les transferts linéaire et cyclique, constitueraient des entités séparées permettant le fonctionnement prédominant selon l'un des deux modes. La question est maintenant de savoir, par le ou lesquels paramètre(s) cette commutation serait contrôlée.

2 Les transitions d'état

Les systèmes LHC (Light Harvesting Complex) qui sont les antennes collectrices de photons, présents autour des deux Photosystèmes, ont été décrits précédemment. Des rapports portent sur l'étude des changements de fluorescence des antennes LHC lors de modifications des conditions environnementales, comme l'utilisation de lumière de différente couleur, permettant l'excitation préférentielle de l'un des deux Photosystèmes (Bonaventura and Myers 1969).



L'idée de deux états différents et d'une transition entre ces deux états est lancée. Appelé état 1 et état 2, ils expliqueraient les variations de fluorescence observées précédemment selon des conditions où l'un des deux Photosystèmes est excité préférentiellement, (Murata. 1969 ; Delepaire and Wollman. 1985). L'observation des changements spectraux de fluorescence à basse température, sous les lumières spécifiques de l'excitation du PSI ou du PSII, (Murata. 1969), traduit le transfert d'excitation entre les deux systèmes pigmentaires, permettant ainsi aux organismes photosynthétiques d'utiliser efficacement l'énergie lumineuse absorbée.

En d'autres termes, lorsque le PSII est plus fortement excité que ne l'est le Photosystème I, une partie des antennes du PSII migrent vers le PSI, cette situation est nommée état 2. Inversement, lorsque le PSI est plus fortement excité que ne l'est le Photosystème II, les antennes LHCI associées au PSI migrent vers le PSII, appelé état 1. Ces déplacements des antennes vers l'un des Photosystèmes entraînent l'augmentation de sa section efficace de capture permettant donc de rééquilibrer les flux excitoniques au niveau des deux Photosystèmes, (Delosme, Olive et al. 1996).

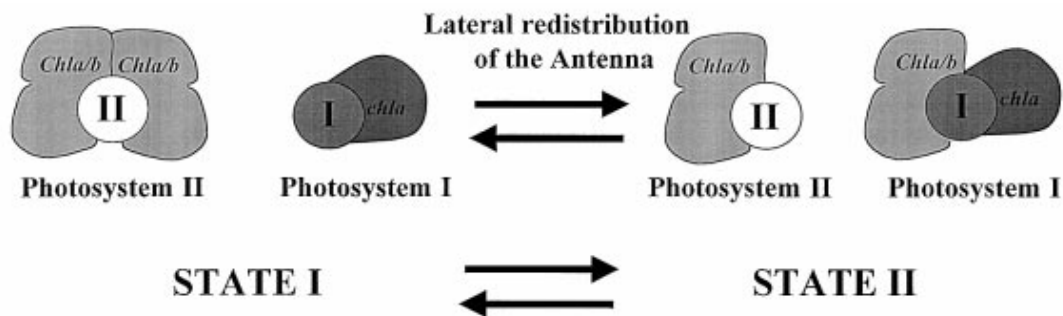


Figure 19 : Schématisation de la transition des antennes LHCI mobiles, symbolisée en gris clair (Chl a/b), du Photosystème II vers le Photosystème I, lors de la transition de l'état 1 à l'état 2, et réciproquement (Wollman. 2001).

Chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, l'étude de la distribution de l'énergie lumineuse entre les deux Photosystèmes dans les deux états, par Delosme, R et ses collègues, a conduit à évaluer à environ 80 % la quantité de LHCI capables de se déplacer vers le Photosystème I, le reste des antennes restant fixé aux PSII (Delosme, Olive et al. 1996).

C'est un peu plus tard que le mécanisme de cette migration d'antennes a été trouvé. Cela correspond à l'identification des LHCI-Kinases, dont les mutants altérés sur les gènes codant pour certaines kinases, comme le gène *stt7*, montrent des souches affectées dans les transitions d'état.

C'est par l'étude des données de fluorescence à froid 77 K, des cellules *stt7* mutantes sous les deux conditions redox (oxydée et réduite) que l'observation de leur blocage à l'état 1 est faite. C'est-à-dire que les antennes LHCI, chez un mutant *stt7*, restent connectées aux Photosystèmes II (Fleischmann, Ravanel et al. 1999), sans aucune migration vers les régions membranaires où sont localisés les Photosystèmes I. Chez un type sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii*, après phosphorylation de sous-unités spécifiques des protéines LHCI par la LHCI-Kinase, ces dernières sont détachées du



Photosystème II par une répulsion électrostatique due à l'augmentation des charges négatives à la surface des membranes thylacoïdales empilées, du côté stromal ([Baker, Harbinson et al. 2007](#)) créant un déplacement de ces antennes hors des membranes accolées vers les membranes non accolées. Permettant ainsi, en d'autres termes, leurs déplacements des régions où sont principalement localisés les Photosystèmes II aux régions où sont exclusivement situés les PSI.

Cela traduit donc la transition réversible de l'état 1 vers l'état 2 liée à deux activités antagonistes. La phosphatase qui peut déphosphoryler les antennes et la LHCI-kinase qui contrôle de façon importante cette transition et qui peut être stoppée par la mutation du gène *stt7* ([Fleischmann, Ravanel et al. 1999](#)). En effet, les phosphatases sont actives constitutivement, tandis que le gène *stt7* peut être activé ou inactivé.

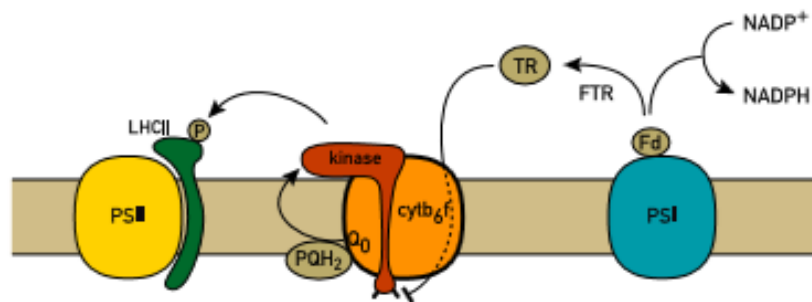


Figure 20 : Schématisation du circuit d'électrons à travers la membrane thylacoïdale dans la phosphorylation des antennes LHCI mobiles (**vertes**) du PSII (**jaune**) et leur déplacement (non représenté) vers le PSI (**bleu**). Représentation de la Kinase *stt7* (**rouge**), comme un domaine transmembranaire au niveau du complexe Cytochrome *b₆f*, et son contrôle par l'état redox du pool de plastoquinone, ([Rochaix. 2007](#)).

Il est intéressant de noter que les supercomplexes formés par {PSI-LHCI} sont plus larges chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, que dans les plantes supérieures ([Germano, Yakushevskaya et al. 2002 ; Kargul, Nield et al. 2003](#)). Le fait que *Chlamydomonas* possède neuf gènes *Lhca* alors que les plantes supérieures en ont seulement 4 ou 5 ([Drop, Webber-Birungi et al. 2011](#)) explique cette différence de taille.

L'étude des agents transporteurs d'électrons, oxydants et réducteurs de la chaîne photosynthétique sur l'activité de la kinase a été investie. L'étude de sa capacité de phosphorylation des antennes mobiles LHCI, a permis de mettre en évidence le déclencheur de cette transition d'état. Par différentes expériences, comme la fluorescence et avec différents inhibiteurs, comme le DBMIB, et en surveillant l'activation de la protéine kinase thylacoïdale, Allen, J.F et ses collaborateurs, ont situé l'élément redox de la chaîne de transport des électrons après le PSII et avant le complexe cytochrome *b₆f*, déduisant alors que le plus sérieux candidat est la plastoquinone ([Allen, Steinback et al. 1981](#)).

Ainsi, le signal déclenchant la phospho- ou déphosphorylation des antennes par la kinase est l'état redox du pool de Quinone.

De plus, des études sur les mutants déficients de l'activité du PSII et de l'ATP synthase, ne montrent pas d'effet direct sur la migration des antennes, contrairement



au mutant déficient en cyt *b₆f*. Une approche *in vivo*, chez le mutant du complexe *b₆f* affecté au site Qo, montre une perte du lien avec la plastoquinone mais aussi résulte en un blocage à l'état 1 par une incapacité à activer la LHCII-Kinase (Zito, Finazzi et al. 1999). En effet, la LHCII-Kinase est activée par la présence d'une molécule PQH2 dans le site Qo du complexe cyt *b₆f* (Vener, Ohad et al. 1998 ; Zito, Finazzi et al. 1999), et cette dernière est désactivée par l'oxydation du site Qo (Vener, van Kan et al. 1997). Et enfin, il est même possible d'observer un arrêt de l'activation de la kinase par l'ajout d'inhibiteur du complexe cytochrome (Gal, Schuster et al. 1988 ; Barbagallo, Finazzi et al. 1999), alors que le pool de PQ est encore réduit.

Ainsi pour qu'ait lieu la migration des antennes réversible entre les deux Photosystèmes, la présence du complexe cytochrome *b₆f* et sa fonctionnalité sont requises.

Concernant la localisation du complexe cyt *b₆f*, l'analyse d'immunoblot avec un anticorps du cyt *f*, révèle à l'état 2, une présence dans les régions stromales lamellaires plus marquée qu'à l'état 1 (Vallon, Bulté et al. 1991). Il s'opère un déplacement de quelques cyt *b₆f*, des régions accolées aux non accolées de la membrane dès la transition de l'état 1 à 2. Cette information vient s'ajouter à l'idée de la formation de supercomplexes dans des fortes demandes d'ATP, où le cyt *b₆f* se retrouve majoritairement dans les régions où sont localisés les PSI. Et cela, lors de la migration des antennes LHCII mobiles, à l'état 2.

Il faut rajouter que selon les études déjà exposées ci-dessus, la présence de la protéine Nda2 est montrée pour être requise pour une transition efficace à l'état 2, lors de l'induction des cellules aux conditions anaérobiques (Jans, Mignolet et al. 2008).

Le rôle de la migration des antennes, décrit comme une réponse adaptative à la lumière, est discuté à de nombreuses reprises. Son intervention est proposée comme une fonction de protection contre des expositions à de hauts niveaux lumineux. Cependant, des études ont montré que la kinase responsable de leur migration était inactivée sous forte lumière (Rintamaki, Martinsuo et al. 2000).

Une autre possibilité serait que les transitions d'état soient impliquées dans l'optimisation du rendement photosynthétique, permettant de pousser sous des conditions de faible lumière.

De plus, l'idée a été énoncée que quand l'algue verte est dans les conditions d'état 1, le linéaire serait prédominant et qu'à l'état 2, le transfert d'électrons cyclique se trouve dominant dans le système des membranes thylacoïdales (Delosme, Olive et al. 1996 ; Vallon, Bulté et al. 1991). Et que au-delà d'une adaptation à la lumière, les transitions d'antennes pourraient répondre aussi à un changement dans la demande cellulaire en ATP (Bulté, Rebeillé et al. 1990 ; Fleischmann, Ravanel et al. 1999 ; Joliot and Joliot 2005).

Sur la base des différentes observations présentées dans cette introduction, il est aussi tentant de proposer l'existence d'une corrélation entre la migration latérale des antennes et du cytochrome *b₆f*, qui tend à être co-localisé avec le PSI quand le



système membranaire dans l'état 2. Mais aussi l'établissement de conditions structurales singulières favorisant l'efficacité du flux cyclique, comme la formation et la dissociation des supercomplexes décrits précédemment. Ainsi il existerait une forte corrélation entre transition d'état et commutation d'un transfert d'électrons linéaire à cyclique.

Les travaux de Finazzi, G. et ses collègues ([Finazzi, Furia et al. 1999](#)), par l'étude de l'état redox du complexe cytochrome *b₆f* ont montré la force de cette corrélation. Cependant, plusieurs observations viennent infirmer l'hypothèse d'une corrélation stricte entre les deux mécanismes. Devant de telles controverses, il est important d'approfondir ces études pour un exposé correct et une bonne compréhension. Pour cela, les résultats expliquant le fort constat du lien entre migration des antennes et commutation vers un transfert d'électron cyclique mais aussi pourquoi ce sujet restait un débat ouvert, constitue la problématique de ma thèse et sont développés ci-après.





Problématique

Etude de la corrélation entre la commutation L_{EF} – C_{EF} et la transition des antennes

Et contradictions bibliographiques

I Etudes de corrélation transitions d'antennes - CEF

Dans la littérature, il a été clairement établi qu'il existait une corrélation forte entre la commutation vers un transfert d'électrons linéaire à cyclique et le passage de l'état 1 à l'état 2 dans le processus réversible de la transition latérale des antennes mobiles LHCII, le long des membranes thylacoïdales.

Dans les études qui ont conduit à cette conclusion la relation entre la commutation vers un mode de transfert d'électrons cyclique et la redistribution des antennes LHCII a été étudiée via l'observation de l'état redox du cytochrome *f* en différentes conditions de fonctionnement de la chaîne photosynthétique (Finazzi, Furia et al. 1999). Ces études sur un type sauvage et un mutant altéré dans la transition des antennes et bloqué à l'état 1, le mutant *stt7* de *Chlamydomonas*, montrent les variations d'absorptions sur l'oxydation du cytochrome *f* dans les conditions oxygènes où l'état 1 est promu et les conditions anoxiques où l'état 2 est promu. Avec l'utilisation d'inhibiteurs du PSII : le DCMU, et du cyt *b_{6f}* : le DBMIB.

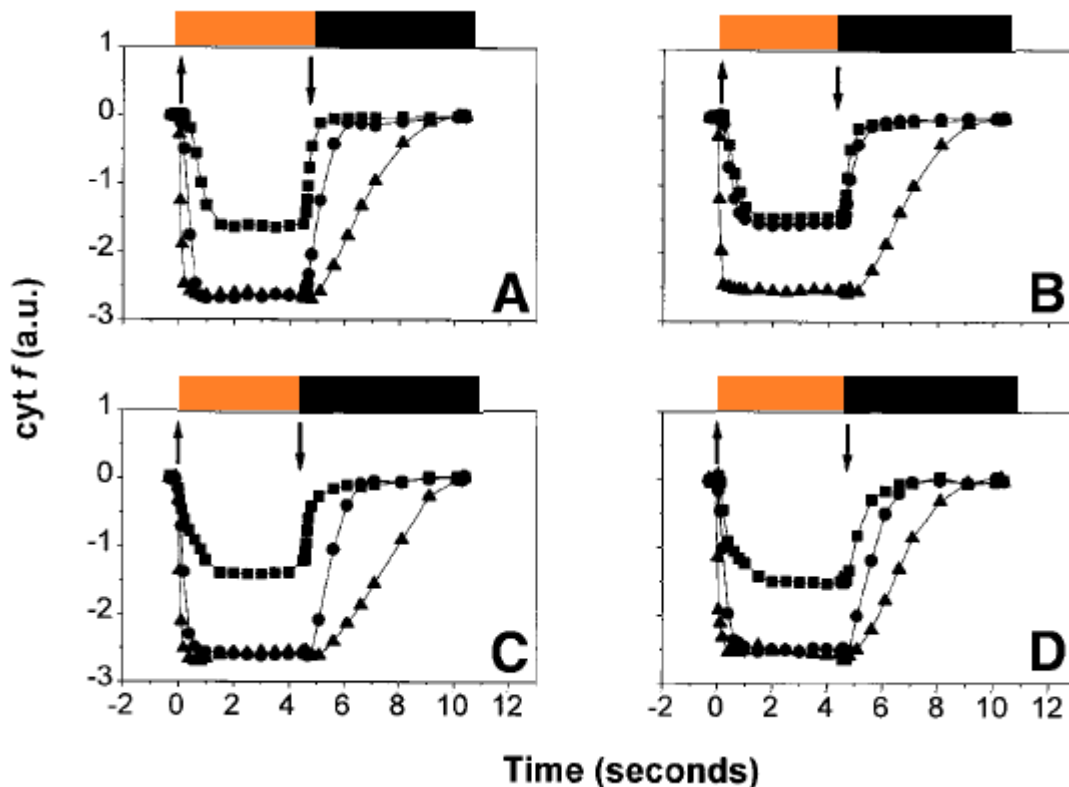


Figure 1 : Flux d'électrons linéaire et cyclique chez *C. reinhardtii*. Etat redox du cytochrome *f* mesuré en lumière continue par variation d'absorption (Finazzi, Rappaport et al. 2002).

Conditions aérobiques A et C, conditions anaérobiques B et D. Souche contrôle A et B, souche mutante *stt7* C et D. carré : sans inhibiteur, cercle : 10 µM DCMU, triangle : 2 µM DBMIB



1 Descriptions des résultats

Au départ de l'illumination, on observe l'oxydation du cytochrome *f* plus ou moins rapide jusqu'à obtenir un état stationnaire. Lorsque l'on éteint la lumière, on observe la re-réduction du cytochrome *f* plus ou moins rapide.

Ces cinétiques de variations d'absorptions du cytochrome *f* montrent, dans un premier temps, chez le type sauvage, dans les conditions aérobiques (A), une certaine oxydation du cytochrome sans présence d'inhibiteur (carré). La présence de DCMU, inhibiteur du PSII, montre une cinétique différente (cercle) de celle observée sans inhibiteur. On observe une oxydation du cytochrome *f* plus rapide ainsi qu'une re-réduction un peu plus lente. De même pour la cinétique en présence de DBMIB, inhibiteur du cyt *f* (triangle), similaire à celle en présence de DCMU excepté pour la re-réduction à l'obscurité, plus lente.

Ces premières courbes fournissent déjà des informations intéressantes sur le fonctionnement de la chaîne photosynthétique dans les conditions aérobiques. Au vue des résultats qui montrent que l'inactivation fonctionnelle des complexes photosynthétiques : Photosystème II et du cytochrome *f*, donnant des cinétiques de variations d'absorptions différentes pour l'oxydation du cytochrome *f* sans inhibiteur, impliquent la sollicitation fonctionnelle du PSII et du cytochrome *f* dans les conditions aérobiques. Ceci décrit le parcours de transfert des électrons linéaire, qui sollicite tous les complexes de la chaîne photosynthétique.

Les courbes en conditions anaérobiques (B), toujours pour le type sauvage, sont similaires sans inhibiteur (carré) et avec utilisation de DCMU (cercle). Contrairement à celle avec l'utilisation de DBMIB qui montre une cinétique similaire en condition aérobique. Donc que le Photosystème II soit actif ou non fonctionnellement, les cinétiques d'oxydation du cytochrome *f* sont identiques.

Au vue de ces résultats, en conditions anaérobiques, le PSII est peu sollicité, contrairement au cytochrome *f*, qui semble toujours avoir une fonction dans ces conditions, au vue des cinétiques en DBMIB (triangle). Le flux d'électrons semble donc « tourner » autour du PSI et du cytochrome *f*, ce qui décrit le parcours de transfert des électrons cyclique, qui sollicite les complexes PSI et cytochrome *b₆f* de la chaîne photosynthétique.

Cette première série d'expériences apporte des conclusions importantes sur l'implication des flux d'électrons et de leur commutation dans le changement d'états et la transition des antennes. Selon les résultats, chez le type sauvage de *Chlamydomonas*, le transfert d'électrons linéaire est promu dans les conditions aérobiques, soit à l'état 1. Et le transfert d'électrons cyclique est promu dans les conditions anaérobiques, soit à l'état 2.

Maintenant intéressons-nous aux expériences menées sur le mutant *stt7*, altéré dans la transition d'état et bloqué à l'état 1 : les antennes LHCI restant alors associées aux Photosystèmes II.

Tout comme le type sauvage dans les conditions aérobiques (C), le mutant *stt7* montre une certaine cinétique sans inhibiteur (carré) et des cinétiques différentes en présence d'inhibiteur du PSII et du cytochrome *f*, permettant de conclure tout comme



le type sauvage que le transfert d'électrons linéaire est prédominant dans les conditions aérobiques, chez ce mutant.

Cependant, les cinétiques sont similaires dans les deux types de conditions : aérobique (C) et anaérobique (D). Ces résultats sont donc différents de ceux observés chez le type sauvage, suggérant que la commutation vers le transfert d'électrons cyclique n'a pas lieu.

Ces résultats qui montrent que, le cyclique n'est pas induit dans les conditions anaérobiques qui promeuvent l'état 2, le mutant *stt7* restant par sa mutation, bloqué à l'état 1, suggèrent que la migration des antennes LHCIi mobiles sont déterminantes pour la commutation entre les deux types de transferts d'électrons.

Il semble donc, aux vues de ces résultats qu'il existe une corrélation forte entre la commutation du transport d'électrons linéaire à cyclique et la redistribution latérale réversible des antennes mobiles collectrices de lumière entre le PSII et le PSI.

II Constats expérimentaux - Discussion

J'ai tout d'abord reproduit les expériences d'oxydation du cytochrome *f*, pour le type sauvage et pour le mutant altéré dans la migration des antennes : le mutant *stt7* bloqué à l'état 1.

Nous retrouvons les mêmes profils de cinétiques pour le type sauvage *t222+* et le mutant *stt7-9* de *chlamydomonas reinhardtii*, dans les deux conditions redox.

Il est donc possible de reproduire les résultats observés dans l'article ([Finazzi, Rappaport et al. 2002](#)), dans les mêmes conditions expérimentales.

Mais il est important de souligner que pour faire ces observations de variations d'absorptions sur le cytochrome *f*, j'ai dû travailler à une intensité lumineuse très faible et ce à cause de la grande constante d'équilibre entre le PSI et le Cytochrome *f*, discuté ci-dessous.

A l'état stationnaire, la quantité de P₇₀₀ oxydé est donnée par le rendement : $k_{ox} / (k_{ox} + k_{red})$, où k_{ox} et k_{red} sont respectivement les constantes de vitesses d'oxydation et de réduction de P₇₀₀. En absence d'activité PSII, l'hypothèse est faite que k_{red} correspond à la vitesse cyclique. Nous constatons que deux cas extrêmes doivent être distingués : celui où k_{ox} est faible devant k_{red} , dans ce cas le flux cyclique sera cinétiquement limité par la vitesse à laquelle P₇₀₀ est oxydé, en d'autres termes par la vitesse photochimique, et le cas où k_{red} est faible devant k_{ox} , est dans ce cas c'est la réduction de P₇₀₀ par le processus cyclique qui est cinétiquement limitante. Il va sans dire que seule cette situation est significative si nous voulons mesurer le flux d'électrons cyclique. Or, lorsque cette condition est satisfaite, $k_{ox} > k_{red}$, et par conséquent $k_{ox} / (k_{ox} + k_{red}) > 0,5$.

Si cette condition est réunie, alors forcément nous obtenons une concentration d'au moins 50% de P₇₀₀ oxydé.

Or, de par les potentiels redox des complexes : +420 mV pour P₇₀₀ à l'état fondamental et de +350 mV pour le cytochrome *f*, on obtient, selon les lois thermodynamiques une constante d'équilibre de 15. En d'autre terme, avec une telle constante d'équilibre, pour 10 % de P₇₀₀ oxydé nous obtenons plus de 90 % de cytochrome *f* oxydé. Il est, dans de telles conditions, impossible de mesurer le



cyclique en utilisant la sensibilité de l'état redox du cytochrome *f* au DCMU comme observable. Pour n'obtenir que 50 % de cytochrome *f* oxydé en présence de lumière en DCMU, il faut donc diminuer l'intensité lumineuse et obtenir ainsi en diminuant la quantité de P_{700} oxydé, faire de l'état d'oxydation du cytochrome *f* une observable sensible à d'éventuelles variations de l'activité du PSI. Dans ces conditions le niveau stationnaire de P_{700} oxydé n'excédera pas ~10 % et k_{ox} sera nécessairement plus faible que la k_{red} .

Or à très faible intensité, le poids relatif d'autres flux électroniques que le transfert cyclique augmente. Ainsi la chlororespiration et même les électrons produits par l'activité photochimique peuvent interférer. La diminution du flux cyclique est illustrée sur la figure suivante qui montre sa dépendance en fonction de l'intensité lumineuse (Méthode de calcul ([Takahashi, Clowez et al. 2013](#))), dans les conditions anoxiques.

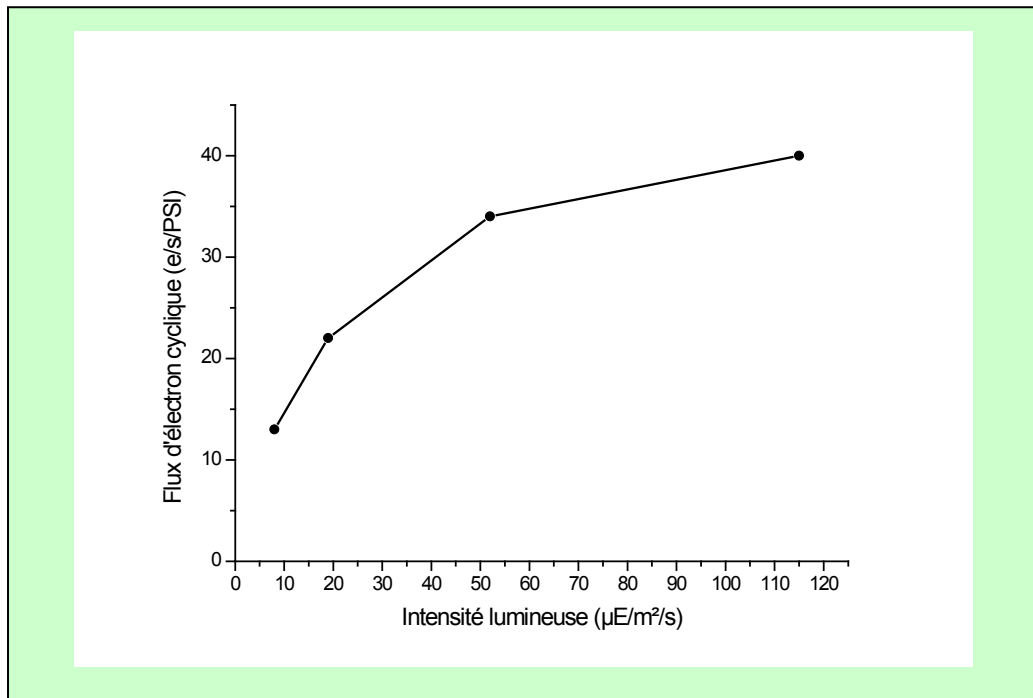


Figure 2: vitesse d'électrons cyclique ($e s^{-1} PSI^{-1}$) en fonction de l'intensité lumineuse ($\mu E m^{-2} s^{-1}$), dans les conditions anoxiques.

Comme ce graphique le montre, à des intensités de 52 et 115 $\mu E m^{-2} s^{-1}$, les flux d'électrons cycliques sont similaires, soit entre 34-40 électrons par seconde par Photosystème I. On peut considérer que le flux est indépendant de l'intensité lumineuse dans ces domaines d'intensité. Il est donc cinétiquement limité par une étape non-photochimique. Au contraire, à faible intensité le flux cyclique diminue et devient dépendant de l'intensité lumineuse ; il est cinétiquement limité par la vitesse photochimique. En conclusion, la mesure du niveau stationnaire du cytochrome *f* sera donc une mesure de l'intensité lumineuse et non du flux cyclique.



Il est donc impossible, en se plaçant à une intensité aussi faible comme cela a sans doute été fait dans les études reposant sur les mesures de l'état d'oxydation du cytochrome *f* comme mesure des flux linéaire et cyclique, de conclure sur le transfert d'électrons cyclique. C'est pourquoi, nous avons opté pour une autre approche consistant à mesurer le flux cyclique via les états redox de P₇₀₀ dans des conditions de relativement forte intensité.

Nous venons donc de voir que les conclusions sur la corrélation stricte entre transition d'état et activation du mode cyclique reposent sur des bases expérimentales dont nous pouvons interroger la fiabilité. En outre, plusieurs études viennent également affaiblir cette corrélation.

III Constats contradictoires théoriques

1 Migration d'antenne chez les plantes

Dans un premier temps, l'inadéquation entre le rapport NADPH / ATP produit par le linéaire et les exigences du cycle de Benson Calvin se posent dans les mêmes termes chez les plantes. Il est donc important, pour le fonctionnement du système de recourir à d'autres mécanismes permettant la synthèse d'ATP, comme le flux d'électrons cyclique. Cela pourrait alors être le cas par le biais de la migration des antennes mobiles comme chez les algues.

Cependant, chez les plantes, il a été montré que la fraction mobile des LHCII est seulement de 15 à 20 % (Allen. 1992). Chez *Arabidopsis*, les auteurs vont jusqu'à montrer, chez un type sauvage, une migration de seulement 10 % des antennes du PSII vers le PSI (Bellafiore, Barneche et al. 2005). Cette quantité est bien inférieure à celle observée chez *Chlamydomonas*, qui est, je le rappelle de 80% (Delosme, Olive et al. 1995).

1.1 Transfert d'électrons cyclique chez les plantes

La présence d'un flux d'électrons cyclique *in vivo* était présenté comme un sujet de controverses chez les plantes supérieures (Fork and Herbert 1993 ; Bendall 1995). Cependant, Pierre Joliot, dans son article (Joliot and Joliot 2002), décrit des expériences montrant, à l'obscurité, que dans les conditions où la concentration en ATP est limitante, le transfert cyclique est un processus efficace et nécessaire, par la génération d'ATP, pour l'activation du cycle de Benson-Calvin. De plus, d'autres études montrent que chez les feuilles adaptées à l'obscurité, une fraction de PSI est impliquée dans le processus de transfert d'électron cyclique (Joliot and Joliot. 2005 ; Sacksteder and Kramer 2000 ; Allen, Steinback et al. 1981, Joliot and Joliot 2002 ; Joliot, Beal et al. 2004 ; Joliot and Johnson 2011).

Ainsi, chez les plantes, la transition d'états est, en termes de migration d'antennes, de bien moins grande amplitude que chez les algues, comme *Chlamydomonas reinhardtii*, alors qu'un flux d'électrons cyclique tout aussi efficace a lieu.

A noter, que la kinase STN7 est importante pour la réponse à des fluctuations lumineuses fréquentes dans l'environnement naturel, dans son rôle de précurseur



aux transitions des antennes et de l'équilibre de l'absorption lumineuse entre les deux Photosystèmes (Bellafiore, Barneche et al. 2005), mais pas en lumière continue. Pour conclure, il y a peu de migration d'antennes chez les plantes, alors que l'intervention de la kinase STN7 et du flux d'électrons cyclique sont importants, ce qui impliquerait un autre mécanisme de régulation que celui proposé chez *C. reinhardtii*.

2 CEF à l'état 1 chez *Chlamydomonas reinhardtii*

De plus, les études menées par Jean Alric et al. (Alric, Lavergne et al. 2010) montrent que le flux d'électrons cyclique peut s'opérer en condition aérobie où l'organisation de la chaîne photosynthétique est celle de l'état 1 chez le type sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii*.

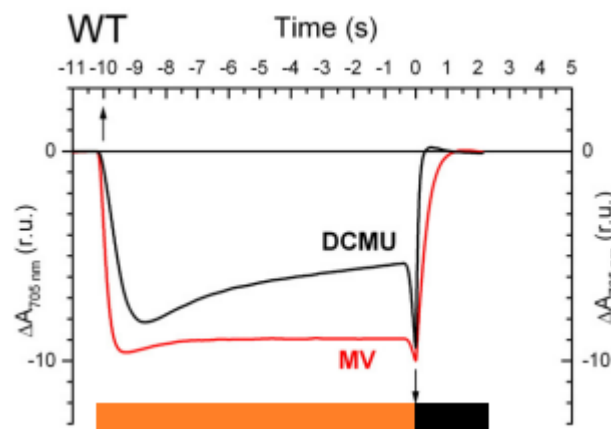


Figure 3 : cinétiques d'oxydation-réduction de P700 en fonction du temps, à 705 nm (Alric, Lavergne et al. 2010). Intensité de $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en présence de 1 mM DCMU (noire), de 10 mM MV (rouge), sous conditions aérobie. 10 s d'illumination et application d'un pulse saturant de lumière avant l'obscurité (flèche noire).

Ces travaux sur l'estimation du flux cyclique ont été faits de la façon suivante : l'utilisation du DCMU rend le Photosystème II inactif fonctionnellement, ce qui tend à bloquer le transfert d'électrons linéaire et à favoriser le cyclique. De plus, lorsque l'état stationnaire est atteint, donnant la quantité de P700 photo-oxydé, l'application d'un pulse saturant de lumière permet d'estimer la fraction de P700 total photo-oxydable, c'est-à-dire la quantité de P700 réduit à la lumière. La comparaison entre les deux niveaux obtenus permet d'évaluer l'intervention du transfert d'électrons cyclique, ici, en condition aérobie.

La cinétique noire (en DCMU) montre, d'une part que l'état stationnaire de P_{700}^+ atteint à la lumière est inférieur à celui atteint après un pulse saturant. Le fait que l'oxydation totale ne soit pas observée implique qu'il existe une voie de réduction, ou qu'en d'autres termes, des électrons sont transférés à P_{700}^+ et permettent sa réduction. Ceci soulève la question de l'origine de ces équivalents réducteurs. Pour y répondre,



les auteurs utilisent le méthyle viologène (MV), qui va jouer le rôle de pool d'accepteurs d'électrons côté PSI et donc entrant en compétition avec le transfert d'électrons cyclique. La courbe rouge, en présence de MV, montre une cinétique différente de celle observée en présence de DCMU et que l'oxydation de P₇₀₀ devient proche de la quantité maximale photo-oxydable de P₇₀₀, par l'application du pulse saturant.

Le niveau stationnaire d'oxydation de P₇₀₀ de *Chlamydomonas reinhardtii* semble donc sensible au MV. La conclusion est qu'il existe une voie permettant la réduction de P₇₀₀ et que l'efficacité de cette voie est sensible à l'utilisation de MV. Par conséquent les électrons pouvant être prélevés par le MV, proviennent des accepteurs d'électrons du PSI qui sont eux-mêmes réduits par l'activité photochimique de ce dernier. Cette voie décrite correspond bien à la définition du transfert d'électrons cyclique.

Aux vue de l'interprétation des résultats apportés par cette expérience, il est possible de conclure qu'il existe un flux d'électrons cyclique en condition aérobique, c'est-à-dire à l'état 1 chez le type sauvage de *C. reinhardtii*.

Suite à ces quelques constats selon lesquels, d'une part, chez les plantes, la transition d'états est faible comparée à *Chlamydomonas* alors qu'un CEF est requis pour le bon fonctionnement de la chaîne ; et d'autre part, qu'il existe un transfert d'électrons cyclique à l'état 1, où par définition les antennes associées aux PSII devrait favoriser le transfert d'électrons en mode linéaire.

Cela semble souligner le fait que la corrélation entre commutation vers un mode cyclique et la transition des antennes n'est pas aussi stricte que nous pouvions le penser, laissant donc le débat ouvert, ce qui explique notre intérêt pour ce projet. Au vue de ces éléments, nous constatons qu'il est nécessaire de réexaminer la corrélation entre transition d'état et efficacité du cyclique.

De plus, une étude récente, accentue notre intérêt pour cette question. L'étude des supercomplexes chez des mutants déficients en PGRL 1, d'ANR 1 et de CAS chez *Chlamydomonas reinhardtii*, montrent qu'il est possible de diminuer l'efficacité du CEF sans affecter l'abondance des supercomplexes. Ces résultats permettent de conclure que les supercomplexes ne sont pas suffisants pour établir le CEF ([Terashima, Petrousos et al. 2012](#)).



C'est dans cet objectif que mon projet de thèse s'est développé, interrogeant la nécessité de la transition d'états et de la formation de supercomplexe pour l'établissement d'un CEF efficace. Nous avons donc cherché à identifier d'autres paramètres pouvant contrôler cette commutation.

Dans la mesure où la transition d'états est promue par un changement des conditions redox ambiantes à l'intérieur de la cellule, ce paramètre qui induit le cyclique pourrait être l'état d'oxydo-réduction du pool de plastoquinone, qui est responsable de l'activation de la kinase impliquée dans la migration des antennes.





Matériels et Méthodes

I Informations complémentaires sur quelques mutants

1 Chapitre 1

Nous présentons ici les deux mutants utilisés durant nos premières études ([chapitre 1](#)) un peu plus en détails.

1.1 Mutant *stt7-9*

La distribution de l'énergie excitatrice entre les deux Photosystèmes I et II est contrôlée par le processus appelé transition d'états. Elle implique une réorganisation des fractions mobiles des complexes périphériques antennaires du PSII.

Ce processus consiste en une migration des antennes LHCI du PSII dans la membrane thylacoïdale qui permet de rediriger l'énergie lumineuse capturée préférentiellement par le PSII, lorsque celui-ci est fortement excité, vers le PSI, et inversement.

La transition des antennes est corrélée avec la phosphorylation réversible de nombreuses protéines LHCI.

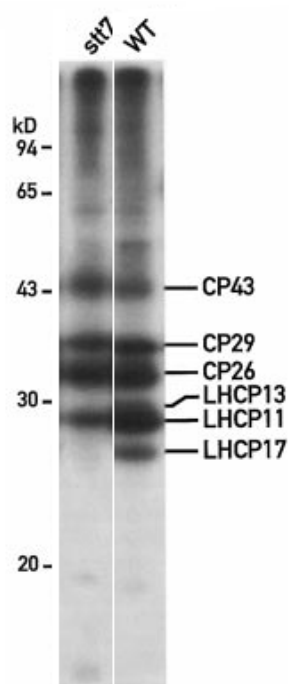


FIG. 7. Autoradiogram of *in vitro* ^{32}P -labeled thylakoid polypeptides. Membrane fractions of the different strains in state II were labeled *in vitro* with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (for details see "Experimental Procedures"). Proteins were fractionated on a 12% polyacrylamide gel containing 6 M urea and autoradiographed.

Figure 1 : Etude de phosphorylation des protéines antennaires du mutant *stt7* et du contrôle chez *Chlamydomonas reinhardtii* ([Fleishmann, Ravanel et al. 1999](#)).

Illustré sur la phosphorylation de la protéine *in vivo* et *in vitro*, la figure 1 montre que le mutant *stt7* est déficient dans celle-ci. *Stt7* est incapable de mettre en œuvre la transition d'antennes qui normalement a lieu lors de la transition de l'état 1 à l'état 2, et reste bloqué à l'état 1 même dans des conditions redox qui promeuvent l'état 2.



De plus, la fluorescence à 77 K montre des spectres similaires chez le mutant, dans les deux conditions redox, conduisant à la conclusion que les antennes mobiles LHCI sont préférentiellement connectées aux PSII. Il en est de même pour les mesures photo-acoustiques qui indiquent que les antennes Chl a et b restent fortement connectées aux PSII sous les deux types de conditions.

Les auteurs concluent à une mutation affectant la kinase, rendant le mutant *stt7* incapable d'opérer la migration de ces antennes mobiles périphériques dans la membrane thylacoïdale et restent donc bloqué à l'état 1 indépendamment de l'état redox des cellules (Fleishmann, Ravanel et al. 1999).

1.2 Mutant *ptox2*

La protéine PTOX fait partie de la chaîne de transport d'électrons chlororespiratoire (Bennoun. 1982, Peltier and Cournac 2002). Son rôle exact est encore discuté, mais il semblerait que deux l'emporte. Celui qui serait que PTOX prévient de la sur-réduction du pool de PQ, comme une valve de sécurité (Nigoyi. 2000). Mais aussi intervient dans la synthèse des caroténoïdes.

PTOX est aussi présentée comme un mécanisme auxiliaire (avec Ndh1, Ndh2, PGR5, PGRL1) qui a contribué à l'adaptation des microalgues photosynthétiques dans les environnements changeant (Peltier, Tolleter et al. 2010).

Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, il existe deux gènes codant pour les oxydases PTOX1 et PTOX2. Le mutant *ptox2* a été généré par transformation avec une cassette de marqueur de sélection aphVIII (Houilles, Rappaport et al. 2011).

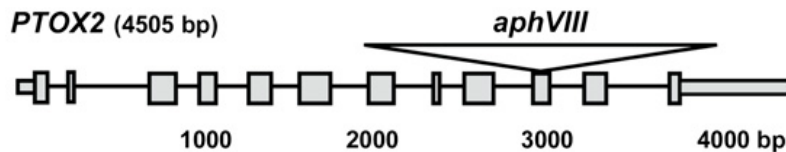


Figure 2 : Schéma de l'insertion de la cassette *aphVIII* dans le gène *ptox2* (Houilles, Rappaport et al. 2011).

Les clones obtenus sont triés selon leur résistance et les données de fluorescence chlorophylle pour déterminer les phénotypes pouvant être lié à une mutation PTOX2

L'étude des flux d'électron avec estimation de l'état redox du pool de PQ à l'obscurité, permet aux auteurs de proposer le model suivant,

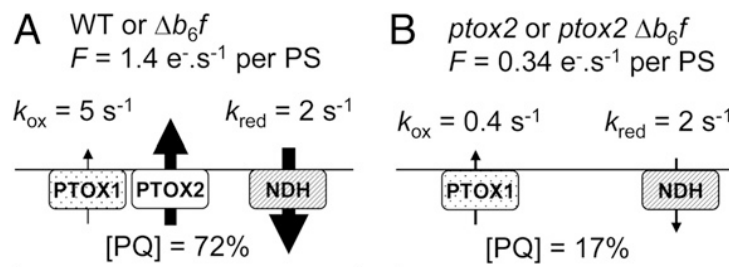


Figure 3 : Model pour la chlororespiration à l'obscurité impliquant les trois protéines PTOX 1 et 2, et NDA2, dans la représentation des flux d'électrons avec et sans inhibiteurs (Houilles, Rappaport et al. 2011).



Chez le mutant *ptox2*, le pool de PQ est majoritairement réduit conduisant les cellules dans les conditions oxic et anoxie, à être à l'état 2 à l'obscurité.

1.3 Nos études des deux mutants – Publication

Lors de l'étude de ces deux mutants nous avons caractérisé nos souches selon les observables qui viennent d'être décrites.

Voici les études de fluorescence des mutants et du contrôle, ainsi que la phosphorylation des protéines antennaires chez les deux mutants et le contrôle d'étude, que nous avons publié (Takahashi, Clowez et al. 2013),

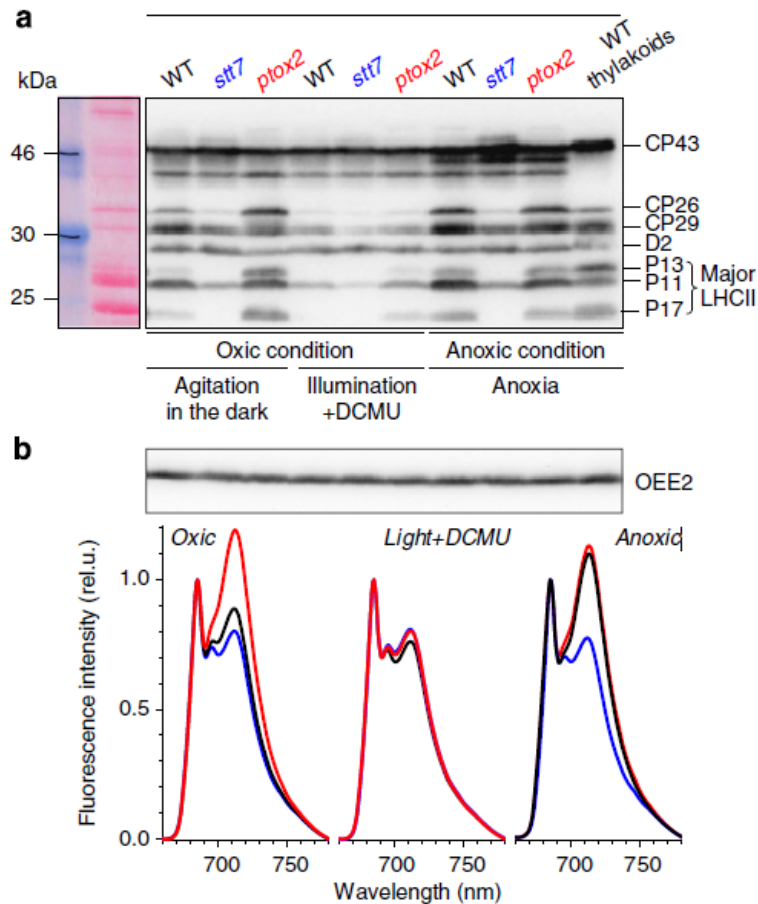


Figure 4 : (a) phosphorylation des protéines antennaires et (b) fluorescence à 77 K des mutants *stt7* et *ptox2* et du contrôle de *C. reinhardtii*, dans différentes conditions ; oxic, obscurité et lumière en présence de DCMU et anoxie, (Takahashi, Clowez et al. 2013).

Dans nos conditions d'études les cellules sont maintenues à l'obscurité et sont agitées pendant 30 minutes. Les conditions anoxiques sont induites par l'ajout de glucose, glucose-oxydase et de catalase (informations complémentaires par la suite). La figure 4a nous montre que le mutant *ptox2* a des quantités d'antennes phosphorylées similaires dans les conditions oxic à l'obscurité et en anoxie. De plus, son profil de phosphorylation est le même que celui du contrôle à l'état 2, indiquant bien que le mutant *ptox2* est à l'état 2 dans les deux types de conditions, à l'obscurité. Ces résultats sont confirmés par les spectres de fluorescence à froid (figure 4b).



Le mutant *stt7* montre une légère phosphorylation des sous unités antennaires CP43 mais reste similaire entre les deux conditions, et ne suffit pas à induire le changement d'état comme le montre les spectres de fluorescence à 77 K. Le mutant *stt7* est bloqué à l'état 1 indépendamment de l'état redox des cellules.

2 Chapitre 2

La caractérisation des différentes situations d'oxydation de P_{700} ([chapitre 2](#)) dans les conditions anoxiques ont nécessité l'utilisation du mutant d'hydrogénase. Nous donnons ici quelques informations complémentaires sur cette enzyme.

2.1 Mutants d'hydrogénase

La production d'hydrogène est due à l'induction de l'enzyme hydrogénase durant les conditions anaérobiques. C'est par l'implication de maturases, enzymes intervenant dans la maturation, que l'hydrogénase à centre fer [FeFe] est assemblée. Les mutants utilisés durant cette thèse sont nommés *HydEF* ([posewitz](#)) et *HydG* ([Ghysels, Godaux et al. 2013](#)).

Les trois maturases identifiées *HydE*, *F* et *G* montrent des activités de l'hydrogénase différentes dans les études de caractérisation *in vitro* de ces maturases. La méthode d'étude consiste dans un échantillon contenant une ou deux maturases, à analyser l'effet de l'absence et la présence à différentes concentrations de la ou des autres maturases.

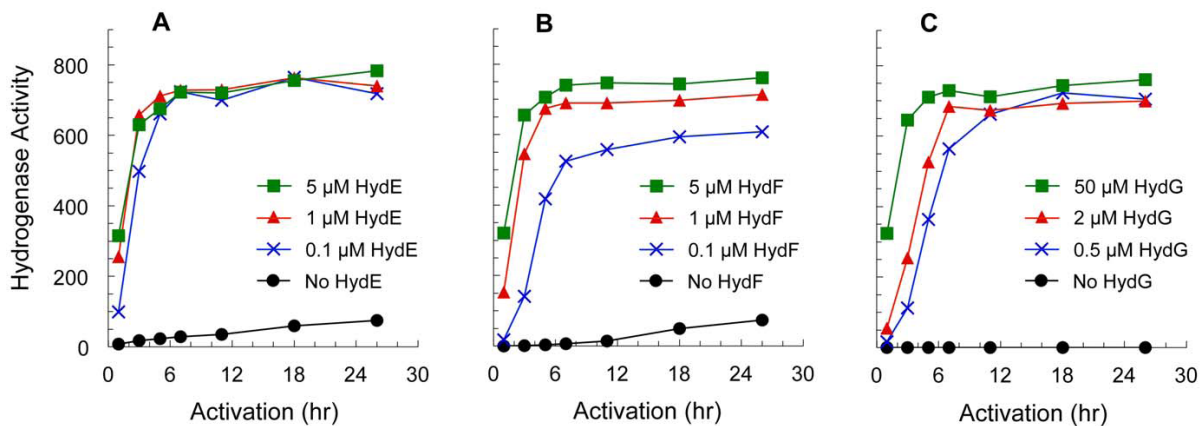


Figure 5 : Mesures de l'activité de l'hydrogénase selon présence ou absence des maturases, *in vitro*, *HydE* (A), *HydF* (B) et *HydG* (C) en fonction du temps d'incubation anoxique ([Kuchenreuther, Britt et al. 2012](#)).

Les courbes de la figure 5 (ronds noirs) montrent une activité de l'hydrogénase faible dépendant du temps d'anoxie d'activation, lorsque les maturases *HydE* et *F* sont absentes, il en est de même pour les solutions dépourvues des deux maturases *HydEF*. Cependant, sans la présence de la maturase *HydG*, il y a une complète absence d'activité de l'hydrogénase.

Les auteurs concluent que la maturase *HydG* est indépendamment assemblée des deux autres *HydE* et *F* selon le modèle proposé suivant ([Kuchenreuther, Britt et al. 2012](#)),



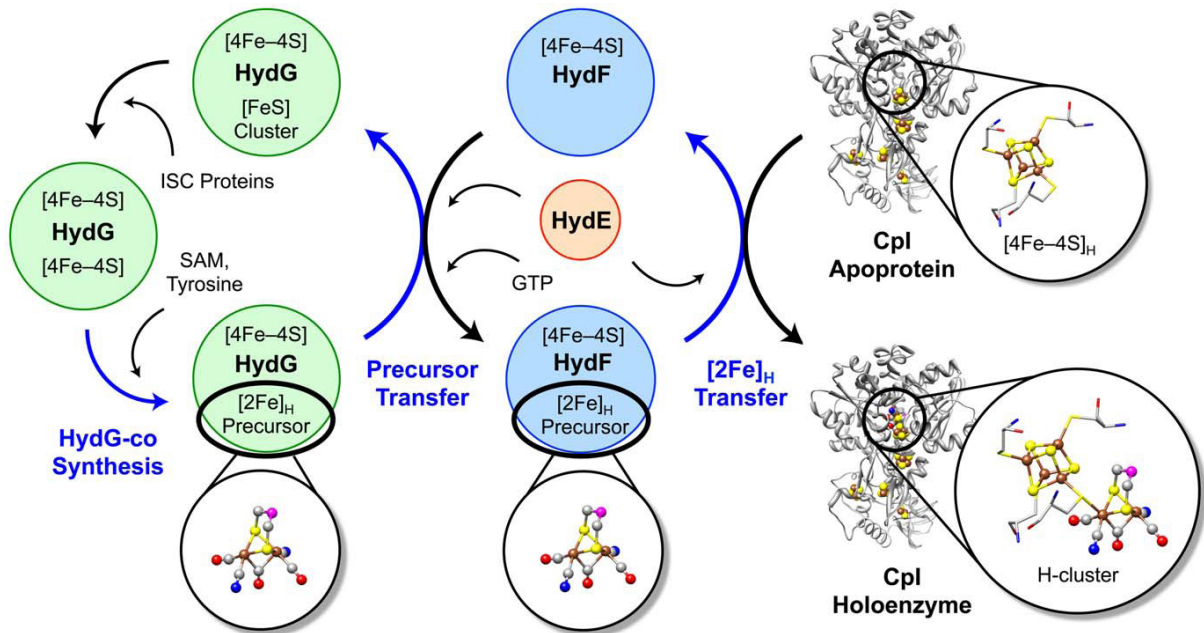


Figure 6 : Model d'assemblage des trois maturases de l'hydrogénase : HydG, E et F, (Kuchenreuther, Britt et al. 2012).

La position de la maturase HydG en tant que précurseur peut expliquer que, sous l'hypothèse qu'elle est assemblée séparément, les mutants *Hyd E* et *F* présentent une activité hydrogénase, le précurseur HydG étant toujours présent (Kuchenreuther, Britt et al. 2012).

II Inhibiteurs

Cette section vise à donner quelques informations supplémentaires sur les inhibiteurs utilisés.

1 Le glycol aldéhyde

Le glycol aldéhyde est un inhibiteur de la phospho-ribulo-kinase que nous avons utilisé dans nos expériences dites à la lumière, sur le contrôle de *Chlamydomonas reinhardtii* (Discussion).



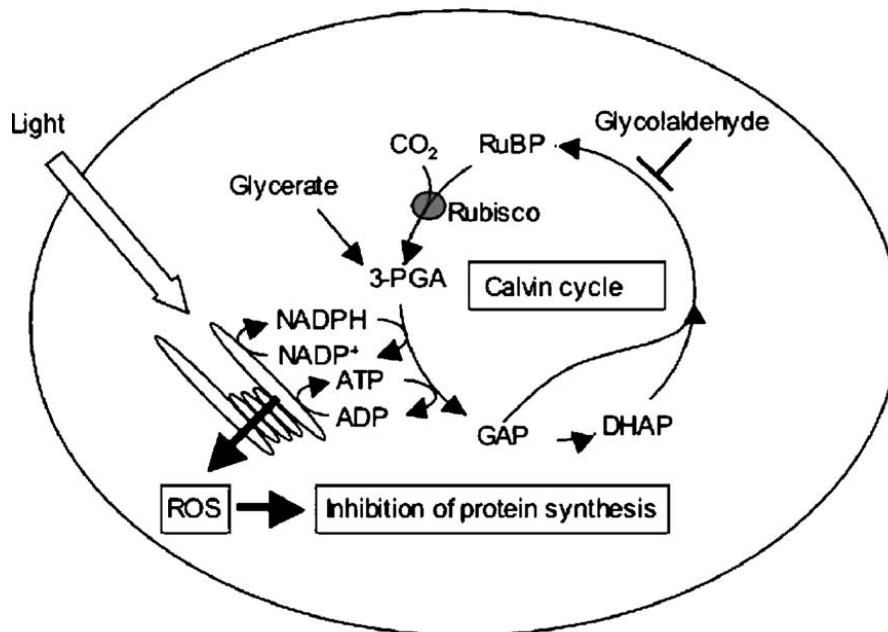


Figure 7 : Schématisation hypothétique de cycle d'échange métabolique dans le chloroplaste des organismes photosynthétiques de *Chlamydomonas reinhardtii*, pour le cycle de Benson Calvin. Abréviations, DHAP : Dihydroxy-acétone phosphate, GAP : Glyceraldéhyde-3-phosphate, 3-PGA : Glycérate-3-phosphate, RuBP : Ribulose-1,5-biphosphate, Rubisco : Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase / oxygénase. Référence ([Takahashi and Murata 2006](#)).

L'étude de cet inhibiteur montre une diminution de l'activité de la production d'oxygène dépendante de la lumière, dans les cellules, traduisant l'interruption de la fixation de carbone par le cycle de Benson-Calvin. Cette diminution dépend de la concentration de glycol aldéhyde utilisée, pour 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, montre une activité décroissante de 61 %, 41 % et 14 %, respectivement ([Takahashi and Murata 2005](#)).

2 Conditions d'études

On s'intéresse à l'activité du PSI, en utilisant des inhibiteurs du PSII (le DCMU et/ou l'hydroxylamine) bloquant le Photosystème du côté accepteur et donneur, le flux linéaire d'électron se trouvant alors bloqué. Le DCMU 10 μM (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthylurea) est utilisé comme inhibiteur spécifique du PSII en bloquant le côté accepteur, ainsi que l'hydroxylamine (HA) 1 mM, inhibiteur spécifique du PSII en bloquant le côté donneur.

III Techniques de culture de *Chlamydomonas reinhardtii*

1 Souches et conditions de cultures

Les souches (sauvage et mutantes) de *Chlamydomonas reinhardtii* ont été cultivées à 25°C, dans 200 ml ou 100 ml de TAP sous une lumière blanche continue d'environ 10-20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Inoculée (i.e. passage du milieu solide : boîte de Pétri au milieu liquide : TAP) au jour 0, diluée une première fois le troisième jour. Les échantillons pourront être utilisés le quatrième jour.

2 Préparation des échantillons - Etudes biophysiques



Les cultures (TAP + algues) sont centrifugées à 2455 RCF pendant cinq minutes à 20°C. Les algues sont re-suspendues dans 1 ml d'HEPES Ficoll (pH 7.2, 20 mM HEPES, 10 % Ficoll). Le Ficoll est un polymère de saccharose hydrophile qui rend la solution visqueuse permettant ainsi aux cellules de ne pas sédimenter. Et l'HEPES (Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) est utilisé comme solution tampon pour maintenir la structure. Les cellules sont diluées dans le milieu HEPES-Ficoll pour une concentration finale de 3-5. 10^6 cellules par ml, et mises dans de petit erlen ne contenant pas plus de 20 ml d'échantillon. Les cellules sont ensuite agitées dans le noir à 250 rpm pendant trente minutes.

2.1 Conditions d'études

Il est possible de placer la souche dans un état déterminé en contrôlant son milieu (aérobiose ou anaérobiose). L'utilisation de glucose/glucose-oxydase permet la condition anaérobique : la glucose-oxydase est une enzyme qui oxyde le glucose avec l'aide d'oxygène. Les conditions anaérobiques sont donc obtenues par une concentration de 20 mM de glucose et 2 mg/ml de glucose oxydase (type II, à partir d'*Aspergillus Niger*), ainsi que 50 UE de catalase. L'échantillon à étudier est ensuite placé dans une cuve étanche adaptée à l'appareil de spectroscopie : le JTS-10.

IV Techniques Physiques

1 Utilisation du JTS-10 (Joliot Type Spectrometer)

Le fonctionnement de la chaîne photosynthétique peut être évalué en utilisant la spectroscopie d'absorption résolue en temps. Cette technique permet de suivre les cinétiques de variations d'absorption associées aux transferts d'électrons au sein des différents complexes et ainsi de caractériser leur fonction. Plus important, elle peut être appliquée *in vivo*.

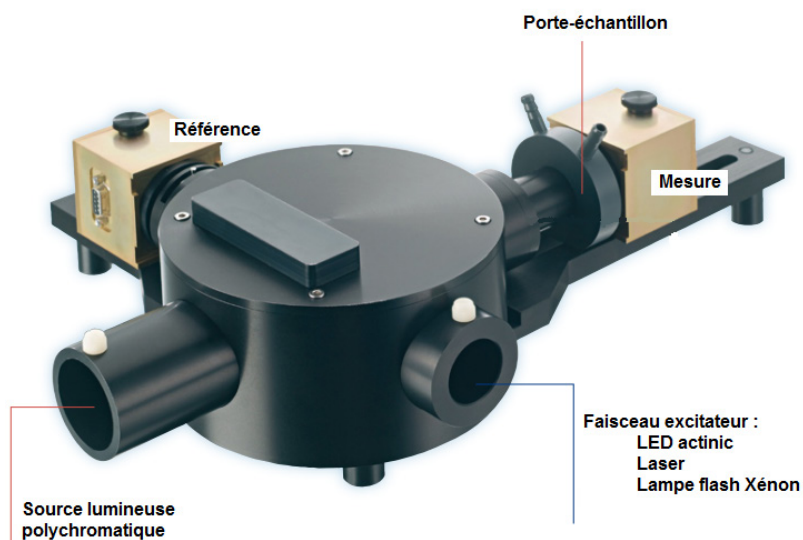


Figure 8 : Matériel spectrophotométrique utilisé, le JTS-10 (Joliot Type Spectrometer).

Le JTS-10 présenté sur la figure 8 est un spectromètre de mesure de fluorescence et d'absorbance. L'excitation de l'échantillon et la détection par la lumière permettent de suivre le transfert des électrons dans les organismes photosynthétiques, à



différentes longueurs d'ondes. Il devient donc possible de regarder spécifiquement tel mécanisme de tel complexe en changeant la longueur d'onde d'étude.

2 Champ électrique transmembranaire - 520 nm

Le transfert d'une charge à travers la membrane résulte en une variation de la densité de surface de charge des deux côtés de la couche lipidique et, en conséquence, en un changement dans l'amplitude du champ électrique transmembranaire.

La détection se fait par une source blanche avec l'utilisation d'un filtre interférentiel de 520 nm. Des filtres bleus BG-39-6 placés devant les détecteurs (mesure et référence, figure 8) pour rejeter la plupart de l'excitation due à la LED utilisée.

La mesure du champ électrique se fait par un flash laser qui n'induit qu'un seul électron par Photosystème. Pour la mesure de taille d'antenne, la détection se fait en lumière continue où l'on mesure la vitesse initiale du mécanisme.

3 Oxydation de P_{700} - (705 et 735) nm

L'oxydation du dimère de chlorophylle du PSI, nommé P_{700} est induite par l'illumination continue. Le programme superpose un pulse saturant de façon à déterminer la quantité totale de P_{700} photo-oxydable.

La détection se fait par une LED émettant dans la région des 700 nm avec l'utilisation d'un filtre interférentiel de 705 nm. Des filtres RG 695-6 sont placés devant les détecteurs pour rejeter la plupart de l'excitation due à la LED utilisée.

Le programme utilise la méthode dite de "pulse of dark" qui permet d'annuler la contribution potentielle de la lumière excitatrice quand cette dernière est trop proche en longueur d'onde de la lumière de détection pour être annulée par les filtres classiques.

Pour les mesures d'oxydo-réduction de P_{700} , l'absorbance en 705 nm est corrigée des contributions des autres composants de la chaîne photosynthétique, et cela par la soustraction de l'absorbance à 735 nm.

V Techniques biochimiques

La préparation des gradients de sucrose permettant l'observation de la bande CEF-supercomplexe et de son étude spectroscopique *in vitro* requièrent différentes étapes.

1 Gradient de sucrose

La préparation des gradients de sucrose doit se faire la veille du jour dit d'isolation des membranes thylacoïdales pour permettre aux gradients de s'équilibrer (toute une nuit à 4°C).

Dans chaque tube de gradient, type SW41Ti (11 ml), nous ajoutons 2,5 ml de chaque solution de sucrose {1,3 ; 1 ; 0,7 ; 0,4} M dans l'ordre décroissant, et 500 µl de la solution de sucrose {0,1} M (Tableau 1). Auxquelles nous avons rajouté le détergent TDM pour une concentration finale dans chaque solution de sucrose de 0,005 %.



Concentration solution	Concentration finale Tricine-NaOH pH 8.0	Concentration finale Sucrose
0,1 M	5 mM	0,1 M
0,4 M	5 mM	0,4 M
0,7 M	5 mM	0,7 M
1 M	5 mM	1 M
1,3 M	5 mM	1,3 M

Tableau 1 : Préparations des solutions de sucrose {1,3 ; 1 ; 0,7 ; 0,4 ; 0,1} M.

2 Solutions tampons – étapes précédentes l'isolation des membranes

2.1 Préparation des solutions tampons

Différents tampons vont être utilisés dans les diverses étapes de l'isolation des membranes thylacoïdales de *Chlamydomonas reinhardtii*. Les solutions HEPES (notées de 1 à 5) sont préparées selon les concentrations détaillées dans le tableau suivant,

	2M Sucrose	1M HEPES- NaOH pH 7.5	0.5M EDTA pH 8.0	0.5M NaF	1M glucose
HEPES 1 (500 ml)	75 mL (0.3M)	2.5 mL (5 mM)	10 mL (10 mM)	10 mL (10 mM)	50 mL (100mM)
HEPES 2 (200 ml)	180 mL (1.8M)	1 mL (5 mM)	4 mL (10 mM)	4 mL (10 mM)	20 mL (100mM)
HEPES 3 (100 ml)	65 mL (1.3M)	0.5 mL (5 mM)	2 mL (10 mM)	2 mL (10 mM)	10 mL (100mM)
HEPES 4 (100 ml)	25 mL (0.5M)	0.5 mL (5 mM)	2 mL (10 mM)	2 mL (10 mM)	10 mL (100mM)
HEPES 5 (500 ml)	-	2.5 mL (5 mM)	10 mL (10 mM)	10 mL (10 mM)	50 mL (100mM)

Tableau 2 : Préparations des solutions tampons HEPES.

2.2 Cultures de l'algue verte

Les cellules sont inoculées dans de grande quantité de TAP (jusqu'à 1,5 L), permettant de fournir assez de matériel pour l'isolation des membranes thylacoïdales. Cette dilution se fait à partir de culture de TAP – cellules déjà inoculées deux jours avant et diluée la veille de l'expérience. Cette dilution vise à obtenir une concentration cellulaire d'environ $3 \cdot 10^6$ C/ml.

En sont agitées à la lumière jusqu'à la première étape d'isolation des membranes.

Les cellules sont misent en condition anoxique par bullage d'argon pendant 40 minutes et à l'obscurité.

3 Isolation des membranes thylacoïdales

3.1 Préparation



Les cellules (TAP et cellules) sont centrifugées (2455 RCF, 5 minutes, 20°C) afin d'en récupérer le culot auquel, pour une quantité de 12 ml, nous ajoutons 2 mg / ml de glucose-oxydase, 100 mM (concentration finale) de glucose. Les solutions sont gardées dans la glace.

3.2 Casser les cellules

S'ensuit l'étape où les cellules sont cassées par French Press, veillant avant d'ajouter aux échantillons 100 mM (concentration finale) de PMSF et 10 mM (concentration finale) de NaF.

Le PMSF et le NaF sont des inhibiteurs de protéase, qui empêchent toute activité protéolytique après que les cellules soient cassées.

Les membranes et débris cellulaires sont récupérés dans la solution HEPES 1.

3.3 Flottaison des membranes...

Les cellules cassées et récoltées dans l'HEPES 1 sont centrifugées (15344 RCF, 20 minutes, 4 °C) afin de re-suspendre le culot dans 50 ml d'HEPES 2.

Ensuite ce volume est séparé en deux, et mit dans des tubes d'ultracentrifugation (SW31), auquel s'ajoute 6 ml d'HEPES 3 et les tubes sont complétés avec 7 ml d'HEPES 4.

Cette étape vise à séparer les membranes thylacoïdales intactes, qui se présentera dans la solution HEPES 3, des débris cellulaires restant dans la région HEPES 2, après centrifugation (SW31, 106750 RCF, 1 heure, 4 °C).

Les membranes thylacoïdales ainsi séparées sont transférées dans l'HEPES 5, qui va permettre de laver ces dernières du sucrose présent dans les échantillons.

Elles sont de nouveau centrifugées (15344 RCF, 20 minutes, 4 °C).

3.4 Quantité de chlorophylle

Pour pouvoir déterminer le volume à solubiliser selon la concentration de chlorophylle de chaque échantillon, nous devons déterminer cette dernière.

Pour cela chaque culot récupéré après la dernière étape de centrifugation et diluer 1000 fois dans l'acétone à 80 % et nous mesurons l'absorption de l'échantillon sous trois longueurs d'ondes. La mesure de la concentration de chlorophylle (en mg de Chl par ml) peut être calculée selon l'équation suivante,

$$[\text{Chl a} + \text{b}] = 17.76 * (\text{Abs [646.6]} - \text{Abs [770]}) + 7.34 * (\text{Abs [663.6]} - \text{Abs [770]}).$$

Celle-ci est ajustée à une concentration de 1,6 mg de Chl / ml.

J'ai préparé une solution de TDM (10 %) diluée avec la solution d'HEPES 5 (utilisée pendant la dernière étape d'isolation des MT) pour une concentration initiale de 1,7 %. Enfin, procédant à une dilution « volume pour volume », nous obtenons les concentrations finales de 800 µg de Chl / ml pour 0,85 % de TDM.

3.5 Solubilisation des membranes thylacoïdales

La solubilisation des membranes par le détergent a lieu en même temps que la dilution. L'échantillon lors de sa solubilisation est gardé dans la glace et agité délicatement toutes les cinq minutes pendant 20 minutes.



3.6 Dépôts des membranes isolées sur les gradients de sucrose

Puis 400 μg de chlorophylle est déposée sur chaque gradient de sucrose. Les tubes sont ensuite installés sur le rotor (SW41Ti) et ultra-centrifugés (247606 RCF, 24 heures, 4 °C).

Les tubes de gradients de sucrose pourront alors être fractionnés et les fractions spécifiquement étudiées *in vitro*.

4 Etudes *in vitro* - spectrophotomètre

Nous préparons, dans un premier temps un tampon contenant tous les éléments nécessaires à l'étude *in vitro* de la bande CEF-supercomplexe soit {0,005 % TDM, 2 mM MgCl_2 , 1 mM d'ascorbate, 30 mM NaCl et 30 mM de Tricine pH 8,2}. Nous diluons avec ce tampon les bandes PSI et CEF-supercomplexes afin d'obtenir la concentration finale de 20 μg Chl/ml dans l'échantillon.

4.1 Précision sur l'étude

Lors de notre premier essai d'étude avec le tampon décrit ci-dessus, les cinétiques de flash montraient une différence de quantité de P_{700} photo-oxydé avec et sans {Tricine - NaCl}. Avec, la quantité était inférieure qu'en présence du tampon {Tricine - NaCl}. Nous avons alors déclenché les cinétiques par les flashes, en attendant une minute entre chaque détection sur le même échantillon dans notre tampon et en présence de ferrédoxine.

Il s'est alors avéré qu'après chaque minute que nous attendions, non seulement nous retrouvions la quantité initiale de P_{700} photo-oxydé mais également nous observions une diminution forte de l'amplitude de la réduction de P_{700} à l'obscurité (pour détail voir [chapitre 3](#)).

VI Etude "physiologique" des algues

Les études présentées dans cette partie (paragraphe 1 et 2) sont issues d'expériences indépendantes.

1 Temps de re-suspension

Nous avons souhaité tester l'influence de la durée de re-suspension des algues, après avoir été mises à l'obscurité, sur la vitesse cyclique observée dans les conditions anoxiques.

La stratégie consiste à diluer les algues et à les partager dans des volumes égaux et de même concentration dans différents erlens. Les cellules sont ensuite agitées à l'obscurité en attendant les différents temps d'étude.

Temps d'attente des cellules agitées à l'obscurité	Vitesse photochimique k_{ox} (PSI) (électron/s)	Vitesse cyclique (électron/s)
30 minutes	210	33
1 heure	240	32
1 h 30	225	25
2 heures	201	23



Tableau 3 : Influence du temps de re-suspension des algues *C. reinhardtii* (t222+) sur le fonctionnement (cyclique et transition antenne) du système photosynthétique, dans les conditions anoxiques en **noir** et oxygène (prise à 30 minutes d'agitation à l'obscurité) en **violet**. Intensité 115 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$.

Les cellules du contrôle de *Chlamydomonas reinhardtii* montrent, une diminution dans la vitesse cyclique qu'il est possible de mesurer dans les conditions anoxiques lorsque, à volume constant, les cellules sont restées plus longtemps agitées à l'obscurité. Soit une vitesse de 33 électrons par seconde par PSI, comme publié dans notre article (Takahashi, Clowez et al. 2013) pour 30 minutes à l'obscurité dans les conditions anoxiques. Alors que cette vitesse diminue d'environ 30 %, soit de 23 $\text{e}^{-}\text{s}^{-1}$ PSI⁻¹ après 2 heures d'agitation. Pour expliquer cette diminution nous émettons l'hypothèse que les cellules agitées à l'obscurité pendant un temps long, doivent mettre en place différents métabolismes afin de survivre. La dégradation de l'amidon met en place différentes voies métaboliques, affaiblissant les ressources de l'algue et pouvant expliquer la diminution du CEF.

Cette expérience tend à montrer l'importance d'étudier les cellules moins d'une heure après leur re-suspension et agitation à l'obscurité, pour mesurer un CEF des plus efficace.

2 Adaptation à l'obscurité ou à la lumière

Dans cette présente étude nous avons étudié les cellules agitées (sans inhibiteurs) et à l'obscurité dans le souci de garder nos cellules contrôles et mutantes dans les mêmes conditions, le mutant *ptox2* devant rester à l'obscurité pour répondre à notre problématique.

Nous avons cependant considéré que ces conditions pouvaient avoir des conséquences métaboliques chez les algues, qui sans lumière, ne pouvaient pas s'alimenter par la photosynthèse. Nous avons donc décidé de faire les mesures fonctionnelles sur des algues étant maintenues, après resuspension, à la lumière ou bien à l'obscurité et sans inhibiteurs.

Conditions d'études	Vitesse photochimique k_{ox} (PSI) (électron /s)	Vitesse cyclique (électron /s)
Lumière (oxygène)	113	5
(anoxie)	168	27
Transitions des antennes	49 %	
Obscurité (oxygène)	150	6
(anoxie)	171	36
Transitions des antennes	13 %	

Tableau 4 : Récapitulatifs des mesures de cycliques du contrôle (t222+) *C. reinhardtii* en testant l'influence de la lumière (**rouge**) ou obscurité (**noir**) pendant la re-suspension des algues. Intensité 115 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$.



Les résultats représentés dans le tableau 4 montrent que, dans un premier temps, les conditions oxiques sont similaires indépendamment de l'illumination ou non des cellules. Alors que dans les conditions anoxiques elles sont différentes ; la vitesse cyclique étant plus faible lorsque les cellules ont été exposées à la lumière.

L'hypothèse est que les électrons ont pu être plus facilement évacués dans d'autres modes que celui cyclique, comme par le cycle de Benson-Calvin par l'ATP synthétisé à la lumière.

Comme il sera détaillé dans le chapitre 2, la situation au début de l'anoxie ($t = 5$ minutes) où il n'est pas possible d'observer d'oxydation de P_{700} est visible et cela indépendamment de l'illumination des cellules en re-suspensions. Cependant, le taux d'oxydation est plus grand chez les cellules pré-illuminées (39 %) alors qu'il n'est que de 16 % lorsque les cellules ont été gardées à l'obscurité (détails [chapitre 2](#)). Cette observation appuie notre hypothèse, qu'à la lumière les cellules synthétisant de l'ATP sont plus apte à rapidement transférer les électrons même si il reste une limitation côté accepteur du PSI, dans les conditions anoxique à l'obscurité.

Il est intéressant pour observer une transition d'état plus importante d'illuminer dans les conditions oxiques, les cellules. En effet, la transition d'antennes est de 49 % lorsque les algues ont été illuminées alors qu'elle est seulement de 13 % (valeur plus basse que celle publiée ([Takahashi, Clowez et al. 2013](#))) adaptées à l'obscurité. Les valeurs de vitesses photochimiques différentes dans les conditions oxiques et similaires dans les conditions anoxiques, comparées entre les cellules re-suspendues à la lumière ou non, suggèrent que la taille d'antenne du système I est plus grande, dans les conditions oxiques, lorsque les cellules sont à l'obscurité.

Il est possible de conclure que les cellules re-suspendues à la lumière présentent un meilleur état 1 que celles à l'obscurité.

De plus, cette expérience montre qu'il semble préférable d'adapter les cellules à l'obscurité pour mesurer un CEF des plus efficaces, même si ces résultats doivent être étayés par une analyse statistique.

Ces résultats suggèrent donc que le transfert d'électron cyclique semble être sensible aux conditions métaboliques et donc potentiellement à la croissance cellulaire, ce que nous nous proposons d'étudier maintenant.

3 Etude de la concentration des cellules - test de croissance

Nous voulons étudier à différents temps de croissance de l'algue la vitesse de cyclique dans les deux types de conditions.

La stratégie est d'inoculer plusieurs erlens de TAP dans le même temps, et en comptant le nombre de cellule en fonction du temps d'inoculation, d'estimer la concentration des échantillons (cellules / ml).

Concentration cellulaire 1.10 ⁶	Vitesse cyclique condition oxique (électrons /s)	Vitesse cyclique condition anoxique (électrons /s)
1.10 ⁶	18 ± 5	38 ± 5



5-6.10 ⁶	11 ± 1	28 ± 5
6.10 ⁷ (saturation)	9 ± 4	-

Tableau 5 : test de croissance – Mesure des vitesses cycliques du contrôle (*t*222+) de *C. reinhardtii* dans les conditions oxique et anoxique en fonction de la concentration cellulaire.
Intensité 115 µE/m²/s⁻¹.

Nous pouvons remarquer grâce au tableau 5 que plus la concentration en cellule est grande plus la vitesse cyclique diminue que ce soit dans les conditions oxique ou anoxique. Cependant l'augmentation du taux cyclique qui se fait entre la transition oxie – anoxie reste proportionnelle indépendamment de la concentration cellulaire, et augmente même légèrement lorsque cette dernière est plus importante. Soit une augmentation de 2 pour une concentration de 1.10⁶ cellules / ml et de 2,5 lorsque les cellules sont d'une concentration de 5-6.10⁶ cellules / ml.

Il semble donc que la concentration cellulaire a une influence sur la vitesse cyclique qui diminue lorsque la concentration des cellules augmente. Mais les rapports entre les vitesses lors de la transition oxie – anoxie restent similaires, ainsi la concentration cellulaire ne semble pas influencer l'augmentation du CEF.

Il reste cependant à vérifier si la légère augmentation de ce rapport pour une concentration de 5-6.10⁶ cellules / ml, est significative ou non, cela en mesurant les vitesses cycliques en condition anoxique pour des concentrations saturantes, soit 6.10⁷ cellules / ml.





CHAPITRE 1 : Commutation CEF Indépendante des Transitions des Antennes

Mesures Biophysique et Etudes Biochimique

I Objectifs

Notre objectif a donc été de déterminer la vitesse de fonctionnement du système en mode cyclique en étudiant l'oxydation de P_{700} , chez le type sauvage et des mutants altérés dans la migration des antennes, chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. Et cela, dans les conditions où l'état 1 est promu, soit dans un état où le pool de plastoquinones est oxydé chez le contrôle, c'est-à-dire dans les conditions oxiques. Et les conditions où l'état 2 est promu, c'est-à-dire dans un état où le pool de plastoquinones est réduit chez le contrôle, soit dans les conditions anoxiques.

Il s'agit donc de déterminer le flux électronique généré par le Photosystème I dans ces conditions. Pour cela, il convient de déterminer la fraction molaire de P_{700} réduite. Cette quantité étant connue, le flux généré par le fonctionnement du système est donné par le produit de la vitesse à laquelle P_{700} est oxydé par la fraction de P_{700} réduit.

1 Souches utilisées

La souche contrôle (*t222+*), et les mutants *stt7* (Fleischmann, Ravanel et al. 1999) et *ptox2* (Houille-Vernes, Rappaport et al. 2011), bloqués à l'état 1 ou 2, sont utilisés pour répondre à notre problématique.

Alors que la souche sauvage *t222+* se trouve à l'état 1 dans les conditions oxiques et est à l'état 2 en conditions anoxiques, le mutant *stt7* inactivé pour la kinase responsable de la phosphorylation des antennes, ne pouvant alors faire la migration des antennes LHCI, reste bloqué à l'état 1 dans les deux types de conditions. Et le mutant *ptox2* affecté sur l'oxydase plastidiale qui contribue à déterminer l'état redox du pool de plastoquinones à l'obscurité, est bloqué à l'état 2 à l'obscurité, dans les deux types de conditions (Voir pour plus de détails, la rubrique **matériels et méthodes**). Ces souches nous ont permis d'étudier les conséquences fonctionnelles de la réorganisation des membranes thylakoïdales sur l'efficacité du transfert d'électrons cyclique.

Si nous résumons sous forme d'un tableau schématique l'intérêt de l'utilisation des différentes souches pour traiter notre problématique, nous obtenons la figure suivante,



Conditions:	Oxique	Anoxique
	OXIDE	REDUIT
 PSII PSI ETAT 1	Control stt7	stt7
 PSII PSI ETAT 2	ptox2	Control ptox2

Figure 1 : Représentation schématique de la distribution des souches étudiées selon l'état 1 et/ou 2 en fonction de l'état redox du pool de plastoquinones (oxydé ou réduit)

Ces différentes souches, dont un contrôle et deux mutantes, fournissent un tableau complet qui nous a permis de discriminer la transition d'états des changements dans l'état redox.

II Méthodes physiques et résultats graphiques

C'est donc par spectroscopie d'absorption, que nous allons étudier les différents états redox, à différentes longueurs d'ondes.

Nous avons quantifié le degré d'oxydation de P₇₀₀ en absence de fonctionnement du Photosystème II, par l'utilisation de DCMU, de façon à nous affranchir du transfert d'électrons linéaire et donc à n'observer que le transfert d'électrons cyclique. Les conditions anoxiques sont obtenues par l'ajout de glucose oxydase, de glucose et de catalase.

Comme expliqué ci-dessus, pour mesurer le flux généré par le Photosystème I en mode cyclique, nous devons avoir accès à la fraction de P₇₀₀ réduite et la vitesse à laquelle le Photosystème est oxydé.

Il convient donc, avant même de déterminer P₇₀₀, de déterminer la vitesse d'oxydation induite par une illumination à une intensité lumineuse donnée.

1 Vitesse photochimique – Mesure à 520 nm

Pour ce faire, nous avons tiré parti du déplacement électrochromique qui consiste en un déplacement des spectres d'absorption des pigments photosynthétique composant les antennes collectrices de lumière en présence d'un champ électrique. Les donneurs et accepteurs des électrons des différents complexes photosynthétiques sont placés de part et d'autre de la membrane thylacoïdale, ce qui a pour effet, lors d'une lumière continue de créer une séparation de charge à travers les membranes, due aux échanges d'électrons entre les Photosystèmes et le cytochrome *b₆f*, qui se produit lors du fonctionnement de la chaîne photosynthétique (Junge and Witt 1968). Il résulte des déplacements des électrons et des protons à travers la membrane, la création d'un champ électrique, qui a pour effet de modifier l'énergie associée aux bandes d'absorption des pigments présents dans la membrane.



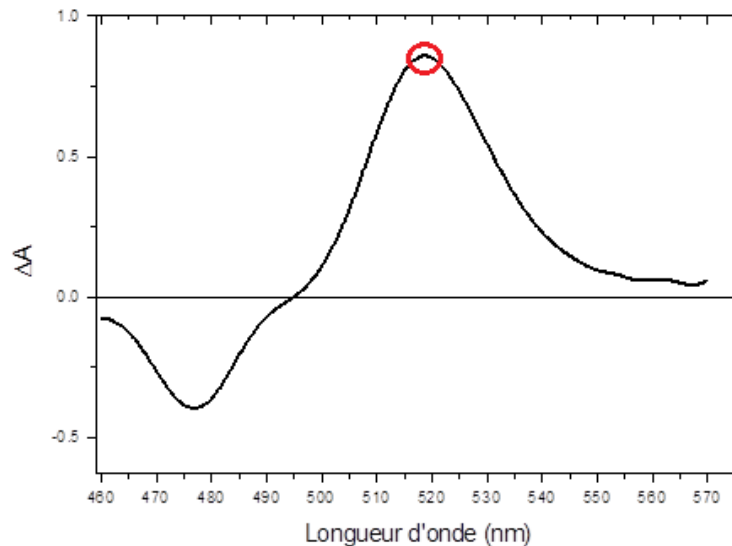


Figure 2 : Spectre d'absorption de la chaîne photosynthétique – déplacement de la bande électrochromique. Pic du signal à 520 nm (**cercle rouge**).

Ces variations d'absorptions sont observables à la longueur d'onde de 520 nm et se trouvent être proportionnelles au champ électrique photo-induit (figure 2).

Nous avons donc en notre possession une méthode non-invasive, par l'étude spectroscopique, qui nous permet de sonder les changements de potentiel membranaire (Bailleul, Cardol et al. 2010).

En utilisant un flash laser saturant qui n'induit qu'un seul transfert d'électrons par Photosystème, nous obtenons, par le biais de ce signal électrochromique, des informations précises sur le fonctionnement des complexes photosynthétiques de la chaîne.

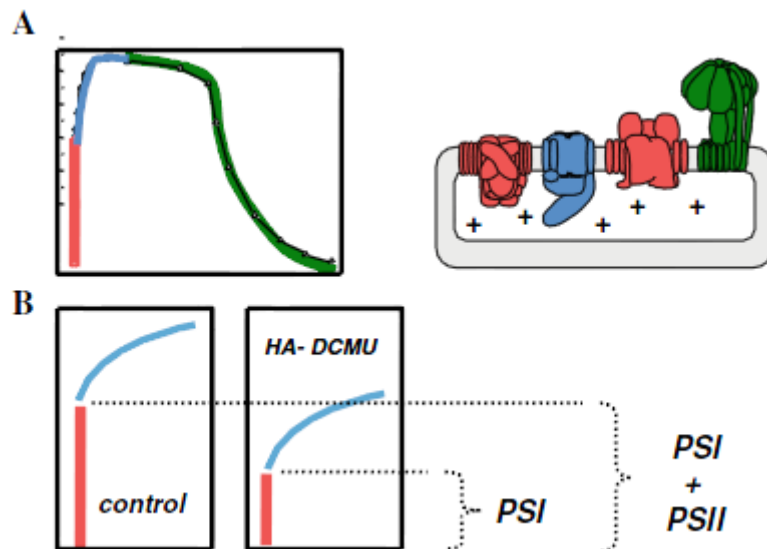


Figure 3 : cinétique électrochromique chez *Chlamydomonas reinhardtii* sous excitation lumineuse avec un pulse laser saturant (Bailleul, Cardol et al. 2010).

Description de la courbe A ; La première phase rapide du champ électrique, appelée phase a (rouge), est consécutive à la séparation de charge au sein des Photosystèmes.



La seconde réponse plus lente, appelée phase b (bleue), correspond à l'activité du complexe cytochrome *b₆f* qui participe à la création du champ, d'où l'augmentation du signal. Et enfin, la phase c (verte), de pente variable, qui traduit la consommation du champ par le complexe ATP synthase (Joliot and Delosme 1974).

L'étude de ces différentes phases permet d'estimer les différents niveaux d'activité, selon les conditions et les souches utilisées, des différentes enzymes composant la chaîne photosynthétique.

Comme nous l'avons déjà signalé, l'utilisation d'inhibiteurs du Photosystème II, permet de bloquer le transfert d'électrons linéaire, favorisant le fonctionnement de la chaîne photosynthétique en mode cyclique.

Dans ce cas, cela nous permet d'estimer la quantité de Photosystème I et II, par l'étude de la phase a avec et sans l'utilisation d'inhibiteurs (DCMU et d'hydroxylamine).

Dans notre cas, seul le fonctionnement du Photosystème I nous intéresse, d'où l'utilisation d'inhibiteurs du PSII. Cette mesure permet de calibrer la variation d'absorption photo-induite correspondant à exactement un électron transféré par PSI.

De plus, l'illumination continue induit le fonctionnement de la chaîne photosynthétique et entraîne de ce fait la production continue du champ électrique. Les mesures des pentes ainsi faites, au temps court, sont proportionnelles au nombre de charge qui sont transférées sous illumination continue, à travers la membrane, par unité de temps. Et, l'amplitude de la phase a, en présence de DCMU et d'hydroxylamine, mesurée après un simple flash, comme décrit ci-dessus, permet la calibration de ce signal et son expression en nombre d'électrons transférés par PSI.

La figure 4 ci-dessous, représente les pentes des changements d'absorptions sous illumination continue,



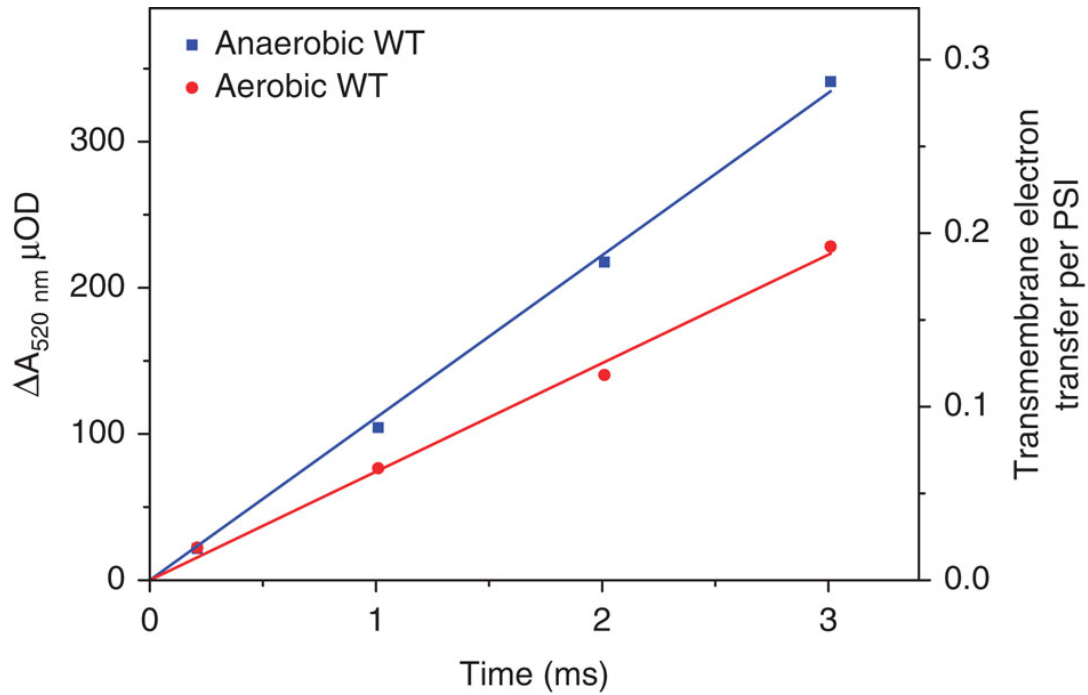


Figure 4 : Variation de la taille d'antennes pendant la transition des antennes, chez le type sauvage (*t222+*) de *Chlamydomonas reinhardtii*, sous illumination continue dans les conditions oxygène (**rouge**) et anoxique (**bleue**), à l'intensité de $52 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. (Takahashi, Clowe et al. 2013).

Grâce à la calibration des signaux en illumination continue par l'amplitude du signal électrochromique, l'axe y peut être normalisé et exprimé en nombre d'électrons transférés par PSI, figurant sur l'axe des y à droite de la figure. Donnant ainsi, directement accès à la vitesse d'oxydation du Photosystème I, induite par une illumination à une intensité lumineuse donnée, ici $52 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, en termes d'électrons par seconde par PSI.

Comme nous pouvons le voir sur cette figure, la vitesse de génération du champ électrique est plus grande en anaérobiose (bleue) qu'en aérobiose (rouge) et ceci bien que les deux expériences soient faites à la même intensité lumineuse. Ceci traduit la migration des antennes vers le PSI, reflétant la transition d'états qui induit une augmentation de la section efficace de capture de l'énergie lumineuse et donc du flux excitonique arrivant sur le PSI.

Il nous a donc été possible de mesurer les taux de séparation de charge pour les trois souches en fonction des conditions anoxiques versus les conditions oxygènes. Ces valeurs sont représentées dans le tableau ci-dessous,

	Conditions oxygènes	Conditions anoxiques
<i>t222+</i>	$1,0 \pm 0,03$	$1,27 \pm 0,04$
<i>stt7</i>	$1,05 \pm 0,05$	$1,07 \pm 0,04$
<i>ptox2</i>	$1,2 \pm 0,03$	$1,25 \pm 0,02$

Tableau 1 : Récapitulatif de la taille relative des antennes du Photosystème I, moyennée sur



neuf expériences, pour la souche contrôle *t222+* et les mutants *stt7* et *ptox2*. Dans les conditions oxygène et anoxique en présence de DCMU ($10\mu\text{M}$). En **noir**, les souches à l'état 1 et en **bleu**, à l'état 2, c'est-à-dire lorsque les antennes mobiles LHCI sont associées soit aux PSII ou aux PSI, respectivement.

Ce tableau, montre d'une autre manière ce que nous pouvons voir sur la figure 4, pour le contrôle, soit l'augmentation de la section efficace du Photosystème I, lorsque celui-ci passe d'une taille relative d'antenne de 1,0 à 1,27 lors du passage des conditions oxygène à anoxique.

De même, chez le mutant *stt7*, la variation du ratio du taux de séparation de charge entre l'anoxie par rapport à l'aérobiose est de 1,02. De même, chez le mutant *ptox2* ce rapport n'est que de 1,05, alors que la variation chez le WT est de 1,25. Ceci est conforme à la prédiction selon laquelle chez nos deux souches mutantes la transition entre conditions oxygène et anoxique ne s'accompagne pas d'une variation de la section efficace de capture du PSI.

De plus, nous retrouvons dans ces valeurs, le fait que le mutant *ptox2* dans les conditions oxygènes est à l'état 2, puisqu'il présente une taille d'antennes relative similaire au contrôle *t222+* obtenue dans les conditions anoxiques, où le WT est à l'état 2. Ceci est en accord avec le fait que ce mutant, affecté sur l'oxydase plastidiale, présente un état redox du pool de plastoquinones réduit, à l'obscurité, dans les deux types de conditions. Le mutant *ptox2* se trouve bien à l'état 2.

De même pour le mutant *stt7*, qui présente dans les deux cas, une taille d'antennes relative du PSI similaire à celle du WT dans les conditions oxygènes. En accord, avec sa mutation qui affecte la kinase responsable de la phosphorylation des antennes, bloquant *stt7* dans l'état 1, soit dans la situation où les antennes sont associées aux PSII.

Nous avons donc ainsi accès aux vitesses d'oxydation induites par l'illumination du système dans les trois souches d'étude.

2 Oxydation du dimère de chlorophylle, P_{700} du PSI - Mesure à (705 et 735) nm

Maintenant, l'objectif est la quantification du flux produit par le transfert cyclique, et c'est par le biais de l'oxydation de P_{700} que l'on va pouvoir obtenir des informations sur ce transfert.

En effet dans ce cas, P_{700} est, avec la chlororespiration, la source d'injection principale d'électrons dans le système et l'observation du degré d'oxydation de P_{700} connaissant la vitesse à laquelle il est oxydé donne une mesure de la vitesse à laquelle il est réduit. En d'autres termes, nous avons accès à la vitesse du transfert des électrons entre le PSI et le cytochrome *b₆f*, associé au transfert d'électrons cyclique.

L'oxydation de P_{700} en P_{700}^+ se manifeste par une baisse d'absorbance à environ 700 nm, c'est pour cela que l'expérience est effectuée en mesurant les variations d'absorption à 705 nm.

Après correction par la soustraction de l'absorbance à 735 nm correspondant aux contributions des autres composants de la chaîne photosynthétique, comme la plastocyanine, nous obtenons des variations d'absorptions spécifiques de l'oxydation



de P₇₀₀.

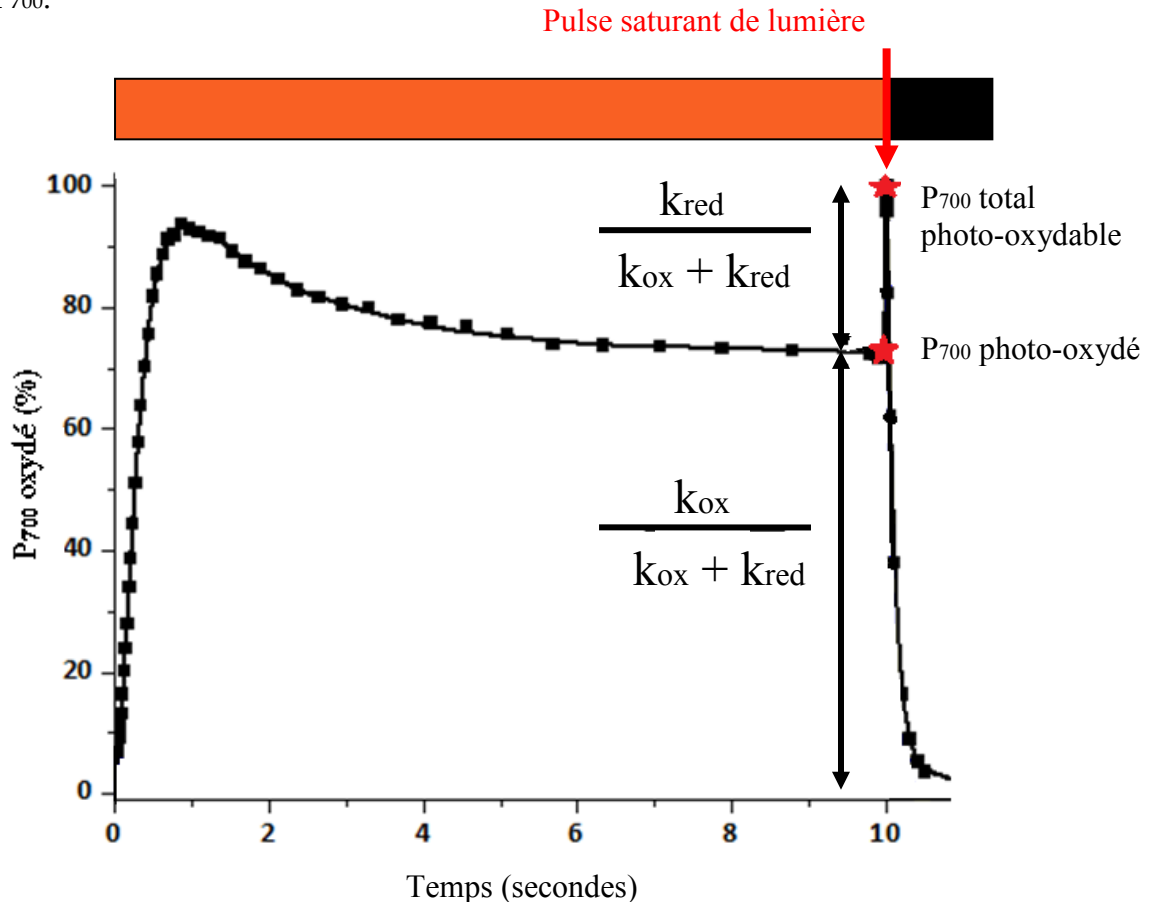


Figure 5 : Schématisation de la courbe de la variation d'absorption de P₇₀₀ chez un type sauvage (t222+) de *Chlamydomonas reinhardtii*, à 705 nm après correction à 730 nm. Intensité de 52 µE/m²/s.

Comme le montre la cinétique en noire sur la figure 5, dès l'application de la lumière une rapide oxydation de P₇₀₀ à lieu, correspondant à une diminution de l'absorption. Après quelques secondes d'illumination continue, nous observons un état stationnaire pour lequel la vitesse de réduction de P₇₀₀⁺ est égale à la vitesse d'oxydation de P₇₀₀ (étoile rouge). Après le pulse de lumière saturant (symbolisé par la flèche rouge), la lumière est éteinte, ce qui conduit à la ré-augmentation de l'absorbance qui traduit la re-réduction de P₇₀₀ à l'obscurité.

Nous avons recouru à une méthode développée par Klughammer et Schreiber ([Klughammer and Schreiber, 1994](#)), visant à déterminer le rendement d'oxydation du Photosystème I.

Il est possible, de par l'application d'un pulse de lumière saturant à l'état stationnaire, de quantifier la quantité totale de P₇₀₀ photo-oxydable, de façon à pouvoir calibrer les signaux obtenus en terme de fraction molaire ([Klughammer and Schreiber, 1994](#)). Cette technique permet de vérifier que l'oxydation de P₇₀₀ n'est pas limitée. Cependant, elle présente tout de même une source d'erreur dans une possible surestimation du degré de centre réactionnel fermé. Et ceci par la fermeture de quelques centres réactionnels ouverts, qui serait induite par la sur-réduction de



leurs pools d'accepteurs due à l'utilisation du pulse ([Baker, Harbinson et al. 2007](#)).

La différence entre cette quantité de P_{700} totale photo-oxydable, obtenue grâce au pulse, et la quantité de P_{700} oxydé à l'état stationnaire (entre les deux étoiles rouges), normalisée par la quantité de P_{700} totale oxydable, nous donne accès à la fraction molaire de P_{700} maintenu à l'état réduit à la lumière.

3 Vitesse d'électrons cyclique

Cette fraction étant déterminée, sa multiplication par le nombre de photons absorbés par PSI par unité de temps obtenu précédemment, nous permet d'estimer le flux d'électrons cyclique généré par le Photosystème I, en termes d'électrons par seconde par Photosystème.

III Conditions expérimentales

Les transitions d'états chez les organismes photosynthétiques sont contrôlées par les changements de l'état redox du pool de plastoquinones ([Allen, Steinback et al. 1981](#) ; [Wollman. 2001](#) ; [Rochaix. 2007](#)) (cf. [Introduction](#)).

Pour l'étude des souches de *Chlamydomonas reinhardtii*, dans des conditions variées d'état redox du pool de plastoquinones, nous avons pu jouer sur les conditions environnementales de l'algue. C'est-à-dire en contrôlant l'état oxygène et anoxique des échantillons.

1 Conditions oxygènes

Dans les conditions oxygènes, la chaîne respiratoire contribue de façon indirecte à la fixation du carbone par la synthèse d'ATP mitochondriale et par la consommation de NADPH, produit par la chaîne linéaire photosynthétique.

Dans ces conditions oxygènes ambiantes dans la cellule, le pool de plastoquinones est essentiellement oxydé, et donc induit, chez le type sauvage de *Chlamydomonas*, la migration des antennes mobiles LHCI du Photosystème I vers le Photosystème II (référence [introduction](#)). L'algue verte type sauvage se trouve alors dans l'état 1.

2 Conditions anoxiques

En conditions anoxiques ambiantes dans les cellules, la respiration cellulaire s'arrête, il n'y a donc plus de production d'ATP mitochondriale. De plus, dans de telles conditions, la consommation du pouvoir réducteur n'a plus lieu, conduisant l'état redox fortement réduit du pool de plastoquinones. Cela induit donc, chez le type sauvage de *Chlamydomonas* la migration des antennes mobiles LHCI du Photosystème II vers le Photosystème I, appelé état 2.

L'étude de l'oxydation de P_{700} dans ces conditions semblait difficile. Les études de Jean Alric & al ([Alric, Lavergne et al. 2010](#)) en conditions anoxiques montraient qu'aucune oxydation du PSI n'est observée, ce qu'ils ont interprété comme traduisant la recombinaison de charge rapide entre les accepteurs d'électrons du PSI et P_{700}^+ .

Ceci est en accord avec nos résultats au début de l'anoxie chez le type sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii*, et c'est ce que nous nommons le mode bloqué dans l'article ([Takahashi, Clowe et al. 2013](#)), traduisant cette forte réduction du Photosystème I. Seulement, nous constatons que le système se ré-oxyde de façon



partielle, après 10 minutes d'anoxie. Jusqu'à une récupération totale de l'oxydation de P₇₀₀ entre 30 et 40 minutes d'anoxie, alors que les cellules sont gardées à l'obscurité entre chaque temps (5min, 15min, 35min) de détection des cinétiques.

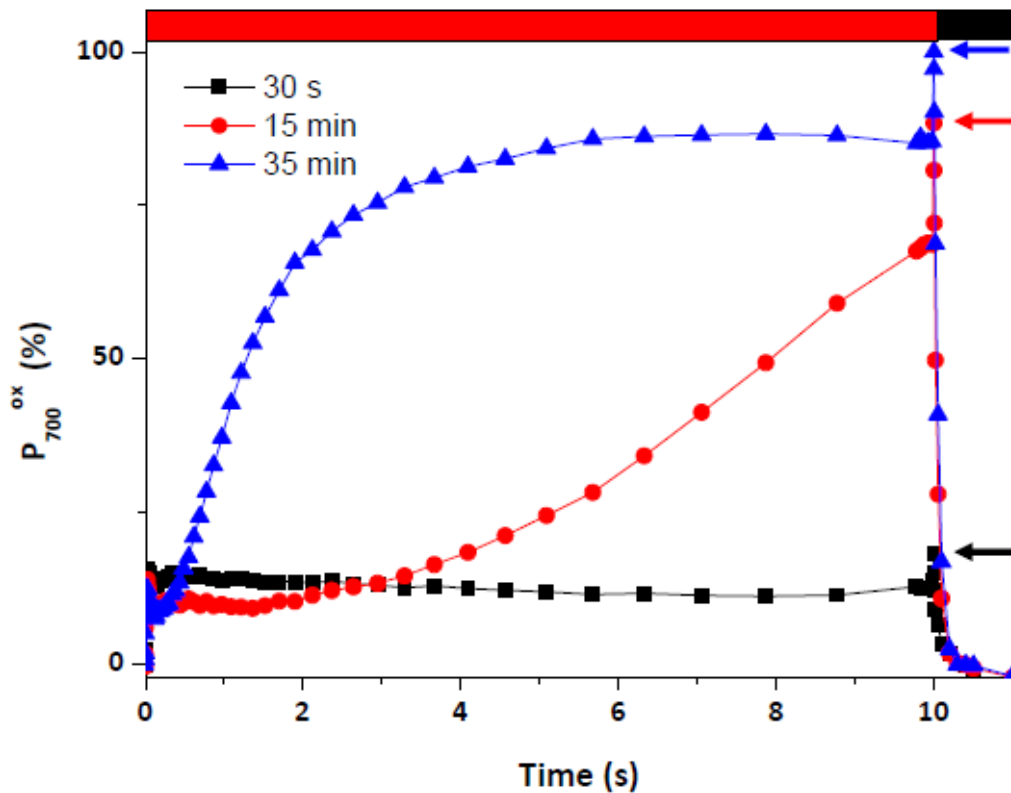


Figure 6 : Cinétiques d'oxydation de P₇₀₀, en présence de DCMU (10µM), chez le type sauvage *t222+* de *C. reinhardtii*, dans les conditions anoxiques et à différents temps d'anoxie. Description des cinétiques selon les temps d'anoxie, **carré noir** t=30 s, **rond rouge** t=15 min et **triangle bleu** t=35 min (Takahashi, Clowez et al. 2013).

La courbe noire, au tout début de l'anoxie, traduit les observations décrites précédemment sur l'impossibilité d'observer l'oxydation de P₇₀₀, et que nous avons appelé le mode bloqué. Cette situation est observée pendant les 10 premières minutes d'anoxie, où il s'opère une très forte réduction du Photosystème I. Comme décrit précédemment, le pulse saturant de lumière excitatrice à l'état stationnaire indique la quantité maximale de P₇₀₀ qui peut être oxydé. Au tout début de l'anoxie, nous constatons que la quantité totale de P₇₀₀ photo oxydable obtenue sous les conditions anoxiques n'est pas atteinte (flèche noire), contrairement à la situation à 30 - 40 minutes d'anoxie (flèche bleue). Soit entre le déclenchement de l'anoxie et 10 minutes, seulement 20 % de la quantité de P₇₀₀ photo-oxydable semble atteinte, pour 100 % après 30 - 40 minutes d'anoxie.

Après environ 15 minutes d'anoxie, courbe rouge, on observe une évolution du système qui se manifeste par une oxydation de P₇₀₀, jusqu'à atteindre environ 80 % de la quantité de P₇₀₀ photo-oxydable totale. Il semble donc maintenant possible, sans toutefois encore atteindre la totalité, d'oxyder le Photosystème I. Donc les électrons qui arrivent en amont de la chaîne dès l'application de la lumière, ont à présent la



possibilité d'être transférés aux accepteurs côté PSI, ce qui implique la suppression de la limitation existante de ce côté au début de l'anoxie.

Enfin, la courbe bleue obtenue après 35 minutes d'anoxie montre une complète récupération de la fraction de P_{700} photo-oxydable, identique à la fraction obtenue dans les conditions oxiques, observée grâce à l'application du pulse saturant. Nous avons nommé cette situation (Takahashi, Clowez et al. 2013), le mode débloqué, puisque à ce temps d'anoxie les cinétiques révèlent une totale restauration de la fraction de P_{700} photo-oxydable.

L'analyse du flux d'électrons cyclique par l'étude de l'oxydation de P_{700} à l'état 2, c'est-à-dire sous les conditions anoxiques pour le type sauvage de *C. reinhardtii*, devient donc possible. Et cela, sous la condition importante d'attendre au minimum 30 minutes après avoir déclenché l'anoxie par l'ajout de glucose, glucose-oxydase et catalase.

La question de l'origine de ce mode bloqué et des mécanismes permettant la transition spontanée vers le mode bloqué fera l'objet d'un chapitre dédié. Mais avant de traiter cette question, je souhaite revenir à celle qui a motivé nos travaux : *Est-ce la redistribution latérale des antennes mobiles LHCI ou les conditions fortement réductrices qui déclenchent leurs migrations le long de la membrane thylacoïdale, qui est responsable de la commutation entre flux linéaire et cyclique ?*

Pour traiter cette question selon la stratégie décrite précédemment, j'ai tout d'abord vérifié qu'il était possible, chez les trois souches identifiées comme d'intérêt, d'obtenir la situation « débloquée ». L'évolution spontanée obtenue pour les deux souches mutantes *stt7* et *ptox2*, dans les conditions anoxiques présente le même profil temporel que chez le WT. Les conditions d'études sont donc les mêmes pour les trois souches de travail.

IV Résultats cycliques

Suivant la stratégie présentée dans notre article (Takahashi, Clowez et al. 2013), les cinétiques d'oxydation de P_{700} des différentes souches sont comparées entre elles, dans les conditions oxique et anoxique (sous deux intensités différentes, telles que 52 et 115 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$). Notre idée ici, est que par l'observable de l'oxydation de P_{700} et des différents mutants altérés dans leurs reconfigurations de la chaîne photosynthétique lors du passage état 1 à état 2, c'est-à-dire dans la migration des antennes, il nous serait possible de voir une conséquence ou non sur le CEF, causée par cette migration.

Mais avant ces études comparatives, il semblait important d'établir que le flux d'électrons cyclique à travers la chaîne augmente lors du passage de condition redox ambiante oxydée à réduite, et ceci chez le WT. C'est ce que nous avons montré dans notre article (Takahashi, Clowez et al. 2013), dans lequel nous trouvons la figure suivante,



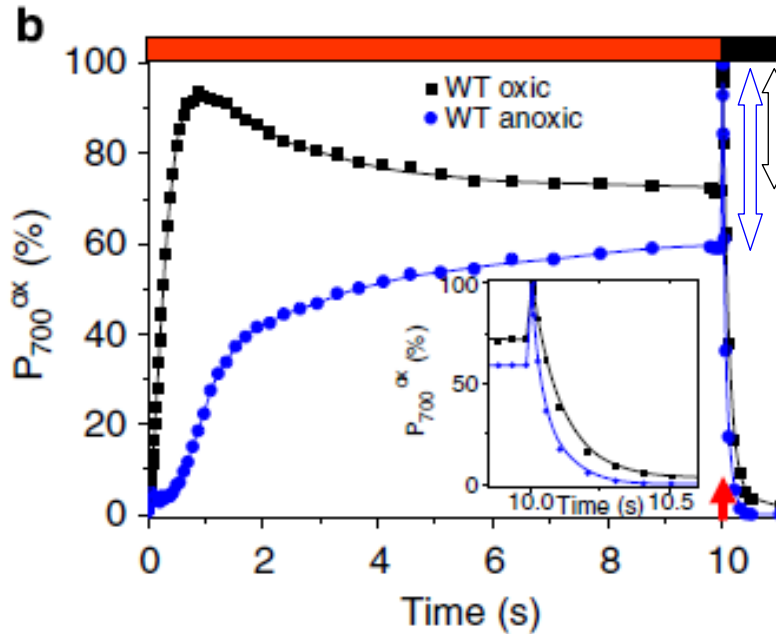


Figure 7 : Cinétiques des changements redox de P700 chez le type sauvage *t222+* de *C. reinhardtii* en fonction du temps (s), dans les conditions oxygène (DCMU 10 μ M et 1 μ M HA), **carré noir** et anoxique (DCMU 10 μ M, glucose 20 mM, glucose-oxydase 2mg/ml et catalase 50 unités/ml), **cercle bleu** (Takahashi, Clowez et al. 2013).

La courbe bleue montrant l'oxydation du Photosystème I dans les conditions anoxiques après 35 minutes, présente un état stationnaire plus faible que celui de la courbe noire, obtenue dans les conditions oxygènes. Les pulses saturants de lumière montrent la même fraction de P700 photo-oxydable dans les deux types de conditions. Cette différence entre les deux états stationnaires traduit l'augmentation de la fraction de P700 réduit et donc l'augmentation du flux d'électrons cyclique associée à la transition entre les conditions oxygène à anoxique. En d'autres termes, le transfert d'électrons cyclique est plus important dans les conditions anoxiques que dans les conditions oxygènes chez le type-sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii*. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés dans (Johnson, Alric. 2012 ; Alric. 2010). Comme il l'a été signalé précédemment, ces auteurs n'observent pas d'accumulation de P700⁺ dans les conditions anoxiques, suscitant l'idée que le transfert d'électrons est bloqué du côté accepteur du PSI du fait de la recombinaison de charge.

Nous avons ensuite comparé les vitesses du transfert d'électrons cyclique chez le contrôle, *ptox2* et *stt7* et ceci en condition oxygène comme anoxique (Takahashi, Clowez et al. 2013). Cette comparaison, présentée dans le tableau 2, nous a conduites à conclure que les vitesses de transfert d'électrons cycliques sont indépendantes de l'état d'association des antennes aux PSII ou aux PSI, mais dépendent de l'état redox ambiant.



Table 2 Cyclic electron transfer rates in the wild type, <i>stt7</i> and <i>ptox2</i> strains in oxic and anoxic conditions.		
	Cyclic electron transfer rates ($e^- s^{-1}$ per PSI) $\pm$ s.d.	
	Oxic conditions	Anoxic conditions
<i>WT</i>		
56 $\mu E m^{-2} s^{-1}$	14 $\pm$ 3 (PS II)	35 $\pm$ 4 (PS I)
135 $\mu E m^{-2} s^{-1}$	17 $\pm$ 2 (PS II)	40 $\pm$ 5 (PS I)
<i>stt7</i>		
56 $\mu E m^{-2} s^{-1}$	17 $\pm$ 2 (PS II)	32 $\pm$ 4 (PS II)
135 $\mu E m^{-2} s^{-1}$	17 $\pm$ 3 (PS II)	33 $\pm$ 5 (PS II)
<i>ptox2</i>		
56 $\mu E m^{-2} s^{-1}$	17 $\pm$ 5 (PS I)	30 $\pm$ 4 (PS I)
135 $\mu E m^{-2} s^{-1}$	22 $\pm$ 4 (PS I)	33 $\pm$ 3 (PS I)
The flux associated with cyclic electron transfer was measured as in the study by Alric et al.³² using DCMU to inhibit LEF. To insure that the measured fluxes were not kinetically limited by photochemical turnovers, we used two different light intensities: 56 and 135 $\mu E m^{-2} s^{-1}$ that correspond to Photosystem I turnovers of ~ 60 and $150 e^- s^{-1}$ per PSI, respectively (see text and Fig. 3, for a detailed description of the methods allowing these estimates). In both cases, the photochemical rate was thus twice- to four-fold larger than the measured CEF rate, so that cyclic electron transfer was the limiting step in the process. In each case, the association of LHCII mobile antenna to PS II or PSI is highlighted by (PS II) or (PSI), respectively. The data are the average of nine independent experiments.		

Tableau 2 : Issu de l'article Takahashi, H. Clowez, S. & al. (Takahashi, Clowez et al. 2013). Vitesses de transfert d'électron en termes d'électrons par unité de temps par PSI, en présence de DCMU (10 μM).

Nous observons, dans un premier temps dans les conditions oxygènes, que pour la souche *ptox2* qui se trouve à l'état 2, les valeurs CEF atteignent des niveaux équivalents à ceux du contrôle *t222+*, et ceci pour deux intensités différentes.

Donc, s'il existait une corrélation entre association des antennes au PSI ou au PSII et commutation vers l'un des types de transferts d'électrons préférentiel (LEF ou CEF), alors l'état 2 doit être accompagné d'un fort transfert d'électrons cyclique, plus important que celui atteint à l'état 1.

Or, chez *ptox2* à l'état 2, la vitesse cyclique atteinte est, dans les mêmes conditions oxygéniques, similaire à celle du contrôle *t222+* se trouvant, lui, à l'état 1 (Tableau 2).

En d'autres termes les valeurs présentées pour le CEF dans les conditions oxygènes sont analogues pour toutes les souches indépendamment de l'état d'association des antennes au PSI ou au PSII.

Dans un second temps, nous constatons que pour toutes les souches, lorsque celles-ci sont placées dans les conditions anoxiques, le flux d'électrons cyclique augmente par rapport à celui obtenu dans les conditions oxygènes.

Suivant la même réflexion que ci-dessus, mais cette fois pour le *stt7*, qui bloqué à l'état 1 quelles que soient les conditions, doit présenter, toujours dans l'idée qu'il existerait une forte corrélation entre migration des antennes et commutation entre les deux types de transferts d'électrons, un cyclique commensurable dans les conditions oxygène et anoxygène.



Or, chez le *stt7*, comme nous pouvons le remarquer dans le tableau 2, les vitesses de cycliques dans les conditions anoxiques ($32 \pm 4 \text{ e s}^{-1} \text{ PSI}^{-1}$) sont proches de celles du contrôle *t222+* ($35 \pm 4 \text{ e s}^{-1} \text{ PSI}^{-1}$) dans les mêmes conditions ($I = 52 \mu\text{E m}^2 \text{ s}^{-1}$).

La comparaison entre les trois souches, *stt7*, *ptox2* et le contrôle *t222+* de *Chlamydomonas reinhardtii*, nous a permis de tester l'incidence des transitions d'états sur la vitesse du transfert d'électrons cyclique. Et les résultats présentés et débattus ici, ainsi que dans notre article ([Takahashi, Clowez et al. 2013](#)), montrent que le transfert d'électrons cyclique évolue similairement lors de la transition entre conditions oxique et anoxique et cela chez les trois souches. La redistribution latérale des complexes membranaires associée à la transition d'état n'est donc pas nécessaire à la commutation vers un mode cyclique.

Ces constats suggèrent qu'il existe un autre paramètre responsable de l'augmentation de l'efficacité du cyclique lors de la transition vers l'anoxie et qui expliquerait, chez le WT, l'apparente corrélation entre cette augmentation et la transition d'état. Il est possible d'envisager que la réinjection des électrons du stroma au pool de quinone constitue l'étape limitante du transfert d'électron cyclique. Nous nous attendons alors à ce que cette vitesse dépende de la disponibilité du substrat donneur d'électron, ou en d'autres termes du pouvoir redox intracellulaire, celui-ci étant plus réducteur dans les conditions anoxiques que dans les conditions oxiques.

V Intérêt biochimique

Nous avons désiré étayer nos conclusions en suivant une autre stratégie, celle de l'analyse moléculaire, pour les trois souches et dans les deux types de conditions. Et cela en cherchant à isoler les supercomplexes, regroupant en une même unité biochimique les différents acteurs du transfert d'électrons cyclique, soit entre autre, les complexes récolteurs de lumière (LHCII), le complexe cytochrome *b₆f* (cyt *b₆f*), la ferrédoxine (Fd) – la NADPH - oxydoréductase (FNR), le Photosystème I (PSI) ([cf. introduction](#)). Tout cela dans le but de tester la solidité de la corrélation entre migration des antennes et formations des supercomplexes par une stratégie analogue.

En effet, Iwai, M. Takizawa, K. & al. ([Iwai, Takizawa et al. 2010](#)) ont identifié la formation de supercomplexe dans les conditions anoxiques, chez les cellules sauvages de *Chlamydomonas reinhardtii*, où l'état 2 est promu. Nous avons donc souhaité tenter de répondre à la question : *Quel est le mécanisme moléculaire qui contrôle la formation du supercomplexe CEF ?*

Pour répondre à cette question, nous avons repris ces travaux et étudié la formation des supercomplexes dans les deux types de conditions d'état redox et de transition d'états, pour le WT et pour nos deux mutants altérés dans la migration des antennes. En effet, l'intérêt ajouté à cette étude, et que comme le précise Iwai, M. Takizawa, K. & al. les deux transferts d'électrons dans la chaîne photosynthétique, linéaire et cyclique, partagent de nombreux transporteurs redox (le pool de plastoquinones, cyt *b₆f*, PC, PSI, Fd et FNR). Cette distribution est potentiellement à l'origine d'une compétition entre les deux flux. La formation des supercomplexes CEF à l'état 2, qui



compartimente les différents protagonistes du CEF, permettrait alors de favoriser le flux d'électrons en mode cyclique.

De part le fait que les supercomplexes, dont la formation se produit à l'état anoxique où la migration des LHCII du PSII vers le PSI a lieu provoquant ainsi l'état 2, favorisent le CEF, il est légitime que les auteurs aient proposé une corrélation entre la transition d'états et la formation des supercomplexes, celui-ci même faisant intervenir les antennes LHCII (Iwai, Takizawa et al. 2010).

Ainsi, la question des supercomplexes englobe les deux processus physiologiques traités dans la thèse présente : la transition d'états et la commutation vers un transfert d'électrons cyclique.

Suivant le protocole décrit dans les deux articles (Iwai, Takizawa et al. 2010 ; Takahashi, Clowez et al. 2013), la solubilisation des membranes cellulaires thylacoïdales par un détergent et la séparation des différentes fractions par un gradient de sucrose conduit aux résultats suivants. Dans un premier temps pour l'équipe d'Iwai, M. Takizawa, K. & al,



Figure 8 : Gradient de densité de sucrose avec les membranes chargées du WT, dans les conditions anoxiques. Les fractions représentées, **A1** : Protéines libres LHC II, **A2** : Complexe de base PSII, **A3** : Supercomplexe PSI – LHCI, **A4** : Supercomplexe {PSI – LHCII – cyt *bf* – FNR – PGRL 1}. Figure provenant de l'article référencé (Iwai, Takizawa et al. 2010).

Cette expérience présente la formation de la bande des CEF-supercomplexes, par la présence de la fraction A4, qui regroupe les principaux acteurs du transport d'électrons cyclique, comme précisé dans la légende.

Nous nous sommes donc intéressés à la formation de supercomplexes chez les souches mutantes, dans les deux conditions oxygène et anoxique. Bien que nos expériences fonctionnelles infirment les conclusions précédentes selon lesquelles il existe une forte corrélation entre cyclique et transition d'états, les données d'Iwai, M. Takizawa, K. & al. quant à elles, semblent s'inscrire dans ce modèle chez le contrôle.



Voici nos gradients de sucrose après solubilisation des membranes thylacoïdales, préalablement placées dans les conditions oxygène et anoxique, pour les trois souches,

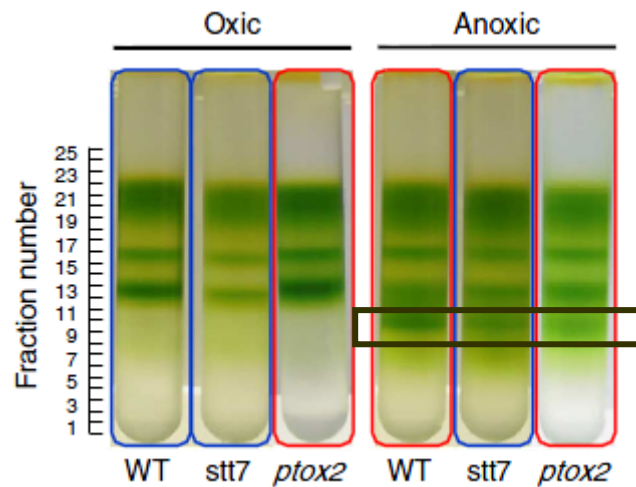


Figure 9 : Gradients de densité de sucrose pour le contrôle *t222+*, les mutants *stt7* et *ptox2*, dans les conditions oxygène et anoxique. Les encadrements **bleus** indiquent que les cellules se trouvent à l'état 1, les encadrements **rouges** pour l'état 2. Le cadre **noir** met en évidence la bande supplémentaire plus lourde, présente uniquement dans les conditions anoxiques pour les trois souches (Takahashi, Clowez et al. 2013).

Tout d'abord nous pouvons noter que nous reproduisons les résultats présentés par Iwai, M. Takizawa, K. & al. Soit, pour la souche sauvage *t222+* de *C. reinhardtii*, la présence d'une fraction supplémentaire (fractions 8 – 12) dans les conditions anoxiques où les cellules sont à l'état 2, par rapport aux conditions oxygènes où les algues WT sont à l'état 1 et où la fraction est absente. Cette fraction rassemble, selon les données du western blot à la figure 10, les différents acteurs du cyclique qui sont associés à la formation de supercomplexe (Takahashi, Clowez et al. 2013).

De plus, la fraction contenant les supercomplexes (fractions 8 – 12) est totalement absente dans les conditions oxygènes pour les trois souches, indépendamment de l'état de transition des antennes des cellules. De même, en conditions anoxiques, les gradients de densité de sucrose présentent tous une fraction supplémentaire, qui tout comme chez le WT, rassemble comme le montrent les westerns blot, les différents acteurs du cycliques.

Dans le souci de montrer que cette fraction additionnelle (fractions 8 – 12) contient bien les différents composants du CEF, comme suggéré précédemment, nous avons détecté les différentes protéines qui sont normalement impliquées dans les supercomplexes (PSI, FNR, cyt *b6f*, etc...) en faisant les westerns blot présentés ci-dessous,



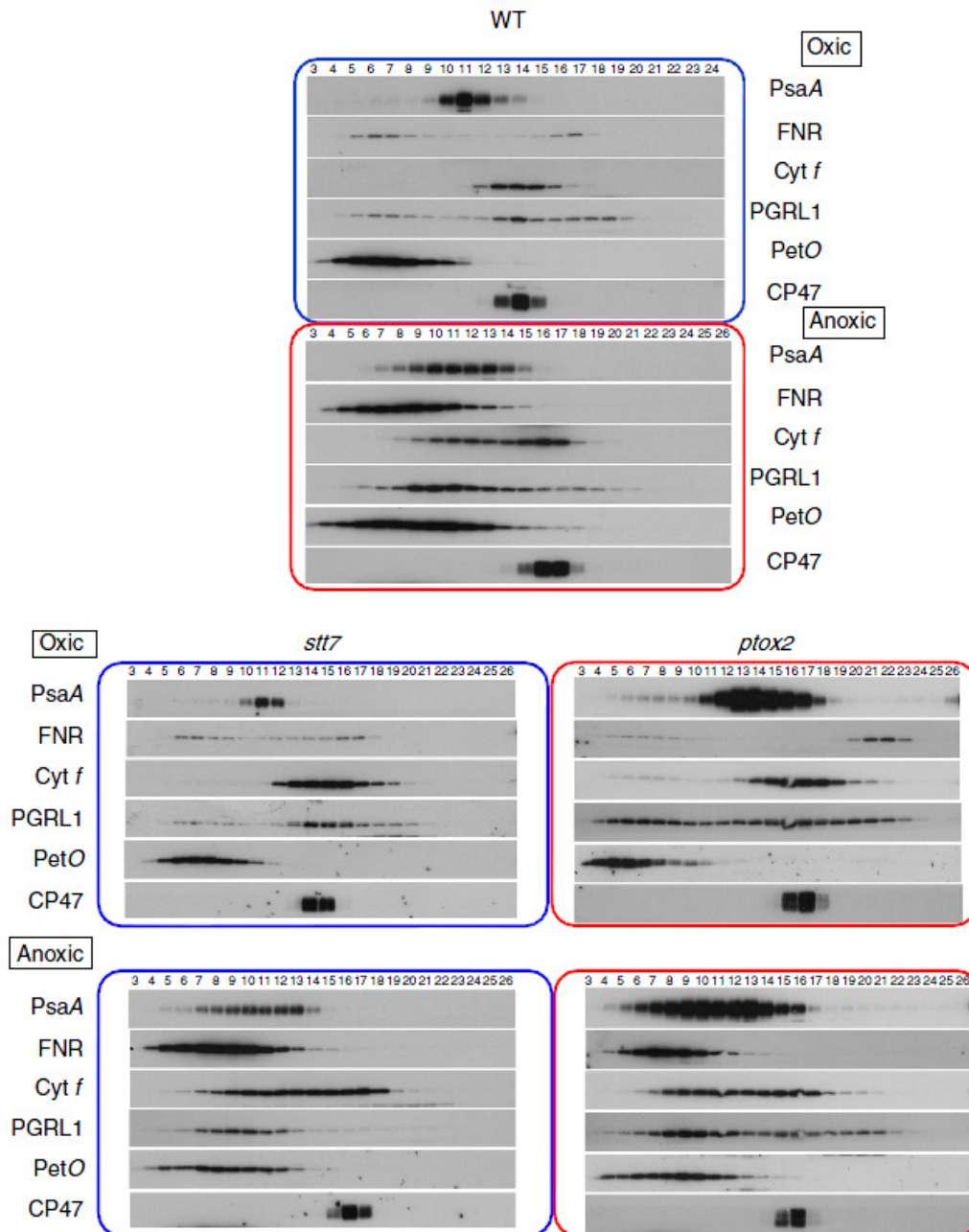


Figure 9 : Western blot, pour les souches mutantes *stt7* et *ptox2* ; et le contrôle WT, dans les conditions oxic et anoxique, selon les fractions détaillées. Détection des différentes protéines : PSI (PsaA), FNR, cyt *b₆f* (cyt *f*), PGRL1, PetO, CP47. Les encadrements **bleus** indiquent que les cellules se trouvant à l'état 1, les encadrements **rouges** pour l'état 2 (Takahashi, Clowez et al. 2013)

Nous observons dans les conditions anoxiques une migration commune dans la fraction (8 - 12), du cyt *b₆f* et du PSI ; deux complexes majeurs de la chaîne photosynthétique ainsi que de plus petits composants comme la FNR, jouant les rôles d'accepteur - transporteur d'électrons, pour leur réinjection du PSI au cyt *b₆f*. Mais aussi PGRL1, dont l'absence se traduit par une diminution du CEF, et PetO, dont le rôle est encore mal compris (présence de cette protéine dans le gradient de la référence (Iwai, Takizawa et al. 2010)).



Il y a donc formation des supercomplexes et ceci pour toutes les souches indépendamment de l'état dans lequel les cellules se trouvent.

Nous avons montré que les supercomplexes CEF sont formés indépendamment des transitions d'états.

Nous sommes donc arrivés, de par nos expériences biophysique et biochimique, à montrer et conclure que la commutation d'un transfert d'électrons linéaire prédominant à un transfert d'électrons cyclique dominant se produit de façon non corrélée avec la migration des antennes mobiles LHCI du PSII au PSI. Néanmoins, puisque nous pouvons contrôler cette commutation par la transition d'un état oxygène à anoxique, l'idée qu'elle soit contrôlée par le pouvoir redox à l'intérieur de la cellule est fortement vraisemblable.

De ces études et des nouvelles observations faites durant ces dernières années, deux nouveaux projets se sont greffés à mon étude de thèse. Le premier, celui de l'approfondissement de la compréhension de ces deux modes d'oxydation de P_{700} observés aux différents temps d'anoxie. Et le second concerne l'étude *in vitro* du fonctionnement de l'unité biochimique des supercomplexes, par spectrophotométrie, après leurs isolations par gradient de sucrose en biochimie.





CHAPITRE 2 : Etude Anoxique

Partie 1 – Etude de la recombinaison de charge

Les mesures de vitesse de transfert d'électrons cyclique dans les conditions anoxiques, par l'étude de l'oxydation du dimère de chlorophylle du PSI, P_{700} , ont révélé différentes situations dépendantes du temps d'anoxie. Deux modes d'oxydation, au début et après 40 minutes d'anoxie, dans les cellules adaptées à l'obscurité montrent des profils de cinétiques opposées reflétant les propos de recombinaison de charge.

I La recombinaison de charge – Introduction bibliographique

Les organismes photosynthétiques sont soumis à de forts changements de condition de leur environnement responsables de nombreux stress pour les cellules. Pour faire face à ces stress environnementaux, ils sont accompagnés d'un grand nombre de changements métaboliques dans la configuration des transferts d'électrons au sein de la membrane thylacoïdale. Notamment, ils induisent des changements métaboliques comme l'état redox du pool de plastoquinones fortement réduit dans les conditions de privation d'oxygène, responsable d'un flux d'électrons cyclique prédominant dans de telles conditions ([Takahashi, Clowez et al. 2013](#)).

Dans les membranes thylacoïdales dans les conditions anoxiques, en l'absence de régulation côté accepteur du PSI le transport d'électrons est ralenti à travers ce dernier, qui sera alors dominé par les réactions de recombinaison de charge ([Heathcote. 1985](#)).

Si en effet, la capacité du pool d'accepteurs, comme pour le NAD(P)H ou la ferrédoxine, devient limitée, alors il est facile d'imaginer que les centres fer-soufre ne soient pas ré-oxydés. Chez *Heliobacterium modesticaldum*, il a été montré par l'étude des modulations dans la fluorescence la présence d'une back-réaction dans les centres réactionnels pouvant être une source majeure des variations de fluorescence observées ([Collins, Redding et al. 2010](#)). Chez cette bactérie, la vitesse de recombinaison de charge entre P_{800}^+ et les centres fer-soufre réduits (~10-100 ms) est plus lente que la re-réduction de P_{800}^+ par le cytochrome (~0,5 ms). Cela conduit, après plusieurs actes photochimiques, à la réduction progressive de tous les centres fer-soufre, et donc à la promotion de la recombinaison de charge.

Enfin, plus les électrons s'accumulent le long de la chaîne d'accepteur du PSI, plus la recombinaison de charges augmente puisqu'elle implique, au fur et à mesure, des acteurs de la chaîne qui sont de plus en plus proches. La recombinaison de charge devient alors plus rapide que le transfert d'électrons entre le PSI et le cytochrome jusqu'à l'emporter sur cette réaction et devenir prépondérante.

Chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, l'oxydation de P_{700} n'est pas observée au début de l'anoxie ([Alric. 2010](#) ; [Takahashi, Clowez et al. 2013](#)). En milieu intracellulaire réduit comme dans les conditions anoxiques, les auteurs ont observés une forte réduction de P_{700} reflétant une probable recombinaison de charge entre les autres sous-unités du PSI et l'unité P_{700} . Cependant, en plus d'obtenir les mêmes



observations nous réalisons qu'il est possible de ré-oxyder totalement le P_{700} au cours de l'anoxie (Takahashi, Clowez et al. 2013).

II Observations de la recombinaison de charge

Dans notre article (Takahashi, Clowez et al. 2013), nous avons montré l'existence de deux modes différents pour l'oxydation de P_{700} , dans les conditions anoxiques.

1 Variations d'absorptions

1.1 Selon l'oxydation de P_{700}

L'étude de l'évolution spontanée, à l'obscurité, de l'oxydation de P_{700} montre que jusqu'à dix minutes d'anoxie la quantité relative de P_{700} photo-oxydable total est plus faible, soit ~20 %, que celle observée après 35 minutes d'anoxie, où 100 % de la quantité de P_{700} oxydable est atteinte lors d'une illumination (figure 1).

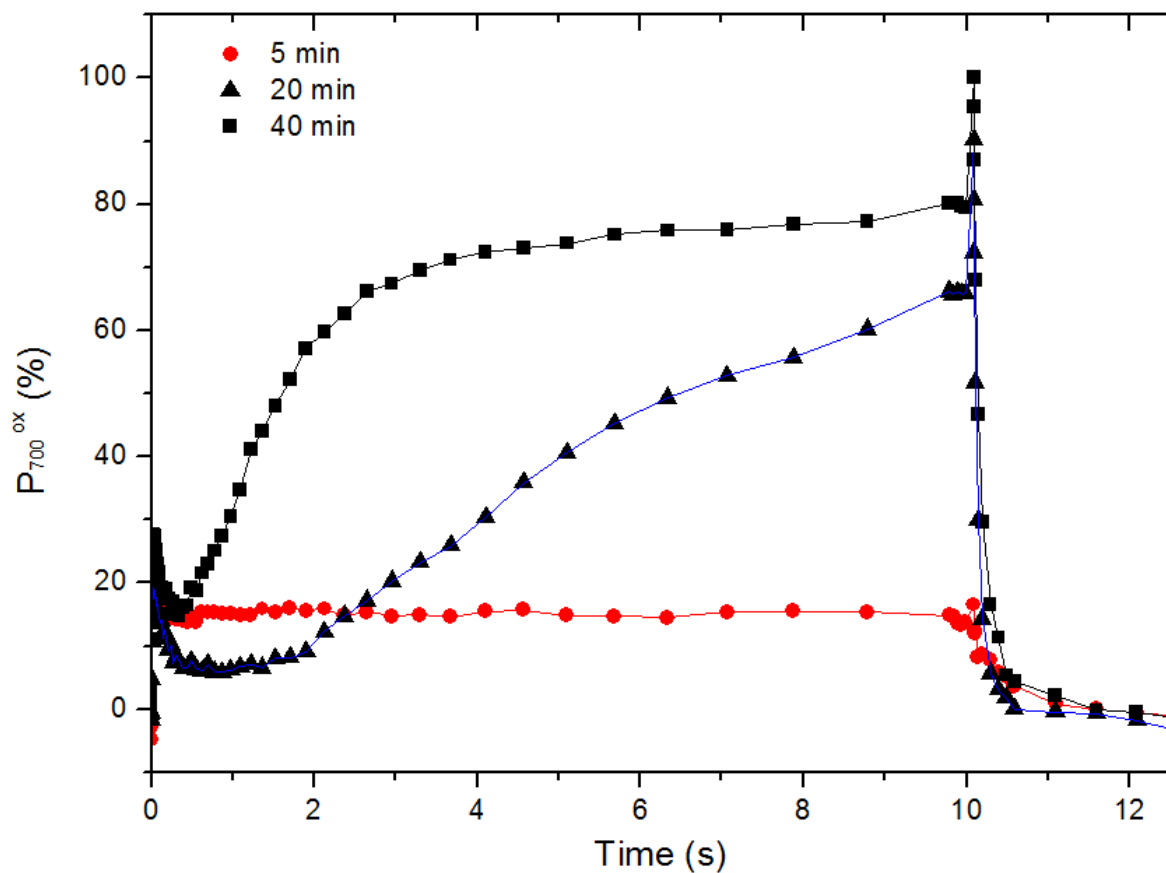


Figure 1 : Cinétiques de variation d'absorptions de l'oxydation de P_{700} , chez la souche contrôle de *C. reinhardtii* (*t222+*) à différents temps d'anoxie (5, 15, 40) minutes. Présence de 10 μ M DCMU, pour inhibition du PSII, de sorte de n'observer que le transfert CEF. Application d'un pulse saturant après 10 s d'illumination. Intensité de 115 μ E $m^{-2} s^{-1}$.

Les courbes obtenues après trois temps différents d'anoxie montrent trois cinétiques différentes. De plus, les pulses saturants appliqués aux deux courbes intermédiaires (5 et 15 minutes) montrent qu'il ne semble pas possible d'oxyder P_{700} totalement contrairement à la situation prévalant après 35-40 minutes d'anoxie.



Cette observation suggère une forte limitation du côté accepteur du PSI, ne permettant pas aux électrons d'être transférés et donc d'observer une oxydation de P_{700} . Si les accepteurs d'électrons du PSI sont en quantité moins importante que les donneurs d'électrons, c'est la limitation côté accepteur. L'électron ne peut être alors « évacué » et revient en arrière.

La recombinaison de charge est une sorte de cyclique mais constitue un cycle futile du point de vue thermodynamique puisqu'elle n'est pas associée à un pompage de protons, contrairement au transfert cyclique impliquant le cytochrome b_6f .

Il convient donc de faire la différence pour les mesures des vitesses CEF.

1.2 Selon les mesures ECS

Les mesures des variations de l'état redox de P_{700} présentent une ambiguïté du point de vue de leur interprétation en termes de flux d'électron cyclique, aux temps courts. En effet, l'incapacité à photo-oxyder P_{700} après 5 min d'anoxie, montre que, dans ces conditions, P_{700}^+ est réduit plus vite qu'il n'est oxydé par la lumière. Cela implique que la vitesse de réduction est bien plus rapide que celle d'oxydation.

Or la vitesse d'oxydation peut être estimée comme décrite précédemment et vaut, dans les conditions de l'expérience 737 e. s^{-1} . $(PSI)^{-1}$, pour une intensité de $115 \mu E m^{-2} s^{-1}$, soit une vitesse photochimique d'oxydation du PSI d'environ 150 e. s^{-1} par PSI. La question que soulève une vitesse si rapide est celle de son interprétation en termes de transfert d'électron cyclique ou de recombinaison de charges puisqu'une telle vitesse de réduction est commensurable avec la recombinaison $P_{700}^+ F_X^-$ (voir (Brettel 1997) pour une revue)

Une façon de traiter cette question et de tenter de discriminer entre recombinaison de charges et transfert d'électrons cyclique est de mesurer les variations de champ électrique transmembranaire photo-induites. En effet, alors que la recombinaison de charge dissipe le champ électrique généré par la séparation de charge, le CEF le préserve. Nous avons donc cherché à lever cette ambiguïté en recourant à une autre observable permettant de quantifier ce flux.

Le champ électrique transmembranaire généré par le fonctionnement de la chaîne photosynthétique induit une modification des propriétés d'absorption des pigments présents dans la membrane (et donc soumis à ce champ). Il se trouve que ces variations d'absorptions sont proportionnelles au champ électrique qui les engendre, ce qui permet d'utiliser cette observable pour vérifier que l'oxydation de P_{700} est possible.



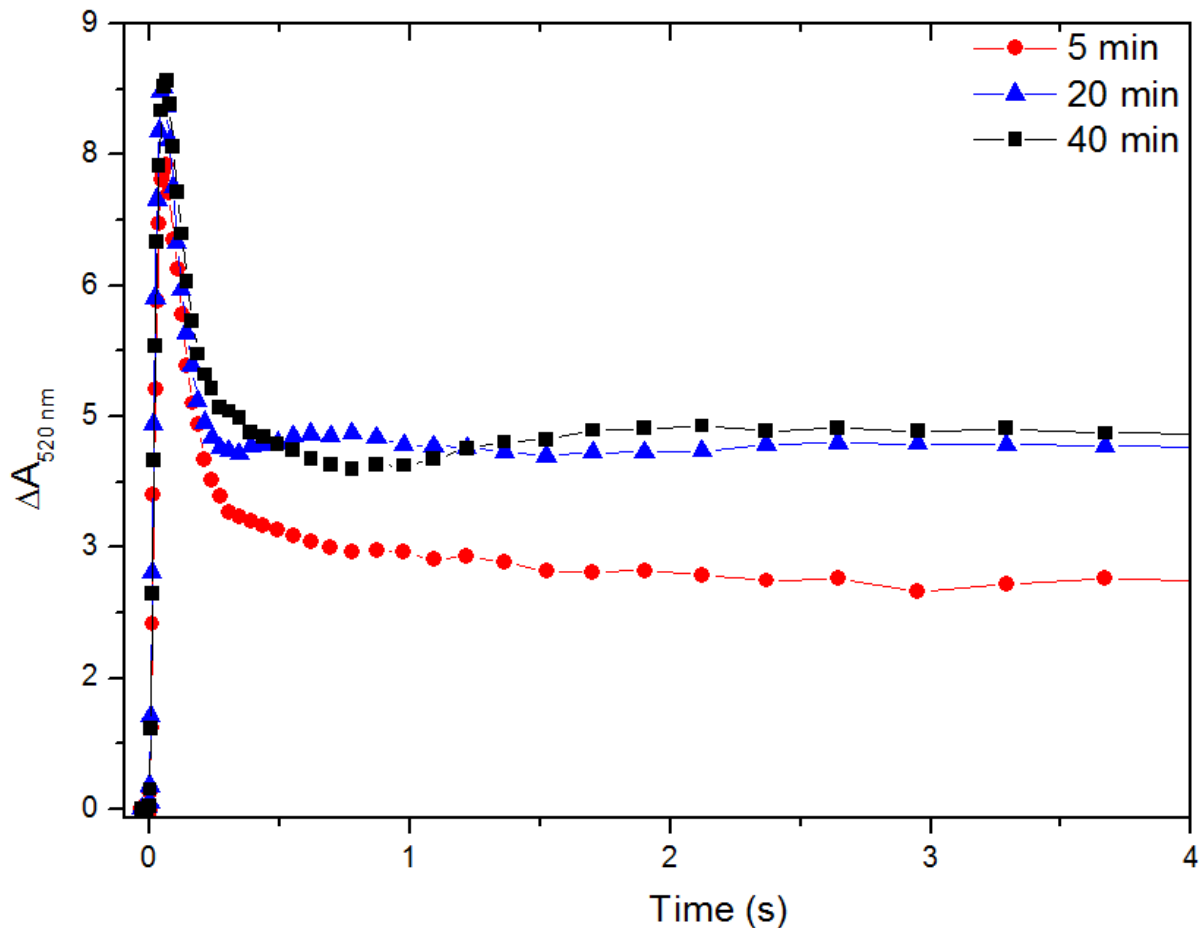


Figure 2 : Observation des variations du champ électrochromique, à 520 nm, créées à travers la membrane thylacoïdale à différents moments de l'anoxie (5, 15, 35) minutes, chez le contrôle de *C. reinhardtii* (*t222+*). Intensité de $115 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, et en présence de $10 \mu\text{M}$ DCMU, 20 mM glucose et 2 mg / ml glucose oxydase. Les changements d'absorption à 546 nm ont été soustraits afin de corriger les contributions non spécifiques à 520 nm .

Description générale des courbes ; l'illumination continue induit le fonctionnement de la chaîne photosynthétique et induit de ce fait la production continue du champ électrique. Celui-ci est par ailleurs consommé par l'ATP synthase, si bien que s'établit au bout d'un certain temps un état stationnaire pour lequel la vitesse de production du champ électrique égale sa vitesse de consommation.

Alors qu'entre 5 et 10 minutes d'anoxie, nous n'observons pas d'oxydation de P_{700} (figure 1) il est observé la création d'un champ électrique transmembranaire à ces mêmes temps, comme nous le montre la figure 2 (courbe rouge).

Dans le cas des cinétiques d'oxydation de P_{700} à 705 nm au temps court de l'anoxie, la vitesse de réduction de P_{700}^+ a considérablement augmenté. Cette observable montre que la vitesse de réduction de P_{700}^+ est telle que l'illumination ne permet qu'une faible accumulation de la forme oxydée. Son interprétation en termes de vitesse de transfert d'électrons cyclique est donc ambiguë.



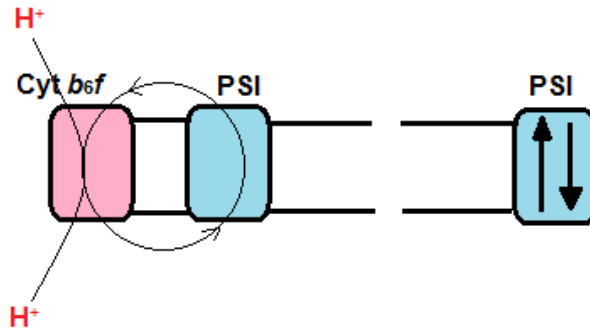


Figure 3 : Schématisation simplifiée des deux chemins possibles pour les électrons. Cas 1 ;
Chemin cyclique entre le cyt b₆f et le PSI, permettant le pompage de proton. Cas 2 ;
Recombinaison de charge, par limitation côté accepteur du PSI, l'électron revient entre les
différentes unités composant le Photosystème I.

Les cinétiques de champ (figure 2) montrent qu'un flux généré par le système se produit, même dans les conditions où nous avons émis l'hypothèse qu'il était absent. La forte réduction de P_{700} dans les temps courts de l'anoxie n'est donc pas seulement due à la recombinaison de charge mais aussi au fait que le système se réduit rapidement par transfert d'électrons depuis la plastocyanine.

Comme nous l'avons développé durant cette thèse, il est envisagé que les électrons peuvent revenir vers P_{700}^+ selon deux chemins. Par le transfert cyclique, la vitesse de celui-ci serait alors très rapide, ou bien par recombinaison de charge (figure 3, schéma 1 et 2, respectivement).

Nous pouvons conclure de ces deux expériences, présentées à la figure 2, qu'un flux d'électrons à travers la voie cyclique a lieu dès les débuts de l'anoxie. Alors que l'incapacité d'observer l'accumulation de P_{700}^+ ne permet pas de conclure, l'existence d'un champ électrique transmembranaire soutient cette hypothèse.

Cependant, la quantification du flux cyclique en termes de nombre d'électrons transféré par unité de temps et par PSI en exploitant les données de champ électrochromique nécessiterait la normalisation par la phase a, alors qu'il n'est pas possible de faire une différenciation entre les centres actifs et recombinants. Ce dernier point ne nous permettrait pas de mesurer, sans une surestimation, le flux d'électrons cyclique puisque nous savons que même si un CEF efficace a lieu, à 5 minutes d'anoxie, la recombinaison de charge est aussi opérante.

Il est donc délicat de discriminer le CEF et la recombinaison de charge au début de l'anoxie. De ce fait nous avons fait le choix, pour nos mesures de vitesse cyclique, d'utiliser l'oxydation de P_{700} comme dans notre article ([Takahashi, Clowez et al. 2013](#)) et d'attendre 30-40 minutes d'anoxie afin de lever toute ambiguïté. Nous nous affranchissons de la limitation côté accepteur du PSI et nous nous plaçons dans une situation où la contribution de la recombinaison de charge est négligeable.

Cette expérience nous a également permis de faire une autre observation. A partir de ces variations de création de champs électrique à travers la membrane photosynthétique (figure 2), lorsque l'état stationnaire est atteint l'application d'un flash saturant permet la mesure de la phase à qui, en présence d'inhibiteur du PSII, correspond uniquement à l'activité des complexes Photosystème I. Après ce flash la



lumière est coupée permettant d'observer le déclin du champ, qui comme nous nous attendions est plus rapide dans les débuts de l'anoxie qu'à 40 minutes.

La phase a est proportionnelle au nombre de séparations de charges au niveau du PSI dont la durée de vie est plus longue que le temps auquel elle est mesurée. Il est donc possible de comparer la quantité de centres PSI capables de générer, après illumination par un flash saturant, une séparation de charge de relativement longue durée de vie, et la quantité, mesurée à 705 nm, de P_{700} qui reste réduit à la lumière et est donc à priori photo-oxydable.

L'idée est de comparer le champ électrique transmembranaire produit, par les expériences à 520 nm, en fonction du rendement de P_{700} obtenue par l'application d'un pulse saturant à 705 nm.

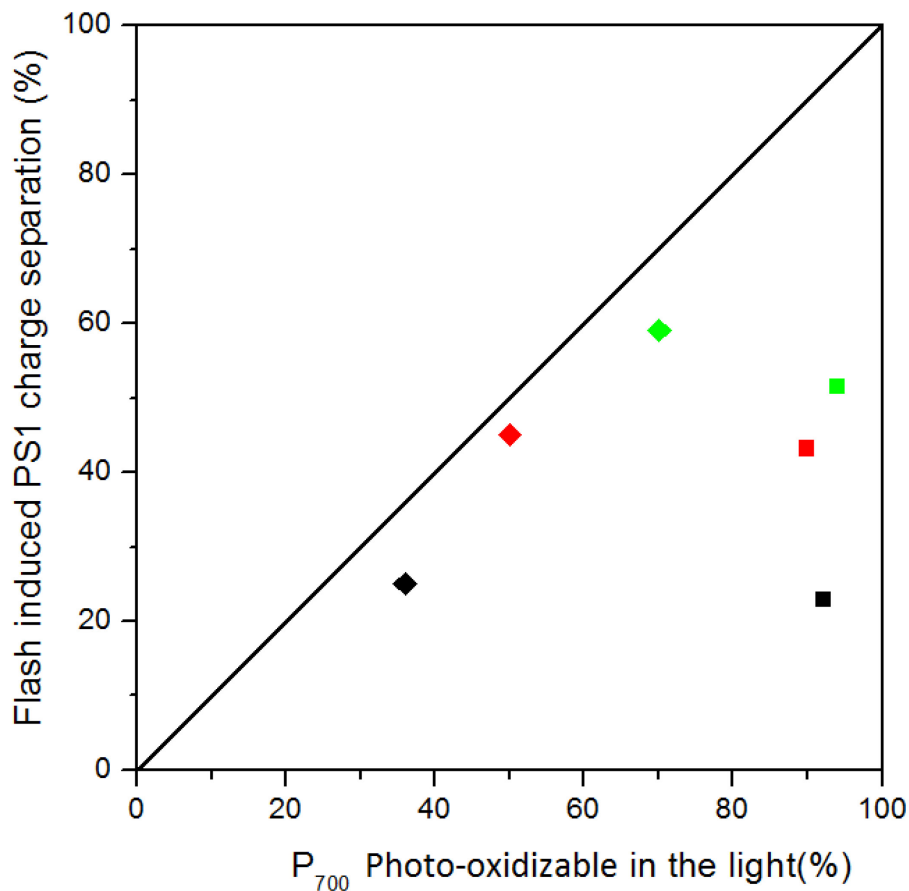


Figure 4 : Modélisation de la séparation de charge au niveau du PSI, induit par un flash après obtention de l'état stationnaire de la création du champ électrique en fonction de la quantité de P_{700} photo-oxydable à la lumière, (%). Temps de mesures à 5 minutes d'anoxie (**carré**) et de 40 minutes (**losange**). Trois intensités différentes utilisées ; en **vert**, $18 \mu E m^{-2} s^{-1}$, **rouge** $52 \mu E m^{-2} s^{-1}$ et en **noir** $115 \mu E m^{-2} s^{-1}$.

Cette expérience nous donne accès à la quantité de P_{700} produisant une séparation de charge ayant une durée de vie supérieure à $150 \mu s$ et la quantité de P_{700} photo-oxydable estimée par les mesures à 705 nm. Les résultats des deux quantités exprimées l'une en fonction de l'autre, selon différentes intensités lumineuse et différents temps d'anoxie, sont représentés sur la figure 4.



Les carrés correspondant à 5 minutes d'anoxie, montrent des quantités de P_{700} photo-oxydable plus importantes que celles à 40 minutes (losanges). C'est la conséquence de la recombinaison de charge, empêchant l'oxydation de P_{700} et un déclin du champ rapide après induction de la phase a.

Les mesures du rendement sont similaires entre les deux expériences (figures 1 et 2) à 40 minutes d'anoxie, suggérant que, dans ces conditions, le champ électrique généré n'est pas dû à la recombinaison de charge, conformément à la conclusion énoncée précédemment que la limitation côté accepteur est levée. Les électrons dans la chaîne photosynthétique sont donc transférés par le mode cyclique pour leur réinjection à travers la membrane, impliquant une séparation de charge stable, que ne l'est celui de la recombinaison de charge.

Après ces observations, il nous semble important de revenir sur les études précédentes concernant l'observation des cinétiques d'oxydo-réduction du cytochrome b_6f , en précisant qu'à l'époque les auteurs ne connaissaient sans doute pas ce phénomène, (Finazzi, Furia et al. 1999). Pendant les dix minutes qui suivent la mise en condition anoxique des cellules, la recombinaison est telle qu'il faut attendre 40 minutes pour pouvoir étudier sans ambiguïté ce qui n'était sans doute pas le cas lors des études précédentes.

Il est aussi important de préciser que les expériences que nous avons entreprises sur les cyt b_6f , ne montrent pas des cinétiques d'oxydation du cyt f similaires aux temps 5 et 40 minutes d'anoxie. La recombinaison de charge a donc aussi une influence sur les courbes d'oxydo-réduction du cytochrome.

2 Conditions d'études anoxiques

Les cellules sont incubées en présence d'inhibiteurs du PSII pour bloquer le LEF et n'observer que le CEF. Dans le cas des conditions oxygènes, nous en utilisons deux, le DCMU et le HA, alors que dans les conditions anoxiques, seul le DCMU est utilisé.

En effet, lorsque les deux inhibiteurs du PSII sont utilisés pour les conditions anoxiques il n'est pas possible d'observer d'oxydation de P_{700} même après 40 minutes d'anoxie. La souche contrôle de *Chlamydomonas reinhardtii* reste en situation bloquée tout au long de l'anoxie montrant des cinétiques similaires à celles observées à 5 minutes.

Les raisons qui sous-tendent cet effet de l'hydroxylamine demeurent inconnues. Quoi qu'il en soit, les expériences précédentes et suivantes ont donc été faites en présence de 10 μ M de DCMU et sans HA, pour l'étude des conditions anoxiques.

3 forte réduction de P_{700} en début d'anoxie – Caractérisation

Cette situation bloquée est définie par une forte réduction du système dans les débuts de l'anoxie (du temps zéro à 10 minutes). Ce phénomène expliqué par la recombinaison de charge implique que le pool de NADPH n'est pas suffisant pour accepter tous les électrons venant du PSI.

Dans le but de caractériser la capacité de ce pool, nous avons étudié des mutants altérés dans la chaîne photosynthétique. Ces derniers, par leur mutation, nous ont permis de contrôler le nombre d'électrons qui peuvent "circuler" à travers la membrane. Nous avons pu quantifier le nombre d'électrons nécessaire à l'obtention



d'une situation bloquée du système, en étudiant les cinétiques d'oxydation de P_{700} après 5 minutes d'anoxie.

L'utilisation de mutants dépourvus de plastocyanine ou de cyt b_6f nous a permis de limiter le nombre d'électrons transférés à la lumière dans le pool d'accepteurs et d'estimer ainsi la capacité du pool avant l'observation d'une recombinaison de charge. Les résultats sont présentés à la figure 5.

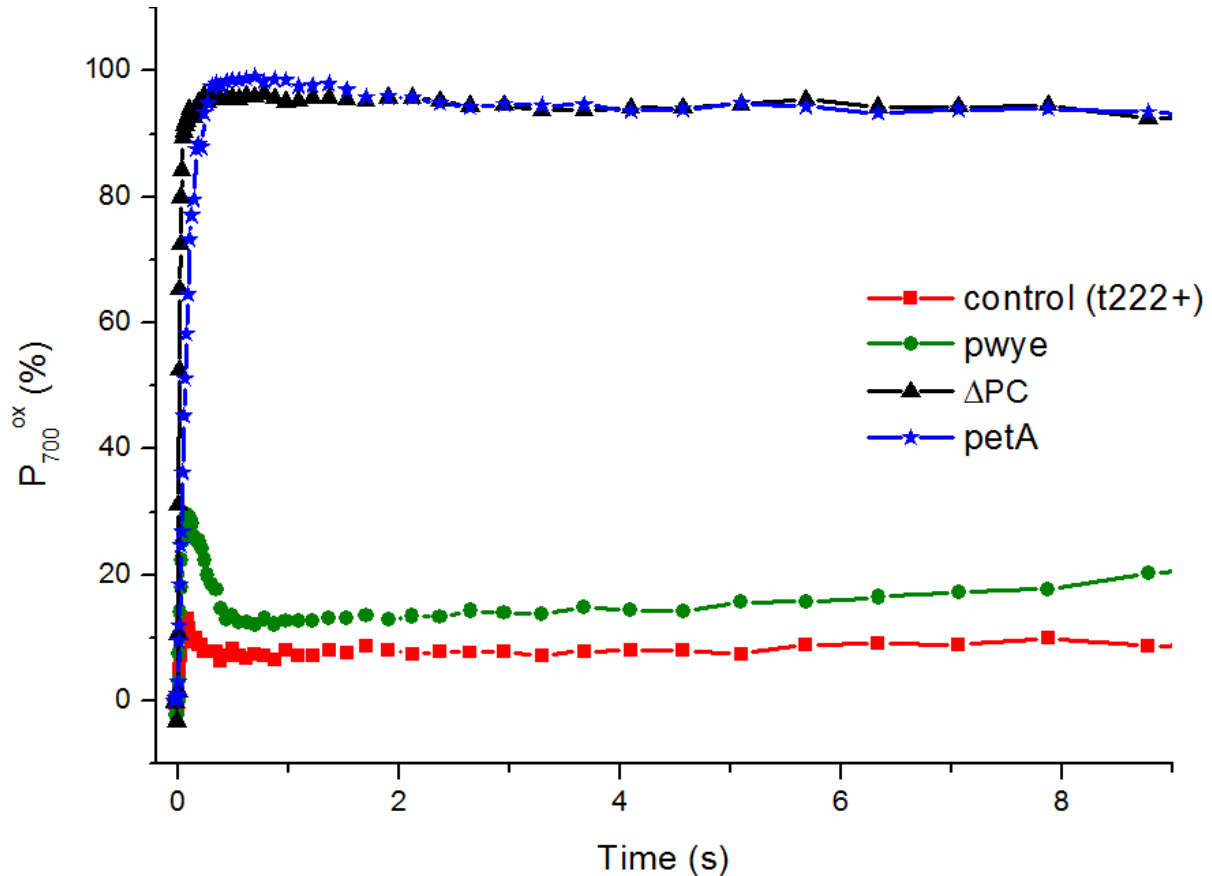


Figure 5 : Oxydation de P_{700} (%) dans les conditions anoxiques à $t = 5$ minutes, en présence de 20 mM glucose, 2 mg / ml glucose oxydase et 10 μ M DCMU. Contrôle $t222+$ (**carré rouge**) ; mutant de la plastocyanine (**triangle noir**) ; mutant du cytochrome b_6f , $PetA$ (**étoile bleue**) et $pwye$ (**rond vert**) mutant altérant l'accumulation des sous-unités du cyt b_6f , chez *C. reinhardtii*. Intensité de 115 μ E $m^{-2} s^{-1}$.

Pour observer le mode "bloqué", il faut un nombre inférieur d'accepteurs côté ferrédoxine que de donneur côté plastocyanine. A intensité lumineuse constante soit à un nombre de photons constant, nous travaillons alors à une vitesse d'oxydation de P_{700} constante.

Or la vitesse de recombinaison de charge dépend de la paire radicalaire du PSI impliquée ($P_{700}^+F_{A/B}^-$ recombine moins vite que $P_{700}^+F_X^-$, qui recombine moins vite que $P_{700}^+PhyQ^-$, etc). Par conséquent, à intensité lumineuse constante, on finira par ne plus observer d'oxydation de P_{700} lorsqu'il y aura accumulation d'une paire radicalaire dont la durée de vie est plus faible que la vitesse d'oxydation.

Inversement, s'il est possible d'oxyder P_{700} c'est que la recombinaison de charge est plus lente que la vitesse d'oxydation et que, par conséquent, le nombre d'électrons



n'a pas permis d'accumuler une paire radicalaire recombinaison suffisamment rapidement pour entrer en compétition avec l'oxydation.

Ainsi, même si il y a de la recombinaison de charge pour quelques PSI, le système aura accumulé un grand nombre de P_{700} oxydé et nous pourrions observer une oxydation dès les débuts de l'anoxie.

C'est le cas avec les mutants dépourvus de plastocyanine (figure 5, courbe noire) et de cyt b_6f (figure 5, courbe bleue). Chez ces deux mutants la taille d'antennes doit être identique dans les conditions oxiques. Il est possible de mesurer le nombre d'électrons disponibles en amont du PSI grâce aux aires sous la courbe, un électron correspondant à l'aire sous la courbe mesurée chez le mutant PC. Ainsi, il est possible de transférer de 3 à 4 électrons par PSI sans accumuler $P_{700}^{+}F_X^{-}$, chez le mutant cyt b_6f (soit 2,7 plastocyanine + P_{700}). En revanche, dans le cas du mutant *pwye*, la cinétique d'oxydation de P_{700} en début d'anoxie (figure 5, courbe verte) montre un profil à celui de la souche contrôle *t222+*, (figure 5, courbe rouge).

Ce mutant est altéré dans la composition accumulé du complexe cytochrome b_6f . Le mutant *pwye* a subi un échange de séquence des acides aminés de PEWY à PWYE (Zito, Finazzi et al. 1999). Chez ce mutant le site Q_o est conservé mais il y a un changement d'affinité pour la quinone. De plus, *pwye* accumule la protéine Rieske et la sous-unité IV dans la membrane thylacoïdale.

Ainsi les sous-unités du complexe cytochrome b_6f qui sont accumulées dans ce mutant suffisent à observer une incapacité d'oxydation de P_{700} en début de l'anoxie, caractéristique de la recombinaison de charge.

Dans les conditions oxiques nous estimons que le flux présent chez ce mutant est de 7 à 8 électrons. Nous pouvons conclure de cette expérience que 8 électrons approximativement sont nécessaires pour engorger le pool de NADPH et observer une limitation du côté accepteur du PSI traduit par l'incapacité d'observer une oxydation de P_{700} .

Cependant, alors que chez le WT à 10 minutes d'anoxie la situation d'oxydation de P_{700} est la même que celle observée à 5 minutes, chez le mutant *pwye* celle-ci évolue plus rapidement et présente, à ces temps, une oxydation partielle, jusqu'à atteindre une oxydation totale dès 20 minutes.

Or chez le contrôle l'aire sous la courbe permet d'estimer un nombre d'environ 17 électrons dans la chaîne. La différence de flux entre les deux souches, celui-ci étant plus faible chez le mutant *pwye* que chez le contrôle, explique que chez ce mutant la ré-oxydation de P_{700} soit plus rapide ayant une limitation côté accepteur du PSI moins marquée que le WT.

III Etudes de la recombinaison de charge

Cette étape de la réflexion porte sur des hypothèses pouvant expliquer que l'oxydation de P_{700} évolue d'un mode de forte réduction à une oxydation totale du dimère.

Cette observation se fait dans les conditions anoxiques où différentes voies métaboliques sont mis en place lorsque les cellules sont privées d'oxygène. La fermentation était l'un des constats principal, pouvant expliquer la synthèse d'ATP et donc la consommation de NADPH par ces voies métaboliques. Ces processus



réoxydent le pool de NADPH dont l'engorgement est responsable de la limitation côté accepteur conduisant à une ré-oxydation partielle puis totale du PSI.

1 Processus de fermentation

1.1 Introduction de l'étude de la voie de fermentation pour la ré-oxydation du NADPH

A l'introduction de cette thèse nous avons abordé ce thème de voies fermentatives présentées dans le paragraphe (V 2.2).

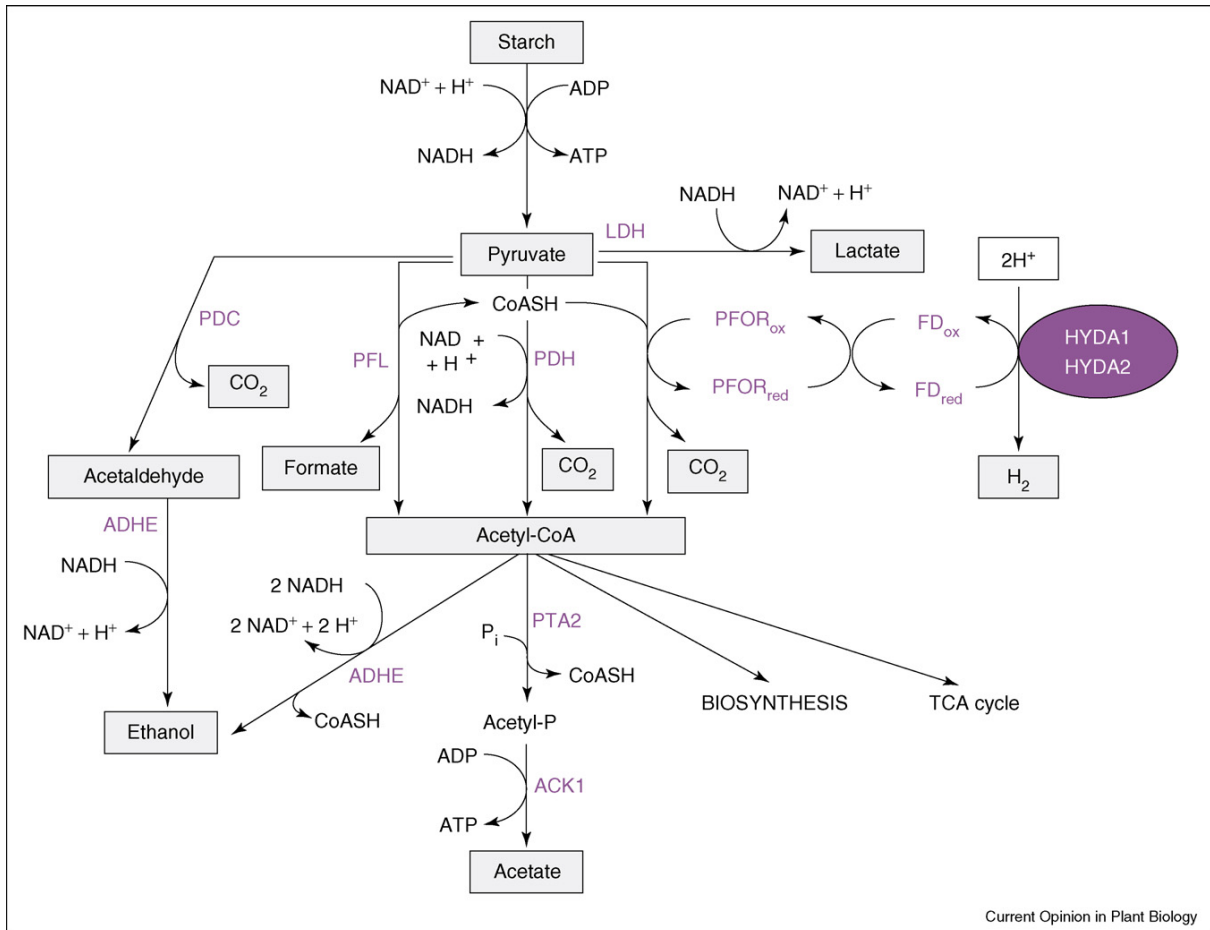


Figure 6 : Schéma représentant différentes voies métaboliques fermentatives existantes chez l'organisme *Chlamydomonas reinhardtii* (Grossman, Croft et al. 2007).

Comme le montre cette figure 6 la voie (ACK1) permet la synthèse de l'acétate en libérant de l'ATP. De plus, certaines permettent la ré-oxydation du NADPH, comme celles utilisées pour la synthèse d'éthanol venant de l'acaldéhyde (PDC) mais aussi par la synthèse de l'acéthyl-CoA (PFL ou PFOR) (Grossman, Croft et al. 2007).

Ainsi la fermentation permet par différentes voies métaboliques la production d'un peu d'ATP mais aussi la ré-oxydation de NADPH. Il serait alors possible de désengorger le pool de NADPH, permettant l'oxydation spontanée à la lumière de P₇₀₀ après un certain temps de l'anoxie.

1.2 Mutant fermentatif – Analyses spectroscopiques



Pour tester cette hypothèse nous avons entrepris d'étudier un double mutant altéré dans les deux plus grandes voies fermentatives : le formate (PFL) et l'éthanol (ADH) (Catalanotti, Dubini et al. 2012). Le double mutant *pfl1-adh1* n'est donc pas capable de métaboliser le PFL1 (Pyruvate Formate Lyase) en éthanol via ADH1 (Alcohol Dehydrogenase) qui réoxyde 2 NADH et entretient la glycolyse.

Si l'hypothèse que le processus de fermentation est responsable de la suppression de la limitation côté accepteur du PSI se vérifie, alors nous nous attendons à ne pas observer d'oxydation de P_{700} photo-induite à la lumière ou, tout au plus, un fort ralentissement, même après 40 minutes.

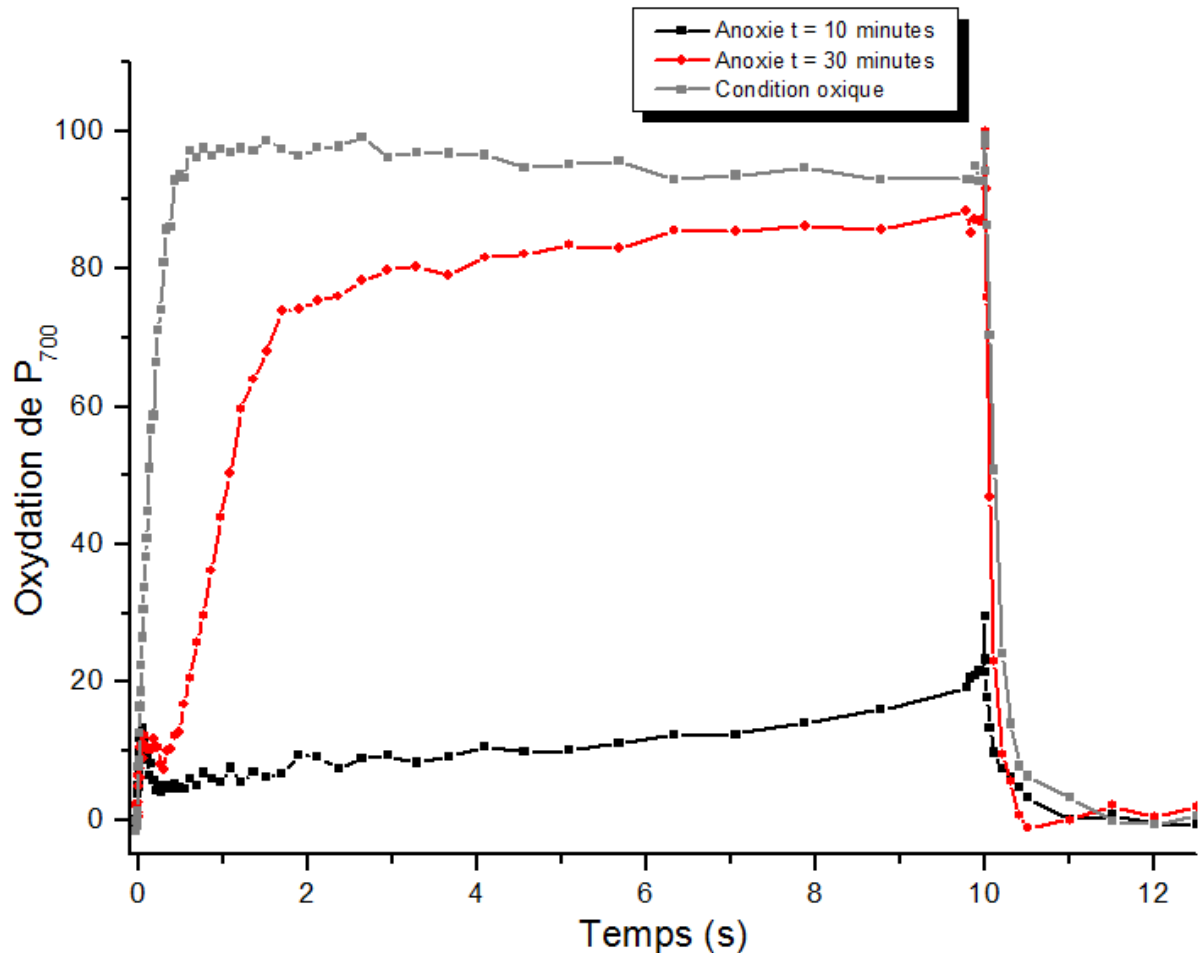


Figure 7 : Cinétiques d'oxydo-réduction de P_{700} chez le double mutant *pfl1.adh1* de fermentation chez *C. reinhardtii*. Conditions oxique (10 μ M DCMU et 1 μ M HA) et anoxique (20 mM glucose, 2 mg / ml glucose oxydase et 10 μ M DCMU) à différents temps de l'anoxie 10 et 30 minutes. Intensité de 115 μ E m⁻² s⁻¹.

Au début de l'anoxie, courbe noire, chez le double mutant *pfl1.adh1* l'oxydation photo-induite de P_{700} est impossible, comme chez son contrôle *cc125*. Cependant, la courbe rouge montre après 30 minutes d'anoxie une oxydation totale de P_{700} comme chez le contrôle.

Or, dans l'hypothèse où la fermentation serait responsable de la ré-oxydation du pool d'accepteurs du PSI à l'obscurité chez le sauvage, nous attendions chez ce double mutant à ne pas observer d'oxydation tout le long de l'anoxie.



L'étude des voies métaboliques et de leur exploitation par la cellule, montre que *Chlamydomonas reinhardtii* "s'adapte" à l'absence d'activité de PFL1 par la mise en place d'autres voies métaboliques qui contribueraient à la synthèse d'ATP et l'oxydation de NADPH pendant l'anoxie (Catalanotti, Dubini et al. 2012). Nos expériences montrent que ces dernières sont suffisamment efficaces pour permettre l'oxydation du NADPH spontanée à l'obscurité, en l'absence d'activité PFL et ADH.

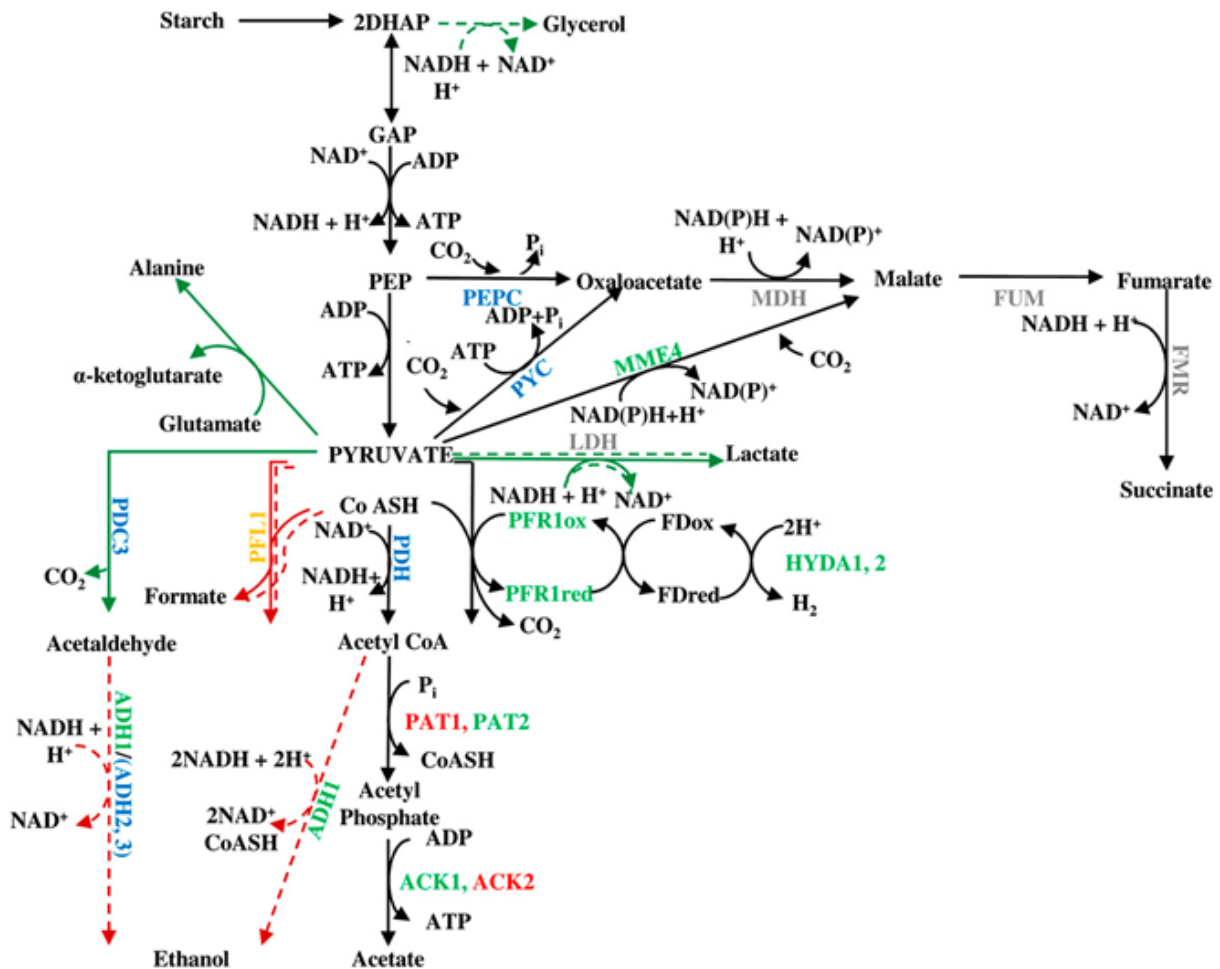


Figure 8 : Schéma des voies métaboliques fermentatives chez le double mutant *pfl1.adh1* de *C. reinhardtii*, dont les voies en **rouge** sont bloquées par la mutation (Catalanotti, Dubini et al. 2012).

Chez le double mutant *pfl1-adh1* la synthèse de hauts niveaux de lactate et de glycérol compense les mutations, permettant l'oxydation de NADH.

La production de glycérol remplace l'activité d'ADH1 en termes de maintenance de l'équilibre cellulaire redox chez le double mutant, permettant la régénération de NADP⁺ et soutient l'activité glycolytique. Le flux de carbone réduit en pyruvate augmente la production d'ATP à travers la synthèse d'acétate.

De plus, les taux de sucres élevés chez le double mutant, peuvent être impliqués dans la facilitation de la régénération de NAD(P)⁺ sous anoxie.

En résumé, le métabolisme de fermentation chez *Chlamydomonas* s'adapte à la perte de l'activité de PFL1 et ADH1, par la synthèse d'une variété d'autres métabolites qui



contribuent à la ré-oxydation du NADPH et permettent le maintien de la production glycolytique et fermentative d'ATP durant l'anaérobiose (Catalanotti, Dubini et al. 2012).

La mesure des vitesses cycliques chez le double mutant et le contrôle, respectivement, montrent un CEF de 8 ± 2 électrons s^{-1} et de 10 ± 2 électrons s^{-1} dans les conditions oxygènes ; et de 35 ± 5 électrons s^{-1} à 54 ± 4 électrons s^{-1} dans les conditions anoxiques.

Chez le double mutant *pfl1.adh1* le taux de transfert d'électrons cyclique dans les conditions anoxiques est plus faible que chez le contrôle *cc125*. Il se produit cependant, une augmentation du CEF chez la souche mutante lors de la transition oxygène à anoxie.

Pfl1.adh1 est capable d'utiliser d'autres voies métaboliques que les principales, celles du formate et de l'éthanol, pour synthétiser de l'ATP et ré-oxyder du NADPH. Cette capacité explique que le double mutant ait la possibilité de supprimer la limitation côté accepteur en vidant de ces électrons, le pool de NADPH. Il est donc possible de mesurer une vitesse cyclique efficace chez le mutant même si les voies métaboliques utilisées ne sont pas les mêmes que chez le contrôle *cc125*, pouvant expliquer une vitesse cyclique plus faible chez *pfl1.adh1* que chez le contrôle.

Les propriétés du double mutant *pfl1.adh1* ne permettent donc pas d'identifier la fermentation comme mécanisme responsable de l'oxydation de P_{700} spontanée dans les conditions anoxiques, lorsque les cellules sont gardées à l'obscurité

2 Synthèse d'ATP - Contrôle de l'oxydation par l'application de la lumière

Les sources de production d'ATP peuvent être celles de la fermentation ou bien de la glycolyse à l'obscurité, par exemple. Mais celle-ci peut aussi être induite par le fonctionnement de la chaîne photosynthétique. L'hypothèse est que la transition entre un mode "bloqué" au début de l'anoxie et un mode "débloqué" après 40 minutes d'anoxie est permise par l'utilisation du NADPH fortement accumulé dès l'anoxie. La consommation du pouvoir réducteur peut être spontanée, comme nous l'avons étudié précédemment mais il est envisageable de la promouvoir. Cela en utilisant la voie du cycle de Benson Calvin, qui permettrait par l'ATP synthétisé à la lumière continue, de consommer le NADPH.

2.1 Utilisation de l'ATP synthétisé pour la ré-oxydation du pool de NADPH

Une façon de vérifier que l'ATP synthétisé grâce au transfert d'électrons à travers la chaîne photosynthétique permet la levée de la limitation côté accepteur du PSI, est d'appliquer de la lumière sur les cellules afin de produire un gradient de proton à travers la membrane thylacoïdale (Arnon, Whatley et al. 1955).

Comme nous l'avons présenté dans l'introduction, le complexe d'ATP synthase utilise le gradient de proton, initialement créé par le flux d'électrons à travers la membrane. Ce processus permet la synthèse de molécule d'ATP permettant de stocker l'énergie chimique nécessaire aux organismes.



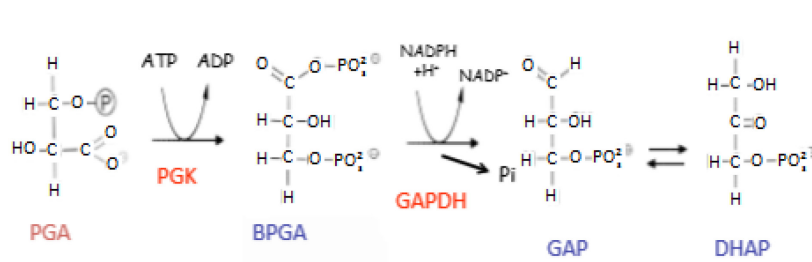


Figure 9 : Schématisation des réactions chimiques entre ATP et NADPH pour la réduction du cycle de Benson-Calvin.

Il est possible d'envisager que la production d'ATP par l'ATP synthase lors de l'application de la lumière sur les cellules puisse promouvoir la consommation du pouvoir réducteur (figure 9) et donc l'oxydation des accepteurs d'électrons rétablissant la possibilité d'oxyder P_{700} à la lumière.

2.1.1 Application de la lumière - Méthode

La stratégie que nous avons suivie est de mettre les cellules en anoxie, à l'obscurité et d'attendre les 5 minutes où la situation observée est une impossibilité d'oxydation de P_{700} . Une illumination constante est ensuite appliquée sur les cellules et nous mesurons après le pulse de lumière saturant, la quantité de P_{700} photo-oxydable induit à la lumière.

Les cinétiques montrant l'évolution de la fraction de P_{700} photo-oxydable en fonction du temps d'illumination sont présentées figure 10. La lumière est appliquée sur les cellules de façon continue après 5 minutes d'anoxie à l'obscurité.

En créant un gradient de protons à la lumière, les cellules peuvent synthétiser par le biais de l'ATP synthase de l'ATP, et utiliser le NADPH qui est présent en grande quantité au début de l'anoxie, par le cycle de Benson-Calvin.

Dans un premier temps, nous avons testé notre hypothèse sur la souche contrôle ($t222+$).



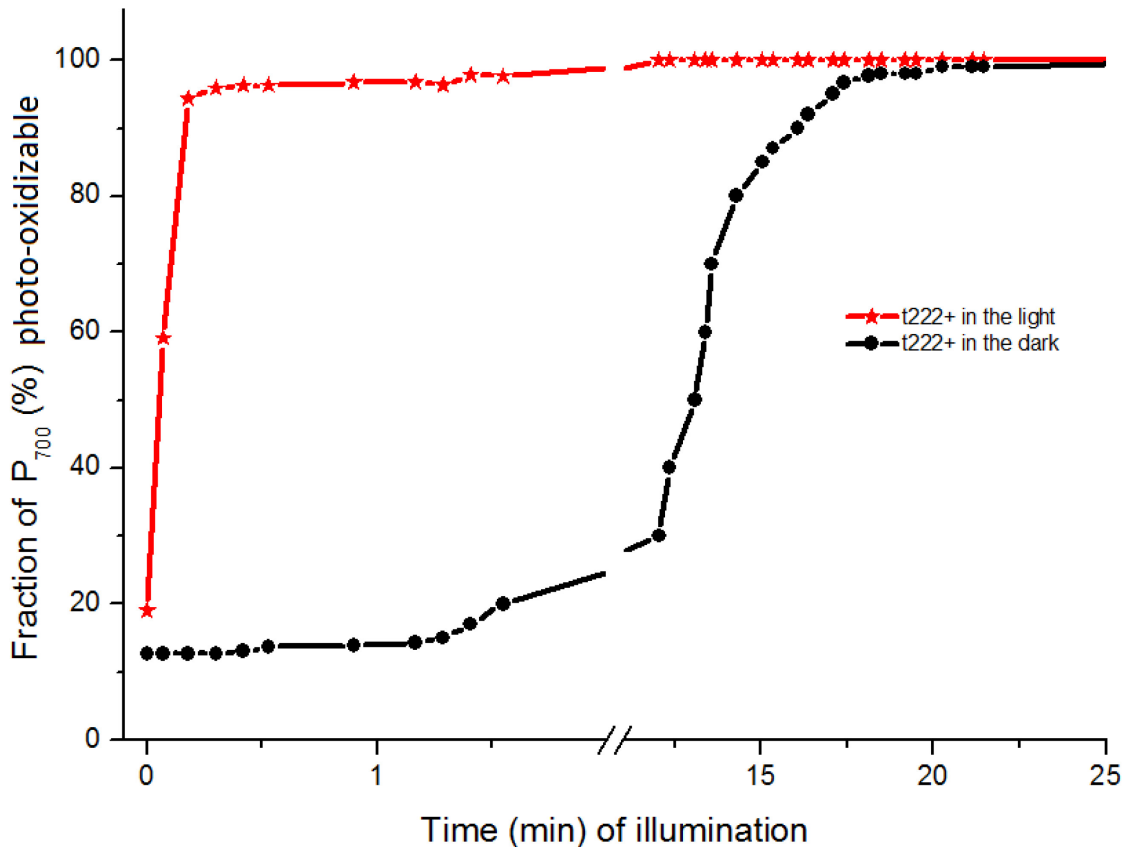


Figure 10 : Cinétiques représentant l'évolution de la quantité de P₇₀₀ photo-oxydable chez le contrôle (t222+) de *C. reinhardtii*, selon le temps de l'illumination. En **rouge**, les cellules sont illuminées et en **noire** elles sont gardées à l'obscurité entre chaque point de détection (évolution d'oxydation de P₇₀₀ dite spontanée). Intensité de 115 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La cinétique en noire de la figure 10 montre la récupération progressive de la capacité à oxyder P₇₀₀, dans les conditions anoxiques, lorsque les cellules sont maintenues à l'obscurité. Au tout début de l'anoxie la fraction photo-oxydable dépasse à peine les 20 % puis présente une évolution traduisant une oxydation partielle, ~80 % à 15 minutes, puis totale à 30 minutes d'anoxie.

La cinétique en rouge montre, lorsque les cellules sont exposées à la lumière continue, une oxydation totale de P₇₀₀ après seulement 90 s de lumière.

La comparaison entre ces deux cinétiques indique qu'il existe une voie métabolique dépendante de la lumière qui permet de désengorger le pool de NADPH accumulé dès les débuts de l'anoxie.

Il est intéressant de noter que ce "déblocage", bien que très rapide, est transitoire car si nous coupons la lumière après les 2 minutes requises pour 100 % de la fraction de P₇₀₀, il redevient impossible d'oxyder totalement P₇₀₀ à la lumière, tout au moins dans les premières minutes de l'anoxie. Après 10 minutes de condition anoxique à la lumière, ce phénomène transitoire n'est plus complètement observable.

Il est donc possible d'induire la levée de la limitation côté accepteur du PSI et ainsi d'avoir accès à la quantité totale de P₇₀₀ photo-oxydable par l'application du pulse saturant. L'expérience permet également de calculer le flux généré par le



Photosystème I selon la méthode que nous avons développée dans (Takahashi, Clowe et al. 2013).

Nous voulons mesurer la vitesse cyclique dans les conditions anoxiques chez le contrôle en utilisant l'oxydation de P_{700} photo-induite. La souche contrôle est à l'état 2 dans nos conditions d'études, cependant l'état 1 peut être induit par la lumière en présence de DCMU (inhibiteur utilisé ici).

La courbe d'oxydation de P_{700} nous donne accès au rendement de photo-oxydation mais pour l'exprimer en termes de flux, nous devons connaître la vitesse photochimique. Il est donc important de savoir si l'état 1 a été induit à la lumière, la vitesse photochimique n'étant pas la même qu'à l'état 2, et ne conduisant donc pas à un même calcul de la vitesse cyclique.

Par les mesures de fluorescence nous avons donc vérifié l'état des antennes après les 2 minutes d'illuminations que nous jugeons nécessaire pour l'oxydation totale de P_{700} à la lumière.

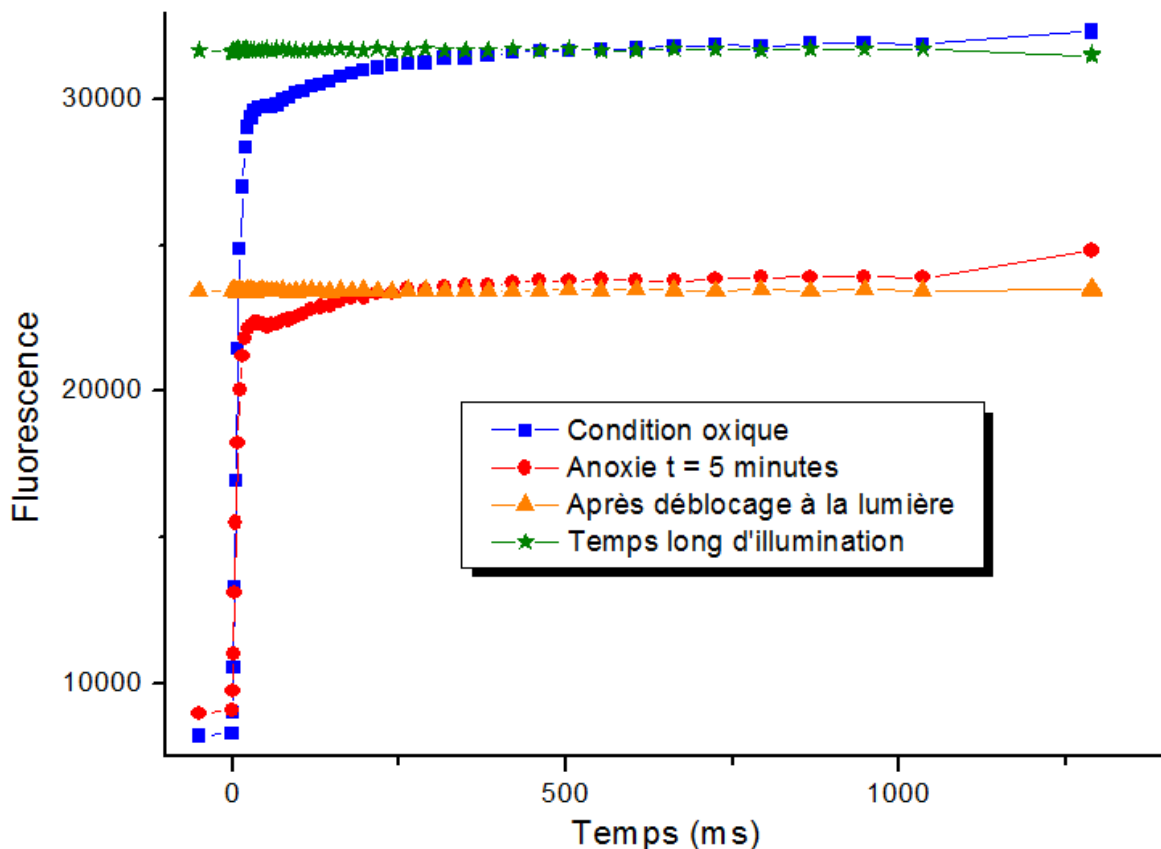


Figure 11 : Cinétiques de fluorescence à température ambiante sur le contrôle (t_{222+}) dans les conditions oxique (**carré bleu**) et anoxique ($t=5$ min) (**rond rouge**) lorsque les cellules sont gardées à l'obscurité. Et dans les conditions anoxiques, sous illumination, après totale oxydation de P_{700} (**triangle orange**) et à un temps long de lumière (**étoile verte**). Intensité de $115 \mu E m^{-2} s^{-1}$.

L'émission de fluorescence des chlorophylles à température ambiante représente la réémission de l'énergie lumineuse que le PSII n'a pas la possibilité de convertir, via la chaîne photosynthétique.



Les cinétiques montrent qu'au temps où nous obtenons une fraction de P_{700} photo-oxydable maximale, à 1,5 minutes, les cellules de la souche contrôle sont toujours à l'état 2. L'état 1 n'est promu qu'après un temps plus long d'illumination (environ 7 à 10 minutes de lumière).

Sachant que les cellules, après deux minutes de lumière, présentant une oxydation totale de P_{700} sous anoxie, sont toujours à l'état 2, nous pouvons maintenant estimer les rendements d'oxydation de P_{700} par la lumière en termes d'électrons par seconde par PSI en fonction du temps d'application de la lumière.

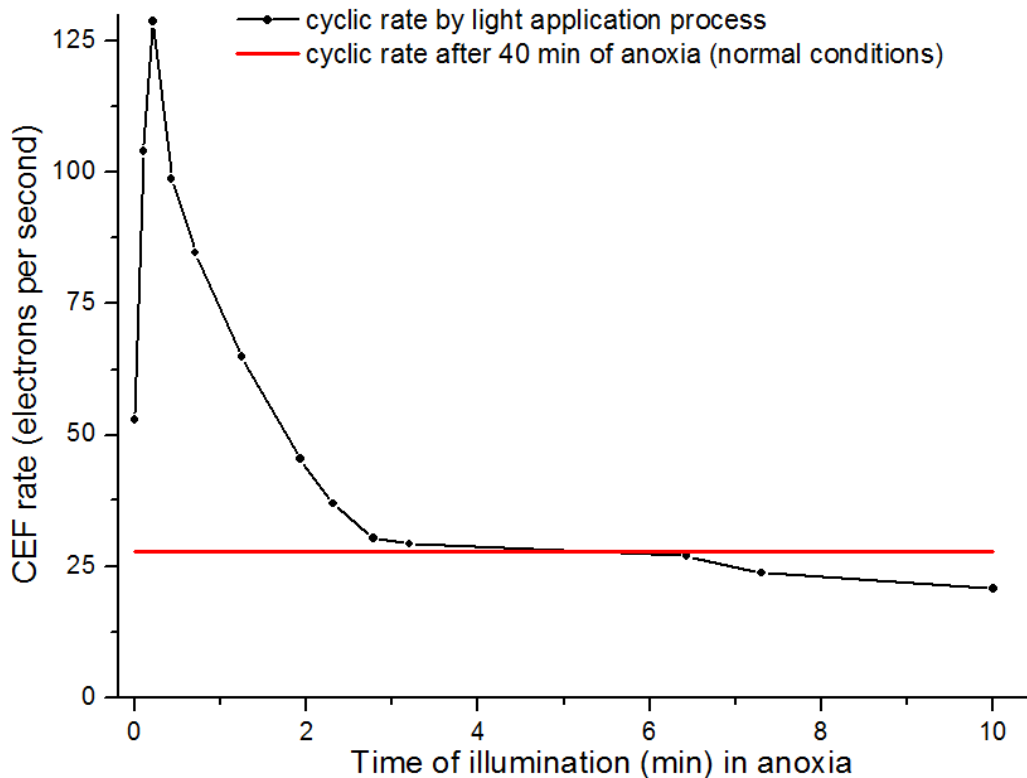


Figure 12 : Représentation des estimations des taux cycliques en termes d'électrons $s^{-1} PSI^{-1}$ pour le contrôle (t_{222+}) de *C. reinhardtii* à l'intensité de $115 \mu E m^{-2} s^{-1}$ en fonction du temps d'illumination des cellules, **courbe noire**. Conditions anoxiques à l'obscurité jusqu'à 5 minutes puis application de la lumière et application de pulses saturants tout au long du temps de l'anoxie. La **ligne rouge** indique la vitesse CEF obtenue dans les cellules contrôles lorsque celles-ci sont adaptées à l'obscurité et mesurée après 40 minutes d'anoxie.

La figure 12 montre des vitesses rapides au tout début de l'illumination excédant $125 d'électrons s^{-1} PSI^{-1}$. Aux vues de nos expériences de champ, nous avons conclu qu'il existe, à ces temps courts d'anoxie, un CEF efficace mais qu'à celui-ci s'ajoute la recombinaison de charge. C'est ce que nous sommes capable d'observer par des mesures de cyclique très importante avec des valeurs de plus de quatre fois celle obtenue à 40 minutes d'anoxie.

La vitesse cyclique diminue au cours de l'illumination en fonction de la fraction de P_{700} photo-oxydable qui augmente. Elle atteint une valeur de $58 \text{ électrons } s^{-1} PSI^{-1}$ après 90 s de lumière, temps que nous avons estimé comme étant nécessaire pour



mettre le système dans une situation débloquée. Or cette vitesse est plus rapide que celle que nous obtenons dans les conditions à l'obscurité, de 29 électrons s^{-1} PSI-1 (courbe rouge). A ce temps d'illumination nous savons qu'il n'y a plus de recombinaison de charge, cette vitesse de cyclique de 58 d'électrons par seconde correspond donc à une importante capacité du système à fonctionner en mode cyclique. Ceci montre que la valeur de la vitesse de cyclique dépend du temps d'illumination et donc de l'état métabolique de la cellule.

Il semble nécessaire pour obtenir des valeurs similaires entre les deux approches d'attendre 2,5 minutes d'illumination (figure 12).

2.1.2 Souche mutante d'ATP synthase à la lumière

Pour vérifier que cette voie dépendante de la lumière est bien une voie ATP synthase dépendante, nous utilisons les mutants dépourvus d'ATP synthase et leur appliquons la même stratégie ; c'est-à-dire d'étudier leur fraction de P_{700} photo-oxydable alors que les cellules sont soumises à une illumination continue.

Deux mutants sont à notre disposition dans notre laboratoire ; *thm24 7.4 mt-* et *Fud 50 OR mt+* (Woessner, Masson et al. 1984), qui présentent tous les deux des délétions de la sous-unité *atpB*, dont l'absence interdit l'assemblage du complexe dans la membrane chloroplastique.

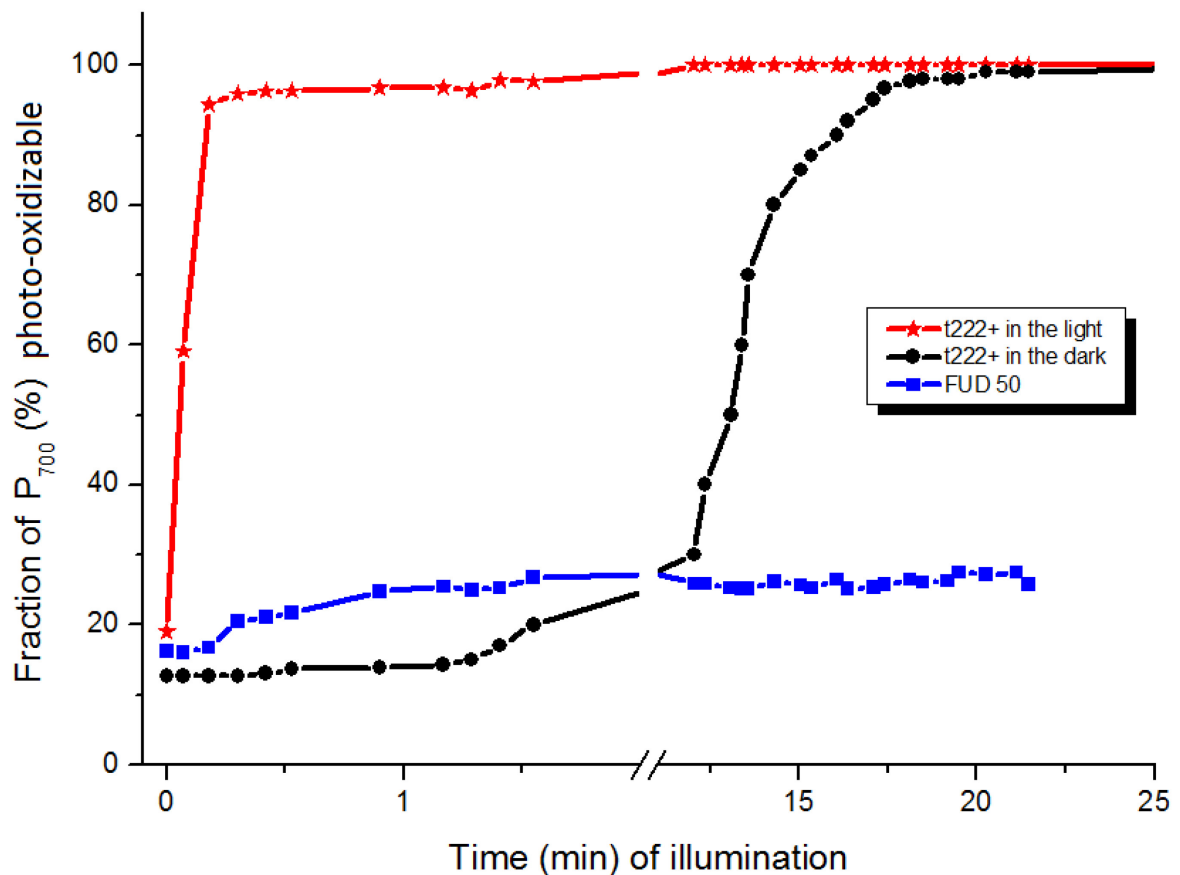


Figure 13 : Cinétiques représentant l'évolution de la quantité de P_{700} photo-oxydable chez le contrôle (*t222+*) de *C. reinhardtii*, selon le temps de l'illumination. En **rouge**, les cellules sont illuminées et en **noir** elles sont gardées à l'obscurité entre chaque point de détection. Et chez



le mutant d'ATP synthase (*Fud 50 OR mt+*) en **bleue**, sous illumination continue.
Intensité de 115 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Comme le montre la figure 13, le mutant *Fud 50 OR mt+* (courbe bleue) ne présente pas d'évolution de la fraction de P_{700} photo-oxydable au court de l'illumination. Et ceci, à l'opposé du contrôle qui comme nous l'avons vu atteint une quantité de P_{700} photo-oxydable rapidement à la lumière.

Cette méthode permet de forcer rapidement l'oxydation de P_{700} dans des conditions où cela ne semblait pas possible, en exploitant la capacité des cellules de synthétiser de l'ATP à la lumière. Elle procure par ailleurs, un outil pour maîtriser expérimentalement l'état redox ambiant du stroma.

2.2 Implication d'une nouvelle voie métabolique

Il a été montré dans la littérature que différents chemins métaboliques sont utilisés pour le rééquilibrage du rapport $\text{NAD(P)H} / \text{NAD(P)}^+$. Cette accumulation d'équivalents réduits forcerait l'activité de l'hydrogénase ce qui compenserait la consommation décroissante de NAD(P)H , fortement ralenti dans les conditions anoxiques (Terashima, Specht et al. 2010).

2.2.1 Nouveau transporteur, accepteur d'électrons - l'hydrogénase

L'oxydation du NADPH pourrait être couplée à la production d'hydrogène (Godde and Trebst. 1980 ; Ben-Amotz and Gibbs 1975).

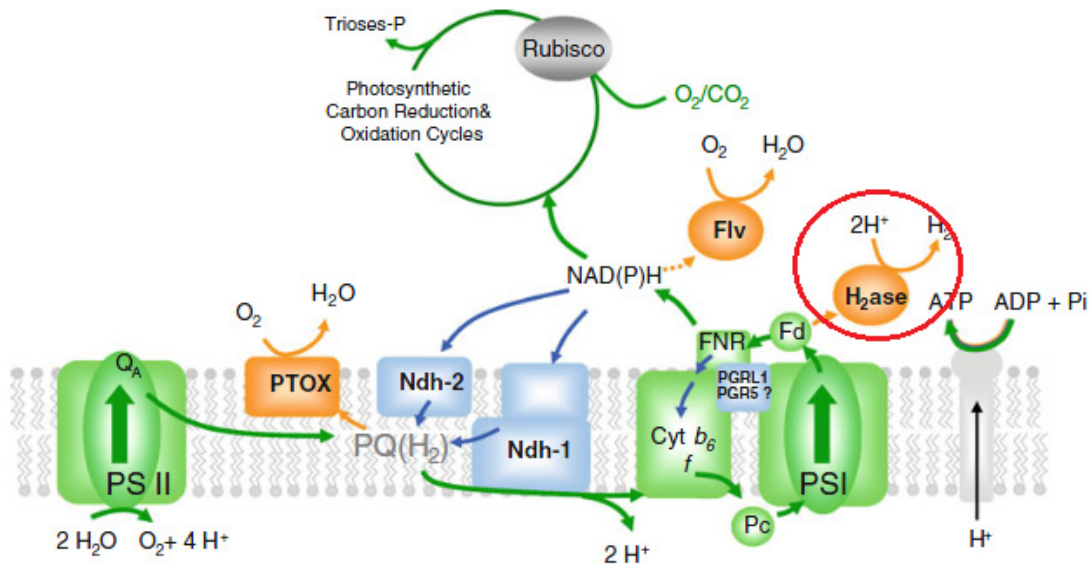


Figure 14 : Schéma des transferts d'électrons à travers la membrane thylacoïdale, entre les différents complexes et protéines composant la chaîne photosynthétique. **Cercle rouge**, localisation de l'hydrogénase dans la chaîne. Référence (Peltier, Tolleter, et al. 2010).

L'hydrogénase est une protéine induite lors de l'anaérobiose. Chez quelques algues vertes, dès une transition de l'obscurité à la lumière sous les conditions anaérobiques, la ferrédoxine transfère transitoirement les électrons aux hydrogénases chloroplastiques qui catalysent la formation d'hydrogène (figure 14) (Melis, Zhang



et al. 2014). Ce transfert est proposé comme un processus de valve de sécurité pour les électrons pour dissiper l'excès du pouvoir réducteur quand le cycle de Benson-Calvin n'est pas encore complètement activé (Zhang, Happe et al. 2002).

Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, l'émission d'hydrogène a été détectée transitoirement dès l'illumination des cellules (Gaffron and Rubin 1942), mais aussi lorsque les cellules sont adaptées à l'obscurité (Gfeller, Gibbs, 1984 ; Kow, Erbes et al. 1982). Dans ce dernier cas, un temps à l'obscurité est nécessaire lorsque les cellules sont incubées en anoxie, pour induire la photo-production d'hydrogène (Roessler and Lien 1984 ; Happe, Mosler et al. 1994 ; Ghirardi, Robert et al. 1997).

Ainsi l'intervention de l'enzyme est envisagée, dans les conditions anoxiques pour accepter les électrons venant de la ferrédoxine. Dans ce cas, le flux d'électrons soutenu qui se crée par la disposition de l'hydrogénase en tant qu'accepteur contribuerait à la génération d'un gradient de proton photo-induit (Arnon, Losada et al. 1961) et donc la synthèse d'ATP pouvant participer à la consommation de NADPH (Melis. 1991). De plus, si les électrons sont dirigés vers l'hydrogénase, ils ne permettent pas la production de pouvoir réducteur, ainsi l'activité photosynthétique génère peu de NADPH.

2.2.2 Application de la lumière - Mutant d'hydrogénase

Pour étudier la voie métabolique qu'est la voie de l'hydrogénase dans l'oxydation de P_{700} photo-induite, nous décidons donc d'appliquer de la lumière sur les cellules mutantes d'hydrogénase, après 5 minutes d'anoxie.

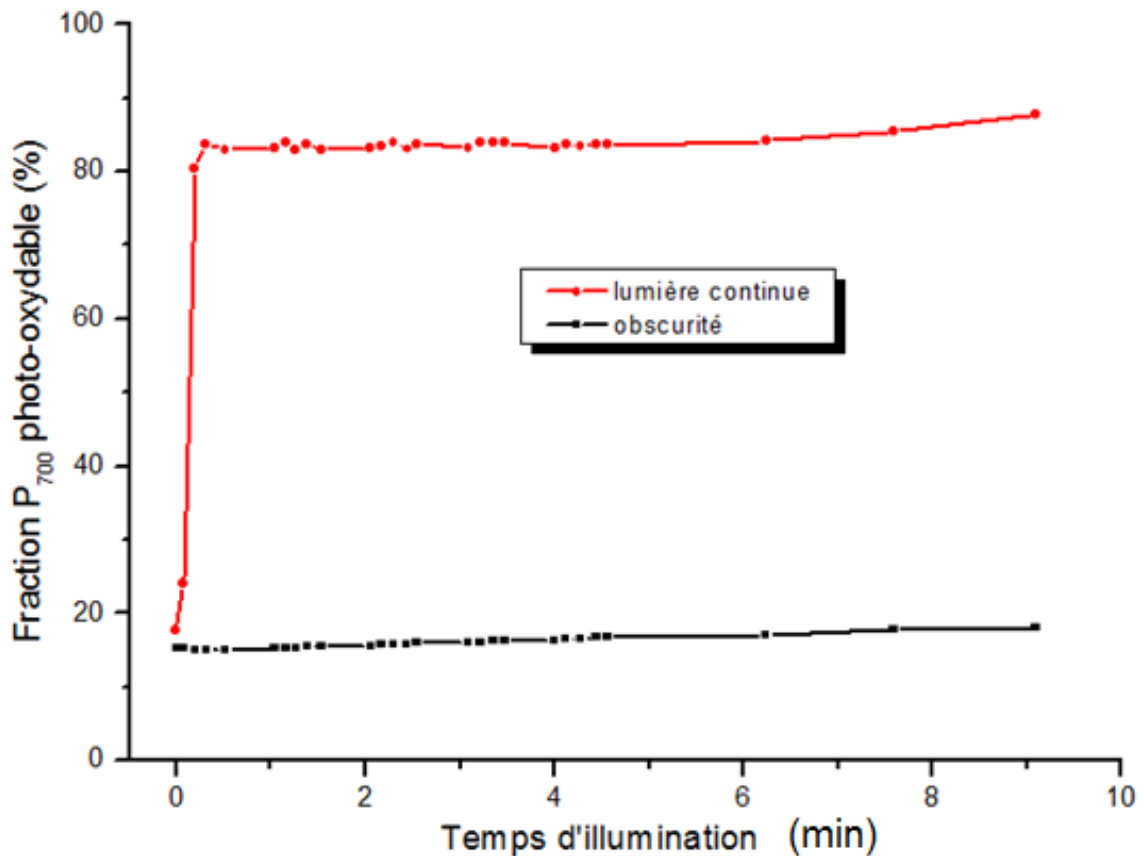


Figure 15 : Cinétiques représentant l'évolution de la quantité de P_{700} réduit chez le mutant d'hydrogénase *HydEF* de *C. reinhardtii*, selon le temps de l'illumination. En **rouge**, les cellules sont illuminées et en **noire** elles sont gardées à l'obscurité entre chaque point de détection. Intensité de $115 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La figure 15 nous montre qu'il est possible chez un mutant d'hydrogénase, de désengorger le pool de NADPH en synthétisant de l'ATP à la lumière, même si celle-ci n'est pas totale (~85 %).

Les résultats suggèrent que dans le cas d'une oxydation de P_{700} photo-induite, lorsque les cellules sont constamment illuminées, l'hydrogénase ne semble pas avoir de rôle prédominant, Puisqu'il est possible d'observer cette oxydation sous illumination même si elle n'est pas totale, contrairement au mutant d'ATP synthase.

Pour conclure, cette méthode mise en place, dans l'étude de la situation fortement réduite du stroma observée au début de l'anoxie, expliquée par une importante accumulation du pouvoir réducteur permet de conclure que la synthèse d'ATP photo-induite est une des voies plausibles pour désengorger le pool de NADPH.

Cela implique qu'une large fraction des protons pompés par le transfert d'électrons cyclique est consommée au niveau de l'ATP synthase pour la synthèse d'ATP. Marquant une certaine corrélation entre la commutation vers un CEF et une demande en ATP, (Joliot and Johnson, 2011).

De plus, l'application de la lumière sur des mutants pour qui l'observation de l'évolution spontanée d'oxydation de P_{700} à l'obscurité est impossible, présente un avantage car celle-ci permet d'obtenir une situation dite débloquée. Cette expérience peut être aussi utilisée pour mesurer un transfert d'électrons cyclique efficace dans les souches mutantes comme chez le contrôle.

2.3 Etude du temps d'oxydation de P_{700} dans les conditions anoxiques, sous illumination

Dans la mesure où nous avons observé que l'illumination permet d'induire la transition entre état "bloqué" et "débloqué", mais que celle-ci est de l'ordre de la minute, il nous a semblé légitime de déterminer si la vitesse de cette transition dépend de la vitesse photochimique et donc de l'intensité lumineuse.

Nous avons donc voulu tester l'idée que l'intensité lumineuse puisse influencer la vitesse d'oxydation de P_{700} , dans les deux sens ; *c'est-à-dire si nous diminuons l'intensité lumineuse, ralentissons nous la vitesse du déblocage du système, et inversement en augmentant cette fois ci l'intensité ?*

Dans les conditions où les cellules sont adaptées à l'obscurité durant 5 minutes d'anoxie où l'oxydation de P_{700} n'est pas observable, et où ces cellules sont ensuite exposées à la lumière continue, nous obtenons une oxydation totale de P_{700} à un temps de 1,5 minutes d'illumination pour une intensité de $115 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Voici les cinétiques que nous obtenons pour des intensités différentes, chez le contrôle de *C. reinhardtii*,



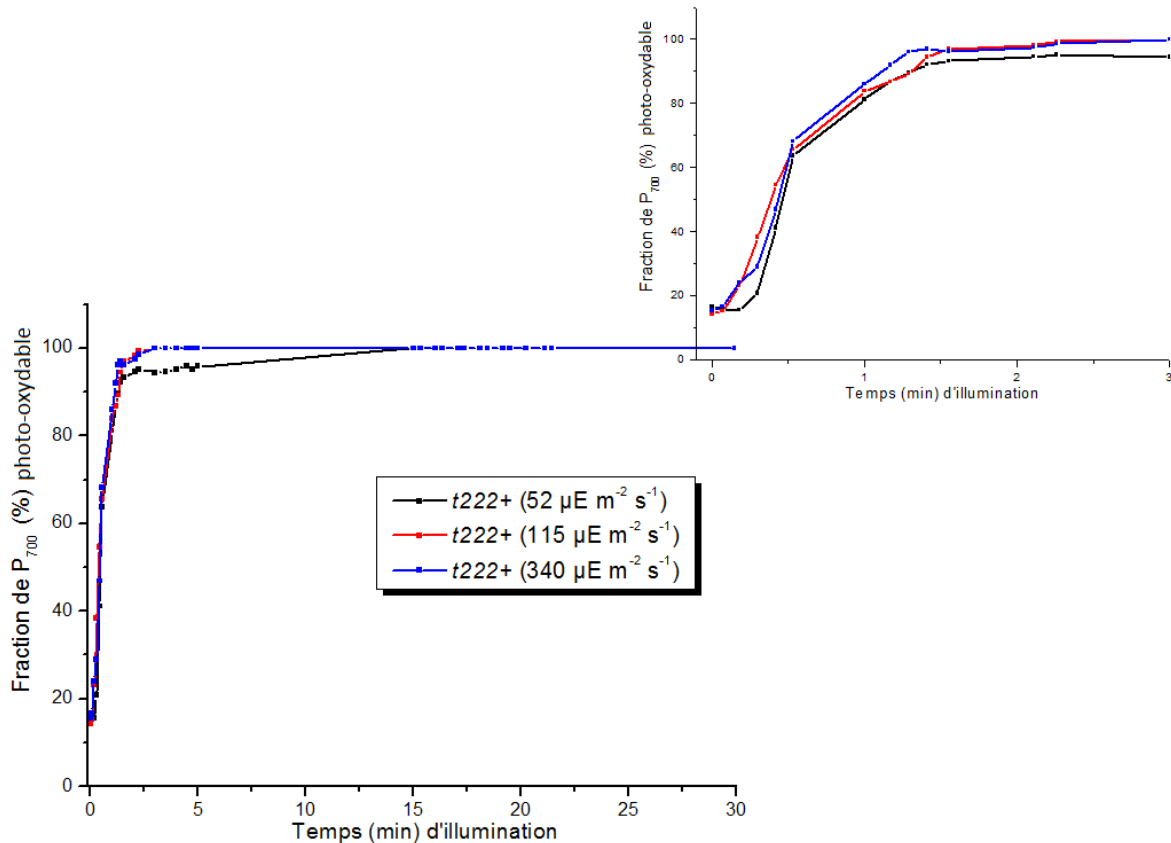


Figure 16 : Cinétiques représentant la fraction de P₇₀₀ photo-oxydable (en %) atteinte en fonction du temps d'illumination des cellules contrôles (t_{222+}) de *Chlamydomonas reinhardtii*. Trois intensités différentes (52-115-340) $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

La pente initiale, au début de l'illumination des cellules, est similaire pour les trois intensités. La courbe correspondant à la plus forte intensité (340 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) semble avoir un léger avantage dans la vitesse de récupération de la fraction de P₇₀₀ photo-oxydable durant l'illumination.

Pendant les 2-3 minutes de lumière nécessaires pour retrouver des vitesses de cycliques similaires entre nos deux méthodes de mesures présentées 100 % de la fraction photo-oxydable est observée, pour les deux intensités 115 et 340 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Ce n'est pas le cas pour une intensité de 52 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Ainsi ces résultats ne montrent pas de grandes différences dans la quantité de P₇₀₀ photo-oxydable accumulée à la lumière, dans les conditions anoxiques, à différentes intensités. Même si à une intensité de 52 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, la fraction de P₇₀₀ photo-oxydable est de 94-95 % pour des valeurs de 100% aux deux autres intensités. Ces résultats restent tout de même très similaires.

Donc, dans un souci d'optimisation d'observation des mesures, il nous semble important de plutôt se placer dans des conditions d'intensité d'au moins 115 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Même si les vitesses d'accumulation de P₇₀₀ photo-oxydable semblent indépendantes de l'intensité lumineuse de travail.

3 Retour sur l'évolution spontanée d'oxydation photo-induite des cellules, à l'obscurité



Nous l'avons montré, l'évolution spontanée du système à l'obscurité, permet l'oxydation de P_{700} photo-induite, chez un contrôle de *C. reinhardtii*, après 10 minutes d'anoxie.

Cette évolution d'oxydation est totale après 40 minutes d'anoxie à l'obscurité. Alors qu'il suffit de 2 minutes de lumière constante pour induire cette oxydation de P_{700} totale, chez la souche contrôle.

Ainsi, les temps d'évolution ne sont pas les mêmes pour la même souche, que celle-ci soit illuminée constamment ou gardée à l'obscurité entre chaque détections. Il est donc légitime de se demander ce qu'il en est pour les souches mutantes que nous avons étudiées, dans les conditions d'illumination continue.

3.1 Mutant d'ATP synthase – Analyses spectroscopiques

Voici les cinétiques du mutant d'ATP synthase dans les conditions anoxiques à l'obscurité,

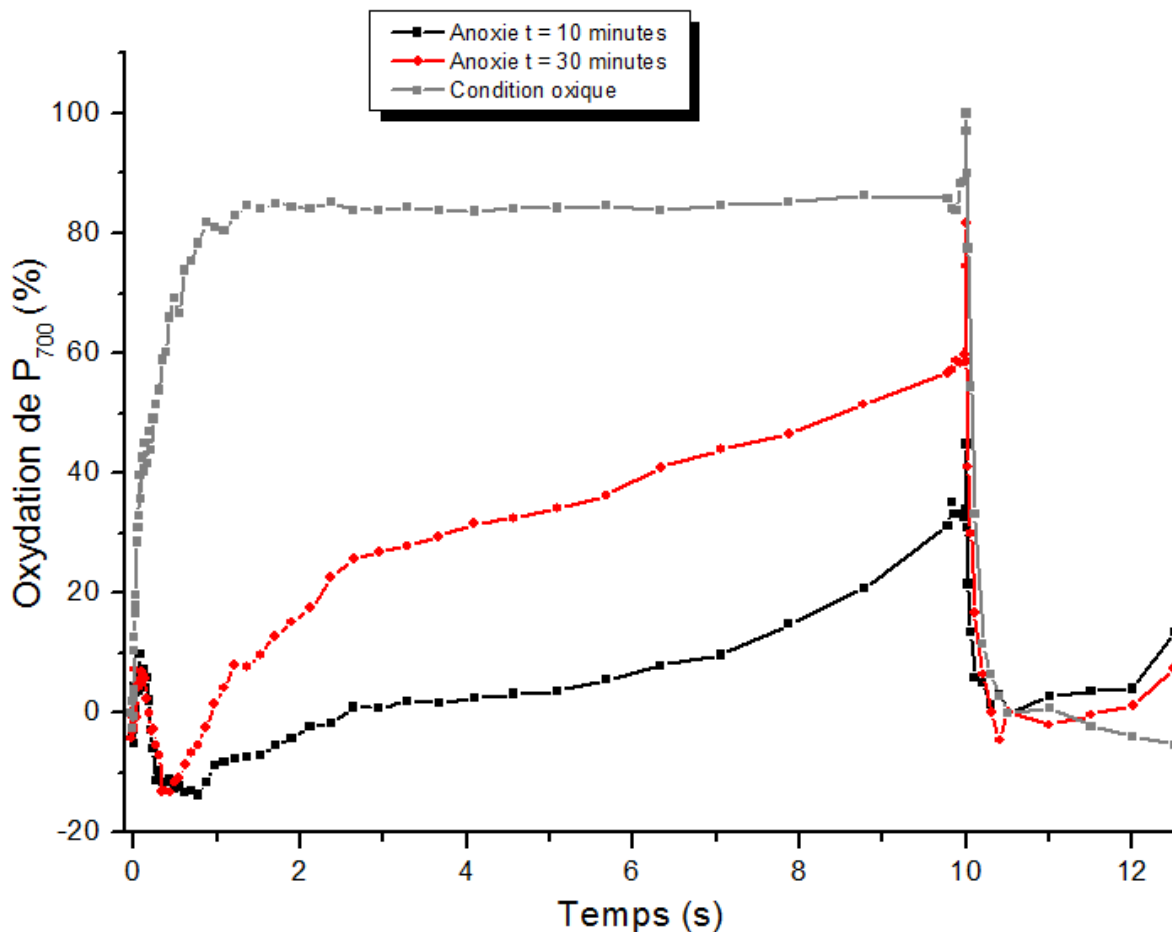


Figure 17 : Cinétiques d'oxydations de P_{700} dans les conditions oxique (grise) et anoxique (20 mM glucose, 2 mg / ml glucose oxydase et 10 μ M DCMU) à différents temps ; 10 minutes (noire) et 30 minutes (rouge). Mutant *thm24 7.4 mt-* de *C. reinhardtii*, intensité de 115 μ E $m^{-2} s^{-1}$.

1.

Les cinétiques d'oxydations de P_{700} chez le mutant *thm24 7.4 mt-* montrent, tout comme le contrôle, une situation où P_{700} reste majoritairement réduit à la lumière au début de l'anoxie (courbe noire) puis un état où son oxydation photo-induite devient



possible après 30 minutes d'anoxie (courbe rouge). Cependant, cette oxydation n'est que partielle comme le montre le pulse saturant à 30 minutes qui n'atteint pas la quantité de P_{700} photo-oxydable montrée dans les conditions oxygènes (courbe grise). En moyenne le mutant atteint ~79 % de la quantité totale de P_{700} .

Les cinétiques à des temps plus long d'anoxie (1h à 1h30) ne montrent pas d'évolution dans l'augmentation du niveau de P_{700} photo-oxydable atteint par le pulse saturant, indiquant que cette oxydation partielle dans les conditions anoxiques est maximale.

Les résultats sont similaires chez l'autre mutant d'ATP synthase, *Fud 50 OR mt+*.

Pour conclure, les mutants d'ATP synthase ont une oxydation de P_{700} limitée en début d'anoxie, mais peuvent lever cette limitation côté accepteur du PSI. Celle-ci étant seulement partielle mais assez importante pour permettre l'observation d'une oxydation quasi-totale du mutant. Alors que, dans les conditions d'illumination continue des cellules, l'oxydation de P_{700} semble impossible.

Ces résultats suggèrent déjà l'idée que deux voies dominantes existent selon que l'on considère l'évolution redox à la lumière ou à l'obscurité. Ils augmentent notre intérêt pour l'étude de la souche mutante d'hydrogénase dans les conditions anoxiques à l'obscurité.

3.2 Etude du rôle de l'hydrogénase - Mutant

La transition spontanée, à l'obscurité, entre la situation 'bloqué' à la situation 'débloqué' fait-elle intervenir l'hydrogénase ? Pour répondre à notre question nous avons étudié l'oxydation de P_{700} photo-induite, à l'obscurité chez un mutant dépourvu d'hydrogénase.

3.2.1 Induction de la protéine

Des études ont montré que 2 à 5 heures d'anoxie étaient nécessaires pour l'induction de l'activité maximale de l'hydrogénase (Happe, Mosler et al. 1994). Ceci va dans le sens de la détection de l'hydrogénase au cours de l'anoxie suivante,

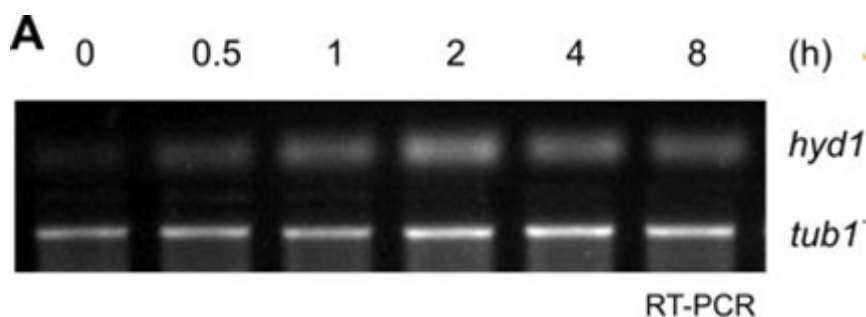


Figure 18 : Détection par RT-PCR des niveaux de transcrits d'Hyd1 chez *C. reinhardtii* à différents temps dans les conditions anaérobiques induites par bullage d'argon (Terashima, Specht et al. 2010).

L'induction de l'hydrogénase est étudiée au cours de différents temps d'anoxie et montre que celle-ci est très faible dans les débuts de l'anoxie (figure 18, temps de 0 à 0,5 h). Il nous semblait donc peu probable que l'hydrogénase soit impliquée dans le



désengorgement du pool de NADPH dans les dix premières minutes de l'anoxie. De plus, l'étude des vitesses de cycliques dans ces conditions montre une décroissance à partir de 1h30 – 2h, qui correspond à la plus forte production d'hydrogénase (figure 17), pouvant traduire une activité optimale de celle-ci à ces temps d'anoxie en jouant le rôle d'accepteur – transporteur d'électrons proche du PSI.

3.2.2 Inhibition de l'hydrogénase – Cycloheximide

Au tout début de notre étude, ne possédant pas encore un mutant dépourvu d'hydrogénase et toujours dans l'optique d'étudier son rôle dans la suppression de la limitation côté accepteur du PSI au début de l'anoxie, nous avons utilisé un inhibiteur de l'expression génétique, la cycloheximide. Celle-ci devrait chez le contrôle (*t222+*) de *Chlamydomonas reinhardtii*, stopper ou pour le moins ralentir l'induction de l'hydrogénase. Dans ce cas, il serait impossible d'observer une oxydation de P₇₀₀ par la lumière, en présence de l'inhibiteur.

Cependant les résultats des cinétiques d'oxydo-réduction de P₇₀₀ dans les conditions anoxiques chez le contrôle montrent des évolutions identiques des courbes avec et sans inhibiteur. Et cela, avec des temps d'incubation avant la mise en conditions anoxiques des cellules allant jusqu'à 2 heures.

Aux vues de nos résultats nous en avons conclu que puisque l'inhibition de l'expression génétique ne changeait pas la situation d'oxydation de P₇₀₀, l'hydrogénase ou bien l'induction d'une protéine n'était pas impliquée dans celle-ci.

Néanmoins, Roessler, P et ses collègues montré que l'on pouvait observer une activité hydrogénase même en présence de cycloheximide, (Roessler and Lien. 1984) pendant les temps de nos expériences. De plus, les auteurs montrent qu'une activité de l'hydrogénase a pu être détectée dans la condition aérobique de la croissance cellulaire des souches étudiées.

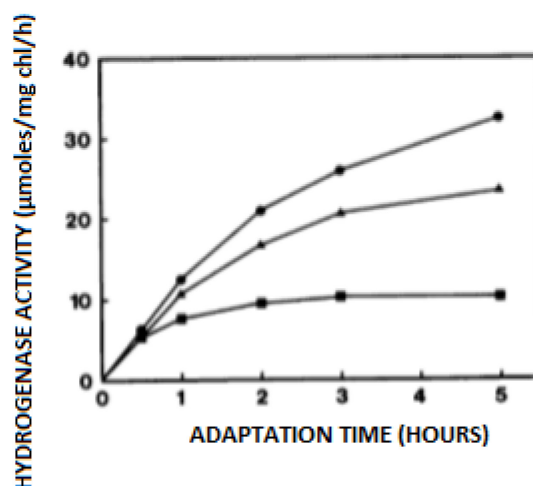


Figure 19 : Effet de la cycloheximide sur les cellules contrôles de *C. reinhardtii* sur l'activité de l'hydrogénase, en fonction du temps d'incubation dans les conditions anoxiques. La souche est incubée pendant une heure avec 15 μg de l'inhibiteur (**carré**) et sans addition (**rond**).

Référence (Roessler and Lien. 1984).

Dans les premiers temps d'incubation en condition anoxique et en présence de cycloheximide, la courbe avec l'inhibiteur (carrés) (figure 19), montre une même



activité de l'hydrogénase que la courbe sans l'inhibiteur (avec les ronds). Même si celle-ci après 30 minutes d'anoxie semble fortement ralentie, l'activité de l'hydrogénase est cependant présente suggérant son induction et donc son utilisation au sein de la cellule.

Donc en présence ou non de la cycloheximide il ne semble pas aberrant d'observer les mêmes courbes d'oxydo-réductions de P_{700} , dans nos temps court d'étude anoxique.

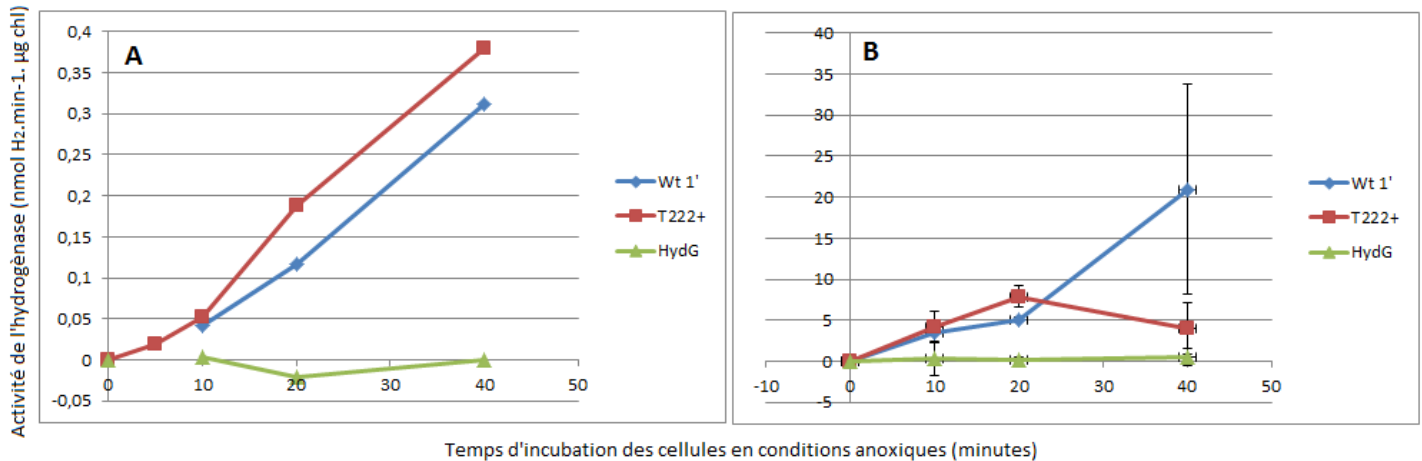


Figure 20 : Etude de l'activité de l'hydrogénase dans les conditions anoxiques (20 mM glucose, 2 mg / ml glucose oxydase et 10 µM DCMU) chez deux types de contrôles (*t222+*, **carré rouge** et *WT 1'*, **rond bleu**) et du mutant d'hydrogénase (*HydG*, **triangle vert**). **A**, sans addition et **B**, en présence de 15 µg de cycloheximide et une incubation d'une heure dans les conditions oxygènes à l'obscurité.

Nous avons reproduit les observations sur l'activité de l'hydrogénase dans les conditions anoxiques en présence de cycloheximide (figure 20). Ces expériences ont été réalisées avec l'aide de Damien Godaux de l'institut de Botanique de l'université de Liège. Ces résultats nous montrent qu'effectivement en présence ou non de cycloheximide, la production d'hydrogénase a lieu de façon identique dans les premiers temps de l'anoxie, avant de décroître.

Il semble donc que même en présence d'un inhibiteur de l'expression génétique qui devrait avoir un effet sur l'induction de l'hydrogénase dans les cellules, il est possible d'observer son activité dans les conditions anoxiques. Par ailleurs, alors que la cycloheximide arrête la synthèse de l'hydrogénase, celle-ci semble présente dans les conditions oxygènes de cultures. Un article parmi d'autre met en garde contre la possible production de la protéine lorsque les cellules sont centrifugées avant leurs études ([Hemschmier, Melis et al. 2009](#)), ce qui pourrait expliquer nos résultats. Les cellules sont effectivement centrifugées avant d'être re-suspendues dans un tampon et agitées pendant au moins 30 minutes à l'obscurité. Même si la quantité détectée dans les conditions oxygènes est inférieure à celle induite sous anoxie ([Happe, Mosler et al. 1994](#)), elle est suffisante pour permettre une activité efficace de l'hydrogénase dans les conditions anoxiques même en présence de cycloheximide.



Pour éclairer ce dernier point, nous sommes allés jusqu'à mettre les cellules en présence de cycloheximide une heure environ dans les conditions de culture oxygène avant leur centrifugation. Nous rajoutons en plus l'inhibiteur lorsque les cellules sont re-suspendues à l'obscurité avant leur étude.

Les courbes d'oxydo-réduction de P_{700} photo-induite, obtenues dans les conditions anoxiques à l'obscurité montrent un ralentissement de l'oxydation du dimère. Dans les conditions d'études du contrôle sans cycloheximide, la situation dite "bloquée" est observée jusqu'à 10 minutes d'anoxie pour finalement s'estomper totalement à 40 minutes.

Alors que dans cette expérience nous observons une impossibilité à oxyder P_{700} jusqu'à 20 minutes, où sans cycloheximide l'oxydation partielle a lieu ; elle reste cependant suivie par une oxydation totale de P_{700} après un temps plus long d'anoxie à l'obscurité.

Donc la cycloheximide a un effet en ce qu'elle ralentit le désengorgement du pool de NADPH. Elle a donc bien un effet sur la cinétique de la transition spontanée entre situation bloquée et débloquée. Pour autant elle ne permet pas de l'abolir complètement et ne fait que la ralentir.

Il semble donc que la centrifugation des cellules induit un état anoxique permettant la synthèse d'hydrogénase. Même si l'enzyme est extrêmement sensible à l'oxygène, dont la présence arrête la production d'hydrogène en quelques minutes ([Abeles. 1964](#) ; [Erbes, King et al. 1979](#)), il semble que même en faible quantité, la synthèse d'hydrogénase permet de réoxyder P_{700} sous les conditions anoxiques, même en présence de cycloheximide.

Ceci fait de l'hydrogénase une bonne candidate même si à ce stade il nous est impossible d'exclure l'intervention d'autres protéines dont la synthèse serait induite par l'anoxie.

3.2.3 Mutant d'hydrogénase – Analyses spectroscopiques

Il existe différents mutants de l'hydrogénase des gènes principaux identifiés dans l'induction de sa synthèse. Ce sont trois maturases d'hydrogénase aux centres [FeS] qui participent directement à l'assemblage des sous centres $[2Fe]_4$ et à la maturation des hydrogénases [FeFe] ([Psewitz. 2004](#) ; [Shepard, McGlynn et al. 2010](#)), (voir pour compléments d'informations, la rubrique [matériels et méthodes](#)).

Les études précédentes de Ghysels, B. et ses collègues sur le mutant *hyd EF* montrent qu'il n'est pas possible d'observer d'oxydation du dimère de chlorophylle du PSI dans les conditions anoxiques même après une longue période d'incubation ([Ghysels, Godaux et al. 2013](#)).



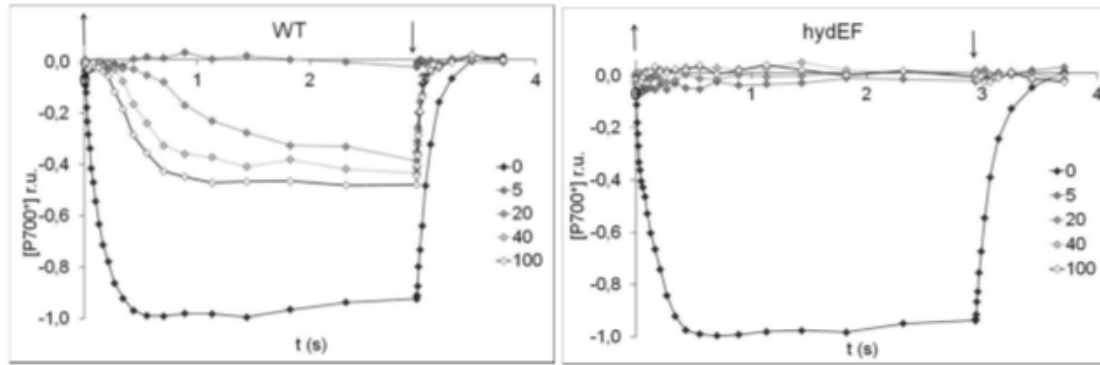


Figure 21 : Cinétiques d'oxydation de P_{700} dans les conditions anaérobiques (20 mM glucose, 2 mg / ml glucose oxydase et 10 μ M DCMU) chez le contrôle (WT) et du mutant d'hydrogénase *HydEF*. Courbes obtenues à différents temps d'anaérobiose du début (temps zéro) et (5, 20, 40 et 100) minutes (Ghysels, Godaux et al. 2013).

Nous observons sur les courbes d'oxydo-réduction de P_{700} de la figure 21 chez le contrôle, une évolution similaire à ce que nous avons présenté dans cette thèse dans les conditions anoxiques. Ces études montrent chez le mutant *HydEF*, une impossibilité d'observer l'oxydation du dimère de 5 minutes à 1h40 d'anoxie. Cette observation implique qu'il n'est pas possible chez un mutant sans hydrogénase d'oxyder le PSI à des temps d'anoxie où c'est normalement le cas chez un contrôle de *Chlamydomonas reinhardtii*.

De ces observations il semble que nous pouvons conclure que l'hydrogénase joue un rôle dans la suppression de la limitation côté accepteur du Photosystème I, à l'obscurité. L'enzyme induite doit en acceptant les électrons du pool de NADPH, désengorger ce dernier et permettre l'oxydation de P_{700} qu'il nous est possible d'observer chez un contrôle, après 10 minutes d'anoxie.

Dans un premier temps nous avons reproduit ces expériences,



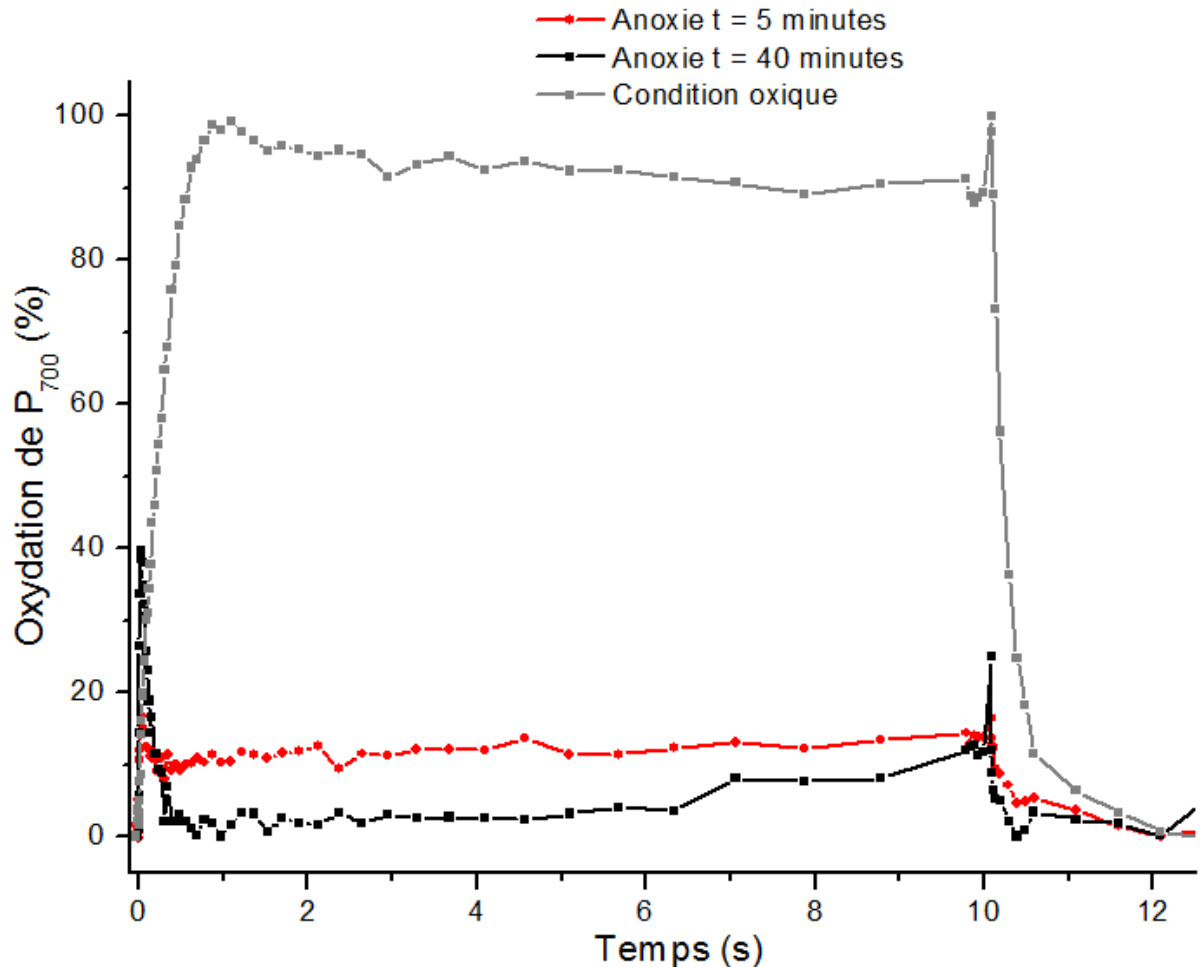


Figure 22 : Cinétiques d'oxydo-réduction de P₇₀₀ dans les conditions oxique (**courbe grise**) et anoxique, à différents temps d'incubation, chez le mutant d'hydrogénase *HydEF* de *C. reinhardtii*. Intensité de 115 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Les courbes d'oxydo-réduction de P₇₀₀ avec l'application du pulse saturant, de nos expériences figure 22, permettent de voir qu'il n'est pas possible d'observer une oxydation totale de P₇₀₀ chez *HydEF* durant l'anoxie (au temps long).

Il existe une forte recombinaison de charge chez le mutant, dont la suppression n'est pas observée même après 40 minutes d'anoxie, contrairement au contrôle. L'hydrogénase serait donc responsable de l'oxydation de P₇₀₀ après 10 minutes d'anoxie chez le contrôle de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*.

Ces expériences d'oxydo-réduction de P₇₀₀ sur les mutants dépourvus de l'hydrogénase, identiques chez le simple mutant *HydG*, permettent de conclure que dans le cadre où les cellules sont adaptées à l'obscurité, l'hydrogénase est un pool d'accepteur d'électrons, ces derniers venant de la ferrédoxine. L'implication de l'hydrogénase dans ces temps d'anoxie semble être confortée par les études de Hemschemeier, A. ([Hemschemeier, Melis et al. 2009](#)) qui montre que chez *Chlamydomonas reinhardtii*, l'activité de l'hydrogénase *in vitro* peut être détectée après 5-15 minutes de bullage.



Ce transfert d'électrons de la ferrédoxine à l'hydrogénase permet, après 10 minutes d'anoxie d'oxyder le dimère du PSI.

Ce phénomène explique donc les cinétiques d'oxydation de P_{700} que nous observons chez le contrôle et présentées dans cette thèse.

4 Cycle de Benson-Calvin

Ainsi, l'hydrogénase serait responsable de l'évolution spontanée de l'oxydation de P_{700} à l'obscurité. Alors que l'oxydation de P_{700} photo-induite implique la synthèse d'ATP.

Ce dernier point soulève l'hypothèse d'un éventuel rôle de la Rubisco dans les conditions d'illumination, une étape du cycle de Benson-Calvin que nous avons voulu étudier.

4.1 Etude de la Rubisco

Selon les descriptions du cycle de Benson-Calvin, la Rubisco (Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase / oxygénase) est une étape pré-requise du carbone, qui catalyse la carboxylation de RuBP (Ribulose-1,5-biphosphate) pour le rendement 3-PGA (Glycérate-3-phosphate), qui est à son tour converti en tris phosphates GAP (Glycéraldéhyde-3-phosphate) et DHAP (Dihydroxy-acétone phosphate), fournissant du NADPH et de l'ATP pour les réactions catalysées par la kinase 3-phosphoglycérate et le glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (figure 23).

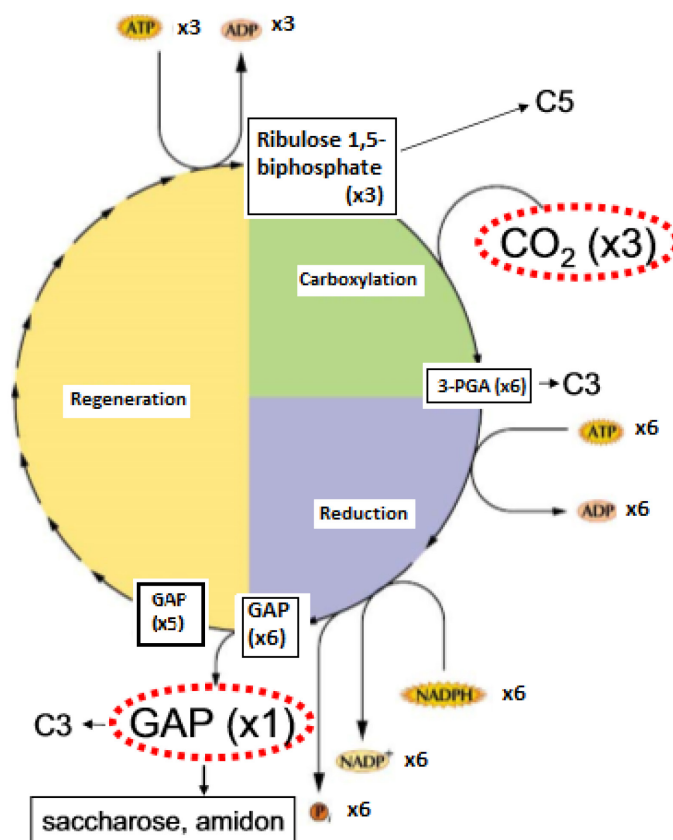


Figure 23 : Schéma du cycle de Benson-Calvin. Représentations des différentes étapes avant fixation et métabolisation d'une molécule de carbone, dont celles de consommations d'ATP et de NADPH.

Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il ne sera pas possible d'atteindre une oxydation de P_{700} durant l'illumination continue, le mutant étant normalement inhibé dans le cycle de Benson-Calvin. Puisque nous avons démontré que cette voie était celle de l'ATP synthétisé utilisant le NADPH via le cycle de Benson-Calvin. Malgré la synthèse d'ATP, la molécule ne pourra sans doute pas être consommée avec le NADPH si, comme dans un mutant de Rubisco, la voie du cycle de Benson-Calvin est compromise.

4.2 Analyses spectroscopiques - Mutant Rubisco $\Delta RbcL$ 1-7.5

4.2.1 Evolution d'oxydation P_{700} photo-induite spontanée.

Voici dans un premier temps les cinétiques d'oxydo-réduction du mutant Rubisco, $\Delta RbcL$ 1-7.5 (Johnson, Wostrikoff et al. 2010), dans les conditions oxygène et anoxique,

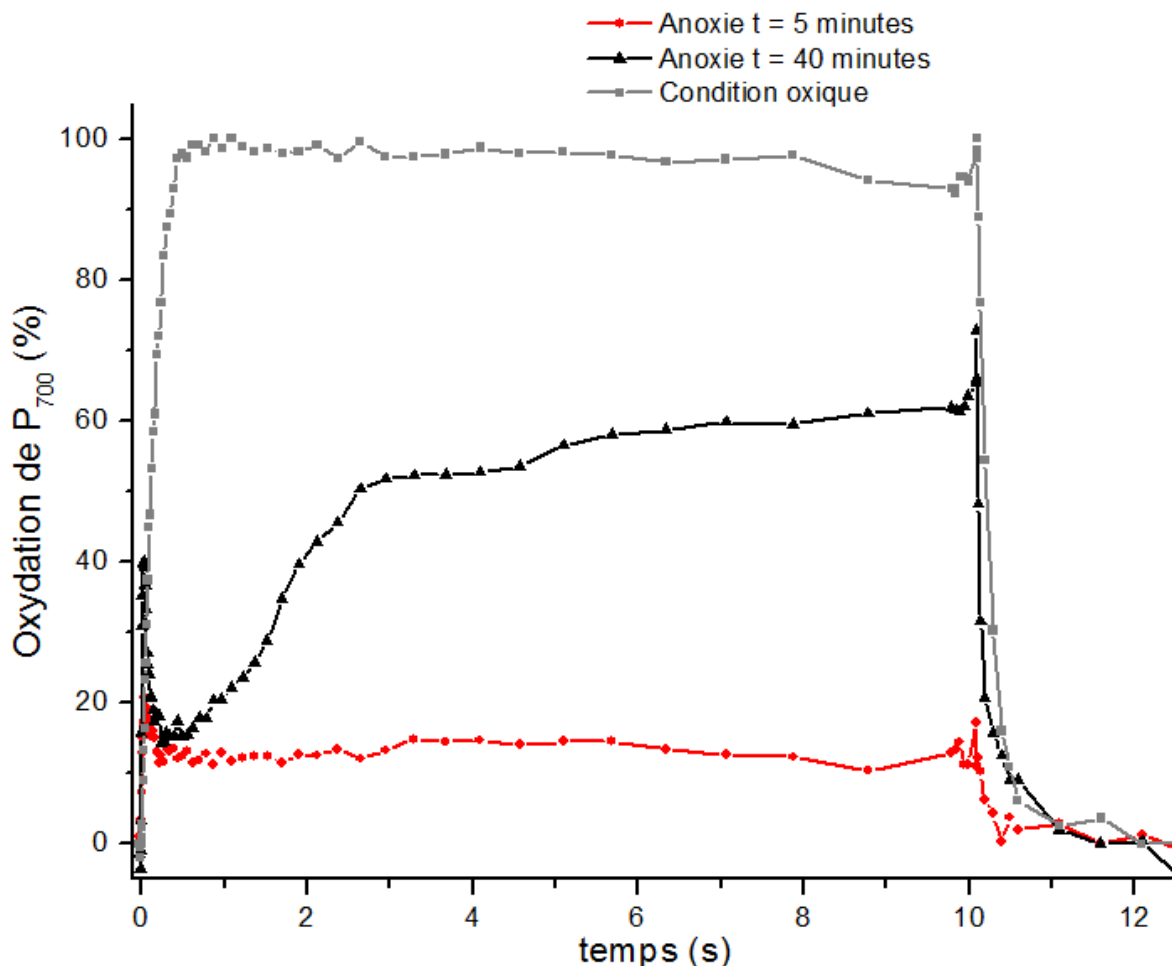


Figure 24 : Cinétiques d'oxydo-réduction de P_{700} dans les conditions oxygène (courbe grise) et anoxique, à différents temps d'incubation, chez le mutant Rubisco $\Delta RbcL$ 1-7.5 de *C. reinhardtii*. Intensité de $115 \mu E m^{-2} s^{-1}$.



La cinétique noire (40 minutes d'anoxie), montre que, chez le mutant $\Delta RbcL$ 1-7.5 il est possible d'oxyder P_{700} par l'hydrogénase, même si la quantité photo-oxydable de P_{700} n'est pas totale même après des temps long d'anoxie (jusqu'à 2 heures d'anoxie, cinétique non montrée). Cette oxydation seulement partielle (~75 %) est la même observable que celle faite chez le mutant d'ATP synthase.

Comme nous l'avons suggéré, l'intérêt de l'utilisation de ce mutant réside surtout à la lumière. La cinétique suivante montre l'évolution de l'oxydation de P_{700} photo-induite atteinte en fonction du temps d'illumination,

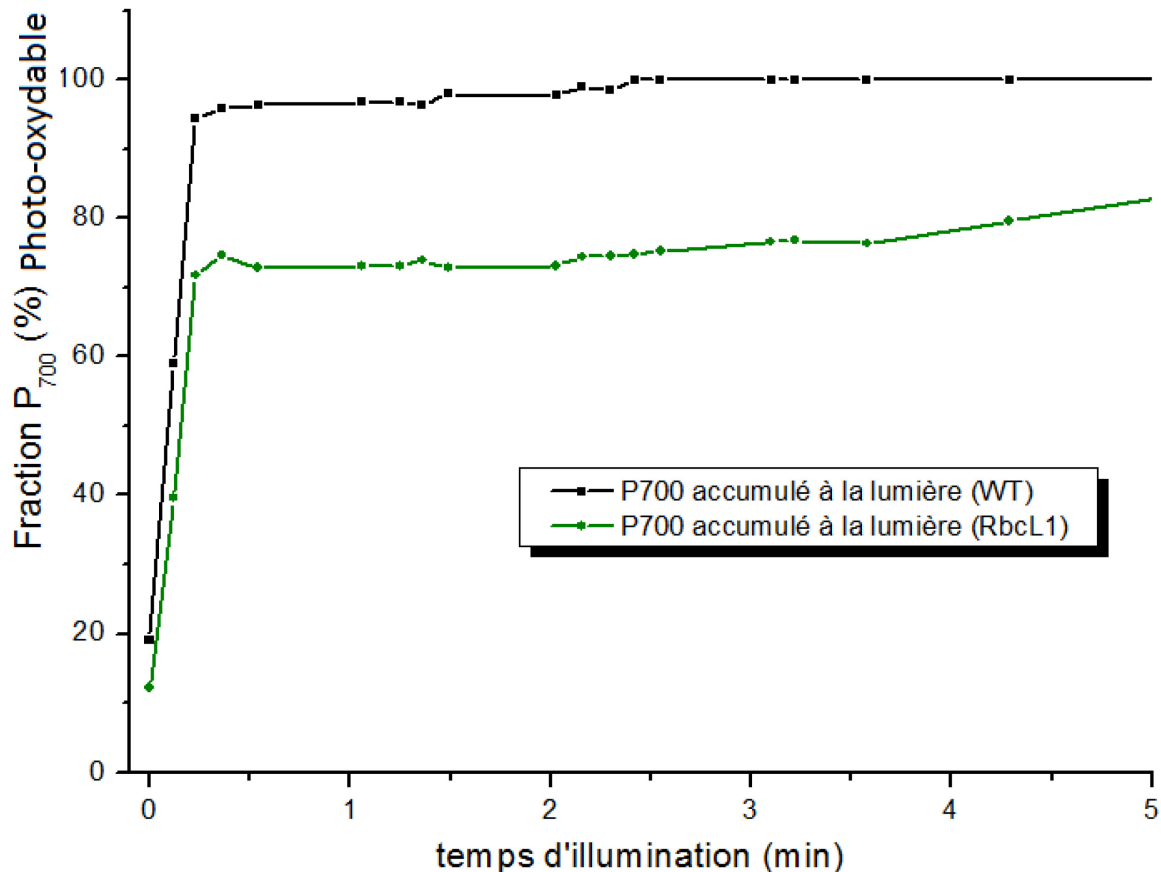


Figure 25 : Cinétiques représentant l'évolution de la quantité de P_{700} photo-oxydable chez le mutant Rubisco $\Delta RbcL$ 1 de *C. reinhardtii*, selon le temps de l'illumination. En **noire**, les cellules contrôles et à la courbe **verte** les cellules mutantes. Intensité de $115 \mu E m^{-2} s^{-1}$.

Il a été suggéré que chez un mutant altéré dans la sous-unité Rubisco, la réaction de Mehler permet la génération d'un gradient de proton induit à la lumière (Johnson, Wostrikoff et al. 2010).

Lorsque la lumière est appliquée sur les cellules mutantes de Rubisco, nous observons qu'il est possible d'oxyder P_{700} par la synthèse et la consommation d'ATP. Or, ce mutant est altéré dans une voie principale du cycle de Benson-Calvin, et la consommation d'ATP par ce dernier devrait être compromise. Mais l'expérience montre que cela ne semble pas être le cas ou alors que partiellement.



Cependant, cette oxydation photo-induite n'est pas totale et ne dépasse pas les 80 % de fraction de P_{700} photo-oxydable. Il semble donc possible de consommer le NADPH par l'ATP synthétisé à la lumière, qui permet la ré-oxydation du pool d'accepteur du PSI. Les étapes précédant celle de la Rubisco mutée peuvent expliquer cette consommation d'ATP (figure 23).

Donc chez le mutant Rubisco, il est possible d'observer, dans les conditions anoxiques, une oxydation de P_{700} spontanée, pour des cellules maintenues à l'obscurité entre les détections, mais pas totale. Il en est de même pour l'oxydation de P_{700} photo-induite, qui n'est pas complète (80 %) lorsque les cellules sont constamment sous illumination en anoxie.

En conclusion, bloquer l'étape catalysée par la Rubisco suffit à stopper l'assimilation du CO_2 dans les conditions stationnaires mais pas à inhiber totalement la consommation de NADPH induite par la synthèse d'ATP à la lumière.

Comme le montre la figure 23 il y a deux étapes qui permettent la consommation de l'ATP produit par la lumière avant celle impliquant la Rubisco. De plus, une étape permet la consommation de NADPH fortement accumulé au début de l'anoxie.

Ces étapes permettent l'oxydation de NADPH et donc celle d'une partie du pool d'accepteurs d'électrons, ce qui permet de lever la limitation côté accepteur et ainsi permettre l'oxydation de P_{700} à la lumière.

Il reste cependant envisageable de bloquer par l'utilisation du glycol-aldéhyde, qui inhibe la phospho-ribulo-kinase qui est impliquée dans le recyclage de la Rubisco, interrompant ainsi la fixation du carbone (Miller and Calvin. 1989) (voir pour plus de détails, la rubrique **matériels et méthodes**).

Ainsi l'utilisation de l'inhibiteur serait un bon moyen, en stoppant la fixation du carbone par le cycle de Benson-Calvin et les étapes avant la Rubisco elle-même, de bloquer la consommation de NADPH mais aussi de l'ATP produit par les cellules à la lumière.

La figure suivante montre les résultats obtenus, dans les études anoxiques à la lumière continue, avec l'utilisation de l'inhibiteur glycol aldéhyde chez le contrôle de *C. reinhardtii*,



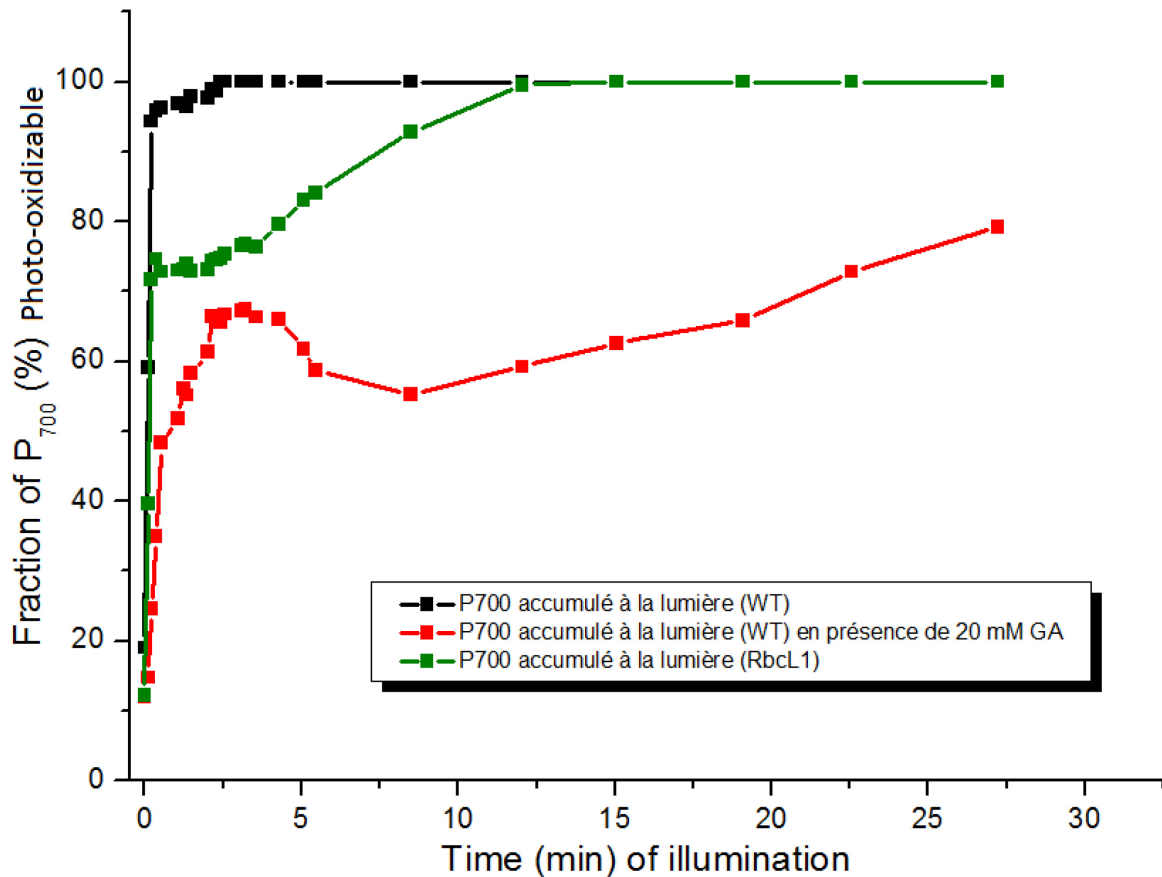


Figure 26 : Cinétiques représentant la fraction de P₇₀₀ photo-oxydable (en %) atteinte en fonction du temps d'illumination des cellules contrôles (*t222+*) de *Chlamydomonas reinhardtii* (**noire**) et du mutant $\Delta RbcL\ 1$ (**verte**). Intensité de $115\ \mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$, plus 20 mM de glycolaldéhyde pour le contrôle (**rouge**). Moyenne pour chaque courbe sur deux échantillons.

La comparaison des fractions de P₇₀₀ photo-oxydables obtenues dans les cellules sous illumination nous montre des différences entre présence et absence de l'inhibiteur chez le contrôle. Dans un premier temps nous pouvons donc conclure que l'inhibiteur a un effet sur la consommation de l'ATP par le cycle de Benson-Calvin et est caractérisé par une diminution d'environ 35 % de la fraction de P₇₀₀ photo-oxydable totale chez la souche contrôle.

De plus, il y a diminution de cette fraction obtenue dans les premiers temps d'illumination, chez le contrôle inhibé comparé au mutant $\Delta RbcL\ 1$. Une perte d'environ 15 % peut être estimée entre ces deux échantillons.

Ainsi, même si la diminution n'est pas aussi importante que nous l'aurions prédit, le rôle du glycolaldéhyde d'inhibiteur de l'étape 3-PGA dans le cycle de Benson Calvin, nous permet de conclure que l'ATP synthétisé par les cellules sous illumination dans les conditions anoxiques permet de consommer, à travers le cycle de Benson-Calvin, le NADPH. Expliquant la récupération rapide de la fraction de P₇₀₀ photo-oxydable sous lumière continue, chez le contrôle de *Chlamydomonas reinhardtii*, où dans ces conditions le flux d'électrons responsable de l'observation de l'oxydation du dimère de chlorophylle du PSI n'est pas limité par la forte réduction du pool de NADPH.



IV Conclusion – Suppression de la limitation côté accepteur du PSI

Les expériences présentées dans ce chapitre, sur l'étude de la recombinaison de charge et des voies métaboliques utilisées pour la stopper, conduisent à deux conclusions.

Lorsque les cellules sont adaptées à l'obscurité jusqu'à 10 minutes d'anoxie, il n'est pas possible d'observer d'oxydation de P_{700} alors qu'après 20 minutes, celle-ci évolue jusqu'à être complète après 30-40 minutes d'anoxie. Cette première situation, au début de l'anoxie, est due à un flux d'électrons constant conduisant à la réduction du pool d'accepteurs d'électrons du PSI amenant à la recombinaison de charge. Sur la base de nos observations, l'état redox des accepteurs d'électrons PSI est tel que peu d'actes photochimiques suffisent à "bloquer" le système et provoquer la recombinaison de charge.

D'une manière spontanée, cette ré-oxydation est permise par le désengorgement du pool de NADPH permettant la suppression de la limitation côté accepteur, est cela par le biais de l'hydrogénase ([Ghysels, Godaux et al. 2013](#)). Cette action permet aux électrons venant du flux constant à la lumière, passant par le PSI, d'arriver sur les accepteurs libres côté stroma.

Cette enzyme est induite par l'anoxie et nos résultats montrent que cette induction est plutôt rapide contrairement à ce qui peut être trouvé dans la littérature. Ce résultat va dans le sens d'une observation faite par St Amans, S. et ses collègues, où l'accumulation de ferrédoxine réduite qui amène à générer du NADPH, conduit à la production d'hydrogène ([Saint-Amans, Girbal et al. 2001](#)).

De plus, nous avons vu aussi que ce désengorgement pouvait être provoqué par la promotion de la consommation du NADPH consécutive à la synthèse d'ATP à la lumière. Nous avons montré une oxydation complète et rapide du P_{700} lorsque les cellules sont constamment illuminées, impliquant la suppression de la limitation côté accepteur par la synthèse d'ATP chloroplastique.

Il semble donc que deux voies métaboliques sont utilisables par les cellules pour utiliser le pool fortement réduit de NADPH.

Ainsi, de façon spontanée l'hydrogénase est principalement impliquée dans le désengorgement du système. De plus, l'utilisation de l'ATP synthétisé pourrait être complémentaire, comme le suggère le mutant d'ATP synthase ou Rubisco, qui comme nous l'avons mentionné précédemment (figures 17 et 24), montre que l'oxydation de P_{700} , après 40 minutes d'anoxie, n'est pas totale. Dans le cas d'une évolution spontanée du système lorsque les cellules sont illuminées, l'intervention de l'hydrogénase permet l'établissement d'un flux d'électrons qui, lui permet la génération d'une force protomotrice génératrice d'ATP ([Melis. 1991](#)). Il peut être alors envisageable que même après 40 minutes d'anoxie il y a encore un peu de recombinaison de charge, dont la synthèse d'ATP durant les 10 secondes d'illumination de détections suffit à permettre l'oxydation totale de P_{700} chez le sauvage. Expliquant que l'oxydation de P_{700} chez les deux mutants ne soit que partielle, même après un temps long d'anoxie, à l'obscurité.



Pour conclure, l'induction de l'hydrogénase dans les conditions anoxiques est utilisée comme un important pool, lorsque la lumière est appliquée sur les cellules. Ceci permet l'évolution spontanée de l'oxydation de P_{700} photo-oxydable, pour des cellules maintenues à l'obscurité, oxydation qui n'est pas possible d'observer dans les débuts de l'anoxie, due à une limitation côté accepteur du PSI.

Pour faire face à l'extra d'électrons au niveau des accepteurs du PSI, la ferrédoxine transfère ces électrons à l'hydrogénase ([Ben-Amotz and Gibbs. 1975](#) ; [Godde and Trebst. 1980](#)), sa présence étant indispensable pour permettre la suppression de la limitation côté accepteur. Cette voie métabolique pour les électrons est rapidement disponible et permet un désengorgement visible après 10 minutes d'anoxie.

Les résultats suggèrent que *Chlamydomonas reinhardtii* utilise dans les conditions anoxiques deux voies métaboliques pour libérer le flux d'électrons dans la chaîne photosynthétique : le cycle de l'hydrogénase et le cycle de Benson-Calvin. La voie de l'hydrogénase étant la principale par rapport à l'utilisation de la synthèse d'ATP dans un mode spontané, lorsque les cellules sont adaptées à l'obscurité.





CHAPITRE 3 : Etude Anoxique

Partie 2 – Etude moléculaire et fonctionnelle des supercomplexes

La chaîne photosynthétique subit une restructuration de ses complexes dans des conditions fortement réduites, en anoxie. *Cette restructuration est-elle un regroupement des complexes protéiques impliqués dans le transfert d'électrons cyclique pour une efficacité optimale de ce flux ?*

I Rappel de la problématique

Les données présentées précédemment sur les supercomplexes ont suscité la volonté de mieux caractériser leur fonctionnement *in vitro*. Ces études ont été conduites en collaboration avec l'équipe du Professeur Michael Hippler, dans le laboratoire de Biologie et de Biotechnologie (Institut für Biologie und Biotechnologie des Pflanzen, Allemagne, Münster).

Nous avons montré dans notre article (Takahashi, Clowez et al. 2013), tout comme d'autres auteurs (Terashima, Petroustos et al. 2012 ; Iwai, Takizawa et al. 2010), que nous retrouvions dans la bande supplémentaire (CEF-supercomplexes) dans les gradients de sucrose en condition anoxique les différents acteurs impliqués dans le transport d'électrons cyclique. Cependant, cette bande de haut poids moléculaire est pour l'instant uniquement interprétable comme une présence concomitante dans une région de densité donnée du gradient. Celle-ci regroupe différentes protéines qui, en condition oxic, migrent différemment dans le gradient. Cette interprétation ne préjuge en rien de leur degré d'association fonctionnelle. La question est donc : *Ces différents acteurs du flux cyclique de la bande CEF-supercomplexes, travaillent-ils ensemble à l'image d'un supercomplexe structural, ou bien est-ce seulement le résultat d'une co-migration ?*

Bien évidemment, cette question s'est déjà posée et des données existent sur l'étude fonctionnelle de la bande CEF-supercomplexes, *in vitro*.

II études précédentes - Supercomplexes

Les études de la formation des supercomplexes ont été conduites en deux temps. La description moléculaire par l'approche biochimique, et l'étude fonctionnelle, *in vitro*, par l'utilisation du spectrophotomètre et l'exploitation de spectres d'absorptions.

1 Description moléculaire

Le modèle moléculaire propose que les supercomplexes regroupent en un bloc, différents acteurs qui sont impliqués dans le CEF. En d'autres termes ces supercomplexes seraient un regroupement biochimique de protéines qui favoriserait la réinjection des électrons entre les deux complexes majeurs : le PSI et le cyt *b₆f*.

Les premiers modèles proposent que ces supercomplexes soient composés des sous-supercomplexes PSI-LHCI, des antennes mobiles LHCI, du complexe cyt *b₆f*, de la FNR (Fd-NADPH oxydoréductase) et de PGR1 (PGR5 (Proton Gradient Regulation 5) - like 1).



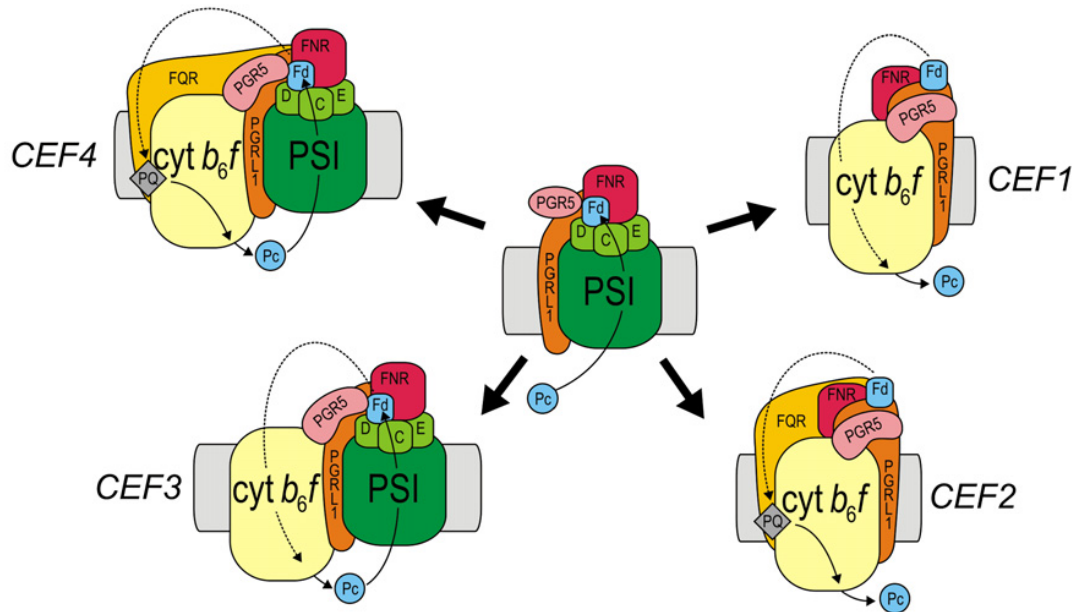


Figure 1 : Modèles schématiques des supercomplexes favorisant le transfert d'électron cyclique chez *Arabidopsis*, proposés par (DalCorso, Pesaresi et al. 2008). Les lignes en **pointillées** représentent les chemins possibles pour le transport des électrons entre le PSI et les autres protéines de la membrane thylacoïdale.

Dans cet article (DalCorso, Pesaresi et al. 2008), les auteurs présentent différentes configurations qui pourraient être adoptées par les CEF-supercomplexes, comme représentés sur la figure 1. Ces modèles incluent donc les protéines et complexes impliqués dans le transfert d'électrons cyclique, cités ci-dessus.

Les modèles CEF 3 et 4, présentent une structure incluant dans les supercomplexes le *cyt b₆f* et le PSI. Alors que les supercomplexes dits CEF 1 et 2 n'incluent que le *cyt b₆f*, avec une configuration protéique particulière des autres acteurs, sans le PSI. Ceci va dans le sens qu'une fraction de *cyt b₆f* pourvue de tous les transporteurs d'électrons, pourrait fonctionner indépendamment et faciliter le flux cyclique dans les régions membranaires où sont localisés les PSI.

Ces différents modèles ont tous pour objet l'optimisation de la réinjection des électrons en mode CEF.



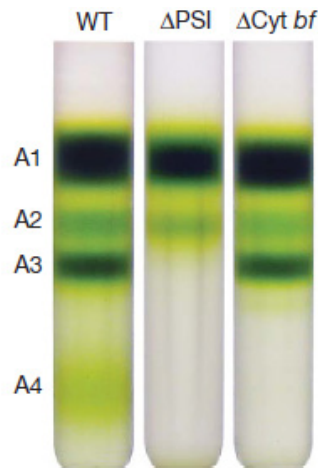


Figure 2 : Gradient de densité de sucrose avec les membranes chargées, WT, Δ PSI et Δ Cyt *bf*, dans les conditions anoxiques. Les fractions représentées, **A1** : Protéines libres LHCII, **A2** : Complexe de base PSII, **A3** : Supercomplexe PSI – LHCI, **A4** : Supercomplexe {PSI – LHCII – cyt *bf* – FNR – PGRL 1}. Figure provenant de l'article référencé (Iwai, Takizawa et al. 2010).

Il est également bien établi que sans la présence de certains composants, il n'y aurait pas formation de la bande CEF-supercomplexe, comme le montre Iwai, M. Takizawa, K. & al. sur la figure ci-dessus.

En effet, l'absence de fraction A4 chez les mutants altérés dans le Photosystème I et le cyt *bf*, montre que leurs présences sont nécessaires à la formation de la bande de haut poids moléculaire observé chez le WT. Suggérant qu'il ne s'agit pas simplement d'une simple co-migration des complexes PSI et *bf*, puisqu'en absence du *bf*, la position de la fraction contenant le PSI est identique à celle observée en condition oxygène. La caractérisation biochimique de la présence ou absence de supercomplexes dans les mutants dépourvus de PGRL 1, ainsi que dans d'autres mutants potentiellement impliqués dans les constituant des CEF-supercomplexes, sont en cours au sein de notre propre laboratoire, ainsi que dans d'autres unités.

Au cours de ces études, d'autres protéines ont été proposées comme étant impliquées dans ces entités biochimiques que sont les CEF-supercomplexes. En 2012, Terashima, M. & al. (Terashima, Petroustos et al. 2012) ont montrés l'association de la protéine CAS (Ca^{2+} - sensor protein) et ANR 1 (Anaerobic Response Protein 1) comme composants additionnels aux CEF-supercomplexes. Ces derniers confirment aussi l'absence de bande CEF-supercomplexe chez le mutant du PSI, et donc la nécessité de la présence du Photosystème I pour la formation de cette dernière.

Au-delà de la présence ou non de CEF-supercomplexes dans les mutants dépourvus d'un des composants présumé comme y étant impliqué, les mutants semblent tout du moins affectés dans l'efficacité du CEF dans les conditions anoxiques, sous-entendant leurs importances mutuelles dans ce dernier.

2 Etudes fonctionnelles *in vitro*



De façon générale, dans la littérature, les analyses spectroscopiques des supercomplexes *in vitro*, montrent que les variations d'états d'oxydo-réduction du Cyt *b₆f* et de P₇₀₀ dépendent de la plastocyanine et de la ferrédoxine.

Dans les deux articles cités ici et qui présentent les travaux majeurs sur les supercomplexes, les auteurs ont observés le transfert d'électrons cyclique dans les supercomplexes.

Les études sont basées sur les données biochimiques, qui montrent que ni la plastocyanine ni la ferrédoxine ne sont piégées dans le supercomplexe. Il est donc nécessaire pour vérifier son efficacité fonctionnelle, de rajouter ces deux éléments pour permettre le transfert des électrons entre les différents éléments composant le supercomplexe.

Ainsi les cinétiques de variations d'absorptions suivant, dans l'étude d'Iwai, M. Takizawa, K. & al, sont observées,

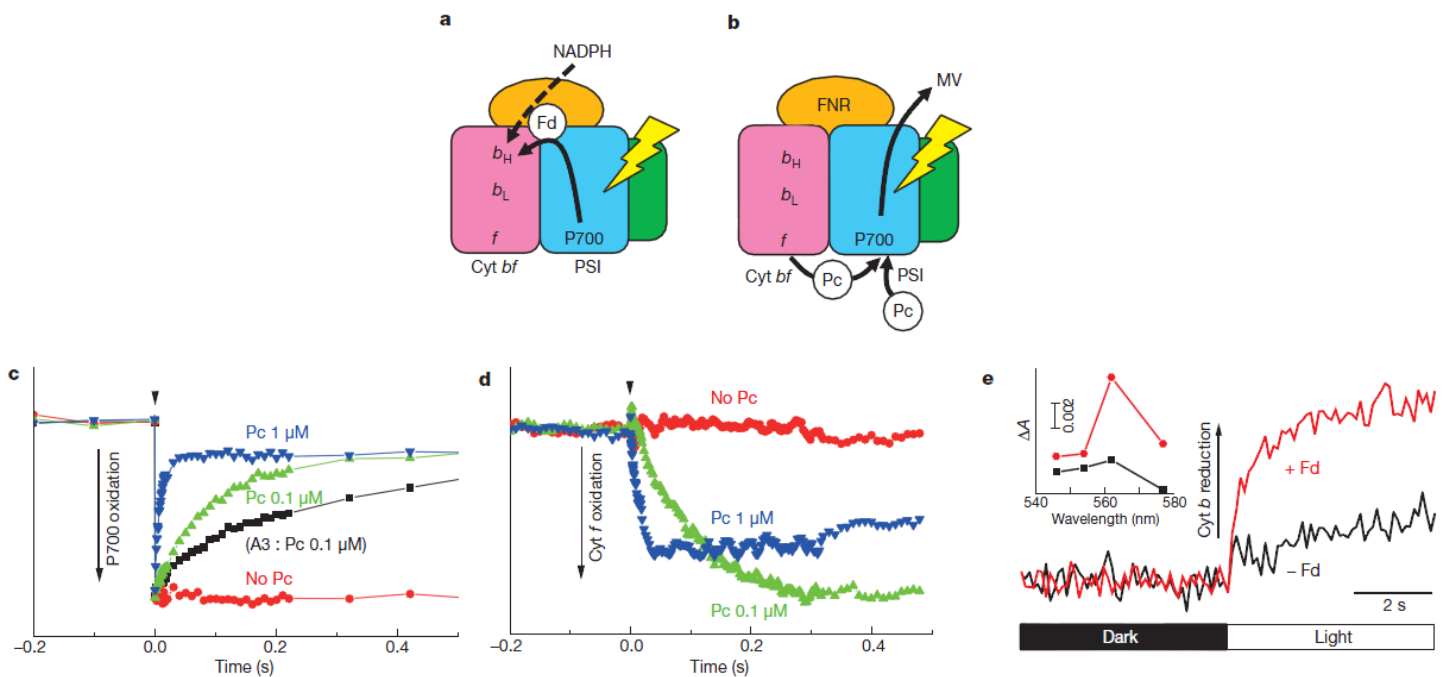


Figure 3 : Activité fonctionnelle de la fraction contenant le CEF-supercomplexe. **a**, **b**, Modèles schématisques simplifiés de la formation et du transfert d'électron des supercomplexes, du côté stromal avec l'ajout de 1 μM Fd et du côté lumen avec l'ajout de PC et MV, respectivement. Variation d'absorptions : **c**, Oxydation de P₇₀₀ par l'induction d'un flash et **d**, oxydation de cyt *f* sans et avec (de 0.1 μM et 1 μM) de PC. **e**, photo-réduction du cyt *b* en présence ou non de Fd. Référence (Iwai, Takizawa et al. 2010).

Ces cinétiques de variations d'absorptions issues des études spectroscopiques sur les supercomplexes *in vitro*, tendent à montrer qu'il existe un flux d'électrons à travers les différents complexes qui forment le CEF-supercomplexe, en présence de plastocyanine et de ferrédoxine.

Il semble donc que l'ajout des deux transporteurs mobiles d'électrons, qui ne sont pas présents dans le supercomplexe, permettent d'observer un transfert d'électrons à



travers les différentes unités qui forment les CEF-supercomplexes, trouvées dans la bande de gradient, A4 (figure 2).

La réduction du dimère de chlorophylle P_{700} , induit par un flash lumineux, est obtenue dès l'ajout de plastocyanine, ainsi qu'une oxydation de cyt f , concomitante. Deux observations qui pourraient être interprétées comme un transfert d'électrons à l'aide de la plastocyanine mobile du cyt f au PSI, induisant une oxydation et une réduction respectivement, de ces deux complexes.

De plus, après l'ajout cette fois de ferrédoxine il est possible d'observer un signal de réduction pour le cyt b , pouvant cette fois être interprété comme le passage des électrons entre le PSI et le compartiment cyt b , impliqué par le transporteur mobile qu'est la ferrédoxine.

Les résultats de variations d'absorptions d'état redox sont similaires pour l'étude de Terashima, M. & al. (Terashima, Petroutsos, et al. 2012).

Ainsi, la présence des deux transporteurs mobiles d'électrons montrent effectivement, de part ces changements de cinétiques, qu'il est possible d'oxyder et de réduire les deux complexes : PSI et cyt b_6f .

Après la démonstration de la diffusion libre du cyt b_6f , dans la membrane thylacoïdale, il est montré l'existence d'une co-migration de ces complexes avec les Photosystèmes I, dans les gradients de sucrose à l'état 2 comparé à l'état 1. De plus, l'augmentation de l'oxydation du complexe Cyt b_6f , induit par un flash dans ces conditions (Delosme. 1991), soutient la formation de supercomplexes proposé dans les régions stromales lamellaires, qui est favorisée par cette diffusion libre, permettant une exploitation des électrons en flux cyclique.

Nous aimerions cependant aller plus loin dans les réflexions sur l'activité du CEF-supercomplexe. Puisque les données présentées, au-delà du fait qu'elles indiquent des variations d'oxydo-réduction, après ajouts de PC et de Fd, des deux complexes PSI et cyt b_6f , ne permettent toujours pas de conclure s'il s'agit bien de supercomplexes actifs dans le flux CEF.

De plus, les données des cinétiques de la figure 3 montrent des temps de réaction d'oxydation plus lent que ceux attendu. Ce dernier point pourrait soulever l'idée d'une limitation possible par la diffusion des transporteurs mobiles, ce qui ne correspond pas à la définition de supercomplexe actif.

Nous nous proposons de reprendre les études de la bande CEF-supercomplexes, en augmentant en particulier la résolution cinétique des mesures et de tenter de caractériser plus précisément les séquences de réactions entre les différents complexes présents dans la bande de haut poids moléculaire.

III Protocole biochimique

Les résultats réalisés et présentés durant ma thèse se basent sur les protocoles indiqués dans les études d'isolation des supercomplexes chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* dans la référence d'Iwai, M. Takizawa, K. & al, (Iwai, Takizawa et al. 2010) ainsi que notre étude (Takahashi, Clowez et al. 2013). Cette partie de biochimie avait été portée par ma collègue Hiroko Takahashi, qui m'a



appris par la suite à manipuler et maîtriser tous les instruments biochimiques nécessaires à l'isolation et le dépôt sur gradient de sucrose des membranes thylacoïdales (Voir pour plus de détails, la rubrique [matériels et méthodes](#)).

Ce protocole basé sur celui d'Iwai, M et Takizawa, K. & al, est modifié pour l'adaptation aux expériences de biophysique. Ces dernières font intervenir l'utilisation de glucose/glucose-oxydase /catalase, pour mettre les cellules dans les conditions anoxiques et permettre ainsi les observations des cinétiques, *in vitro*, dans ces conditions.

Dans un premier temps j'ai gardé ces conditions pour mes propres études *in vitro*, la première étape ayant été d'être capable, moi-même, de retrouver ces bandes de haut poids moléculaires qui sont considérées comme reflétant les CEF-supercomplexes. La première remarque porte sur la difficulté de garantir la présence de cette bande plutôt diffuse, dans le respect de notre protocole ([Takahashi, Clowez et al. 2013](#)). En d'autres termes, nous voulions que l'étude biochimique soit réalisée en parallèle avec l'étude biophysique. Il était donc crucial de garder les mêmes paramètres pour les deux études, d'où les modifications du protocole, initialement établi ([Iwai, Takizawa et al. 2010](#)).

Cependant, dans le cadre de la collaboration avec l'équipe de Michael Hippler et de ces deux étudiants, Janina Steinbeck en thèse et Philipp Gäbelein en stage à cette époque, ils nous ont présenté un autre protocole précédemment suivi par Terashima et al. ([Terashima, Petroustos et al. 2012](#)). Ici, les cellules sont placées dans les conditions anoxiques par bullage d'argon et le détergent utilisé est le DDM (*n*-dodecyl β -D-maltoside). Contrairement à nous qui utilisons le glucose/glucose-oxydase et la catalase ainsi que le TDM (*n*-Tridecyl β -maltoside) comme détergent. Une différence marquante entre les deux résultats obtenus réside dans la forme de la bande CEF-supercomplexes. Cette dernière est plutôt bien définie et fine dans le premier cas que dans le second, où elle est beaucoup plus diffuse comme l'illustre la figure suivante,

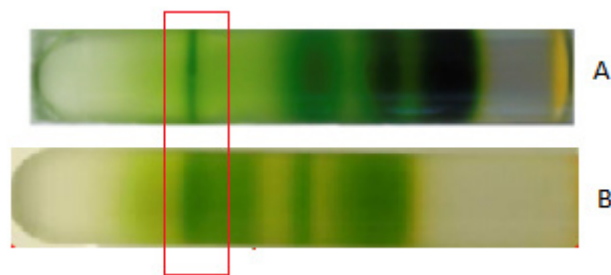


Figure 4 : Gradients de sucrozes après isolation et solubilisation des membranes thylacoïdales du type sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii*, dans les conditions anoxiques.

Bande CEF-supercomplexes dans le **cadre rouge**. A, CEF-supercomplexe obtenu après 4 heures de bullage d'argon, dans un gradient de concentration de sucrose de 1,3 M à 0,4 M ([Terashima, Petroustos et al. 2012](#)), CEF-supercomplexes obtenu après 40 minutes en présence de 20 μ M de glucose, 2mg/ml de glucose-oxydase et 50 UE de catalase, dans un gradient de concentration de sucrose de 1,3 M à 0,1 M ([Takahashi, Clowez et al. 2013](#)).

Comme nous pouvons le voir, les deux bandes ne sont pas au même niveau, cela est dû à la différence de concentration utilisé pour les gradients de sucrose.



En outre, il y a une différence notable dans le temps utilisé pour mettre les cellules dans les conditions anoxiques. Soit 4h dans le cas des expériences réalisées par M. Hippler et son équipe, que nous pouvons qualifier de temps long d'anoxie contre 40 minutes dans notre cas (temps court). Cette différence tient au fait qu'alors que nous souhaitons appliquer exactement les mêmes conditions que celles dans lesquelles les mesures fonctionnelles avaient été faites, l'objectif du groupe de M. Hippler était de caractériser les changements induits par l'anaérobiose en termes de contenu et d'abondance protéiques, ce qui nécessite des temps de traitement plus long. Quoi qu'il en soit, la figure nous montre aussi que dans les deux cas, nous obtenons des CEF-supercomplexes.

Pour des questions pratiques mais aussi dans un souci de limiter les différences de protocoles entre les deux groupes de recherche, nous avons fait le choix de placer les cellules dans les conditions anoxiques en utilisant le bullage par l'argon pendant 40 minutes, tout en maintenant les différentes solutions utilisées dans les conditions anoxiques par le glucose/glucose-oxydase et catalase. De plus, le bullage à l'argon est effectué à l'obscurité. Même si les bandes CEF-supercomplexes des membranes thylacoïdales mises dans les conditions anoxiques à la lumière et à l'obscurité ne présentent pas de différences notables, il nous semble inutile d'ajouter au stress du bullage, un stress lumineux.

En plus de ces légères modifications, nous avons introduit une variante au protocole plus importante. Celle-ci a porté sur l'étape de solubilisation des membranes thylacoïdales.

Durant les nombreuses discussions autour de mes résultats et devant la difficulté à obtenir des conditions parfaitement reproductibles, nous avons identifié l'étape de la solubilisation des membranes comme l'étape cruciale.

Le protocole établi préconise que pour l'étape de solubilisation, nous devons obtenir une concentration de chlorophylle de 800 $\mu\text{g Chl/ml}$ et une concentration finale du détergent TDM de 0,85 %. Pour cela nous diluons les membranes à la concentration demandée et une petite quantité de TDM à 10 % de concentration initiale est déposée délicatement dans cet échantillon. Celui-ci est ensuite gardé précieusement dans la glace en chambre froide (4°C) et agité toutes les cinq minutes pendant 20 minutes.

L'exposition, même transitoire, de l'échantillon à une forte concentration en détergent nous semblait susceptible d'être à l'origine de nos difficultés.

La solution envisagée a été la suivante : pour éviter ce choc, l'idée est de solubiliser les membranes thylacoïdales en procédant à la dilution de celles-ci volume par volume, de façon à ce que la concentration en détergent ne puisse jamais excéder le double de sa concentration finale, soit 800 $\mu\text{g Chl/ml}$ et 0,85 % de TDM (voir compléments d'informations, rubrique [Matériels et Méthodes](#)).

Comme nous pouvons le voir sur la figure suivante, les résultats sont concluants, avec la présence, cette fois-ci d'au moins deux bandes CEF-supercomplexes, qui ne sont pas présentes dans les conditions oxiques, et qui contiennent comme montré plus tard, les différents acteurs qui sont impliqués dans le transfert d'électron cyclique.



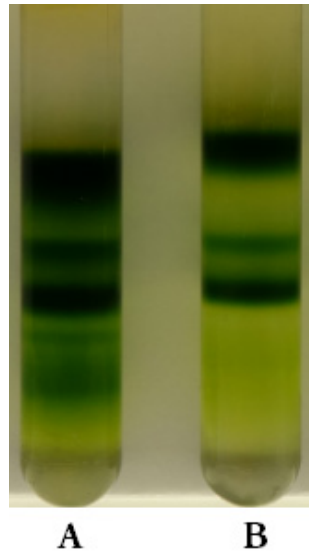


Figure 5 : Gradient de sucrose de concentration {1,3 – 1,0 – 0,7 – 0,4 – 0,1} M, des membranes thylacoïdales du WT (*t222+*) *Chlamydomonas reinhardtii*, dans les conditions **A**, anoxique et **B**, oxygène. Les membranes sont solubilisées avec le TDM pour une concentration finale de 0,85 %. 400 µg de chlorophylle est déposée sur chaque gradient.

Pour conclure ici, le nouveau protocole établi est adapté pour observer la formation de supercomplexe dans les conditions anoxiques. La dilution et la solubilisation par le détergent TDM, volume : volume, permet l'obtention de deux bandes CEF-supercomplexes, qui semblent plus lourdes et plus dense que pour l'ancien protocole (figure 4B), cette dernière étant absente dans les conditions oxygènes (figure 5B).

IV Etudes des supercomplexes - vérification moléculaire

Après avoir validé ce protocole, nous nous sommes lancés dans l'étude complète de ces bandes CEF-supercomplexes.

1 Gradient de sucrose

Voici donc présenté ci-dessous le gradient de sucrose du sauvage *t222+* de *Chlamydomonas reinhardtii*, dans les conditions anoxiques.



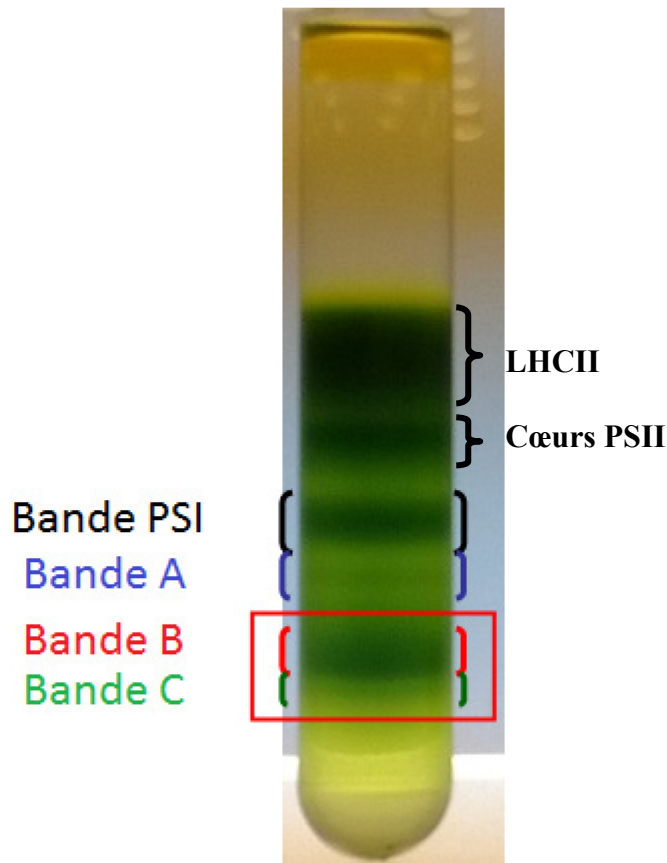


Figure 6 : Gradient de sucrose {1,3 – 1,0 – 0,7 – 0,4 – 0,1} M, des membranes thylakoïdales solubilisées (TDM) du WT (T222+) *Chlamydomonas reinhardtii*, dans les conditions anoxiques. 400 µg de chlorophylle est déposée sur chaque gradient. Entre les **parenthèses noires**, la bande contenant les Photosystèmes I {PSI-LHCI}. Les trois autres bandes sont identifiées comme CEF-supercomplexes par leurs absences dans les conditions anoxiques : bande A en **bleue**, bande B en **rouge** et bande C en **verte**. Le **cadre rouge** indique la position initiale de la bande CEF-supercomplexes reconnue dans les études précédentes.

Contrairement aux résultats précédents, ici il est possible d'identifier trois bandes qui s'accumulent uniquement dans les conditions anoxiques (figure 6).

2 Western blots

Nous avons décidé d'étudier chacune de ces trois bandes CEF-supercomplexes tout en utilisant la bande PSI comme contrôle à nos études. Ainsi après avoir pris soin de fractionner les gradients de sucrose, j'ai pu déposer les fractions que je jugeais intéressante pour les caractériser par Western Blot.

Cette étape biochimique s'est faite avec l'aide précieuse d'Hiroko Takahashi et de Wojciech Nawrocki.

J'ai donc déposé les fractions correspondantes à chacune des bandes qu'il est possible d'observer sur la figure 6. Soit les fractions des trois bandes (A, B, C) du CEF-supercomplexes, les fractions contenant les Photosystèmes I, mais aussi les fractions des bandes LCHII et les cœurs des Photosystèmes II.

Voici les résultats après détection des protéines importantes de par l'hypothèse de leur implication dans le transfert des électrons en mode cyclique. Ainsi, nous avons



testé le PSI (PsaA), le cytochrome *b₆f* (cyt *f*), une sous unité phosphorylée lors de la transition des antennes mobiles LHCII. Mais aussi des protéines que nous savons impliquées dans le CEF par les nombreuses études précédentes, comme PGRL 1, l'ANR 1, la FNR et PETO, (Iwai, Takizawa et al. 2010).

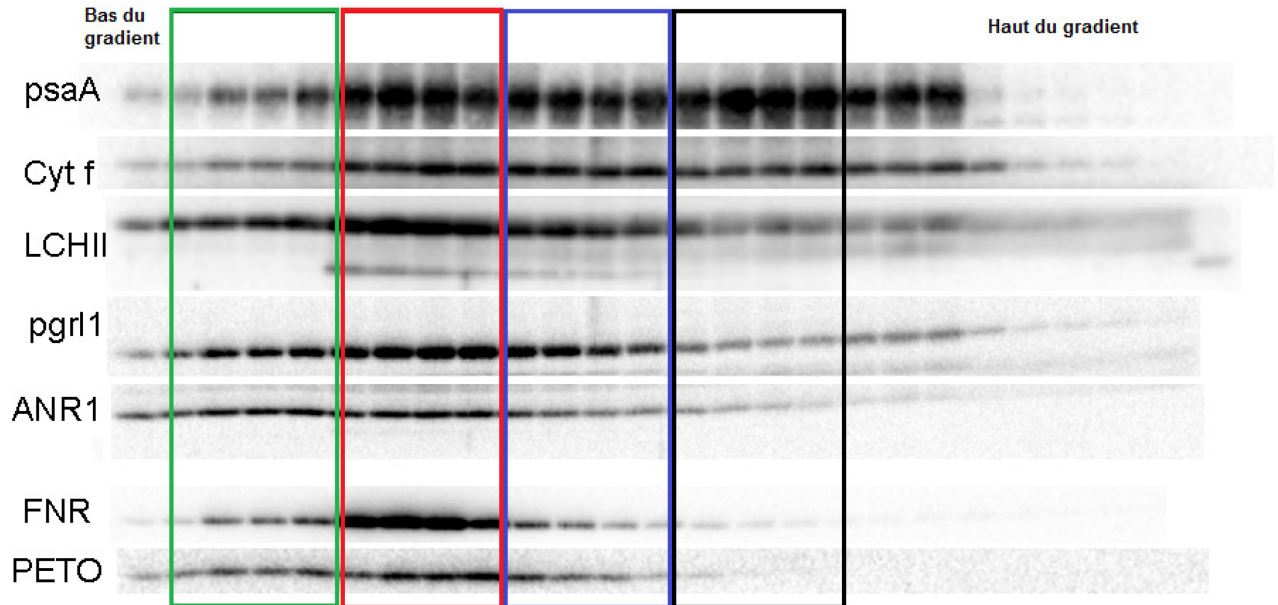


Figure 7 : Western blot des fractions choisies des membranes thylacoïdales solubilisées, du WT (*t222+*) *Chlamydomonas reinhardtii*, en conditions anoxiques, obtenu après dépôts sur gradient de sucrose. Définitions des encadrements : **vert**, bande C. **Rouge**, bande B. **Bleu**, bande A et en **noir**, bande PSI, en référence avec la figure 6 des gradients de sucrose. NB) Comme indiqué, toutes les fractions du gradient de sucrose n'ont pas été déposées. Seules celles considérées comme significatives pour la compréhension de l'expérience ont été utilisées.

Comme nous pouvons le voir, le PSI est présent dans toutes les bandes définies importantes pour notre étude, dont la distribution semble être similaire entre la bande PSI et la bande principale du CEF-supercomplexe, appelée B (encadré rouge). Dans cette bande principale du CEF-supercomplexe, nous retrouvons en quantité importante, les différentes protéines impliquées dans le transfert d'électron cyclique. Nous pouvons aussi détecter ces composants dans les deux bandes, A et C (encadrement bleu et vert, réciproquement) que nous considérons comme caractéristiques de la formation de supercomplexes dans les conditions anoxiques.

Nous pouvons noter que la FNR et PetO ont une distribution similaire. Cette observation était déjà faite lors de nos premières études des CEF-supercomplexes, Figure 10 (Chapitre 1) (Takahashi, Clowez et al. 2013). Il apparaît en être de même pour la répartition des différentes protéines : pour ANR 1 et la protéine PGRL 1, ainsi que les antennes LHCII et le cytochrome *f*. Ce dernier point n'était pas appréciable lors de notre étude précédente. En effet, celle-ci montrait la présence de cyt *f* dans la bande CEF-supercomplexes mais plus notable dans la bande correspondant aux PSI, avec un décalage par rapport aux autres protéines citées ci-dessus.



Ces distributions protéiques dessinent une formation de supercomplexe de type CEF 3 ou 4 désignés à la figure 1, où il y aurait clairement une association structurale permettant une efficacité optimale dans la réinjection des électrons dans l'unité que sont les supercomplexes, en mode cyclique.

Il semble donc qu'en plus du fait que ces bandes (A, B, C) soient présentes seulement dans les conditions anoxiques, elles contiennent les principaux composants intervenant dans le transport des électrons en mode cyclique. Avec dans la bande principale CEF-supercomplexes, une distribution de ces différentes protéines qui permet de penser qu'elles sont associées en un même système. Ce dernier point consolide notre idée première d'étudier, comme il l'a été déjà fait dans la littérature, ce que l'on désigne par l'isolation de CEF-supercomplexes *in vitro*.

V Etude des supercomplexes - vérification fonctionnelle

Comme nous l'avons discuté précédemment, la littérature a montré par les études spectroscopiques, la fonctionnalité de l'unité CEF-supercomplexes par l'observation d'un transfert possible d'électrons à travers les différents complexes le composant. Cependant, nous avons soulevé un certain nombre d'interrogations quant à cette activité.

1 Fluorescence à froid - 77 K

Nous nous proposons de commencer notre étude par une approche encore jamais présentée pour l'examen des supercomplexes. Celle de la méthode de la fluorescence à froid 77 K, pour les trois bandes identifiées (A, B, C).

Nous attendons de cette étude, des informations concernant le degré de la connexion des antennes LHCII identifiées dans les bandes dites CEF-supercomplexes et PSI. Cela pourrait nous permettre d'établir un tableau plus complet de la formation de supercomplexe, puisque la présence des antennes mobiles LHCII n'est plus à montrer, par les études précédentes et présentes, ce qui n'est pas le cas pour leurs connexions aux PSI.



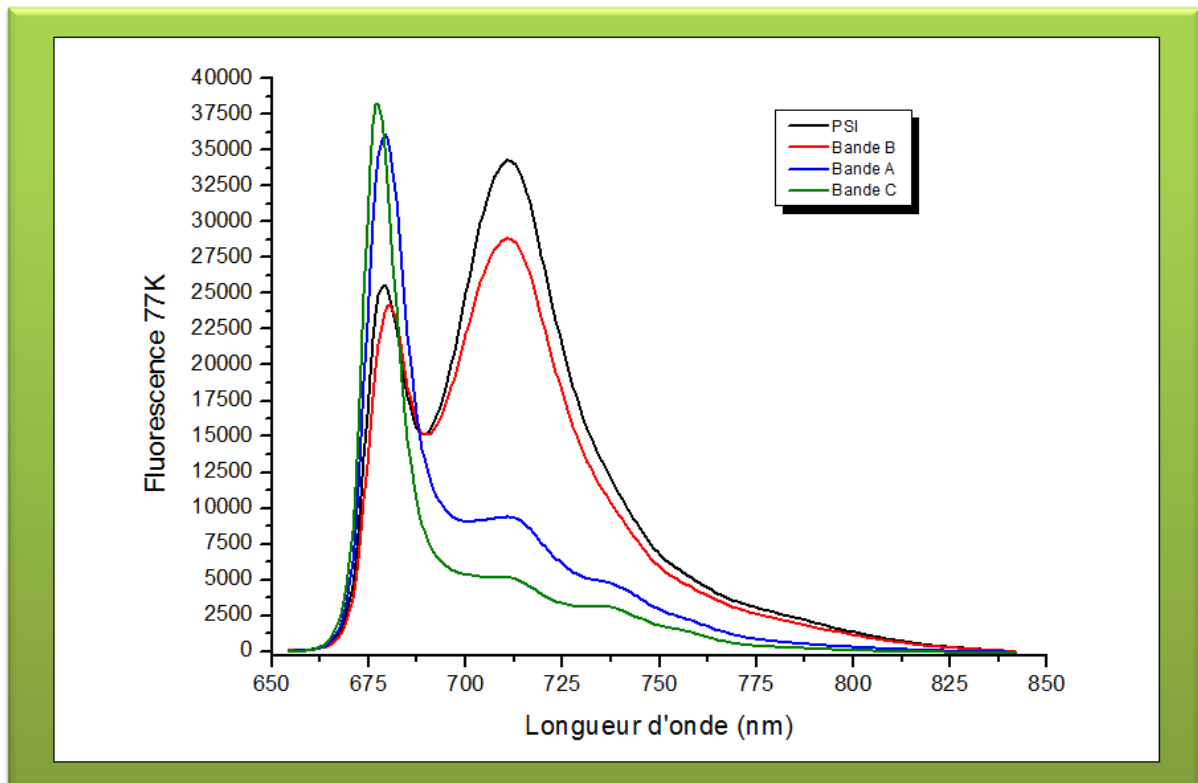


Figure 8 : Spectres d'absorptions correspondant à la fluorescence à froid 77 K pour les trois bandes CEF-supercomplexes : en **bleu**, la bande A. En **rouge**, la bande B et en **vert**, la bande C. Enfin la courbe **noire** représente la fraction contenant les PSI. Voir référence avec le gradient de sucrose figure 6. Longueurs d'onde : 680 nm correspond à un signal pour les antennes LHCI non connectées et ~685 nm aux antennes LHCI connectées aux PSI. De même, à 705 nm correspond le signal des antennes LHCI non connectées alors que ~720 nm traduit les antennes LHCI connectées aux PSI.

Nous pouvons voir sur la figure 8 que le pic principal de la bande C (courbe verte) est décalé vers le bleu par rapport à celui de la bande A (courbe bleue) pouvant témoigner d'une plus faible connectivité entre LHCI et le PSI pour la bande C. Elles présentent un pic important correspondant à des LHCI non connectées, mais aussi deux autres pics de plus faibles amplitudes pour les antennes LHCI à la fois connectées ou non aux Photosystèmes I.

Pour ce qui est de la bande principale B de formation de supercomplexes, elle a le même aspect que la bande des fractions du PSI, à ceci près que le rapport entre les bandes attribuées aux LHCI et au PSI est plus faible dans la fraction B que dans la fraction PSI, ce qui témoigne d'un rapport LHCI / PSI supérieur dans la fraction B. Cependant, cette déconnection peut être induite par la congélation en azote liquide et ne nous permet pas de conclure sur ces dernières données.

De plus, les résultats obtenus pour la bande B (courbe rouge), confirme notre analyse selon laquelle cette bande présente le plus fort contenu en supercomplexes. Puisque cette dernière suit le fonctionnement d'un système comprenant le PSI en fluorescence à froid et que de plus, elle associe les fractions qui comprennent les plus importantes distributions des différentes protéines impliquées dans le flux



d'électrons cyclique. Il est effectivement légitime de choisir cette bande pour les études fonctionnelles plus approfondies au spectrophotomètre.

Les expériences suivantes visent donc à étudier plus spécifiquement les différents complexes qui composent les supercomplexes et que nous savons présents dans notre échantillon, soit la bande principale B. Pour cela, nous utilisons maintenant le JTS-10 et les longueurs d'ondes spécifiques, pour observer les spectres d'oxydo-réduction du dimère de chlorophylle du PSI, P_{700} , de la plastocyanine mais aussi des cytochromes *b* et *f*, pour le complexe cytochrome *b₆f*.

2 Etude de flash – Mesures à 705 nm

Pour aborder notre problématique nous avons décidé d'étudier dans un premier temps les fractions contenant uniquement les Photosystèmes I. Notre expérience comporte plusieurs étapes, celle de l'étude de l'échantillon PSI, avec et sans ajout de la ferrédoxine et ensuite de la plastocyanine.

La méthode est la suivante : un flash laser induit l'oxydation de P_{700} que l'on caractérise par les variations d'absorption qui en résulte à 705 nm. Les cinétiques de changements d'absorptions nous renseignent sur la durée de vie des états formés. En absence d'accepteurs d'électrons exogène, nous nous attendons à ce qu'un flash lumineux induise la formation de la paire radicalaire $P_{700}^{+}F_{A/B}^{-}$.

C'est en effet ce que l'on observe, comme le montre la figure suivante (courbe noire), des cinétiques d'oxydo-réduction de P_{700} , par l'application des quatre flashes successifs.

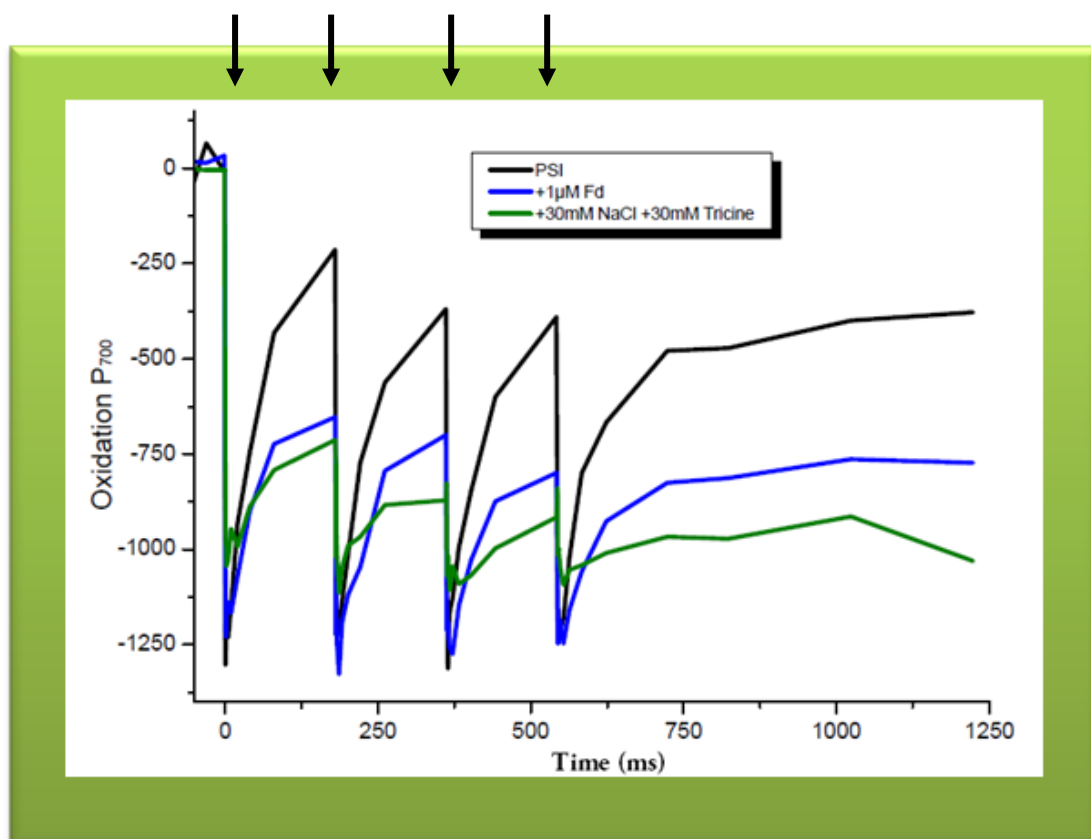


Figure 9 : Etude spectroscopique de la fraction PSI du WT (t222+) de *Chlamydomonas reinhardtii*. Représentation de quatre flashs successifs à 705 nm (**flèches noires**), à une intensité de 340 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$. Pour un échantillon de PSI de 20 μg Chl/ml, ajout pour son étude du tampon : 0,005 % TDM, 2 mM MgCl_2 et 1 mM ascorbate. **Courbe noire**, fraction unique de PSI + tampon, **courbe bleue**, ajout de 1 μM de ferrédoxine et **courbe verte**, l'échantillon est mis, en plus, en présence de 30 mM de Tricine et de NaCl.

De façon décevante mais intéressante, l'ajout de 1 μM de ferrédoxine, accepteur d'électrons du Photosystème I, ne modifie que faiblement le déclin de P_{700}^{+} après un flash (courbe bleue), alors que l'on s'attendrait cette fois-ci à ce que le transfert d'électrons à la ferrédoxine augmente considérablement sa durée de vie en entrant en compétition avec la recombinaison de charge. Ainsi, malgré la présence de ferrédoxine, le complexe Photosystème I est tout de même exposé à un blocage du transfert des électrons vers les transporteurs mobiles, et donc à une recombinaison de charge.

Nous pouvons donc conclure, que le PSI est soumis à une limitation côté accepteur, et qu'il est donc fort probable qu'il en soit de même pour le CEF-supercomplexe.

Une autre information que nous fournit cette expérience est qu'il est possible d'augmenter l'efficacité du transfert d'électrons vers la ferrédoxine.

Les études précédentes conduites sur l'activité du PSI *in vitro* et le transfert d'électrons vers la ferrédoxine ont montré l'importance de la force ionique d'une part et du pH d'autre part. Ainsi, les conditions optimales sont 30 mM NaCl ainsi que de 20 mM de Tricine à un pH 8.0, ([Cassan, Lagoutte et al. 2005](#)).

Comme le montre la figure, nous avons obtenu, après ajout de 30 mM NaCl - Tricine et ajustement du pH, une diminution dans l'amplitude de la phase de réduction de P_{700} après un flash (courbe verte, figure 9). Indiquant que dans ce système la recombinaison de charge est moindre.

Les expériences d'études *in vitro*, ont été conduites en utilisant ce nouveau tampon, (voir [matériels et méthodes](#) pour plus de précisions).



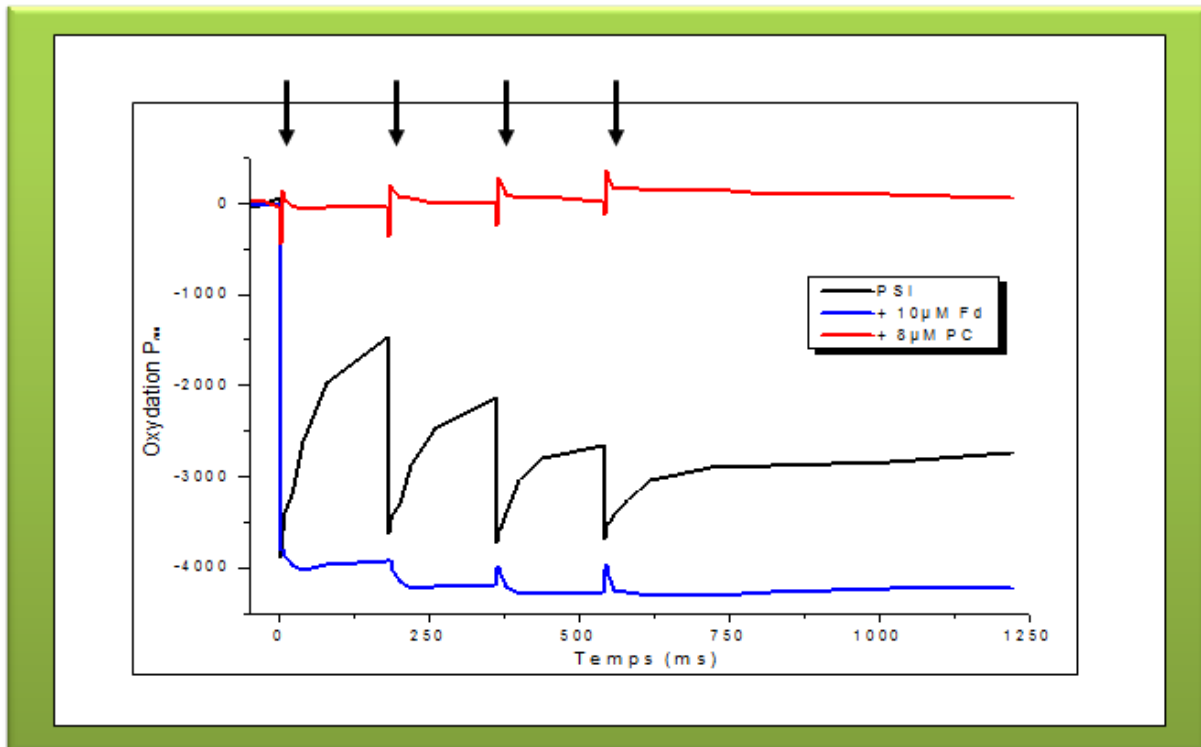


Figure 10 : Cinétiques d'oxydo-réduction par l'application de quatre flashes successifs (**flèches noires**). Etude des bandes PSI fractionnées par gradients de sucrose chez le WT (*t222+*) de *Chlamydomonas reinhardtii*. Intensité de la lumière actinique de $340 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$. Concentration des échantillons étudiés de $20 \mu\text{g Chl}/\text{ml}$, dilués avec le tampon {0,005 % TDM, 2 mM MgCl_2 , 1 mM d'ascorbate, 30 mM NaCl et 30 mM de Tricine pH 8,2}, attente de 3 minutes entre chaque étape de l'expérience, dont la dilution. Courbe **noire**, présence unique des PSI. Courbe **bleue**, ajout de $10 \mu\text{M Fd}$ et courbe **rouge**, ajout de $8 \mu\text{M PC}$.

La discussion précédente est illustrée par la figure 10 sur les courbes noire et bleue, qui présentent réciproquement, l'étude du PSI et après ajout de la ferrédoxine, en présence du tampon décrit. Comme nous pouvons le voir, la courbe bleue montre une amplitude nulle pour ce qui est de la réduction de P_{700} à l'obscurité après l'application d'un flash laser, comparée à l'amplitude observée pour la courbe noire.

Ces résultats font maintenant de l'utilisation de notre protocole une méthode efficace pour s'affranchir de la limitation côté accepteur du PSI.

De plus, la figure illustre l'efficacité de la plastocyanine comme donneur d'électrons à P_{700}^+ . C'est ce que nous pouvons observer sur la courbe rouge, après l'ajout de $8 \mu\text{M}$ de plastocyanine, il s'opère une réduction rapide de P_{700} , avec sur cette figure une impossibilité de la résoudre cinétiquement.

Pour conclure cette partie, la figure 10 montre que notre protocole est valide pour l'observation d'état d'oxydo-réduction de la paire de chlorophylle du PSI, P_{700} . Que ce dernier permet aussi de s'affranchir de la limitation côté accepteur du PSI.

Ces résultats nous apporte aussi une information essentielle qui est que par les cinétiques d'oxydation et de réduction après ajout de ferrédoxine et de plastocyanine, nous savons que ces deux derniers transporteurs fonctionnent, et qu'il nous est donc possible de les exploiter pendant nos études fonctionnelles, *in vitro*,



cette fois-ci directement sur les fractions identifiées comme contenant les CEF-supercomplexes.

Les expériences suivantes sont dans la continuité de nos observations, soit l'étude cette fois-ci des fractions des CEF-supercomplexes en lumière continue. Après avoir vérifié que, par l'expérience des flashes successifs, les conditions appropriées de transfert d'électrons côté donneur et accepteur sont obtenues.

3 Etude en lumière continue - Mesures à 705 nm

Les résultats présentés ci-dessus illustrent typiquement des changements d'absorptions observés à 705 nm, avec les fractions obtenues à partir de la bande B soumises à une illumination continue.

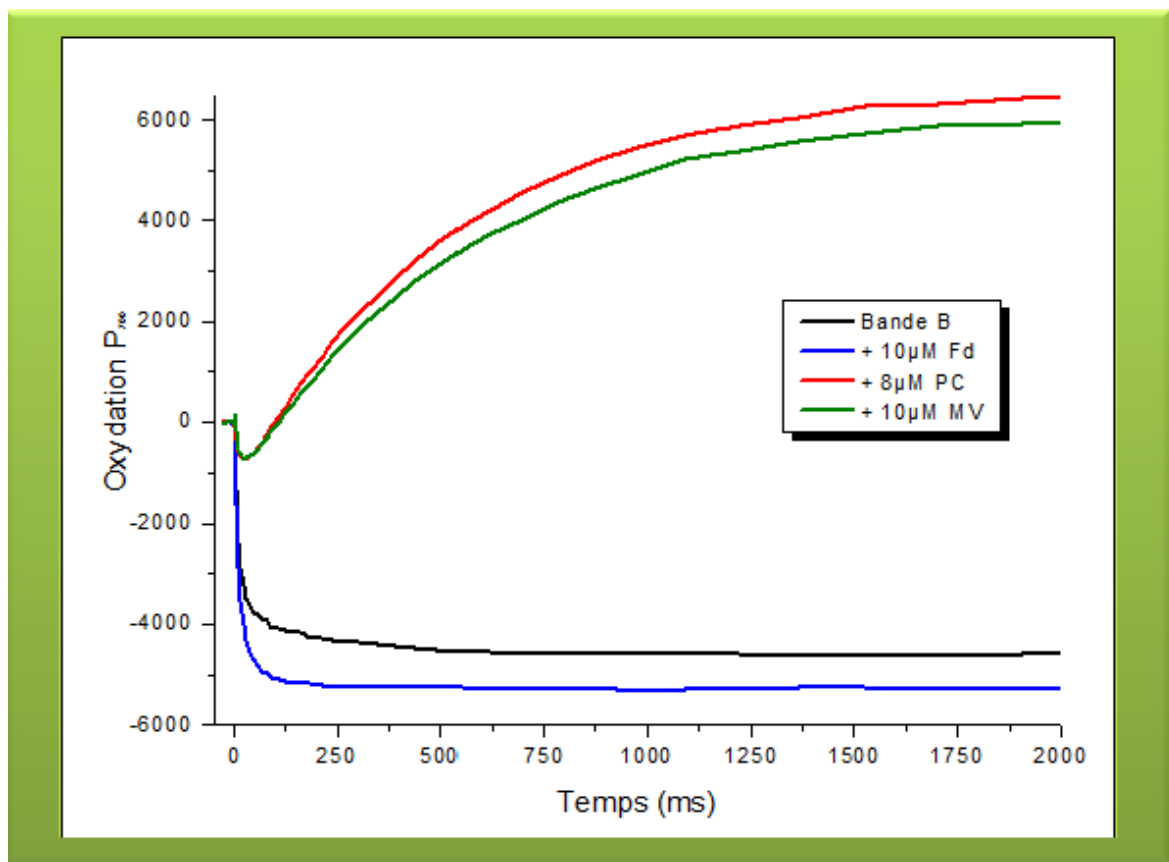


Figure 11 : Cinétiques en lumière continue actinique, d'intensité $340 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$, de l'oxydation-réduction de P_{700} en fonction du temps, dans la fraction B des CEF-supercomplexes obtenue chez le type sauvage (*t222+*) de *Chlamydomonas reinhardtii*. Visualisation des premiers temps d'illumination, la réduction à l'obscurité a été tronquée. Concentration de l'échantillon de $20 \mu\text{g Chl}/\text{ml}$, dilué avec le tampon {0,005 % TDM, 2 mM MgCl_2 , 1 mM d'ascorbate, 30 mM NaCl et 30 mM de Tricine pH 8,2}, attente de 3 minutes entre chaque étape de l'expérience, dont la dilution. Courbe **noire**, présence unique du contenu de la bande B (CEF-supercomplexes principal). Courbe **bleue**, ajout de $10 \mu\text{M}$ Fd. Courbe **rouge**, ajout de $8 \mu\text{M}$ de PC et courbe **verte**, ajout de l'inhibiteur de transfert CEF, $10 \mu\text{M}$ de Méthylviologène (MV).



La cinétique noire à 705 nm correspondant à la bande B sans addition, dite principale de la formation des CEF-supercomplexes, reflète une oxydation de P_{700} . L'observation est la même lorsque nous ajoutons les 10 μM de ferrédoxine (courbe bleue). La variation d'absorptions associée à l'oxydation de P_{700} augmente légèrement. Ceci peut s'expliquer si l'on considère qu'en absence d'accepteurs l'absorption d'un photon conduit à la formation de $P_{700}^+F_{AB}^-$ qui recombine en quelques dizaines de ms. Donc selon l'intensité lumineuse, il est possible qu'une fraction demeure réduite à l'état stationnaire. Cette fraction devrait diminuer après ajout de ferrédoxine, ce qui est effectivement le cas.

En effet, à intensité lumineuse constante, une certaine quantité de P_{700} est observée dépendant de la durée de vie de l'entité. Ce temps de vie augmente lorsque la ferrédoxine est ajoutée par le fait qu'elle peut accepter les électrons venant du PSI.

La courbe en rouge, montre une légère augmentation d'absorption, après l'ajout de 8 μM de plastocyanine. Le système créé à l'étape précédente permettait l'augmentation de la quantité de P_{700} photo-oxydable par la création d'un flux allant du PSI aux ferrédoxines. Cette durée de vie diminuerait par la présence de la plastocyanine, les électrons pouvant être injectés dans le Photosystème I. Cet effet résulte en une diminution de la quantité de P_{700} photo-oxydée ; c'est ce que nous observons.

Cependant, les cinétiques sont d'autant plus difficiles à interpréter qu'il se trouve que la plastocyanine oxydée a un spectre d'absorptions tel que son oxydation contribue aux variations d'absorption mesurées lors de l'observation des deux complexes : le Photosystème I et le cytochrome b_6f . Ainsi, il est difficile d'attribuer les variations d'absorptions observées de façon univoque.

Afin de tester l'efficacité du transfert d'électrons cyclique nous avons choisi de faire l'hypothèse que les cinétiques observées traduisaient le fonctionnement en mode cyclique et qu'elles devraient être affectées si l'on forçait le système à fonctionner en mode linéaire. L'idée première est de « casser » ce flux cyclique en « ouvrant » le système. En effet, dans un système ouvert, ne fonctionnant pas en supercomplexe, l'activité photo-induite du PSI devrait permettre d'établir un transfert d'électrons linéaire entre la ferrédoxine et la plastocyanine.

A 705 nm, nous nous attendons à ce que l'oxydation à la lumière de cette dernière se traduise par une augmentation progressive d'absorption. En revanche, dans un système fermé comme un supercomplexe, la séquestration des éléments solubles, ferrédoxine et plastocyanine, interdit l'oxydation (réduction) de la totalité du pool de plastocyanine (ferrédoxine) ajouté. Ainsi, les variations d'absorptions associées au changement d'états redox de ces transporteurs devraient être bien plus faibles que dans le système ouvert.

Nous avons utilisé un inhibiteur du CEF, le méthylviologène (10 mM). Cependant, la courbe verte montre qu'une très légère diminution de l'absorption s'est opérée après l'ajout de MV. Devant ce résultat, j'ai rajouté de nouveau du MV pour obtenir une concentration finale de 100 mM, mais aucun grand changement n'est observé (données non montrées).



Deux hypothèses sont envisageables : la première, si l'on considère qu'effectivement les CEF-supercomplexes sont actifs, alors ils forment une unité tellement compacte que le méthylviologène est incapable d'entrer en compétition avec la ferrédoxine. La seconde hypothèse est que le système fonctionne en système ouvert en absence de méthylviologène rendant inopérant l'addition de ce dernier.

Ce dernier point nous amène à discuter de l'éventualité que la bande B n'est peut-être pas composée de CEF-supercomplexes formant une unique unité fonctionnelle avec les différents acteurs du CEF. Une autre façon de voir leur activité est d'étudier l'état d'oxydo-réduction du complexe *cyt b₆f*.

En présence des deux transporteurs mobiles d'électrons, la ferrédoxine et la plastocyanine, le fonctionnement en mode cyclique du supercomplexe prédit que le *cyt b* d'une part et le cytochrome *f* d'autre part changent d'état redox en condition d'illumination. Nous pouvons étudier ces deux états par spectroscopie, aux longueurs d'ondes correspondant aux signaux du *cyt b₆f*.

4 Etude en lumière continue du *Cyt b₆f*

Les études spectroscopiques, réalisées durant ma thèse, nous ont appris qu'il était difficilement possible d'observer des signaux de réduction et d'oxydation du *cyt b* et *f*, respectivement, au sein de la bande B des CEF-supercomplexes.

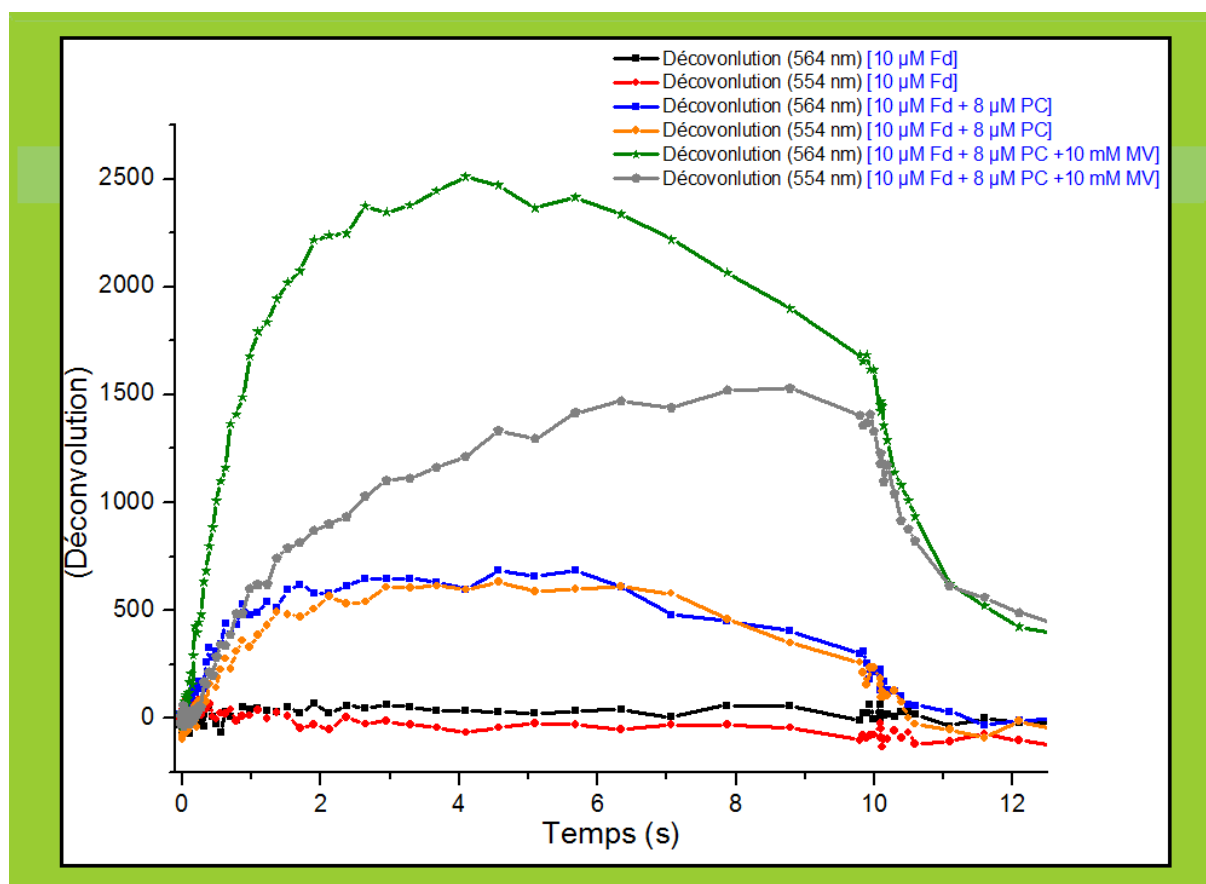


Figure 12 : Cinétiques d'oxydo-réduction des sous unités du complexe *cyt b₆f*, le *cyt b* (**carré**) et *cyt f* (**rond**) chez la bande principale CEF-supercomplexe B, obtenues après déconvolution des longueurs d'ondes (546, 551, 564, 573) nm. Respectivement, en **noire** et **rouges** les



cinétiques en présences de 10 μM de ferrédoxine ; en **bleue** et **orange** les cinétiques en présences en plus de 8 μM de plastocyanine ; **verte** et **grise** les cinétiques en présences de 10 mM de MV.

Les cinétiques de la figure 12 montrent qu'en présence uniquement de ferrédoxine (courbes rouge et noire), aucune oxydation ou réduction du cyt b_6f n'est observable. Nous nous attendions à une réduction du cyt b (déconvolution à 564 nm) par la réinjection des électrons de la ferrédoxine au cyt b_6f , comme présenté à la figure 3, E. Les courbes orange et bleue montrent les états d'oxydation – réduction du cyt b et f , respectivement, après ajout de la plastocyanine. Ces cinétiques présentent une réduction des deux sous unités. Nous nous attendions à une oxydation du sous complexe cyt f (déconvolution 554 nm), comme présenté à la figure 3, D.

Ces résultats semblent montrer que pour observer un changement redox dans le complexe cytochrome b_6f , la ferrédoxine et la plastocyanine sont toutes les deux requises, ce qui semble être en désaccord avec les résultats précédents (figure 3). Ce point semble suggérer que le transfert entre ferrédoxine et cyt b n'est pas possible (courbe noire).

De plus, l'observation d'une augmentation d'absorption du cyt f après l'ajout de plastocyanine au lieu d'une diminution suggère, comme développée précédemment, une contribution de changement d'état redox de la plastocyanine.

Au vue de nos résultats contradictoires, nous avons cherché à favoriser le transfert d'électrons entre le cytochrome f et la ferrédoxine par le PSI, en créant une voie linéaire pour les électrons par l'ajout du méthylviologène. Les cinétiques (grise et verte) sont différentes de celles obtenues sans MV suggérant la présence de CEF-supercomplexe formé.

Cependant nous avons attribué les effets cinétiques, en présence de Fd et de PC, à une forte contribution spectrale de la plastocyanine et non à la formation de supercomplexes. Ce qui ne semble pas être uniquement le cas, puisque les cinétiques avec et sans MV sont différentes.

En conclusion, dans une idée de fonctionnement en termes de transfert d'électrons au sein du complexe cytochrome b_6f , nous pouvons émettre l'hypothèse que nous devrions observer une réduction du cyt b et au mieux d'une oxydation du cyt f , une réduction de ce dernier plus faible que celle du cyt b . Dépendant de la localisation de l'étape limitante dans le transfert d'électrons cyclique, les électrons pourrait être accepter par la PC venant du cyt f plus lentement qu'ils ne sont acceptés par le cyt b venant de la Fd, expliquant l'observation d'une réduction du f .

C'est ce que nous observons en présence de MV pouvant confirmer la présence de supercomplexes. Bien qu'en l'absence de MV, les cinétiques ne sont pas concluantes quant à leurs existences.

Il n'est donc pas possible de conclure sur ces données qui restent équivoques.

L'hypothèse que nous pouvons proposer est le manque d'une unité quelconque, perdue lors d'une des étapes d'isolation de la bande CEF-supercomplexes. Cette absence pourrait expliquer que le flux entre les différentes unités qui composent le CEF-supercomplexes, n'est pas correctement observé.



4.1 Spectre de la plastocyanine -Etude

A ces longueurs d'onde, les changements d'état redox de la plastocyanine sont associés à des variations d'absorptions. Nous avons donc cherché à vérifier qu'il ne s'agit pas uniquement d'un signal correspondant à la plastocyanine, et ainsi pouvoir interpréter les résultats d'oxydo-réduction du cyt *b₆f*, en tant que tel.

Nous avons donc entrepris d'étudier les longueurs d'onde de 540 à 575 nm par palier de 2-5 nm sur la bande CEF-supercomplexes.

Les variations d'absorptions ne montrent qu'une participation de la plastocyanine active mais pas du cytochrome *b₆f*. Ces résultats confirment nos hypothèses de départ que, premièrement le complexe cyt *b₆f* ne semble pas fonctionnel dans l'entité du CEF-supercomplexes. Deuxièmement, les variations d'absorptions observées (figure 12) après convolution des différentes longueurs d'ondes permettant l'observation du cytochrome (par le JTS-10) sont, du moins en partie, un reflet du fonctionnement de la plastocyanine.

VI Conclusion

Pour conclure, l'utilisation du nouveau protocole est adaptée à l'obtention de la formation des bandes de supercomplexes dans les gradients de sucrose, après la solubilisation des membranes thylakoïdales du type sauvage de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, dans les conditions anoxiques. Ces bandes traduisent la formation des CEF-supercomplexes, sur le plan moléculaire puisqu'ils contiennent tous les différents acteurs que nous incluons dans le transfert d'électrons cyclique. Mais au vu des résultats d'oxydo-réduction, la bande de haut poids moléculaire, ne semblent pas former de supercomplexes qui participent aux CEF, *in vitro*.

1 La chaîne mitochondriale

Il semble être bien démontré qu'il existe une dynamique de diffusion libre des complexes ([Hoschman, Ferguson-Miller et al. 1985](#)), dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi qu'une utilisation préférentielle du chemin proposé par l'assemblage des supercomplexes pour les électrons ([Lapiente-Brun, Moreno-Loshurhos et al. 2013](#)), sans toutefois stopper le transfert d'électron *in vivo*, en l'absence de supercomplexe. Il existerait, en plus, une variété d'options structurales différentes, discutées chez la mitochondrie mais aussi chez le chloroplaste ([DalCorso, Pesaresi et al. 2008](#)).

Des études montrent toutefois la réelle difficulté d'observer une activité *in vitro* des supercomplexes dans le transfert d'électrons au sein de cette unité. Puisque, dans le cas des supercomplexes mitochondriaux, une légère diminution du contenu en Coenzyme Q dans la membrane (enzyme essentielle dans le cadre de la respiration cellulaire) suffit pour dissocier la partie de la quinone venant du supercomplexe, diminuant ainsi le taux d'électrons qui est canalisé ([Genova and Lenaz 2014](#)).

Les supercomplexes mitochondriaux correspondent bien à un rassemblement, en une même unité, des différents complexes, permettant un transfert d'électrons actif au sein même de cette unité. Il est donc possible d'envisager que les supercomplexes chloroplastiques sont de mêmes actifs.



Il est donc important avant d'autres expériences de reproduire par gel BN-PAGE les expériences de migration de l'entière entité que formerait le CEF-supercomplexes dans le chloroplaste.

De même que de travailler sur le protocole d'étude *in vitro*, de la bande CEF-supercomplexes. Les études fonctionnelles et biochimiques des supercomplexes mitochondriaux montrent qu'il est possible de déstabiliser, diminuer l'activité de ces supercomplexes. Il est donc possible d'envisager que notre protocole d'étude ne remplisse pas les conditions nécessaires à l'étude des CEF-supercomplexes chloroplastiques, *in vitro*.

Il reste donc difficile pour l'instant de conclure sur l'interprétation des résultats que nous pouvons observer sur le cytochrome *b₆f*, sur son implication fonctionnelle dans la formation, supposée, de supercomplexe. Et les derniers résultats présentés ne permettent pas clairement de conclure sur son implication dans le transfert d'électrons observé.

Il est donc envisageable qu'il existe une limitation qui porte sur le cyt *b₆f*, mais ce point est très difficile à vérifier.





Discussion

Les premières études présentées dans cette thèse ont permis de quantifier la vitesse de fonctionnement du transfert d'électrons cyclique et d'estimer les conséquences sur cette vitesse de la réorganisation de la distribution latérale des complexes résultant de la transition d'états, chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

Les études dans les conditions anaérobiques ont permis, quant à elle, une observation intéressante sur une différence d'oxydation de la quantité de P₇₀₀ photo-induite au cours de l'anoxie, soulevant de nombreuses interrogations et ont fait suite à de nouvelles expériences.

Poussant l'étude à celle de la formation des supercomplexes *in vitro*, qui par son organisation regroupe différents complexes photosynthétiques dans une même unité biochimique, permet la réinjection des électrons en mode CEF, dans les membranes thylacoïdales.

I CEF-transition d'état

Le tracé des mesures des vitesses cycliques a permis d'étudier la corrélation entre transition d'états et transfert linéaire et cyclique. L'étude s'est portée sur trois types de souches de *Chlamydomonas reinhardtii* : type sauvage *t222+* (état 1 en oxie et état 2 en anoxie), le mutant *stt7-9* ne faisant pas la transition d'état (état 1 dans les deux conditions) et le mutant *ptox2* ayant un pool de PQ maintenu réduit à l'obscurité (état 2 dans les conditions oxique et anoxique).

Les vitesses obtenues sont récapitulées dans le tableau suivant,

135 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Conditions oxiques	Conditions anoxiques
<i>t222 + (WT)</i>	17 ± 2	40 ± 5
<i>stt7</i>	17 ± 3	33 ± 5
<i>ptox2</i>	22 ± 4	33 ± 3

Tableau 1 : Récapitulatif des vitesses de transfert d'électrons cyclique (électrons s⁻¹ PSI⁻¹) chez les souches contrôle, *stt7* et *ptox2*, dans les conditions oxique et anoxique.

Il apparait donc en moyenne, dans les conditions anaérobiques, que le transfert d'électrons cyclique est deux fois plus rapide qu'en aérobiose mais que la transition d'états et l'éventuelle restructuration qui en résulte ne contribue que peu ou pas à cette accélération. De plus, nos études permettent aussi de conclure que la transition d'états n'est pas requise pour la formation des CEF-supercomplexes.

Notre conclusion que la transition d'états n'est pas le mécanisme prédominant responsable de la grande efficacité cinétique du cyclique semble donc solidement établie. Les mesures de cycliques issues de ces expériences permettent de conclure qu'il existe un autre mécanisme corrélé à la transition d'états qui permettrait alors le passage d'un transfert prédominant d'électrons à l'autre (transferts linéaire et cyclique).



1 Mécanisme de commutation vers le mode cyclique

Nos résultats montrent que la distribution latérale des complexes membranaires associée à la transition d'états ne contribue pas à cette commutation fonctionnelle. Cela soulève la question du mécanisme prévalant à la régulation entre transferts linéaire et cyclique.

L'hypothèse que nous développons est que la réinjection des électrons du stroma au pool de quinone constitue l'étape limitante du transfert d'électrons cyclique. Nous nous attendons alors à ce que cette vitesse dépende de la disponibilité du substrat donneur d'électrons, ou en d'autres termes du pouvoir redox ambiant. Or celui-ci, plus réducteur en anoxie qu'en oxie, déclenche le processus de la transition d'états. Le mécanisme qui accompagne la transition d'états pourrait donc être un contrôle redox, expliquant alors que les trois souches d'étude aient les mêmes vitesses de cyclique en condition anoxie indépendamment de la phosphorylation des antennes.

2 Mesures du transfert d'électrons cyclique

Un point qui n'a pas été abordé est la comparaison des méthodes de mesure pour le flux cyclique des électrons dans la membrane thylacoïdale.

2.1 Méthode dite de la pente

L'une étant d'utiliser la pente de la courbe de réduction de P_{700} à l'obscurité après avoir atteint un état stationnaire de P_{700} photo-oxydé, (Alric, Lavergne et al. 2010). Par cette méthode les auteurs regardent la vitesse à laquelle les électrons reviennent, c'est-à-dire la vitesse de réduction de P_{700} . Ainsi, en présence des deux inhibiteurs du PSII, le calcul donne le taux d'électrons en fonction du temps, réinjecté en mode cyclique dans la chaîne photosynthétique.

Nos mesures des vitesses cycliques avec la méthode utilisant la pente de la courbe, données chez le WT de *Chlamydomonas reinhardtii* dans les conditions oxiques et anoxiques, sont de 4 et 16 électrons par secondes par PSI, respectivement. La valeur du CEF chez le contrôle de *chlamydomonas reinhardtii*, dans les conditions oxique, trouvé par Jean Alric et ces collègues est de 8 électrons par secondes par PSI.

Dans un premier temps, dans les conditions oxiques la valeur est plus petite que celle trouvée par Jean Alric, qui est de 8 électrons par secondes, mais restent du même ordre. Pour expliquer cette différence, une hypothèse est qu'il existe une divergence génétique entre les deux souches contrôles utilisées. Nous ne pouvons cependant pas conclure, le nom de la souche n'étant pas indiqué dans l'article.

Cependant, si nous comparons les valeurs des CEF obtenues par les deux méthodes dans nos expériences, il est évident que la méthode utilisant la pente de réduction de P_{700} à l'obscurité tend à sous-estimer le flux CEF. Puisque notre méthode donne des valeurs de 17 et 40 électrons s^{-1} PSI^{-1} dans les conditions oxique et anoxique, respectivement (Tableau 1).

La méthode de la pente repose sur l'hypothèse implicite que les électrons injectés dans le pool de cofacteurs redox oxydés à la lumière permettent de façon préférentielle, la réduction de P_{700}^{+} . En d'autres termes, elle fait l'hypothèse que la constante d'équilibre entre P_{700} et le système plastocyanine, cyt *f*, etc... est grande. Dans le cas contraire, une fraction non négligeable des équivalents réducteurs



seraient distribués entre les différents équivalents oxydés retardant ainsi la réduction de P_{700}^+ et conduisant à une sous-estimation de la vitesse du cyclique.

2.2 Application de pulses intermédiaires - oxydation de P_{700}

Une autre méthode de mesure du cyclique est au début de la cinétique d'oxydation de P_{700} dès l'application de la lumière. Pour tester cette efficacité du cyclique en début d'illumination, j'ai utilisé un programme qui suit l'oxydation de P_{700} et applique au cours de cette cinétique des pulses de lumière saturants à différents temps. La mesure de la vitesse du cyclique se fait par la méthode défendue dans cette thèse et dans l'article, (Takahashi, Clowez et al. 2013). Les valeurs obtenues sont résumées dans le tableau suivant,

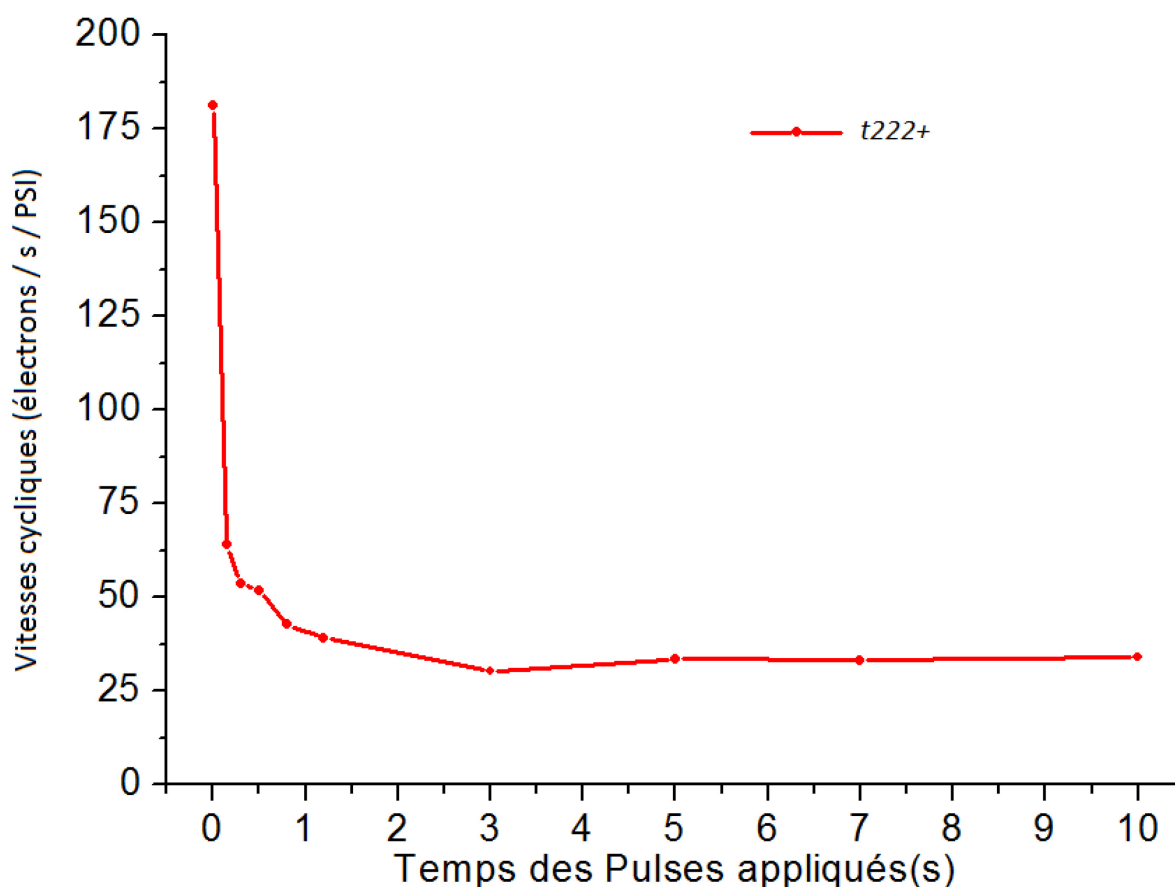


Figure 1 : Mesures de l'efficacité du transfert d'électrons cyclique en termes d'électrons par seconde par PSI, à partir des cinétiques d'oxydation de P_{700} . Les pulses sont appliqués à des temps différents de la cinétique. Dans les conditions anoxiques, à une intensité de $115 \mu E m^{-2} s^{-1}$, sur une moyenne de trois échantillons de la souche contrôle, *t222+* de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Les calculs montrent une vitesse plus importante en début de cinétique que celle obtenue à 10 s. L'hypothèse proposée ici est qu'au début de la cinétique de l'oxydation de P_{700} dès l'illumination des cellules, celle-ci ne traduit pas uniquement un transfert d'électrons en mode cyclique. En effet, au début de l'illumination, nous nous attendons à oxyder les donneurs d'électrons réduits à l'obscurité comme la



plastocyanine, le cyt f, les quinones, etc... Ainsi la vitesse mesurée est celle de ces différentes réactions et pas celle du cyclique. De plus, nous considérons que la vitesse limitante du cyclique est située au niveau de la réinjection des électrons du côté stromal dans le pool de quinone.

Le niveau de P₇₀₀ photo-oxydable mesurable par les pulses appliqués en début de cinétique montrent des niveaux d'amplitudes inférieurs à celui observé à 10 s d'illumination, à l'état stationnaire de la cinétique (données non montrées). Ceci traduit le phénomène de recombinaison de charge que nous avons décrit tout au long de cette thèse. Donc les résultats de mesures du CEF donnés à la figure 1 correspondant aux pulses en début de cinétique, surestiment le taux de cyclique.

La recombinaison de charge ainsi que l'existence de divers chemins métaboliques impliqués dans l'injection des électrons dans la chaîne en début d'illumination se superposent au taux de CEF mesurable, et restent difficiles à discriminer entre les vitesses cycliques des électrons.

Pour conclure, la détermination du taux CEF par la mesure de la pente initiale est fondée sur une hypothèse discutable. Et les mesures de cyclique au début de cinétique ne nous permettent pas de discriminer les interventions d'autres chemins de transfert d'électrons autre que le CEF, de ce dernier.

2.3 Autres résultats - Etude bibliographique

Dans l'étude ([Alric. 2014](#)), Jean Alric mesure le champ après utilisation des deux inhibiteurs du PSII, normalisé par l'amplitude du flash électrochromique induit dans les conditions adaptées à l'obscurité correspondant à une charge transférée à travers la membrane par centre PSI. Méthode défendue dans l'étude de ([Avenson, Cruz et al. 2004](#)). Les résultats de transfert d'électrons cyclique chez la souche contrôle, sont de 14 électrons s⁻¹ dans les conditions oxiques et de ~66 électrons s⁻¹ dans les conditions anoxiques.

La vitesse CEF en condition anoxique est plus élevée que ce que nous présentons dans notre article ([Takahashi, Clowe et al. 2013](#)) de 35 électrons s⁻¹ PSI⁻¹, pour des valeurs similaires dans les conditions oxiques. La comparaison entre nos deux valeurs est toujours difficile puisque le nom de la souche contrôle n'est pas indiqué. Or au cours de ma thèse j'ai été amenée à étudier des souches contrôles qui présentent un CEF dans les conditions anoxiques similaires à celui de la référence ([Alric. 2014](#)). De plus, ces études sont faites en alternance de lumière et d'obscurité, et pour des temps d'illumination plus long que les conditions décrites dans le chapitre 2 de cette thèse. Et dont l'application permet de mesurer des vitesses de cycliques plus importantes que dans nos conditions d'études à l'obscurité.

Même si les résultats de vitesse cyclique nous semblent cohérents avec nos résultats, il reste cependant impossible de comparer avec nos mesures, les conditions pour les obtenir n'étant pas les mêmes.

3 Etude des mutants sans antennes LHCI



Nous avons voulu continuer nos études sur la question de la commutation entre transfert d'électrons linéaire et cyclique que nous savons maintenant non induite par la transition d'états. Et cela en utilisant des mutants (*bf4.74* et *p71.18+*) dépourvus de LHCII, LHCI et Cp29. Les sous unités principales Lhca (LHC I) et CP26, CP29 (LHC II) sont donc absentes de ces mutants (de Vitry and Wollman, 1988 ; Et données plus récentes de Sandrine Bujaldon).

L'idée est donc d'évaluer le taux de transfert d'électrons cyclique chez ces mutants privés d'antennes, cherchant à montrer que chez de tels mutants, la commutation entre les deux transferts existe et de manière similaire à une souche contrôle WT.

Mais, de par la perte de leurs antennes il devient impossible de calculer le taux du CEF comme présenté dans cette thèse et dans l'article (Takahashi, Clowez et al. 2013). En effet la valeur de la vitesse photochimique n'est pas évaluable, puisqu'aucun signal de champ électrochimique n'est mesurable. Il n'est donc pas possible d'exprimer le rendement en termes de taux CEF, puisqu'il n'est pas possible d'exprimer l'intensité en termes d'électrons par seconde.

Cependant, que nous soyons dans les conditions oxygène ou anoxique puisqu'il n'y a pas de transition d'antennes, il reste encore possible de comparer les rendements mesurables par les cinétiques d'oxydation de P_{700} .

Le résultat attendu, selon nos précédents résultats, est une augmentation de ce rendement dans la transition des conditions oxygène à anoxique, permettant de conclure à une augmentation du transfert d'électrons cyclique dans les cellules des mutants dépourvues d'antennes.

Voici les cinétiques et mesures des rendements, chez deux mutants dépourvus d'antennes, *bf4* et *p71*,

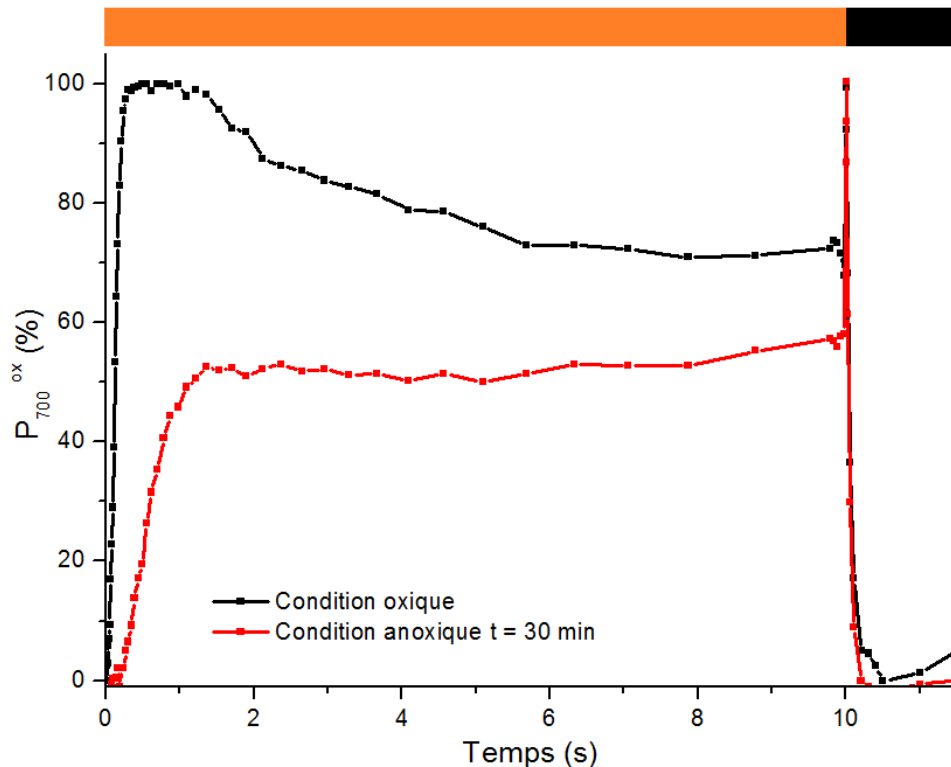


Figure 2 : Oxydation du dimère de chlorophylle du PSI, P_{700} , chez le mutant *bf4*. Dans les conditions oxygènes, **courbe noire**, et à 30 minutes d'anoxie, **courbe rouge**, en fonction du



temps d'illumination suivie d'un pulse de lumière saturante et d'une réduction à l'obscurité. Intensité de 115 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, et utilisation de 10 μM DCMU, inhibiteur du PSII.

Dans un premier temps, les cinétiques d'oxydations chez le mutant *bf4* montre un état stationnaire, avant le pulse, différent selon les deux conditions. L'utilisation du DCMU, inhibent le PSII permettant de n'observer que le CEF autour du PSI. Ainsi le fait que le rendement correspondant à la différence entre les quantités de P_{700} oxydées et photo-oxydables, soit plus grand dans les conditions anoxiques que dans les conditions oxiques, peut être interprété comme une augmentation du CEF autour du PSI (figure 2).

135 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Conditions oxiques	Conditions anoxiques	Augmentation (%)
<i>t222+</i> (WT)	0,07025	0,11485	63
<i>bf4.72</i>	0,2812	0,45545	62
<i>p71.18+</i>	0,3633	0,64365	77

Tableau 2 : Rendements des CEF, soit la différence entre l'état stationnaire et la quantité de P_{700} photo-oxydable atteinte grâce au pulse saturant, dans les conditions oxique et anoxique, pour la souche contrôle (*t222+*), et les deux mutants dépourvus d'antennes *bf4* et *p71*, de *C. reinhardtii*. Quantité de l'augmentation du rendement exprimé en %.

Comme le montre la dernière colonne de ce tableau, l'augmentation du rendement chez les souches mutantes est similaire à celle de la souche contrôle *t222+*, lors de la transition des conditions oxique à anoxique.

Les résultats préliminaires présentés ici, viennent confirmer nos conclusions précédentes que la commutation entre transfert d'électrons linéaire à cyclique n'est pas induite par la migration des antennes.

De plus, ces mutants sont dépourvus d'antennes et présentent selon les premiers résultats, une augmentation dans le taux de transfert d'électrons cyclique aussi important que celui de la souche sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii*, impliquant que pour la commutation entre les deux transferts d'électrons, la phosphorylation des antennes n'est pas requise.

Au-delà du fait que ces mesures sont à reproduire afin de pouvoir fournir des résultats avec incertitudes, nous voudrions établir une méthode nous permettant d'exprimer cette fois le rendement cyclique, des mutants LHC, en termes d'électrons par seconde par PSI. Cela implique de trouver le moyen d'estimer la vitesse photochimique d'une autre manière que celle présentée dans l'article ([Takahashi, Clowez et al. 2013](#)).

Comme nous l'avons énoncé plus haut, il n'y a pas d'antennes mobiles dans les mutants *bf4* et *p71*, ainsi la quantité d'antennes du Photosystème I reste la même dans les conditions oxique et anoxique. Il ne devient donc pas nécessaire de corriger le rendement par la taille de l'antenne.



Il serait envisageable, connaissant la quantité du pool de plastocyanine, de connaître la vitesse d'oxydation k_{ox} en utilisant l'inhibiteur de complexe cytochrome b_6f , le DBMIB.

La mesure de l'aire sous la courbe d'oxydation de P_{700} à la lumière est proportionnelle au temps qu'il faut pour oxyder toutes les espèces oxydables. L'hypothèse est faite que la quantité d'espèces oxydables entre le contrôle et les mutants sans antennes ne change pas, les aires sont donc comparables. Il reste cependant difficile d'estimer cette quantité chez le contrôle, la taille du pool (état redox) étant changeante. La solution serait donc de "bloquer" l'oxydation des quinols, comme le fait l'inhibiteur du cytochrome b_6f , le DBMIB. En présence de DBMIB, la mesure chez le contrôle des rapports des aires est proportionnelle au rapport des tailles d'antennes. Ces aires sont à comparées avec un mutant de plastocyanine et du Cyt b_6f , qui permettent par leurs mutations de connaître le nombre d'espèces à oxyder. Ainsi il serait possible d'estimer la taille d'antennes initiale et donc d'avoir accès à la vitesse du Photosystème I, k_{ox} , et de l'utiliser pour exprimer le rendement en termes de flux d'électrons chez les mutants dépourvus d'antennes.

Une autre perspective serait l'étude de la formation des CEF-supercomplexes chez ces mutants, permettant de confirmer biochimiquement que la formation de ces supercomplexes ne dépend pas de la présence d'antennes dans la chaîne photosynthétique. La difficulté de cette expérience réside dans la possibilité d'obtenir une quantité suffisante de chlorophylle pour la solubilisation et l'étude par gradient de sucrose, due à la perte majeure de leurs antennes.

4 Migration d'antennes chez *Chlamydomonas reinhardtii*

Nous l'avons évoqué dans la partie précédente ([chapitre 1](#)), la quantité d'augmentation de la taille d'antennes du PSI, lors de la transition des conditions oxygène à anoxique, est seulement de 27 % dans nos études ([Takahashi, Clowez et al. 2013](#)), alors que la littérature montre une augmentation de 80 % chez *Chlamydomonas reinhardtii* ([Delosme, Olive et al. 1996](#)).

Les hypothèses suivantes peuvent être proposées : (i) Une partie des antennes déconnectées des Photosystèmes II au début de la transition d'états ne sont tout simplement pas connectées aux Photosystèmes I, suggéré dans notre article ([Takahashi, Clowez et al. 2013](#)). (ii) L'hétérogénéité des tailles des pigments : nous mesurons les antennes, au tout début de la cinétique d'établissement du champ électrique, qui provoque une auto-sélection des antennes qui ont une taille importante et dont leurs volumes, après la transition des antennes mobiles LHCI, n'augmentent que de peu, soit seulement de 27 %. De plus, au début de la cinétique, le phénomène de recombinaison de charge est très présent. (iii) Enfin, si la taille des antennes du Photosystème II est plus petite que la taille des antennes du Photosystème I, alors l'augmentation de la taille des antennes du PSI est très minime. La taille d'antennes vue par le PSII serait donc différente de celle vue par le PSI.

4.1 Etude de la migration d'antennes

Dans les conditions anoxiques, même après quarante minutes, il y a présence d'une recombinaison au début de la cinétique d'oxydation de P_{700} . Or c'est au tout début



de l'illumination que nous mesurons la taille des antennes, à 520 nm. Avec ce retour en arrière de l'électron, il est possible d'expliquer que la taille d'antennes n'augmente que faiblement, soit de 25-30 % alors qu'elle est estimée à 75-80 %.

Cette question a été le sujet d'un projet du stage de Laura Mosebach, visant à mesurer la pente pour la taille d'antenne plus loin qu'au début de l'illumination. Permettant de s'acquitter de la recombinaison de charge et de permettre au cyclique d'être actif et surtout maximal.

La stratégie est d'utiliser le déplacement du champ électrique transmembranaire. Par l'application d'un flash saturant, tous les systèmes sont touchés et crée une séparation de charge.

Trois souches sont utilisées, dont le contrôle *t222+* et la souche *stt7-9*, mutant qui est dans l'impossibilité de faire la migration d'antennes et est donc bloqué à l'état 1. La troisième souche est un mutant de la plastocyanine *ac208*, où l'oxydation de P_{700} ne dépendra pas de la taille des antennes, puisque la plastocyanine, par son absence, ne réduit pas le Photosystème I. Et la comparaison entre les expériences de mesures entre le champ électrique et l'oxydation de P_{700} donne des résultats similaires, suggérant que la méthode de mesure par le champ électrique est validée ([Takahashi, Clowez et al. 2013](#)).

Les premiers résultats semblent nous permettre de conclure que toutes les antennes qui partent du Photosystème II arrivent au Photosystème I. La question maintenant porte sur la variabilité et donc sur une hypothétique hétérogénéité de la taille d'antennes des PSI ; Tous les PSI "voient" leurs quantités en antenne augmentées en même temps et de façon homogène ou bien, il y a une distorsion dans la redistribution selon la taille initiale des PSI.

Nous voulons faire suite à ces expériences dans notre laboratoire.

4.2 LHC II libres ?

Dans les hypothèses développées plus haut pour expliquer la différence de nos mesures d'augmentations de la taille d'antennes au niveau du PSI, nous avons proposé que seulement une partie des antennes qui serait déconnectée du PSII s'associe aux PSI. Ce point pourrait impliquer qu'il existerait des LHCII sous une forme libre dans la membrane.

Des antennes mobiles LHCII libres impliquent une augmentation du quenching qui serait alors proportionnelle à la perte d'antennes, puisque ces dernières ne fonctionneraient pas selon leur rôle initial. Le quenching étant un mécanisme utilisé par les plantes et les algues pour convertir un trop plein d'énergie d'excitation sous forme de chaleur, protégeant les organismes.

Chez les plantes, le quenching serait plus important que chez *Chlamydomonas reinhardtii* et ferait intervenir l'agrégation des LHCII. Il est important alors de savoir s'il est possible de distinguer dans nos mesures le quenching de la transition d'états. Même si les ordres de temps sont différents pour les deux événements et qu'il existe différentes phases de quenching, qu'il est possible d'observer chez les plantes, cela est apparemment difficile voire impossible chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*.

4.2.1 Antennes quenchées - études bibliographiques



De plus, des études concluent qu'il existe un pool de LHCII libre, qui ne s'associe pas aux Photosystèmes I après leurs déconnexions des Photosystèmes II lors de la transition des antennes, et que ce pool est quenché, (Nagy, Unnep et al. 2014 ; Ünlü, Drop et al. 2014). Ainsi, effectivement la taille du PSII diminue mais l'effet sur le PSI est plutôt petit. Une certaine partie seulement s'associe aux PSI et le reste du pool de LHCII non couplé est quenché.

II Etude anoxique – Recombinaison de charge

Dans les conditions anoxiques, les chercheurs ont du faire face à l'impossibilité d'évaluer l'efficacité de la chaîne photosynthétique par l'observation de l'oxydation de P_{700} , comme reporté dans la littérature. En effet, comme nous l'avons montré et discuté dans cette thèse, au début de l'anoxie il est impossible d'observer une oxydation de P_{700} , que nous avons attribué à la recombinaison de charge. Il reste cependant possible d'observer une oxydation de P_{700} spontanée et totale après 40 minutes d'anoxie.

Nos études présentées dans cette thèse, ont tourné autour de la compréhension et de la caractérisation de ces deux modes d'oxydation de P_{700} observé au cours du temps de l'anoxie. Dédaisant que la présence de l'hydrogénase est indispensable pour permettre l'oxydation de P_{700} photo-induite spontanée, lorsque les cellules sont à l'obscurité entre les différentes détections à la lumière; la synthèse d'ATP dépendante de la lumière pouvant être utilisé pour provoquer cette oxydation lorsque les cellules sont soumises à une illumination constante, sous anoxie.

1 Inhibition du transfert d'électrons cyclique

Un accepteur artificiel du Photosystème I, le méthyl viologène (MV), permet d'éviter l'accumulation de NADPH et limite fortement la réinjection des électrons dans le mode de transfert cyclique, (Joliot and Joliot 2006). Son utilisation dans les conditions anoxiques devrait, par son rôle de pool accepteur d'électrons, empêcher l'accumulation de ces derniers au niveau du pool de NADPH et donc permettre l'observation de l'oxydation de P_{700} au début de l'anoxie.

C'est ce qu'il nous a été permis d'observer,



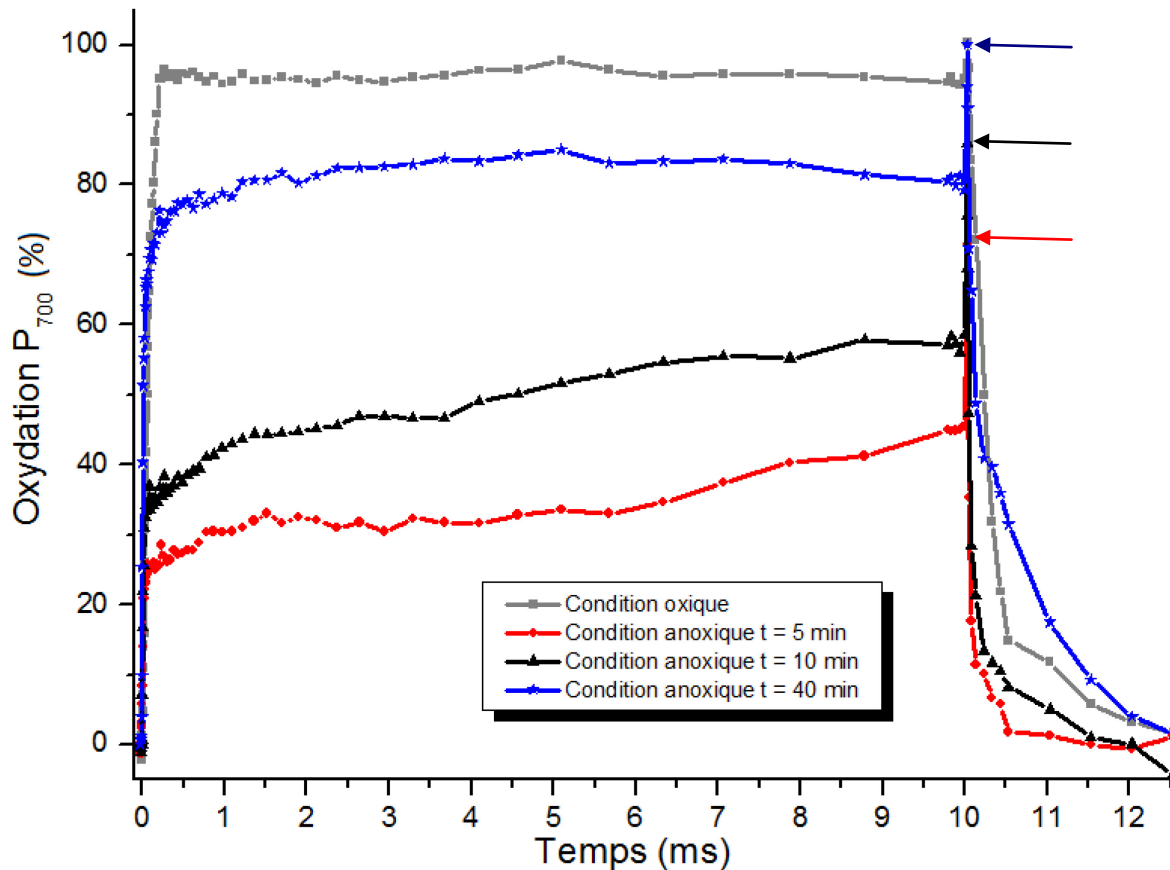


Figure 3 : Cinétiques de variation d'absorptions du dimère de chlorophylle du PSI, chez le contrôle de *Chlamydomonas reinhardtii*, à différents temps de l'anoxie, en présence de 10 mM de méthyle viologène et 10 μ M DCMU. Comparées à la condition oxygène (grise). Intensité de $115 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Ces cinétiques d'oxydation et de réduction de P_{700} (figure 3), en présence de MV dans les conditions anoxiques, montrent que dans les temps de cinq minutes, il est déjà possible d'oxyder $\sim 75\%$ de P_{700} (flèche rouge) et 100% dès 20 minutes d'anoxie (flèche bleue). Rappelons-le, dans les conditions sans MV, aucune oxydation de P_{700} n'est observable aux débuts de l'anoxie et seulement $\sim 80\%$ à 20 minutes.

Lorsqu'une voie d'évacuation pour les électrons stockés au pool de NADPH est disponible, comme le permet le méthyl viologène, la limitation côté accepteur n'est plus. Il devient possible aux électrons d'être transférés au PSI et réinjectés dans la membrane en mode cyclique, sans recombinaison de charge qui empêcherait l'observation de l'oxydation de P_{700} . Le MV joue donc bien son rôle de pool pour les électrons au niveau des accepteurs du PSI, et nous permet de confirmer notre hypothèse de travail, mais aussi les études que nous trouvons dans la littérature sur l'existence et l'impact de la recombinaison de charge.

L'oxydation à la lumière de P_{700} est plus rapide et sa réduction à l'obscurité plus lente avec l'utilisation de MV comparé à une cinétique d'oxydation - réduction de P_{700} en présence seulement de DCMU, comme le montre les expériences d'Alric, J. & al. (Alric, Lavergne et al. 2010). Cependant, nous n'avons pu reproduire ces résultats. En effets, en condition oxygène, nous n'observons pas cette différence de cinétique au début de l'illumination et la réduction à l'obscurité de P_{700} . Même si il semble que le



MV agisse d'une certaine manière, puisque l'amplitude du pulse saturant diminue en sa présence, traduisant bien l'évacuation des électrons par une voie présentant un pool efficace pour les recevoir. Il nous est difficile de trouver une explication physique et/ou métabolique à ces résultats ; de plus, la littérature montre l'efficacité du MV et cet inhibiteur était utilisé dans notre laboratoire avec succès.

Cependant, dans les conditions anoxiques, le MV est efficace, comme nous le montre la figure 3. De plus, nous observons que l'étape de réduction de P_{700} à l'obscurité est biphasique (figure 4).

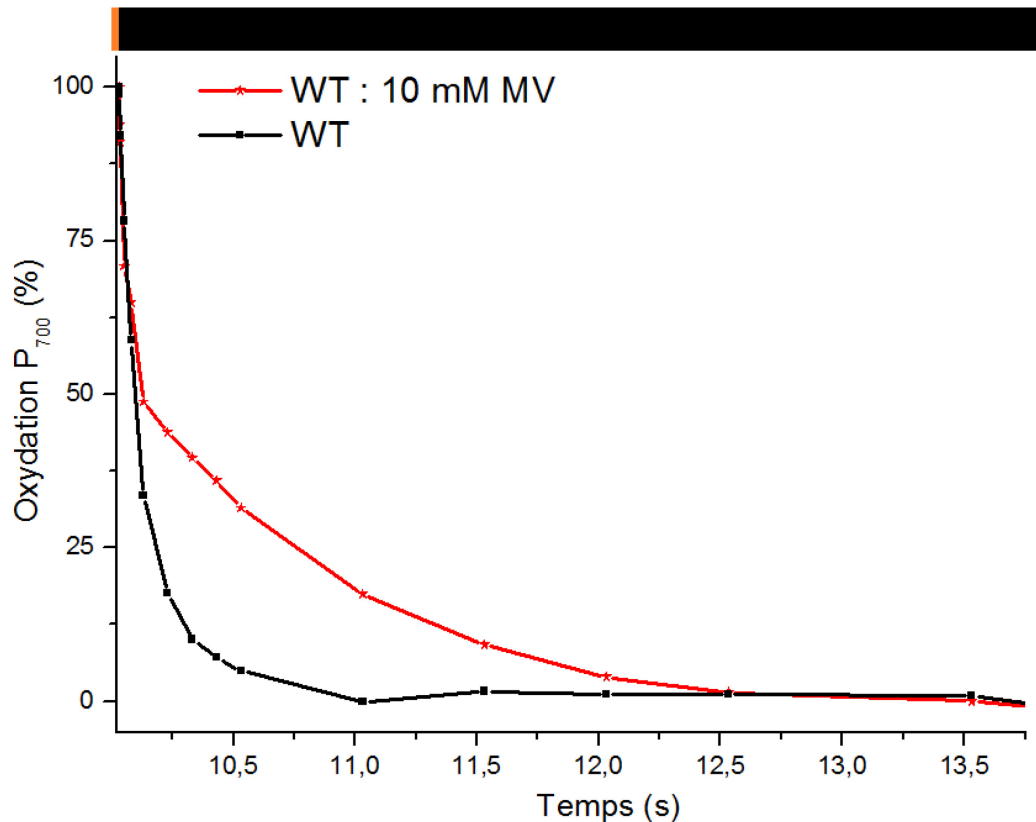


Figure 4 : cinétiques de réduction de P_{700} à l'obscurité, après illumination des cellules pendant 10 s et application d'un pulse saturant dans les conditions anoxiques. Intensité lumineuse de $115 \mu E m^{-2}s^{-1}$. Observations des cellules WT ($t222+$) de *C. reinhardtii* en présence de 10 mM de MV (rouge) et en absence (noire), après 40 minutes d'anoxique.

Il est tentant d'imaginer l'existence d'une compartimentation entre les différents complexes dans la membrane thylacoïdale ; CEF-supercomplexes et complexes libres. Après l'application du pulse saturant à 10 s de lumière, la détection à l'obscurité de la réduction de P_{700} dans les cellules nous montre des vitesses de réduction identiques au début indépendamment de la présence ou non de méthyle viologène. Ensuite, environ 200 ms après, les cinétiques de réduction de P_{700} divergent. Cette hétérogénéité cinétique serait compatible avec la coexistence de deux modes de fonctionnement au sein même de la membrane thylacoïdale.

L'effet du MV est observable à la phase dite 2, où nous pouvons observer un ralentissement de la réduction de P_{700} . Les électrons sont donc transférés vers cette



nouvelle voie "ouverte" par le méthylviologène, rendant la réduction de P_{700} plus lente. Alors que la phase 1 suggère qu'une partie des complexes est "résistante" au MV.

Dans les conditions oxygènes cette hétérogénéité n'est pas observée,

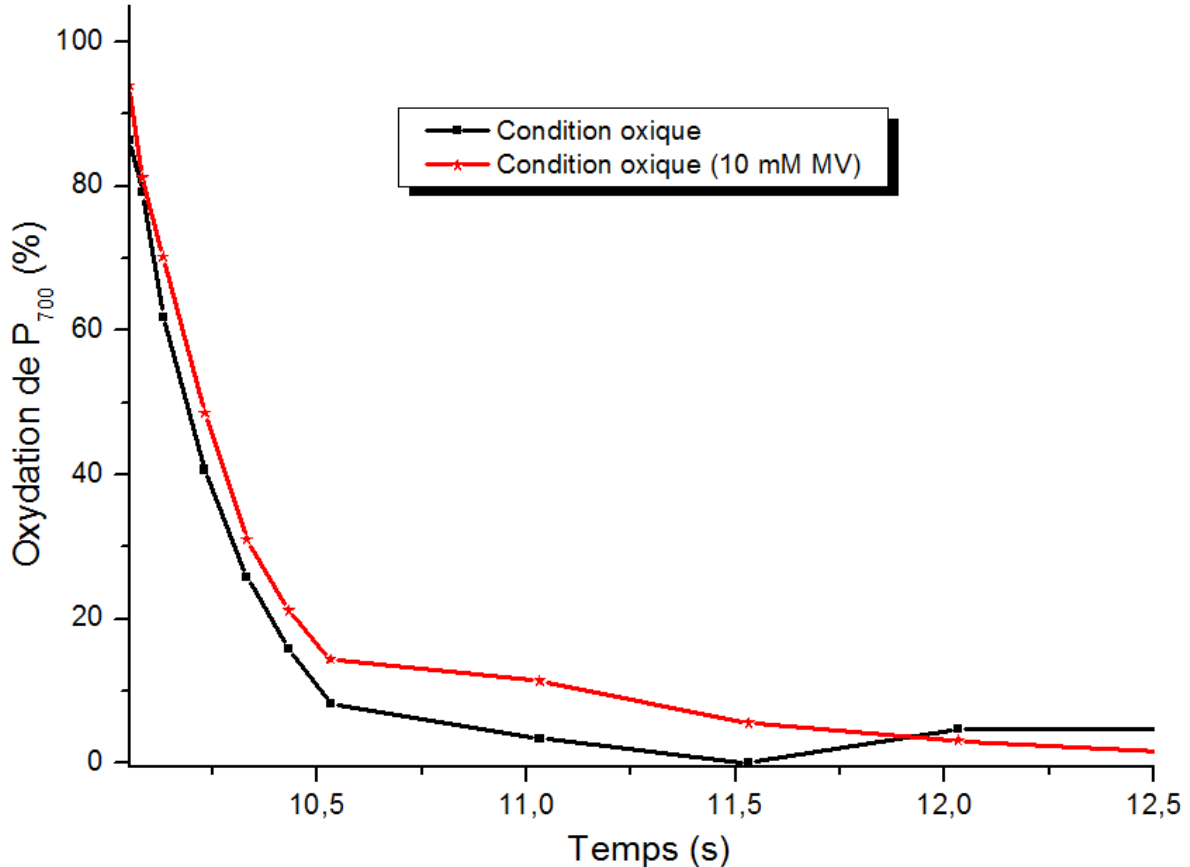


Figure 5 : cinétiques de réductions de P_{700} à l'obscurité, après illumination des cellules pendant 10 s et application d'un pulse saturant dans les conditions oxygènes. Intensité lumineuse de $115 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Observations des cellules WT ($t222+$) de *C. reinhardtii* en présence de 10 mM de MV (**rouge**) et en absence (**noire**).

Ces cinétiques de réductions à l'obscurité de P_{700} dans les conditions oxygènes chez le contrôle montrent une réduction légèrement plus lente en présence de MV, en accord avec l'idée que l'on se fait du rôle de ce médiateur redox, même si les vitesses que nous observons ici sont plus rapides que celles présentées par Jean Alric et al. (Alric, Lavergne et al. 2010).

Les cinétiques de la figure 5, sont homogènes contrairement à ce que nous observons dans les conditions anoxiques. Il est tentant d'attribuer la biphasicité (figure 4) à la formation de supercomplexe, qui a lieu durant la restructuration, observée en anoxie, des membranes thylacoïdales lors de la transition oxe - anoxie (chapitre 3).

Ces résultats nous permettent donc de proposer les hypothèses suivantes, dans les conditions anoxiques en présence et absence de méthylviologène : (i) La phase 1 est attribuée à la formation de supercomplexe dont l'accès au MV serait difficile par la forte structuration que formerait les complexes. Le méthylviologène ne pourrait alors pas rentrer en compétition avec le transfert d'électrons cyclique qui subsiste au sein



du CEF-supercomplexe. Ainsi les vitesses avec ou sans MV sont similaires durant cette phase. (ii) La phase 2 est alors attribuée aux complexes libres dans la membrane thylacoïdale. Ces derniers sensibles à l'ajout de MV auraient une vitesse de réduction plus lente.

Ces résultats reproductibles soulèvent la possibilité d'observer *in vivo* la formation des supercomplexes.

2 Influence de la lumière sur le mutant ATP synthase - précédent bibliographique

Nos études d'illumination constante des cellules dans le début de l'anoxie ont montré une oxydation rapide de P_{700} , à des temps où il est impossible de l'observer lorsque les cellules sont adaptées à l'obscurité. L'oxydation de P_{700} induite par la lumière est vraie chez le contrôle (*t222+*) de *Chlamydomonas reinhardtii*, alors que chez le mutant d'ATP synthase (*thm24* et *FUD50*) cette ré-oxydation n'a pas lieu, suggérant fortement que la quantité de P_{700} photo-oxydable augmente grâce à la consommation du NADPH et de l'ATP synthétisé à la lumière, par le cycle de Benson-Calvin.

Nous avons décidé de nous intéresser aux états migratoires des antennes lorsque les cellules sont illuminées constamment sous anoxie. Des observations (discussion interne au laboratoire et (Bulté, Rebeillé et al. 1990)) déjà faites, sous entendent que deux situations sont envisageables sur le mutant d'ATP synthase.

Il est rapporté qu'en présence de DCMU à la lumière, l'état 1 est promu dans les cellules contrôles. Chez ce mutant, les résultats précédents suggèrent que la complète réversion à l'état 1 a eu lieu seulement dans les conditions expérimentales qui permettraient la synthèse d'ATP et la ré-oxydation des transporteurs d'électrons, (Bulté, Rebeillé et al. 1990). Les auteurs concluent que la réversion sous la lumière à l'état 1 dans les cellules contrôles entières préalablement à l'état 2, requièrent la synthèse d'ATP. Or les conditions de mise à l'état 2, soit les conditions anoxiques, inhibent la production d'ATP mitochondriale.

Dans nos conditions expérimentales, voici les résultats de fluorescence que nous avons sur le mutant d'ATP synthase,



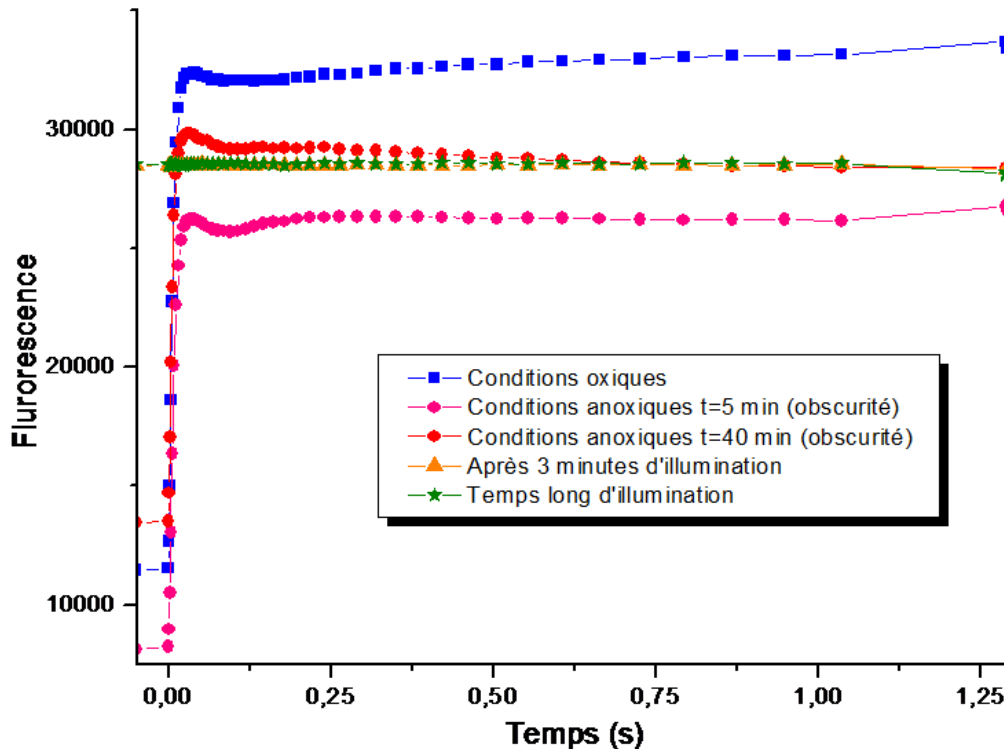


Figure 6 : Cinétiques de fluorescence à température ambiante sur le mutant d'ATP synthase (*FUD50*) dans les conditions oxique (**bleue**) et anoxique ($t=5$ min) (**rose**) et ($t=40$ min) lorsque les cellules sont gardées à l'obscurité (**rouge**). Et dans les conditions anoxiques, sous illumination, à 3 minutes (**orange**) et à un temps long de lumière (**verte**). Intensité de $115 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Les cinétiques de fluorescence (figure 6) montrent que contrairement au contrôle (réf [chapitre 2, figure 11](#)) même après un temps long d'illumination, la fluorescence maximale est la même que dans les conditions anoxiques, les cellules sont donc à l'état 2. Le mutant d'ATP synthase reste donc bloqué dans un état 2 dans les conditions anoxiques même après un temps suffisamment long d'illumination, devant induire un changement d'état.

Un mutant d'ATP synthase à l'état 1 lorsque les cellules sont dans les conditions oxiques, se retrouve donc bloqué à l'état 2 sous une longue illumination continue, contrairement au WT. Dans le cas où cette transition d'état n'a pas lieu, l'hypothèse est la même que celle que nous proposons, soit, sous illumination le système ne peut synthétiser d'ATP de par le rotor ATP synthase, cette souche en étant mutée. Il n'est donc pas possible d'induire l'état 1.

Cependant, des discussions avec Francis-André Wollman ont suggéraient qu'il était parfois possible d'observer un transfert à l'état 2 chez les souches mutantes d'ATP synthase, cela au bout d'un temps plutôt long d'anoxie et / ou d'anoxie prolongée à la lumière.

Les processus décrits pour permettre l'apport d'ATP dans la cellule, sont l'existence d'un transfert d'électrons entre la mitochondrie et le chloroplaste mais aussi la dégradation d'amidon chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Klein, 1987). Cette dernière résulte en une accélération du chemin glycolytique (effet Pasteur) et dans la synthèse d'ATP (Donce, 1985).



Dans le cas où la migration des antennes vers le PSII serait induite (état 1), l'hypothèse est que la glycolyse fonctionnelle dans les cellules mutantes d'ATP synthase permettrait la synthèse d'ATP suffisante pour la transition à l'état 1. Mais aussi dans nos observations, de permettre la consommation de NADPH par le cycle de Benson Calvin, montrant une fraction de P_{700} réduite croissante en fonction du temps d'illumination, même si celle-ci n'est jamais complète.

Il semble qu'il existe un "facteur temps de re-suspension" à l'obscurité, qui implique que dans les temps courts (30 minutes) les cellules resteront bloquées dans un état 2 sous illumination, chez le mutant d'ATP synthase. Alors que pour des temps plus longs de re-suspension (2 à 3 heures) le mutant présentera une transition à l'état 1 sous illumination, plutôt rapide et une consommation du pouvoir réducteur. Ce dernier point implique que ces temps de re-suspension à l'obscurité suffisent pour que le chemin métabolique de la glycolyse puisse être utilisé.

Une autre hypothèse pourrait être l'implication de l'hydrogénase, dont l'induction pourrait avoir lieu lorsque les cellules sont agitées à l'obscurité, au bout d'un temps long. La présence de l'hydrogénase pourrait alors permettre le déblocage à la lumière, en acceptant les électrons selon un processus ne requérant pas l'ATP.

III Supercomplexes

Le dernier chapitre présenté dans cette thèse concerne l'étude de la formation des CEF-supercomplexes, regroupant les différents acteurs du transfert d'électrons cyclique au sein de la même unité, dans la membrane thylacoïdale.

La présence d'une bande de haut poids moléculaire dans les gradients de sucrose, après solubilisation des membranes thylacoïdales, seulement dans les conditions anoxiques, chez les cellules de *Chlamydomonas reinhardtii*, suggère que la formation de cette bande serait contrôlée par l'état redox du système. L'assemblage des complexes en supercomplexes serait alors conduit par un pool de plastoquinone réduit et leurs dissociations seraient déclenchées par un état redox oxydé du pool de PQ. Une autre façon de voir le problème est en termes de demande en ATP ; lors de forte demande, comme dans les conditions anoxiques dû à l'arrêt de la synthèse d'ATP mitochondriale, la formation des CEF-supercomplexes serait déclenchée, pour permettre un transfert cyclique et donc une synthèse d'ATP plus efficace. Et inversement, lors d'une faible demande, comme dans les conditions oxiques, leurs dissociations seraient conduites (Khalifat, Puff et al. 2008 ; Khalifat, Fournier et al. 2011). Il y aurait donc une formation de CEF-supercomplexes dans les conditions anoxiques, et notre étude portait sur l'étude *in vitro* du fonctionnement de cette bande supplémentaire. Ce dernier point fut traité dans le troisième paragraphe, qui conclut à une co-migration par immunoblot, mais aussi à une difficulté pour se prononcer sur une activité efficace de transfert d'électrons cyclique au sein des supercomplexes par les expériences spectroscopiques.

Dans la perspective de nouvelles études sur les CEF-supercomplexes *in vitro*, nous pouvons nous poser quelques questions : *Est-ce simplement une co-migration qu'il est possible d'observer dans le gradient de sucrose ? Manque-t-il un élément dans cette bande qui permettrait le fonctionnement du CEF ?*

1 Co-migration ? - Activité ?



La présence d'une bande de poids moléculaire plus lourd dans le gradient de sucrose, chez le contrôle dans les conditions anoxiques, n'est-elle due qu'à une unique co-migration des complexes impliqués dans le CEF ? Ou ce regroupement protéique en une bande unique correspond à une association fonctionnelle ?

Des études fonctionnelles, *in vitro*, de la bande identifiée comme la formation des supercomplexes dans la membrane thylacoïdale chloroplastique montraient une activité, par les cinétiques d'absorptions. Nous avons attribué cette observation d'activité à une participation spectrale des longueurs d'ondes de la plastocyanine, et non au fonctionnement des supercomplexes.

1.1 Transfert d'électrons cyclique au sein du CEF-supercomplexe

Les études de mesures de cyclique ont permise d'étudier les chemins métaboliques de réinjection des électrons dans le mode CEF dans la membrane thylacoïdale. Et d'évaluer les différentes hypothèses par l'utilisation de mutants altérés dans les unités pensées pour être impliquées dans le cyclique (*pgrl1* (Tolleteer, Ghysels et al. 2011) ; *pgr5* (Alric. 2014)). Le transfert d'électrons cyclique a lieu dans ces mutants mais l'augmentation du CEF n'étant pas observé suggère une implication des protéines mutées dans la restructuration des différents acteurs cyclique en CEF-supercomplexes permettant une efficacité fonctionnelle de ces supercomplexes et du transfert d'électrons.

L'étape suivante est donc l'étude de la formation des CEF-supercomplexes chez les mutants *pgrl1* et *pgr5* de *Chlamydomonas reinhardtii*. Des études préliminaires montrent qu'il y a présence de supercomplexes chez ces deux mutants mais pas dans le double mutant (expérience *pgr5*, au sein de notre laboratoire et *pgrl1*, *pgr5* et le double mutant de Janina Steinbeck (laboratoire de Münster)).

2 Mutants de diffusion des transporteurs d'électrons - formation des CEF-supercomplexes

Toujours dans l'optique d'observer une activité *in vitro* des CEF-supercomplexes chloroplastiques, nous cherchons à 'consolider' cette formation.

Plutôt que de tester différent protocole biochimique d'étude, nous avons à notre disposition des mutants qui présentent de plus haute affinité, que le contrôle, pour la ferrédoxine et le PSI pour l'un, et de la plastocyanine pour le PSI pour le second mutant.

Il est donc possible en limitant la diffusion des deux transporteurs mobiles entre les deux complexes principaux (PSI et cytochrome *b₆f*) du CEF-supercomplexes, de modifier le flux d'électrons cyclique et ainsi d'étudier son efficacité dans, entre autre, la formation des supercomplexes.

2.1 Mutant T26 - Limitation de la diffusion entre PC et PSI

Le cœur du Photosystème I se construit des deux sous unités PsaB et PsaA, arborant la paire de chlorophylle P₇₀₀ et le centre fer-soufre [4Fe-4S]Fx. Il est montré que la sous unité chargée négativement, possède deux résidus E613 et D612 importants pour l'efficacité de la déconnection de la plastocyanine oxydée venant du complexe PSI.



Le mutant *T26* est issu d'un transformant *PsaB-D612H/E613H*, chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Kuhlgert, Drepper et al. 2012). Il présente lors des descriptions des interactions électrostatiques entre les partenaires du transfert d'électrons (PC – cyt – PSI), une haute affinité de la plastocyanine au Photosystème I en comparaison au contrôle.

Les études de variations d'absorptions montrent des temps de réduction de P_{700}^+ plus rapide. Le transfert d'électrons par l'examen de la photo-réduction du NAP^+ , *in vitro*, montrent une vitesse trois fois plus élevée que chez le contrôle WT.

Le mutant *T26* présente donc une plus haute affinité pour réduire la PC et permet un transfert d'électrons plus rapide entre la plastocyanine et le Photosystème I que chez la souche contrôle.

Nous avons donc étudié ce mutant dans les conditions oxygène et anoxique afin de mesurer les vitesses cycliques.

Notons tout d'abord que la transition entre états bloqué et débloqué est plus rapide chez le mutant que chez notre souche de référence. Les vitesses cycliques montrent des valeurs, pour la souche *T26*, d'une moyenne (sur 6 échantillons) de 54 ± 21 électrons $s^{-1} PSI^{-1}$ pour les conditions oxygènes et de $\sim 84 \pm 22$ électrons $s^{-1} PSI^{-1}$ pour les conditions anoxiques.

Pour conclure sur l'oxydation de P_{700} et le taux CEF important observé dans les conditions oxygènes chez le mutant *T26*, il serait bon de comparer ces valeurs avec celle du contrôle de la souche, que nous ne possédons pas encore.

Nous pouvons cependant conclure que comme chez notre contrôle d'étude (*t222+*) une augmentation du cyclique est observée lors de la transition conditions oxygène – anoxique.

Nous envisageons d'étudier la formation de CEF-supercomplexe dans le mutant *T26* dans les deux conditions, pouvant émettre l'hypothèse que dans les conditions anoxiques, l'affinité entre la plastocyanine et le Photosystème I favorise un transfert d'électrons entre le cytochrome b_6f et le PSI au sein de l'entité qui forme le supercomplexe. La plastocyanine pourrait donc se trouver piégée et permettrait l'observation d'une activité efficace du CEF-supercomplexes.

2.2 Mutant *PsaC-FB1* – Limitation de la diffusion entre PSI et Fd

Le Photosystème I est composé de sous-unité dont les rôles sont variés, allant du bon assemblage de ce dernier à l'interaction entre ferrédoxine et PSI, permettant un transfert d'électrons efficace. Les deux sous-unités *PsaE* et *D* sont connues pour être responsables de la haute affinité de la Fd pour le PSI, dans des proportions différentes. *PsaE* semble contrôler le temps de vie du complexe PSI/Fd, alors que le *PsaD* apparaît important pour la connexion entre la Fd et le site de liage du PSI (Barth, Lagoutte et al. 1998). Les auteurs ont montré qu'en leurs absences, les propriétés principales du Photosystème I sont conservées comparé au WT, malgré la perte importante de l'affinité du couple Fd/PSI. Au-delà, les données présentées supportent l'existence d'un site de liaison étendu pour la ferrédoxine, principalement partagé entre *PsaC-D-E*.

La sous-unité du PSI, *PsaC-FB1* contient les centres fer-soufre $[4Fe-4S]F_A$, et se situe côté stromal. Elle est identifiée pour avoir un site d'interaction avec la ferrédoxine



(Setif 2001) et jouerait un rôle dans le contrôle géométrique du complexe PSI-Fd requis pour un transfert d'électrons rapide (Barth, Lagoutte et al. 1998).

2.2.1 Analyses spectroscopiques – Résultats préliminaires

Les expériences de flash d'ECS montrent un déclin de champ différent que le contrôle, dans les conditions oxiques. Celui est beaucoup plus lent chez le mutant *PsaC-FB1*, comme ce qu'il est possible d'observer chez le contrôle dans les conditions anoxiques.

L'application pendant 30 secondes de lumière suivie de 10 secondes d'obscurité et de nouveau l'étude de champ montre cette fois une consommation plus rapide du champ produit.

Le mutant *PsaC* montre donc une activité à deux facettes de l'ATP synthase. Ce complexe fonctionne correctement comme le montre l'application de la lumière. Cependant son activité est différente de celle du contrôle, pour des raisons qui ne sont pas encore identifiables pour le moment. Dans les conditions oxiques, l'ATP synthase arrête son activité spontanément, et la reprend lorsque les cellules ont été précédemment exposées à la lumière.

Il est possible d'imaginer que le transfert de protons n'est pas optimal, par exemple, ne permettant pas une accumulation suffisante pour observer un fonctionnement de l'ATP synthase. Il serait intéressant dans un premier temps de reproduire ces résultats, et d'étudier le retour du fonctionnement de l'ATP synthase en fonction de l'intensité et du temps d'exposition des cellules à la lumière.

De plus, nous avons étudié l'oxydation de P_{700} chez le mutant *PsaC-FB1* qui ne montre pas d'oxydation totale dans les conditions anoxiques après 40 minutes,



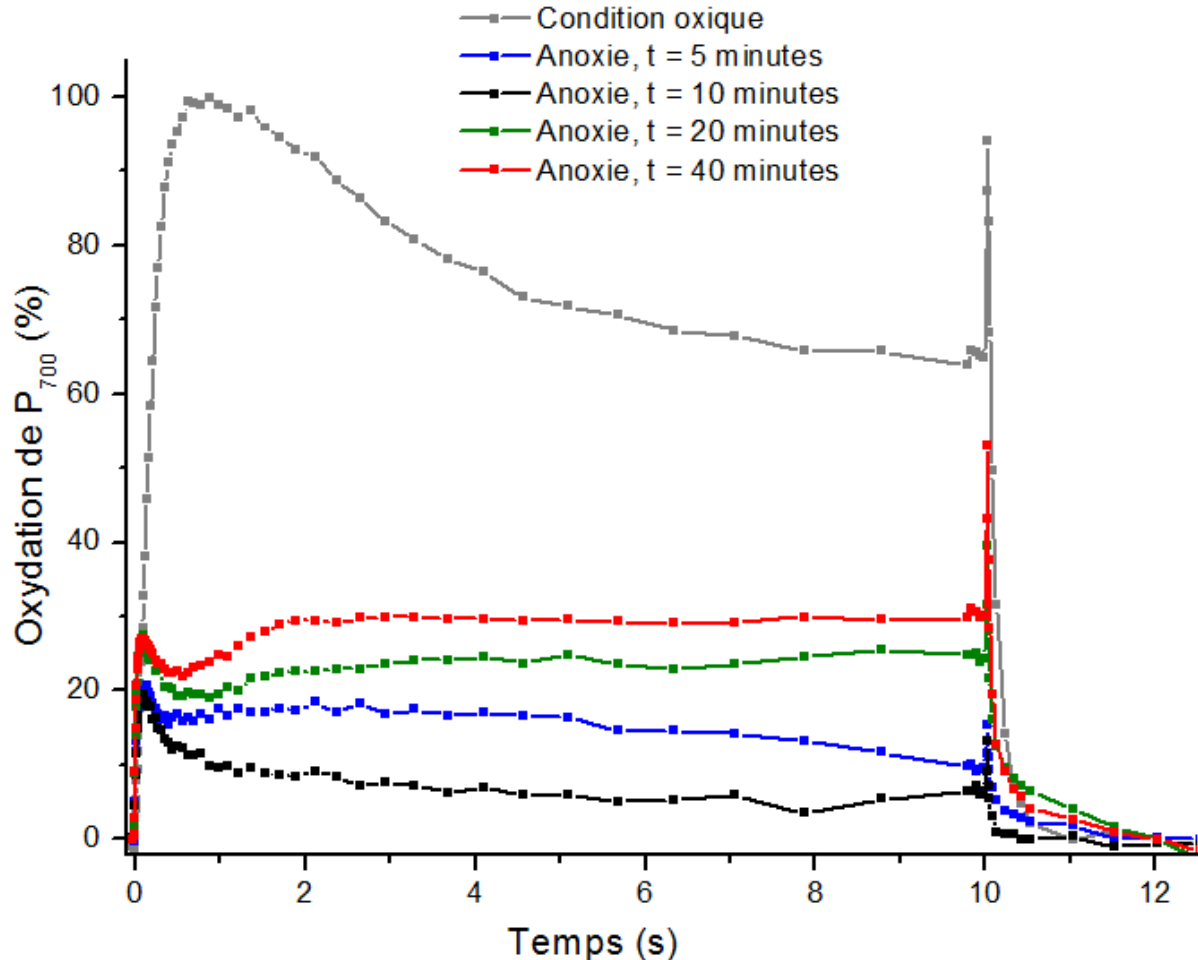


Figure 7 : Cinétiques d'oxydo-réduction de P_{700} chez le mutant *PsaC-FB1* dans les conditions oxiques (courbe grise) et à différents temps d'anoxie (5, 10, 20, 40) minutes. Intensité de $115 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Les cinétiques de la figure montrent que l'oxydation de P_{700} après 40 minutes (courbe rouge) n'est que partielle (56 %). La vitesse cyclique dans les conditions oxiques est de $48 \text{ électrons s}^{-1} \text{ PSI}^{-1}$, qu'il faudrait comparer avec celle du contrôle de la souche, que nous ne possédons pas.

Ces résultats suggèrent que l'état métabolique des cellules est différent que le contrôle. Il semble qu'il est possible de désengorger le pool de NADPH mais lentement, comme le montre la courbe rouge à 40 minutes.

Il serait intéressant de suivre l'oxydation de P_{700} chez le mutant *PsaC-FB1* à des temps plus long d'anoxie. Mais aussi d'étudier ce mutant en appliquant la lumière au début de l'anoxie pour permettre une éventuelle oxydation de P_{700} par la synthèse d'ATP chloroplastique.

3 Imagerie-supercomplexes

Nous avons envisagé d'étudier par microscopie électronique, les CEF-supercomplexes que nous pouvions trouver dans notre bande de haut poids moléculaire issue des gradients de sucrose. Cette étude est en collaboration avec



Roman Kouril du département de biophysique de l'université d'Olomouc en République-Tchèque.

Leurs études ont déjà permis l'obtention de la première étude structurale de supercomplexes {PSI-NDH} chez les plantes ([Kouril, Strouhal et al. 2014](#)).

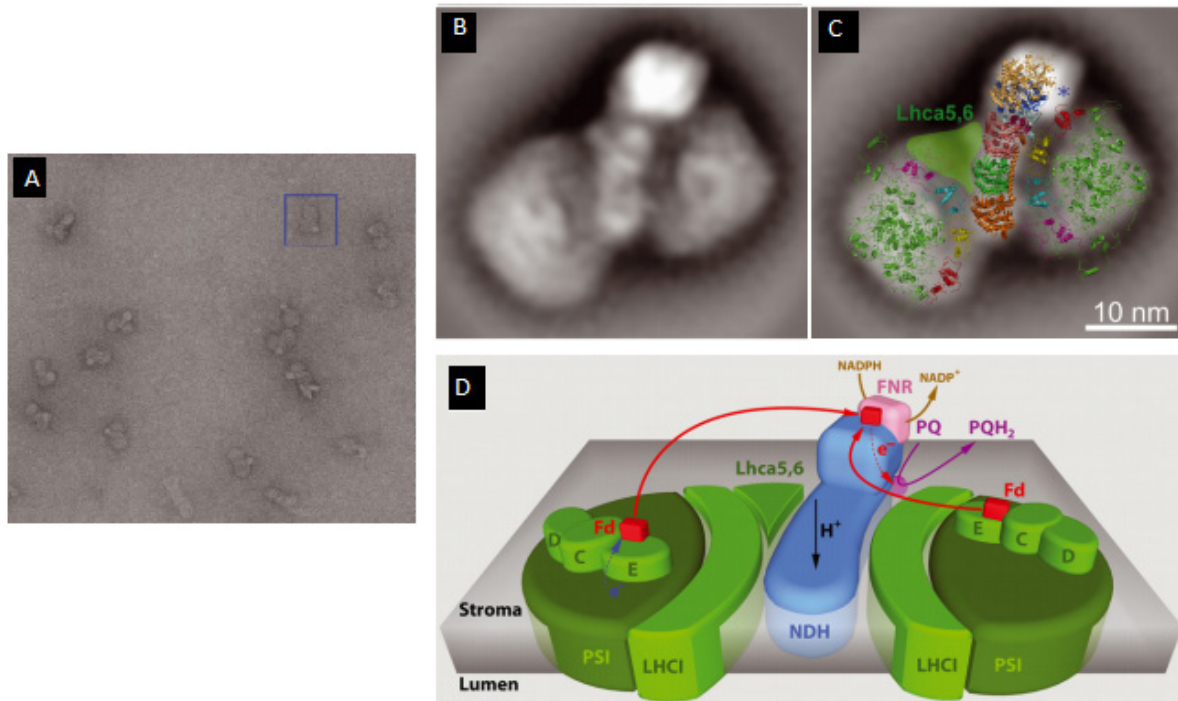


Figure 8 : Etude structurale de la formation du supercomplexe {PSI-NDH} chez les plantes, réalisée par microscopie électronique. **A**, Exemple d'espèce de la forme d'un supercomplexe {PSI-NDH} ; **B**, Plan de projection moyennée contenant le complexe NDH et deux copies du complexe PSI. Et **C**, Structures superposées basées sur l'ajustement des structures rayons X du complexe I ([Amunts, Toporik et al. 2010](#)) et du complexe respiratoire I ([Baradaran, Berrisford et al. 2013](#)).

Les auteurs ont détecté la présence de protéines mineures Lhca5 et / ou Lhca6, qui ont un rôle majeur dans la formation de supercomplexe ([Peng, Fukao et al. 2009](#)). Cette formation suggère la présence de ferrédoxine qui va dans le sens d'un fonctionnement du supercomplexe plus efficace quant au transfert des électrons de la Fd au NDH. Dans cette analyse structurale, les électrons transférés du complexe PSI au complexe NDH se fait par le biais de la ferrédoxine plutôt que directement par le NAD(P)H. Dans ce modèle de transfert d'électrons cyclique, le ferrédoxine peut être réduite par le NAD(P)H et réduire à son tour une molécule de plastoquinone via les transporteurs d'électrons NDH intermédiaires.

Nous envisageons donc d'utiliser une tactique similaire pour définir une structure, par microscopie électronique, de la formation des CEF-supercomplexes dans les études anoxiques chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. La difficulté avec une telle entité est dans l'attribution des différentes formes aux unités composant le supercomplexe. En effet, la position d'observation des acteurs peut varier et le nombre important d'unité dans un supercomplexe augmente la difficulté



d'attribution. Il devient difficile d'associer et de superposer des structures tant de possibilités existent pour celles-ci.

Cependant, avant cela il se trouve difficile d'obtenir des images correctes, sans doute dû à la congélation des fractions de hauts poids moléculaires dans les gradients de sucrose associées aux CEF-supercomplexes. Nous envisageons donc une étude en envoyant les membranes congelées et Roman Kouril se propose de faire les analyses structurales après solubilisation des membranes et séparations des CEF-supercomplexes, dans son propre laboratoire.

Pour conclure, savoir si cette organisation supramoléculaire de la chaîne apporte un avantage cinétique réel dans le transfert d'électrons ? Ou bien s'il s'agit seulement d'une structuration permettant la stabilisation des protéines sans rôle fonctionnel clair dans le transfert d'électrons ? Restent deux questions ouvertes dans le cas de la formation des supercomplexes dans la membrane thylacoïdale chloroplastique.





Références

- Abeles, F. B. (1964). "Cell-free Hydrogenase from Chlamydomonas." Plant Physiol **39**(2): 169-176.
- Abrahams, J. P., et al. (1994). "Structure at 2,8Å resolution of F1-ATP ase from bovine heart mitochondria." Nature **370**: 621-628.
- Albertson, P. (2001). "A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane." Trends Plant Sci **6**.
- Allen, J. F. (1992). "Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis." Biochim Biophys Acta **1098**(3): 275-335.
- Allen, J. F. (2002). "Photosynthesis of ATP-electrons, proton pumps, and poise." Cell **110**: 273-276.
- Allen, J. F., et al. (1981). "Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems." Reprinted from Nature **291**(5810): 21-25.
- Alric, J. (2010). "Cyclic electron flow around photosystem I in unicellular green algae." Photosynth Res **106**(1-2): 47-56.
- Alric, J., et al. (2010). "Redox and ATP control of photosynthetic cyclic electron flow in Chlamydomonas reinhardtii (I) aerobic conditions." Biochim Biophys Acta **1797**(1): 44-51.
- Alric, J. (2014). "Redox and ATP control of photosynthetic cyclic electron flow in Chlamydomonas reinhardtii: (II) involvement of the PGR5-PGRL1 pathway under anaerobic conditions." Biochim Biophys Acta **1837**(6): 825-834.
- Amunts, A. et al. (2007). "The structure of a plant PSI supercomplex at 3.4 Å resolution." Nature **447**: 58-63.
- Amunts, A., et al. (2010). "Structure determination and improved model of plant photosystem I." J Biol Chem **285**(5): 3478-3486.
- Andersson, B. and J. M. Anderson (1980). "Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts." Biochim Biophys Acta **593**(2): 427-440.
- Antal, T. K., et al. (2013). "Photosynthesis-related quantities for education and modeling." Photosynth Res **117**(1-3): 1-30.



Arnon, D. I., et al. (1954). "Photosynthesis by isolated chloroplasts." Nature **174**(4426): 394-396.

Arnon, D. I., et al. (1955). "Vitamin K as a cofactor of photosynthetic phosphorylation." Biochim Biophys Acta **16**(4): 607-608.

Arnon, D. I., et al. (1961). "Photoproduction of hydrogen, photofixation of nitrogen and a unified concept of photosynthesis." Nature **190**: 601-606.

Atteia, A., et al. (2006). "Pyruvate formate-lyase and a novel route of eukaryotic ATP synthesis in Chlamydomonas mitochondria." J Biol Chem **281**(15): 9909-9918.

Atteia, A., et al. (2013). "Anaerobic energy metabolism in unicellular photosynthetic eukaryotes." Biochim Biophys Acta **1827**(2): 210-223.

Avenson, T. J., et al. (2004). "Modulation of energy-dependent quenching of excitons in antennae of higher plants." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(15): 5530-5535.

Bailleul, B., et al. (2010). "Electrochromism: a useful probe to study algal photosynthesis." Photosynth Res **106**(1-2): 179-189.

Baker, N. R., et al. (2007). "Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves." Plant Cell Environ **30**(9): 1107-1125.

Baradaran, R., et al. (2013). "Crystal structure of the entire respiratory complex I." Nature **494**(7438): 443-448.

Barbagallo, R. P., et al. (1999). "Effects of inhibitors on the activity of the cytochrome b(6)f complex: evidence for the existence of two binding pockets in the lumenal site." Biochemistry **38**(39): 12814-12821.

Barth, P., et al. (1998). "Ferredoxin reduction by photosystem I from Synechocystis sp. PCC 6803: toward an understanding of the respective roles of subunits PsaD and PsaE in ferredoxin binding." Biochemistry **37**(46): 16233-16241.

Bellafiore, S., et al. (2005). "State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7." Nature **433**: 893-895.

Ben-Amotz, A. and M. Gibbs (1975). "H₂ metabolism in photosynthetic organisms. II. Light-dependent H₂ evolution by preparations from Chlamydomonas, Scenedesmus and spinach." Biochem Biophys Res Commun **64**(1): 355-359.

Bendall, D. S. M., R.S (1995). Biochim. Biophys. Acta **1229**: 23-38.

Bennoun, P. (1982). "Evidence for a respiratory chain in the chloroplast." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(14): 4352-4356.



Bishop, N. I. and H. Gaffron (1962). "Photoreduction at lambda 705 millimicrons in adapted algae." Biochem Biophys Res Commun **8**: 471-476.

Bonaventura, C. and J. Myers (1969). "Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*." Biochim Biophys Acta **189**(3): 366-383.

Brettel, K. (1997). "Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in PSI." BBA.

Bukhov, N. and R. Carpentier (2004). "Alternative photosystem I-driven electron transport routes: mechanisms and functions." Photosynth Res **82**(1): 17-33.

Bulté, L. G., P. Rebéillé, F. Wollman, F-A (1990). "ATP-control on state transitions in vivo in *Chlamydomonas reinhardtii*." Biochim Biophys Acta **1020**: 72-80.

Calvin, M. (1962). "The path of carbon in photosynthesis." Science **135**(3507): 879-889.

Cape, J. L., et al. (2006). "Understanding the cytochrome bc complexes by what they don't do. The Q-cycle at 30." Trends Plant Sci **11**(1): 46-55.

Catalanotti, C., et al. (2012). "Altered fermentative metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* mutants lacking pyruvate formate lyase and both pyruvate formate lyase and alcohol dehydrogenase." Plant Cell **24**(2): 692-707.

Cassan, N., et al. (2005). "Ferredoxin-NADP⁺ reductase. Kinetics of electron transfer, transient intermediates, and catalytic activities studied by flash-absorption spectroscopy with isolated photosystem I and ferredoxin." J Biol Chem **280**(28): 25960-25972.

Collins, A. M., et al. (2010). "Modulation of fluorescence in *Heliobacterium modesticaldum* cells." Photosynth Res **104**(2-3): 283-292.

Cournac, L., et al. (2000). "Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration." J Biol Chem **275**(23): 17256-17262.

DalCorso, G., et al. (2008). "A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*." Cell **132**(2): 273-285.

Delepaire, P., and Wollman, F.A. (1985). "Correlations between fluorescence and phosphorylation changes in thylakoid membranes of *Chlamydomonas* in vivo: a kinetic analysis." BBA **809**: 277-283.



Delosme, R., et al. (1996). "Changes in light energy distribution upon state transitions : an in vivo photoacoustic study of the WT and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* " BBA **1273**: 150-158.

Delosme, R. (1991). "Electron transfer from cytochrome f to photosystem I in green algae." Photosynth Res **29**(1): 45-54.

de Vitry, C. and Wollman, F-A (1988). "Changes in phosphorylation of thylakoid membrane proteins in LHC mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*." BBA **933**: 444-449.

Donce, R. (1985). "In mitochondria in higher plants." Academic Press.

Drop, B., et al. (2011). "Photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* contains nine light-harvesting complexes (Lhca) located on one side of the core." J Biol Chem **286**(52): 44878-44887.

Dubini, A., et al. (2009). "Flexibility in anaerobic metabolism as revealed in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking hydrogenase activity." J Biol Chem **284**(11): 7201-7213.

Duysens, L. N., et al. (1961). "Two photochemical systems in photosynthesis." Nature **190**: 510-511.

Eberhard, S., et al. (2008). "The dynamics of photosynthesis." Annu Rev Genet **42**: 463-515

Erbes, D. L., et al. (1979). "Inactivation of Hydrogenase in Cell-free Extracts and Whole Cells of *Chlamydomonas reinhardtii* by Oxygen." Plant Physiol **63**(6): 1138-1142.

Ferreira, K. et al. (2004). "Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center." Science **303**.

Finazzi, G., et al. (1999). "State transitions, cyclic and linear electron transport and photophosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*." Biochim Biophys Acta **1413**(3): 117-129.

Finazzi, G., et al. (2002). "Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*." EMBO Rep **3**(3): 280-285.

Fleischmann, M. M., et al. (1999). "Isolation and characterization of photoautotrophic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in state transition." J Biol Chem **274**(43): 30987-30994.



Fork, D. C. and S. K. Herbert (1993). "Electron transport and photophosphorylation by Photosystem I in vivo in plants and cyanobacteria." Photosynth Res **36**(3): 149-168.

Gaffron, H. and J. Rubin (1942). "Fermentative and Photochemical Production of Hydrogen in Algae." J Gen Physiol **26**(2): 219-240.

Gal, A., et al. (1988). "Role of the cytochrome b6.f complex in the redox-controlled activity of Acetabularia thylakoid protein kinase." J Biol Chem **263**(16): 7785-7791.

Genova, M. L. and G. Lenaz (2014). "Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes." Biochim Biophys Acta **1837**(4): 427-443.

Germano, M., et al. (2002). "Supramolecular organization of photosystem I and light-harvesting complex I in Chlamydomonas reinhardtii." FEBS Lett **525**(1-3): 121-125.

Gfeller, R. P. and M. Gibbs (1984). "Fermentative Metabolism of Chlamydomonas reinhardtii: I. Analysis of Fermentative Products from Starch in Dark and Light." Plant Physiol **75**(1): 212-218.

Ghirardi et al. (1997). "Oxygen sensitivity of algal H₂-production." Appl Biochem Biotech **63**: 141-151.

Ghysels, B., et al. (2013). "Function of the chloroplast hydrogenase in the microalga Chlamydomonas: the role of hydrogenase and state transitions during photosynthetic activation in anaerobiosis." PLoS One **8**(5): e64161.

Godde, D. and Trebst, A. (1980). "NADH as electron donor for the photosynthetic membrane of Chlamydomonas Reinhardtii." Arch Microbiology **127**: 245-252.

Grossman, A. R., et al. (2011). "Multiple facets of anoxic metabolism and hydrogen production in the unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii." New Phytol **190**(2): 279-288.

Grossman, A. R., et al. (2007). "Novel metabolism in Chlamydomonas through the lens of genomics." Curr Opin Plant Biol **10**(2): 190-198.

Happe et al. (1994). "Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga Chlamydomonas reinhardtii." Em J Biochem **222**: 769-774.

Heathcote, R. (1985). "Primary photochemistry in PSI." Photosynth Res **6**: 293-316.

Hemschemeier, A. and T. Happe (2005). "The exceptional photofermentative hydrogen metabolism of the green alga Chlamydomonas reinhardtii." Biochem Soc Trans **33**(Pt 1): 39-41.



- Hemschmier, et al. (2009). "Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae." Photosynth Res **102**: 523-540.
- Hochman, J., et al. (1985). "Mobility in the mitochondrial electron transport chain." Biochemistry **24**(10): 2509-2516.
- Houille-Vernes, L., et al. (2011). "Plastid terminal oxidase 2 (PTOX2) is the major oxidase involved in chlororespiration in Chlamydomonas." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(51): 20820-20825.
- Huber, S. C. and G. E. Edwards (1976). "Studies on the pathway of cyclic electron flow in mesophyll chloroplasts of a C4 plant." Biochim Biophys Acta **449**(3): 420-433.
- Iwai, M., et al. (2010). "Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis." Nature **464**(7292): 1210-1213.
- Jans, F., et al. (2008). "A type II NAD(P)H dehydrogenase mediates light-independent plastoquinone reduction in the chloroplast of Chlamydomonas." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(51): 20546-20551.
- Johnson, X. and J. Alric (2012). "Interaction between starch breakdown, acetate assimilation, and photosynthetic cyclic electron flow in Chlamydomonas reinhardtii." J Biol Chem **287**(31): 26445-26452.
- Johnson, X. et al. (2010). "MRL1 as conserved Pentatricopeptide Repeat Protein is required for stabilisation of rbcL mRNA in Chlamydomonas and Arabidopsis." Plant Cell **22**: 234-248.
- Joliot, P., et al. (2004). "Cyclic electron flow under saturating excitation of dark-adapted Arabidopsis leaves." Biochim Biophys Acta **1656**(2-3): 166-176.
- Joliot, P. and R. Delosme (1974). "Flash-induced 519 nm absorption change in green algae." Biochim Biophys Acta **357**(2): 267-284.
- Joliot, P. and G. N. Johnson (2011). "Regulation of cyclic and linear electron flow in higher plants." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(32): 13317-13322.
- Joliot, P. and A. Joliot (2002). "Cyclic electron transfer in plant leaf." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 10209-10214.
- Joliot, P. and A. Joliot (2005). "Quantification of cyclic and linear flows in plants." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(13): 4913-4918.
- Joliot, P. and A. Joliot (2006). "Cyclic electron flow in C3 plants." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 362-368.



Junge, W. and Witt, H.T. (1968). "On the ion transport system of photosynthesis-- investigations on a molecular level, ." Z. Naturforsch. **23b**: 244-254.

Kamiya, N. and J. R. Shen (2003). "Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 98-103.

Kargul, J., et al. (2003). "Three-dimensional reconstruction of a light-harvesting complex I-photosystem I (LHCI-PSI) supercomplex from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Insights into light harvesting for PSI." J Biol Chem **278**(18): 16135-16141.

Klein, U. and A. Betz (1978). "Fermentative Metabolism of Hydrogen-evolving *Chlamydomonas moewusii*." Plant Physiol **61**(6): 953-956.

Klein, U. (1987). "Intracellular Carbon Partitioning in *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant Physiol **85**(4): 892-897.

Klughammer, C. and Schreiber, U. (1994). "An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700+ - absorbance changes at 830 nm." Planta **192**: 261-268.

Khalifat, N., et al. (2008). "Membrane deformation under local pH gradient: mimicking mitochondrial cristae dynamics." Biophys J **95**(10): 4924-4933.

Khalifat, N., et al. (2011). "Lipid packing variations induced by pH in cardiolipin-containing bilayers: the driving force for the cristae-like shape instability." Biochim Biophys Acta **1808**(11): 2724-2733.

Kok, B. (1961). "Partial purification and determination of oxidation reduction potential of the photosynthetic chlorophyll complex absorbing at 700 millimicrons." Biochim Biophys Acta **48**: 527-533.

Kouril, R., et al. (2014). "Structural characterization of a plant photosystem I and NAD(P)H dehydrogenase supercomplex." Plant J **77**(4): 568-576.

Kow, Y. W., et al. (1982). "Chloroplast Respiration : A MEANS OF SUPPLYING OXIDIZED PYRIDINE NUCLEOTIDE FOR DARK CHLOROPLASTIC METABOLISM." Plant Physiol **69**(2): 442-447.

Kuchenreuther, J. M., et al. (2012). "New insights into [FeFe] hydrogenase activation and maturase function." PLoS One **7**(9): e45850.

Kuhlgert, S., et al. (2012). "Residues PsaB Asp612 and PsaB Glu613 of photosystem I confer pH-dependent binding of plastocyanin and cytochrome c(6)." Biochemistry **51**(37): 7297-7303.



Laprente-Brun, E. et al. (2013). "Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain." Science **340**: 1567-1570

Malkin, R. and R. K. Chain (1980). "The relationship of the cyclic and non-cyclic electron transport pathways in chloroplasts." Biochim Biophys Acta **591**(2): 381-390.

Marcel H.N Hoefnagela, O. K. A., Joseph T Wiskicha (1998). "Interdependance between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark." Biochim Biophys Acta **1366**: 235-255.

Melis (1991). "Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. ." BBA **1058** 87-106.

Melis, A. et al. (2014). "Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant Physiol **122**: 127-135.

Merchant, S. S., et al. (2007). "The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions." Science **318**(5848): 245-250.

Miller, A. G. and D. T. Canvin (1989). "Glycolaldehyde Inhibits CO₂ Fixation in the Cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625 without Inhibiting the Accumulation of Inorganic Carbon or the Associated Quenching of Chlorophyll a Fluorescence." Plant Physiol **91**(3): 1044-1049.

Minagawa, J. (2013). "Dynamic reorganization of photosynthetic supercomplexes during environmental acclimation of photosynthesis." Front Plant Sci **4**: 513.

Mitchell, P. (1975a). "The proton motive Q cycle : a general formulation." FEBS Lett **59**(2).

Mitchell, P. (1975b). "Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c₁ complex in the respiratory chain : protonmotive ubiquinone cycle, ." FEBS Lett **56**(1).

Munekage, Y., et al. (2004). "Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis." Nature **429**(6991): 579-582.

Munekage, Y., et al. (2002). "PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*." Cell **110**(3): 361-371.

Murata, N. (1969). "Control of excitation transfer in photosynthesis. II. Magnesium ion-dependent distribution of excitation energy between two pigment systems in spinach chloroplasts." Biochim Biophys Acta **189**(2): 171-181.



- Nagy, G., et al. (2014). "Chloroplast remodeling during state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii* as revealed by noninvasive techniques in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(13): 5042-5047.
- Nigoyi, K. K. (2000). "Safety valves for photosynthesis." Curr Opin Plant Biol **3** 455-460.
- Ohta, S. a. (1987). "Hydrogen evolution as a consumption mode of reducing equivalents in green algal fermentation." Plant Physiol **83**: 1022-1026.
- Ozawa, S., et al. (2010). "Identification and characterization of an assembly intermediate subcomplex of photosystem I in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." J Biol Chem **285**(26): 20072-20079.
- Peltier, G. and L. Cournac (2002). "Chlororespiration." Annu Rev Plant Biol **53**: 523-550.
- Peltier, G., et al. (2010). "Auxiliary electron transport pathways in chloroplasts of microalgae." Photosynth Res **106**(1-2): 19-31.
- Peng, L., et al. (2009). "Efficient operation of NAD(P)H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in *Arabidopsis*." Plant Cell **21**(11): 3623-3640.
- Psewitz, M. (2004). "Discovery of 2 novel radical-S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active." J boil Chem **279**: 25711-.
- Rintamaki, E., et al. (2000). "Cooperative regulation of light-harvesting complex II phosphorylation via the plastoquinol and ferredoxin-thioredoxin system in chloroplasts." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(21): 11644-11649.
- Rochaix, J. D. (2007). "Role of thylakoid protein kinases in photosynthetic acclimation." FEBS Lett **581**(15): 2768-2775.
- Rochaix, J. D. (2011). "Reprint of: Regulation of photosynthetic electron transport." Biochim Biophys Acta **1807**(8): 878-886.
- Roessler, P. G. and S. Lien (1984). "Activation and de novo synthesis of hydrogenase in *chlamydomonas*." Plant Physiol **76**(4): 1086-1089.
- Rumeau, D., et al. (2007). "Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response." Plant Cell Environ **30**(9): 1041-1051.



Sacksteder, C. A. and D. M. Kramer (2000). "Dark-interval relaxation kinetics (DIRK) of absorbance changes as a quantitative probe of steady-state electron transfer." Photosynth Res **66**(1-2): 145-158.

Saint-Amans, S., et al. (2001). "Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures." J Bacteriol **183**(5): 1748-1754.

Sazaniv, L. A. et al. (1998). "The plastid *ndh* genes code for an NADH-specific dehydrogenase: Isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes." Proc Natl Acad Sci USA **95**: 1319-1324.

Schliephake, W., et al. (1968). "Correlation between field formation, proton translocation, and the light reactions in photosynthesis." Z Naturforsch B **23**(12): 1571-1578.

Seelert, H., et al. (2000). "Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor." Nature **405**(6785): 418-419.

Setif, P. (2001). "Ferredoxin and flavodoxin reduction by photosystem I." Biochim Biophys Acta **1507**(1-3): 161-179.

Shepard, E. M., et al. (2010). "Synthesis of the 2Fe subcluster of the [FeFe]-hydrogenase H cluster on the HydF scaffold." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(23): 10448-10453.

Stroebel, D. et al. (2003). "An typical haem in the cytochrome *b6f* complex." Nature **426**: 413-418.

Tagawa, K., et al. (1963). "Role of chloroplast ferredoxin in the energy conversion process of photosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **49**: 567-572.

Takahashi, H., et al. (2013). "Cyclic electron flow is redox-controlled but independent of state transition." Nat Commun **4**: 1954.

Takahashi, S. and N. Murata (2006). "Glycerate-3-phosphate, produced by CO₂ fixation in the Calvin cycle, is critical for the synthesis of the D1 protein of photosystem II." Biochim Biophys Acta **1757**(3): 198-205.

Takahashi, S. and Murata, N. (2005). "Interruption of the calvin cycle inhibits the repair of PSII from photodamage." BBA **1708**: 352-361.

Terashima, M., et al. (2012). "Calcium-dependent regulation of cyclic photosynthetic electron transfer by a CAS, ANR1, and PGRL1 complex." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(43): 17717-17722.



Terashima, M., et al. (2010). "Characterizing the anaerobic response of *Chlamydomonas reinhardtii* by quantitative proteomics." Mol Cell Proteomics **9**(7): 1514-1532.

Tollete, D., et al. (2011). "Control of hydrogen photoproduction by the proton gradient generated by cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant Cell **23**(7): 2619-2630.

Toth, S. Z., et al. (2007). "A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient." Photosynth Res **93**(1-3): 193-203.

Ünlü C., D. B., Croce R. and van Amerongen H. (2014). "States transitions in *Chlamydomonas reinhardtii* strongly modulate the functional size of PSII but not of PSI." PNAS.

Vallon, O., et al. (1991). "Lateral redistribution of cytochrome b6/f complexes along thylakoid membranes upon state transitions." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(18): 8262-8266.

Vener, A. V., et al. (1998). "Protein phosphorylation and redox sensing in chloroplast thylakoids." Curr Opin Plant Biol **1**(3): 217-223.

Vener, A. V., et al. (1997). "Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome b₆ f mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(4): 1585-1590.

Witt, H. T., et al. (1961). "Oxidized cytochrome and chlorophyll C₂-plus in photosynthesis." Nature **192**: 967-969.

Woessner, J. P., et al. (1984). "Molecular and genetic analysis of the chloroplast ATPase of *chlamydomonas*." Plant Mol Biol **3**(3): 177-190.

Wollman, F. A. (2001). "State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus." EMBO J **20**(14): 3623-3630.

Zhang, H., et al. (2001). "Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome b₆f complex." J Biol Chem **276**(41): 38159-38165.

Zhang, L., et al. (2002). "Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga)." Planta **214**(4): 552-561.

Zito, F., et al. (1999). "The Q_o site of cytochrome b₆f complexes controls the activation of the LHCII kinase." EMBO J **18**(11): 2961-2969.



Zouni, A., et al. (2001). "Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution." Nature **409**(6821): 739-743.

