



HAL
open science

Caractérisation des mécanismes contrôlant l'agrégation, un processus de défense contre le stress chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*

Félix De Carpentier

► **To cite this version:**

Félix De Carpentier. Caractérisation des mécanismes contrôlant l'agrégation, un processus de défense contre le stress chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Interactions cellulaires [q-bio.CB]. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASB018 . tel-03341552

HAL Id: tel-03341552

<https://theses.hal.science/tel-03341552>

Submitted on 11 Sep 2021

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.

Caractérisation des mécanismes contrôlant
l'agrégation, un processus de défense
contre le stress chez l'algue unicellulaire
Chlamydomonas reinhardtii

Characterization of mechanisms controlling aggregation, a defense process in
response to stress in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 567 : Sciences du Végétal : du gène à l'écosystème (SEVE)
Spécialité de doctorat : Biologie
Unité de recherche : Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Eucaryotes (UMR8226)
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 30/03/2021, par**

Félix DE CARPENTIER

Composition du Jury

Marc HANIKENNE Directeur de recherche, F.R.S-FNRS-ULiège	Président
Angela FALCIATORE Directrice de recherche, CNRS-Paris	Rapporteur & examinatrice
Michel HAVAUX Directeur de recherche, CEA Cadarache	Rapporteur & examinateur
Raphaël JEANNERET Docteur, ENS-PSL	Examineur
Zhou XU Chargé de recherche, CNRS-Sorbonne Université	Examineur

Direction de la thèse

Antoine DANON Maître de conférences, Sorbonne Université	Directeur de thèse
---	--------------------

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier les membres du jury. Merci à Angela Falciatore et Michel Havaux qui ont donné beaucoup de leur temps pour évaluer cette thèse. Je remercie aussi Zhou Xu, Marc Hanikenne et Raphaël Jeanneret qui ont accepté d'être examinateurs. Tous les membres du jury ont accepté immédiatement et avec grand enthousiasme de participer et je les en remercie chaleureusement. Je suis certain que les remarques que vous ferez et discussions que nous aurons seront d'une grande valeur scientifique.

J'aimerais aussi remercier mon directeur de thèse, Antoine pour son soutien tout au long de ces quatre dernières années. Ce que j'ai le plus apprécié est la confiance dont tu as fait preuve à mon égard. Tu as supervisé mes travaux tout en me laissant une grande liberté pour diriger des stages, mettre au point des expériences, apprendre (et faire des erreurs).

La recherche est un processus collectif et mon parcours m'a appris l'importance d'une bonne ambiance au laboratoire. Je n'aurais pas pu mieux tomber, j'ai été accueilli dans une unité incroyable. Merci à ceux qui ont égayé les longues journées au laboratoire, les soirées au bar, les congrès, etc. : Pierre, Stéphane, Christophe, Marcio, Nicolas, Théo, Cynthia, Antoine, Prisca, Oznur, Julien, Mariette, Thomas, Isabelle, Ferdinand, Cyrielle, Héloïse, Achille, Bechara et Alexandre. J'insiste vraiment sur les bons moments que j'ai pu passer avec ces personnes car c'est une des raisons pour laquelle j'ai autant aimé faire cette thèse. Merci aussi pour les discussions scientifiques passionnantes et les conseils que nous avons pu échanger.

Mes remerciements vont aussi à mes parents, mes frères, ma sœur et l'ensemble de ma famille qui ont cru en moi depuis des années et m'ont permis de faire de ma passion mon travail. En outre, je n'oublierai jamais la fidélité dont mes amis ont fait preuve. Même si, absorbé par mon travail, je les ai parfois laissé tomber, ils ont toujours été au rendez-vous pour me faire oublier mon doctorat au moyen de soirées, de vacances, de week-ends, etc. Merci aux lillois, aux agros et aux parisiens, ils se reconnaîtront.

Enfin, je ne pourrai jamais remercier Agathe à la hauteur de son soutien. Ce n'est pas le lieu où étaler mes sentiments mais je sais que ce n'est pas facile de vivre avec un thésard absorbé par ses recherches bizarres jusqu'au bout de la nuit ! Merci Agathe d'avoir vécu ces années à mes côtés.

Sommaire

CHAPITRE I AGREGATION EN REPONSE AU STRESS : MISE EN EVIDENCE D'UN MOYEN DE DEFENSE DE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	1
1 Introduction	2
1.1 Réponses au stress chez <i>Chlamydomonas</i>	2
1.1.1 <i>Chlamydomonas</i> , un organisme unicellulaire modèle	2
1.1.2 When Unity Is Strength: The Strategies Used by <i>Chlamydomonas</i> to Survive Environmental Stresses	3
1.2 Comportements multicellulaires chez les organismes unicellulaires	20
1.2.1 Différentes structures multicellulaires	20
1.2.2 Structures multicellulaires en réponse au stress abiotique et la prédation	21
1.2.3 Mutualisme et agrégation inter-espèces	23
1.3 Morphologie et régulation des structures multicellulaires	24
1.3.1 Perception du stress et communication	24
1.3.2 Mode de formation des agrégats : clonal ou agrégatif	25
1.3.3 Matrice extracellulaire	27
1.3.4 Réversibilité : retour à la forme planctonique	28
1.4 Comment devenir multicellulaire et le rester ?	28
1.4.1 Innovations morphologiques et génétiques	28
1.4.2 Evolution expérimentale de la multicellularité	30
2 Résultats	31
2.1 Bases de l'agrégation chez <i>Chlamydomonas</i>	31
2.1.1 Résumé de l'article	31
2.1.2 Stress-induced collective behavior leads to the formation of multicellular structures and the survival of the unicellular alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	32
2.2 Caractérisation des autres mutants <i>socializer</i>	68
2.2.1 Création de la banque de mutants <i>saz</i>	68
2.2.2 Morphologie des mutants <i>saz</i>	68
2.3 Quantification de l'agrégation	70
2.3.1 Analyse d'image	70
2.3.2 Quantification de l'agrégation des mutants <i>saz</i>	71
2.4 Agrégation et résistance au stress	73
2.4.1 Analyse d'image	73
2.4.2 Résistance au stress des mutants <i>saz</i>	74
2.5 Mode de formation des agrégats : clonal ou agrégatif	75
2.5.1 Création d'une souche rapportrice	75
2.5.2 Mode d'agrégation des mutants <i>saz</i>	77
2.6 Rôle du compartiment extracellulaire dans l'agrégation	77
2.6.1 Effet du milieu extracellulaire des mutants <i>saz</i>	77
2.6.2 Tentative d'identification du type de molécules pro-agrégatives	78
2.7 Analyse transcriptomique des mutants <i>saz</i>	80
2.8 Génotype des mutants <i>saz</i>	83
2.8.1 Identification des gènes inactivés chez les mutants <i>saz</i>	83
2.8.2 Fonction des gènes identifiés chez les mutants <i>saz</i>	86
2.8.3 Complémentation de <i>saz3</i> avec <i>PPI</i>	88
2.8.4 Tentatives de complémentation de <i>saz1</i> avec <i>VLE</i>	91
2.8.5 Epissage de la cassette chez un mutant CLiP <i>vle</i>	94

2.8.6	Cluster d'agrégation du chromosome 6	96
3	Discussion	97
3.1	Mécanismes de l'agrégation	97
3.2	Régulation de l'agrégation	100
 CHAPITRE II NOUVEAUX OUTILS GENETIQUES POUR <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>		 103
1	Introduction au Clonage Modulaire	104
2	Biosenseur d'activités métacaspases	107
3	Nouveaux marqueurs de sélection	108
3.1	Chlamydomonas est sensible Trichothécènes	108
3.2	BSR comme marqueur de sélection chez Chlamydomonas	109
3.2.1	Résumé de l'article	109
3.2.2	Blasticidin S Deaminase: A New Efficient Selectable Marker for <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	109
4	Discussion	118
 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES		 119
1	Multicellularité	119
2	Biotechnologies	119
 MATERIEL ET METHODES		 121
1	Cultures et stress de Chlamydomonas	121
1.1	Souches et conditions de cultures	121
1.2	Stress	121
2	Quantification de l'agrégation et de la mort cellulaire	121
2.1	Matériel de capture et logiciels	121
2.2	Quantification de l'aire des particules	122
2.3	Quantification de la mortalité	122
3	Construction des plasmides	122
3.1	Clonage Modulaire	122
3.2	Gibson Assembly	123
4	Transformation de Chlamydomonas et cribles	124
4.1	Création de la banque de mutants <i>saz</i>	124
4.2	Autres transformations	124
5	Détection de l'insert	125
6	RT-qPCR	125

BIBLIOGRAPHIE	126
ANNEXES	143
1 Analyse protéomique	143
2 Analyse RNAseq	143
3 Birth of a Photosynthetic Chassis: A MoClo Toolkit Enabling Synthetic Biology in the Microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	143

Chapitre I

Agrégation en réponse au stress : mise en évidence d'un moyen de défense de *Chlamydomonas reinhardtii*

1 Introduction

1.1 Réponses au stress chez *Chlamydomonas*

1.1.1 *Chlamydomonas*, un organisme unicellulaire modèle

Chlamydomonas reinhardtii (nommé « *Chlamydomonas* » ci-après) est la microalgue modèle la plus utilisée pour des recherches fondamentales mais aussi pour des applications biotechnologiques. *Chlamydomonas* a, en effet, plusieurs avantages : elle est facile à cultiver en hétérotrophie ou autotrophie, sur milieu liquide ou solide et elle est haploïde, ce qui facilite grandement les expériences de génétique. Cette microalgue a permis, en particulier, d'étudier le fonctionnement de la photosynthèse puisqu'elle n'est pas indispensable à son fonctionnement, ou du flagelle du fait de l'importance fondamentale de cette structure chez certaines cellules animales (Salomé and Merchant, 2019). Ces avancées ont pu être réalisées grâce aux nombreux outils disponibles. En premier lieu, le génome est séquencé et annoté ce qui est une source d'information primordiale pour étudier la génétique et la biologie moléculaire de *Chlamydomonas* (Merchant et al., 2007). Le séquençage de ce génome a aussi permis la création d'une banque de mutants appelée CLiP (Li et al., 2019). Cette collection compte plus de 62 000 mutants couvrant environ 83% du génome. Ces mutants ont été générés par transformation qui est aussi une technique très facile à mettre en œuvre chez *Chlamydomonas* (Salomé and Merchant, 2019). La banque CLiP est utilisée pour trouver de nouvelles fonctions de gènes (Vilarrasa-Blasi et al., 2020) et faire de la génétique inverse chez *Chlamydomonas*, c'est-à-dire se procurer un ou plusieurs mutants pour un gène d'intérêt (www.chlamylibrary.org). Si aucun mutant n'est disponible pour un gène précis, il est possible d'en générer de façon ciblée par CRISPR-Cas9 (Greiner et al., 2017). De nombreux autres outils ont été adaptés à *Chlamydomonas* comme des promoteurs, des terminateurs, des marqueurs de sélection, des protéines fluorescentes, ou encore des miRNA. Ces briques moléculaires utilisées pour générer différentes constructions génétiques ont été regroupées sous formes de briques standardisées dans un kit de clonage modulaire (MoClo) que nous avons développé dans l'équipe (Annexe 3, Crozet et al., 2018), et enrichi au cours du temps (chapitre II.2, de Carpentier et al., 2020). Ce kit permet l'assemblage rapide et directionnel de constructions complexes par clonage Golden Gate (Engler et al., 2014). De plus, la standardisation du système permet un partage rapide des briques à toute la communauté (se référer au Chapitre II). Les avantages de *Chlamydomonas* et les outils disponibles en font un organisme adapté pour étudier de nombreux domaines dont la réponse au stress.

Lorsque les plantes font face à un environnement néfaste, les cellules coopèrent pour assurer la survie de l'individu. Par exemple, les pathogènes induisent la réaction hypersensible, c'est-à-dire que certaines cellules s'autodétruisent pour permettent aux autres de mieux survivre (Saur and Hükelhoven, 2021). Chez les unicellulaires comme *Chlamydomonas*, l'individu est composé d'une seule cellule et doit donc opter pour des stratégies différentes. Si les cellules possèdent des défenses individuelles, elles sont aussi capables de coopérer entre elles. Nous avons écrit une revue présentant ces réponses de *Chlamydomonas* au stress environnementaux (se référer à 1.1.2). Les défenses individuelles identifiées sont l'acclimatation

et le renforcement de la paroi. L'acclimatation est une réponse induite par l'environnement qui permet à l'organisme de survivre à de nouvelles expositions au stress. Chez *Chlamydomonas* l'acclimatation est induite par plusieurs stress, dont les ROS (Reactive Oxygen Species), et des facteurs de transcription ont été identifiés comme nécessaires à l'acclimatation (Ledford et al., 2007; Wakao et al., 2014). *Chlamydomonas* est aussi capable de modifier sa paroi pour mieux résister au stress et des microalgues proches, comme *Chlamydomonas nivalis*, prennent une forme de dormance appelée « cyste » en réponse à des conditions environnementales défavorables (Remias et al., 2005). Et, de façon remarquable, *Chlamydomonas* met en place des comportements collectifs. Cette socialisation comprend la mort cellulaire programmée (PCD) et la formation de structures multicellulaires. En effet, certaines cellules sont capables de s'autodétruire pour permettre une meilleure survie du reste de la population (Durand et al., 2011). Plusieurs structures multicellulaires de taille variable ont été identifiées en fonction du stress.

Les différentes réponses individuelles et collectives, leurs mécanismes et leurs régulations sont discutés dans la revue « *When Unity Is Strength: The Strategies Used by Chlamydomonas to Survive Environmental Stresses* » disponible ci-après.

1.1.2 When Unity Is Strength: The Strategies Used by *Chlamydomonas* to Survive Environmental Stresses

Review

When Unity Is Strength: The Strategies Used by *Chlamydomonas* to Survive Environmental Stresses

Félix de Carpentier ^{1,2}, Stéphane D. Lemaire ¹ and Antoine Danon ^{1,*}

¹ Institut de Biologie Physico-Chimique, UMR 8226, CNRS, Sorbonne Université, 75005 Paris, France; carpentier@ibpc.fr (F.d.C.); stephane.lemaire@ibpc.fr (S.D.L.)

² Faculty of Sciences, Doctoral School of Plant Sciences, Université Paris-Sud, Paris-Saclay, 91400 Orsay, France

* Correspondence: antoine.danon@ibpc.fr; Tel.: +33-158415100

Received: 13 September 2019; Accepted: 21 October 2019; Published: 23 October 2019



Abstract: The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is a valuable model system to study a wide spectrum of scientific fields, including responses to environmental conditions. Most studies are performed under optimal growth conditions or under mild stress. However, when environmental conditions become harsher, the behavior of this unicellular alga is less well known. In this review we will show that despite being a unicellular organism, *Chlamydomonas* can survive very severe environmental conditions. To do so, and depending on the intensity of the stress, the strategies used by *Chlamydomonas* can range from acclimation to the formation of multicellular structures, or involve programmed cell death.

Keywords: stress responses; acclimation; palmelloid; aggregation; programmed cell death

1. Introduction

The photosynthetic green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is the most prominent model organism in the green algae lineage for both basic research and biotechnological applications. One of the current challenges for a better understanding of the functioning of this unicellular model organism is to understand how it adapts to hostile environmental conditions. While the different stress response strategies of multicellular photosynthetic organisms are now well known (e.g., programmed cell death (PCD), hypersensitive reaction, and autophagy) [1], much less is known for unicellular organisms like *Chlamydomonas*. Nevertheless, several reports have described the response to environmental stresses of *Chlamydomonas*, showing how this alga is able to adapt and trigger specific responses according to the intensity of the stress it faces. For instance, in *Chlamydomonas*, like in other photosynthetic organisms, environmental stresses most often result in the disturbance of photosynthesis and the production of reactive oxygen species (ROS) [2–6]. The first line of defense aims at containing the occurrence of this oxidative stress by decreasing ROS production and increasing ROS degradation using multiple strategies, such as non-photochemical quenching [7], alternative electron transport pathways [7,8], or the activation of antioxidant enzymes and pathways [6]. If these strategies are not sufficient to limit the impact of environmental stresses on the cell, *Chlamydomonas* will trigger alternate processes. The first strategy is acclimation which consists of building stronger defenses to protect the cell against future stress episodes. If acclimation does not provide sufficient protection to the cell, the socialization processes will be triggered, which ranges from the formation of multicellular structures to the outbreak of PCD. In all cases, interaction between *Chlamydomonas* cells will allow survival under severe stress conditions. In this review, we will describe the different strategies implemented by *Chlamydomonas* to survive environmental stresses.

2. Coping Strategies for Moderate Stress

2.1. Acclimation: Building Defenses to Protect Cells from Future Stresses

Acclimation is regarded as an environmentally-induced, short-term response leading to an improved tolerance to subsequent stresses [9]. In *Chlamydomonas*, acclimated cells are known to survive stress that would kill non-acclimated cells. Acclimation has been shown to be induced by several stresses, including ROS [10,11], UV-B [12], salt [13], and ionic stress [14]. Interestingly ROS, such as hydrogen peroxide (H_2O_2) or superoxide (1O_2), induce specific acclimation pathways, and no cross acclimation between different ROS is observed [9,10]. Similarly, in plants, specific signaling pathways are associated with different ROS [15]. In *Chlamydomonas*, singlet oxygen acclimation is mediated by the key regulator SAK1 (singlet oxygen acclimation knocked-out 1) and the *sak1* mutant is unable to acclimate to 1O_2 [10]. SAK1 is a basic leucine zipper (bZIP) transcription factor that regulates the expression of important genes involved in acclimation, including *glutathione peroxidase*—*GPXH*, and *glutathione S-transferase*—*GSTS1* [10]. SOR1 (Singlet Oxygen Resistant 1) is also a bZIP transcription factor, and the corresponding mutant, which is more resistant to 1O_2 , has higher levels of *GPXH* and *GSTS1* transcripts [16].

It seems that at least some of the mechanisms controlling acclimation in *Chlamydomonas* are conserved in plants. For example UV-B acclimation in plants is mainly controlled by UVR8 (UV resistance locus 8) that interacts with COP1 (constitutively photomorphogenic 1) to induce a signaling pathway involving the bZIP transcription factors HY5 (elongated hypocotyl 5) and HYH (HY5 homolog) [17]. In *Chlamydomonas*, the roles of UVR8 and COP1 appear to be similar, suggesting a very early evolution of UV-B acclimation in photosynthetic organisms [12].

Acclimation is triggered in conditions of moderate stress that do not kill cells. While in the face of harsher stresses, *Chlamydomonas* will be able to enable a range of alternate strategies involving interaction between multiple cells and/or programmed cell death (Figure 1).

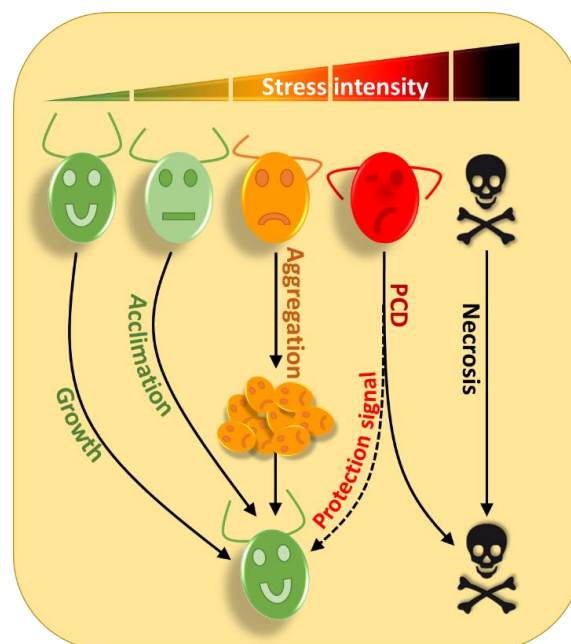


Figure 1. The strategies used by *Chlamydomonas* to survive increasing stress intensities. Under optimal conditions *Chlamydomonas* can grow normally (green cell); under moderate stress conditions (light green cell), several acclimation processes can be triggered to allow the cells to better adapt and resist the occurrence of any additional stress of similar or greater magnitude. Under more intense stress conditions (orange cell), cells can form multicellular structures such as palmelloids or aggregates that can dissociate when environmental conditions improve.

Under very harsh stress conditions (red cell), the most exposed cells will self-destruct and release in the medium, molecules that will allow other cells to survive, to avoid the disappearance of the entire population. In the case of a stress of an intensity such that the cell cannot overcome (skull), the cell is physically destroyed by its environment through necrosis.

2.2. Protection by Degradation

There are two main degradative pathways to recycle cellular components in eukaryotic cells: the ubiquitin-proteasome system (UPS) and autophagy.

UPS is a degradation pathway that allows eukaryotic cells to control the abundance of numerous cellular proteins [18,19]. Ubiquitinated proteins are targeted for degradation by the proteasome, a multiproteic complex. In *Chlamydomonas*, UPS was found to be activated by stresses such as chloroplast damage [20], cold stress [21], copper [22], arsenate [23], metal nanoparticles [24], or selenite [25]. Selenite stress is associated with ROS production, which can inhibit UPS at a high concentration [25], as previously reported in mammals [26]. This could indicate that in the face of harsh stress conditions, UPS is not sufficient and more dramatic responses have to be triggered. In plants, UPS plays a prominent role in stress responses by degrading specific transcription factors [27,28]. It would be interesting to determine if such mechanisms are conserved in *Chlamydomonas*.

Autophagy is a catabolic membrane-trafficking process where cytosolic components, including proteins and membranes, are enclosed selectively or non-selectively within a double membrane vesicle, termed the autophagosome, and delivered to the vacuole or lysosome for degradation by resident hydrolases [29,30]. Autophagy usually occurs at a low, basal level under optimal growth and is activated upon stress in order to maintain cellular homeostasis. It is a pro-survival mechanism under stress conditions allowing cells to eliminate damaged cellular elements and recycle them into essential components [31]. Selective forms of autophagy exist in plants, such as chlorophagy [32] or mitophagy [33] but have not yet been reported in *Chlamydomonas*. Nevertheless, in *Chlamydomonas*, non-selective autophagy, i.e., macroautophagy (hereafter referred to as 'autophagy'), which degrades cytosolic components, has been extensively studied during the last decade [34,35]. Autophagy is well conserved among eukaryotes and is mediated by AuTophagy-related (ATG) genes [36]. The main role of ATG proteins is the formation and regulation of autophagosomes where damaged components will be imported. In *Chlamydomonas*, autophagy is strongly induced under different stress conditions, including nitrogen or carbon starvation [37,38], endoplasmic reticulum stress (accumulation of unfolded proteins) [39], the impairment of starch biosynthesis [40], metal exposure [41], high-light, and carotenoid deficiency [42]. The study of ATG mutants shows that autophagy is essential for cell survival, chlorophyll content, and starch accumulation during nutrient starvation [34]. ROS appears to play a major role in the control of autophagy in all organisms, including plants and algae; they have been proposed to constitute a link between the perception of stress and autophagy induction [43]. The intracellular redox state was found to control autophagosome formation and the small disulfide oxidoreductase thioredoxin plays an important role through regulation of the activity of the Atg4 protease in both *Saccharomyces cerevisiae* [44] and *Chlamydomonas* [45]. In addition, oxidative stress triggered by endoplasmic reticulum (ER) stress plays a role in the induction of autophagy [39]. Therefore UPS and autophagy are induced under moderate stress conditions, probably through ROS signaling, to eliminate toxic molecules and recycle nutrients that will allow survival until a return to optimal conditions. However, under extreme stress conditions, alternate processes are required to allow cell survival (Figure 1).

3. Socialization Allows for Better Resistance to Severe Stress

3.1. Multicellular Structures: Stronger Together

When confronted with harsh environmental stress conditions, adaptation processes are not sufficient to survive and *Chlamydomonas* cells interact to form two types of multicellular structures:

palmelloids and aggregates (Figure 2). The name “palmelloid” comes from the resemblance of this structure with the alga *Palmella* [46]. Palmelloids are composed of 4 to 16 cells surrounded by a cell wall and are the result of successive divisions induced by stress without degradation of the cell wall.

In *Chlamydomonas*, stress induced palmelloid formation was initially reported by Iwasa and Murakami in the presence of organic acids [47]. Since then, a few studies have described palmelloid formation in response to a diversity of stresses (Table 1). Palmelloids can be induced by biotic and abiotic stresses in *Chlamydomonas*, and palmelloid-like structures have been reported in other green algae, such as *Scenedesmus* or *Chlorella*, suggesting that this mechanisms of stress response may be conserved in green algae [48,49].

Table 1. Multicellular structure formation in response to stress in *Chlamydomonas*. In response to different types of biotic or abiotic stresses and depending on their intensity, *Chlamydomonas* can form palmelloids or aggregates, suggesting that socialization may be a conserved mechanism that help algal cells adapt to harsh environmental conditions.

Behavior	Stress	Conditions	Reference	
Palmelloids	Predator	<i>Brachionus calyciflorus</i>	[50]	
	Organic acids (succinate, fumarate, aspartate, glutamate, glycolate, citrate, phthalate)	0.15–5%	[47]	
	EDTA, GEDTA	1.25 mM	[51]	
	Calcium deficiency	<3.5 μ M		
	Phosphorous deficiency	<1 μ g/L	[52]	
	Cadmium	200–400 μ M	[53]	
	NaCl		300–700 mM	[54]
			100–150 mM	[55]
			50–150 mM	[56]
	Acidic pH	pH 4.4	[57]	
	Chloroplatinic acid	50 μ M	[58,59]	
Aggregates	Predator	<i>Brachionus calyciflorus</i>	[50]	
		<i>Peranema trichophorum</i>	[60]	
	Acidic pH	pH 3.4	[57]	
		pH 2.5–pH 4		
	Basic pH	pH 10–pH 13	[61]	
	FeCl ₃ , CaCl ₂ , MgCl ₂	1–10 mM		
Naphthenic acids	100 mg/L	[62]		

In their natural environment, microalgae, as primary producers, are surrounded by grazers able to ingest algal cells [63]. A common defensive strategy employed by algae is to form colonies or palmelloids to exceed the upper size limit for ingestion. The rotifer predator *Brachionus calyciflorus* is indeed able to induce palmelloidation of *Chlamydomonas* within a day [50]. Palmelloid formation has also been observed under abiotic stress conditions (Table 1). During palmelloidation induced by NaCl, Khona and colleagues showed that inside the palmelloid, a stress dependent exopolysaccharides matrix is generated, probably for cell protection [55]. Inhibition of the destruction of the wall surrounding palmelloids may participate in their stabilization and could be mediated by inactivation of specific metalloproteinases (MMP) [55]. When conditions are favorable again, palmelloids dissociate rapidly; in less than an hour, and cells start to divide again (Figure 2) [55]. In case of prolonged or excessive stress, the cells remain in palmelloid form but will eventually die, through a process that may involve programmed cell death [54,55]. Proteomic analysis of the medium surrounding palmelloids indicates that the abundance of several hydroxyproline-rich glycoprotein (HPRG), such as

pherophorins and MMPs, increases during palmelloid dissociation [55], suggesting that the medium could play an important regulatory role in this process. Interestingly, cells in palmelloids were found to contain more autophagic vesicles, suggesting that both autophagy and palmelloidation processes could be initiated concomitantly or that cells first induce acclimation before engaging in the path of palmelloidation [35].

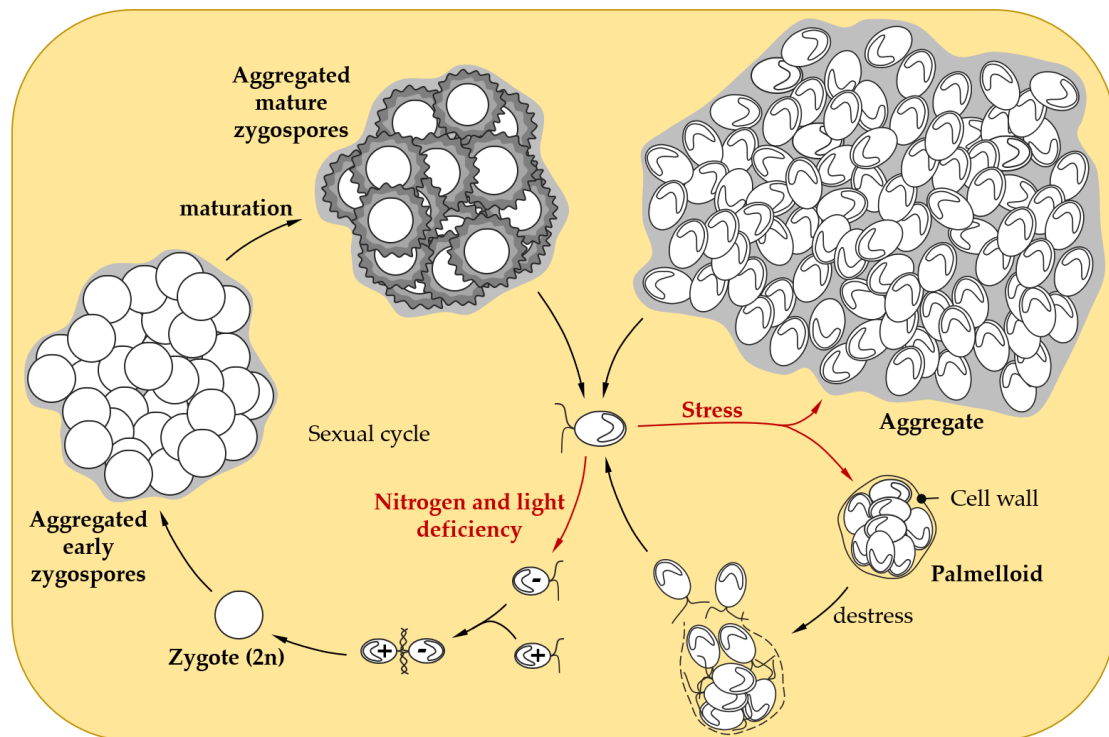


Figure 2. Social behavior in response to stress in *Chlamydomonas*. When facing adverse conditions, *Chlamydomonas* vegetative cells can form palmelloids, a cluster of 4 to 16 cells surrounded by a cell wall resulting from the division of a single cell. As soon as the environmental conditions improve, the outer cell wall is hatched, to allow the liberation of daughter cells [55]. When confronted with harsher stress conditions, *Chlamydomonas* cells are able to form larger multicellular structures called aggregates that might confer stress tolerance [60,61]. Under conditions of non-optimal growth (e.g., nitrogen or light limitation), *Chlamydomonas* can induce gamete differentiation to enable sexual reproduction, which leads to zygote formation after the mating of gametes. Maturation of the zygospore confers resistance to environmental stresses, such as desiccation [64]. In liquid cultures, early and mature zygospores can form aggregates, that could further enhance resistance to stress [65–67].

In more severe conditions, the size of palmelloids may be too limited to allow survival and *Chlamydomonas* forms larger multicellular structures called aggregates or flocculates (hereafter referred to as “aggregates”). Palmelloids and aggregates are distinct structures. Aggregates are formed by a few tens, to several thousand cells, held together in an extracellular matrix, whereas palmelloids are composed of 4 to 16 cells surrounded by a cell wall (Figure 2).

Aggregation can be induced by predators, such as *Peranema trichophorum* (Euglenoidea), forming multicellular structures containing up to 100,000 *Chlamydomonas* cells [60]. Aggregated cells can secrete a mucous extracellular matrix (ECM) that may improve resistance to digestion [50,64]. Interestingly, strains of *Chlamydomonas* with smaller cells that are more easily engulfed by *Peranema* but are also slow-swimming, were found to form more aggregates compared to large fast-swimming strains [60].

The formation of aggregates may result either from agglutination of cells or from consecutive cell divisions without cell separation. When aggregation was induced in a mixed population of *Chlamydomonas* strains by the *Peranema* predator, the aggregates were found to be composed of cells

from the different strains [60]. In addition, the mixing of a stained population with an unstained one also resulted in the formation of mixed aggregates [60]. This suggests that *Peranema* induces aggregation by the agglutination of cells. By contrast, aggregates of *Chlamydomonas* induced by a rotifer predator were formed only in the presence of light, suggesting that active growth may be required and that the aggregates result from consecutive divisions [50]. Therefore, multiple mechanisms of aggregate formation may exist. Unraveling these mechanisms will require more extensive cellular and molecular studies under a wide range of stresses.

Abiotic stresses, such as acidic or basic pH, can also induce aggregation (Table 1). *Chlamydomonas* culture medium is usually adjusted to pH 7. Basic pH is an efficient inducer of aggregation, especially above 10, where cations such as Ca^{2+} and Mg^{2+} form precipitates which are suggested to trigger aggregation [61]. Aggregation at low and high pH is correlated with a raise of the zeta potential [61]. The zeta potential characterizes the surface charge of a particle [65]. When aggregation is induced in *Chlamydomonas* by cationic cassia, a biopolymer, a shift of zeta potential is also observed [66]. It is, therefore, conceivable that by modifying the charge of the surface of *Chlamydomonas* cells, their ability to interact with each other would be modified and that a rise of the cell surface zeta potential might be important for aggregation.

In several studies, the mechanisms of aggregation in *Chlamydomonas* have been confronted with other species capable of forming multicellular structures. The self-flocculating yeast *Saccharomyces bayanus* was shown to induce *Chlamydomonas* aggregation, indicating that similarities in the aggregation process could exist between these two unicellular organisms [67]. In *Saccharomyces*, flocculation is mainly controlled by *flocculin* (*FLO*) genes [68,69] for which no homologs are present in *Chlamydomonas* genome [70]. Nevertheless, the expression of yeast *FLO5* in *Chlamydomonas* was shown to induce aggregation [71]. *FLO5* is a lectin, a family of calcium dependent glycoproteins. Interestingly, concanavalin A, a plant lectin, is also able to induce aggregation in *Chlamydomonas* [67], maybe through binding to the flagella of vegetative cells [72,73]. The role of flagella seems to be important, since during aggregation induced by a predator, cell mobility was impaired although the flagella remained intact and active [74], and strains lacking flagella aggregated much less in response to pH stress [61]. Altogether these results suggest that, as in yeasts and plants, lectins could also play a role in the control of aggregation in *Chlamydomonas*, maybe in connection with flagella. Twenty genes containing a lectin-C domain have been identified in the *Chlamydomonas* genome [75] but their possible role in controlling aggregation remains to be explored.

Volvox carteri, a multicellular organism, belonging like *Chlamydomonas* to the order of Volvocales, uses an ECM mainly composed of HPRG to hold cells together. The heterologous expression of Volvox Algal-CAM (Cell Adhesion Molecule) is able to induce aggregation in *Chlamydomonas* [76]. Algal-CAM is a HPRG exhibiting an N-terminal extensin-like domain and two fasciclin1 (*FAS1*) domains. *FAS1* is known to mediate cell-cell adhesion in many organisms, such as bacteria, fungi, plants, and algae [77,78]. The *Chlamydomonas* genome encodes five proteins showing identity with Algal-CAM, called *FAS2*, *FAS3*, *FAS4*, *FAS7*, and a Periostin-related protein (Cre17.g745097) [70], whose role in the aggregation process remains to be explored.

More than twenty-five examples of transitions from uni to multi-cellular organization have been reported in diverse phylogenetic groups [79]. Volvocales, with their colonial organisms like *Volvox* or *Gonium* and unicellular relatives like *Chlamydomonas*, are excellent models to study the evolutionary pathways leading from unicellularity to multicellularity [80,81]. Selection of *Chlamydomonas* sedimented cells (multicellular structures) through multiple generations allowed researchers to detect de novo multicellular forms [82]. Predation has also been used to create de novo multicellular *Chlamydomonas* lineages. Using selection in the presence of a ciliate predator (*Paramecium tetraurelia*), *Chlamydomonas*' multicellular structures appeared after roughly 750 generations [83]. Since multicellular structures can be generated in response to specific stress conditions, it is conceivable that there is a link between stress responses, evolution, and the transition from unicellularity to multicellularity [81,84].

3.2. Programmed Cell Death: Suicide for the Good of the Community

Programmed cell death was identified in animals in 1972 on the basis of morphological criteria [85], and over the years, additional cellular hallmarks were found to distinguish PCD from necrosis, the accidental cell death. Mitochondria were found to play a crucial role in the control of PCD, and signals emanating from this organelle (particularly cytochrome C and apoptotic protease activating factor-1) lead to irreversible destruction of the cell [29]. This process starts with the activation of caspases, a family of proteases specifically induced during PCD. Caspases are cysteine proteases cleaving proteins after an aspartate residue, the specificity being conferred by the three amino acids preceding the aspartate [86]. The specific activities of the different caspases can be measured using artificial peptides as substrates. These peptides are often coupled to fluorophores, allowing detection of caspase activities by measuring changes in the fluorescence signal. Caspases can be inhibited using the same peptides coupled to aldehyde (CHO, reversible inhibition) or methylketone radicals (CMK, FMK: irreversible inhibition). During PCD, several caspases are activated for degradation of specific targets, resulting in DNA and nucleus fragmentation, dismantling of the cell, and the formation of apoptotic bodies [87]. The specific degradation of DNA during PCD is detectable in situ by the TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) reaction. It can also be visualized through gel electrophoresis by the specific appearance of a DNA ladder of 180 base pairs, the size of a nucleosome, whereas DNA degradation during necrosis is random and results in a smear [88].

Although it adopts variable forms, PCD exists in all multicellular organisms, where it is required for homeostasis, various developmental processes, and resistance to biotic or abiotic stresses [89]. If for a multicellular organism, it is clear that the disappearance of certain cells by PCD can be beneficial to the whole individual (to eliminate cells infected by a pathogen or abnormal cells for example), for a unicellular organism like *Chlamydomonas*, it seems paradoxical that PCD could exist, as it would result in the destruction of the organism itself. However, a few examples of PCD have been described in microorganisms, including, bacteria, yeasts, and microalgae [90–92]. In recent years, several teams have attempted to identify specific criteria for PCD in *Chlamydomonas*. In particular, it has been shown that during death induced by different stresses, caspase-like activities are induced and specific inhibitors are able to block these activities but also cell death [93–95]. Like land plants, *Chlamydomonas* does not appear to encode canonical caspases; however, other types of proteases have been shown to be responsible for caspase-like activities in plants [96,97]. *Chlamydomonas* contains two metacaspase genes, *MC1* and *MC2* [70]. In animals and plants, metacaspases are arginine and lysine-specific proteases which are involved in PCD induction [98,99]. This role might be conserved in *Chlamydomonas*, since *MC* genes were found to be induced during oxidative stress [100]. Therefore, the exact function of *Chlamydomonas* *MC1* and *MC2* will have to be clarified, for example, using knockout mutants.

The specific degradation of DNA during PCD has also been described in *Chlamydomonas* in response to different stresses, and could be detected by TUNEL or by the detection of a DNA ladder by electrophoresis [93–95,101–103]. Other markers of PCD have also been detected in *Chlamydomonas*, such as phosphatidylserine membrane translocation by annexin V [102] or fragmentation of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) [95]. Altogether these results suggest that a PCD-like process exists in *Chlamydomonas*, while the very reason for its existence remains to be established. Several studies have attempted to address this question by inducing PCD using heat shock [103] or UV-C [102]. In both cases the principle was to induce PCD in a culture, then to get rid of the cells to recover only the pre-conditioned “PCD” culture medium where fresh cells are inoculated, grown, and treated with the same stress that induced PCD in the first part of the experiment. The authors found that the cells placed in the PCD medium were more resistant than control cells [102,103]. Thus, the most exposed cells would be destroyed by PCD and could release into the medium, molecules capable of helping remaining cells of the population to better resist to death. This suggests that PCD should be considered as a pro-survival mechanism at the level of the whole population (Figure 1). These results also indicate that the culture medium has a fundamental role and allows cells to communicate to better adapt to their environment. The identification of molecules involved in cell to cell communications and

enabling increased resistance to stress would be a major milestone for understanding this peculiar type of survival mechanism.

4. Cellular Reinforcement Strategies

4.1. The Cell Wall: The Last Defender

The cell wall plays an important role in the mechanisms allowing the protection of *Chlamydomonas* from environmental stresses. It is mainly composed of HPRGs [104], whose nature is likely to change according to environmental conditions. Consistently, cell wall-less strains are less resistant to metals such as cadmium, cobalt, copper, and nickel [105–107]. The cell wall has been reported to be modified by environmental conditions, including high-CO₂, the presence of singlet oxygen, sulfur deprivation, or an acidic pH [9,57,108,109]. High-CO₂ cells produce different HPRGs and MMPs [108]; under sulfur starvation the profile of extracellular proteins is strongly modified [109,110]; and incubation at pH 3.4 induces significant thickening of the cell wall [57].

In nutrient-limiting conditions, cell wall thickening can lead to *Daphnia* resistance in *Chlamydomonas* [111]. Indeed, *Chlamydomonas* is able to resist digestion in the gut of its predator *Daphnia*, while cell wall-less strains are digested [111–113]. This may be crucial for survival of the population under nutrient-limiting conditions where the cell cycle is arrested, and therefore, every single life matters for the population to survive. In open-water ecosystems, a *Chlamydomonas* population could remain at equilibrium thanks to this mechanism of resistance to digestion [111,114]. It has also been proposed that the passage through the gut allows *Chlamydomonas* to take up nutrients from *Daphnia* [64]. A complete cell wall does not seem to be crucial for aggregation, as cellwall-less strains are also able to generate aggregates [61,76,115]. The role of the cell wall in the stress response has also been highlighted in cysts, where a thicker cell wall helps the cell to resist to extreme conditions.

In *Chlamydomonas*, strains used for genetic or reverse genetic experiments are usually cell-wall-deficient because of their higher transformation efficiencies [116]. Therefore special attention should be paid to studies on stress resistance using such strains.

4.2. Cyst: Surviving Extreme Conditions

If, like Charles Darwin, you were walking in the snows of the Andes mountains, European Alps, Antarctica, or Alaska, you might encounter the strange phenomenon of red snow [117,118]. This pink–red coloration of the snow is due to extremophile microalgae living in these hostile environments. The red snow appears in the spring/summer melting snows, at the onset of high intensities of sun radiation [119,120]. Most of snow algae are members of the Volvocales order [117]. This is a striking example of the ability of some photosynthetic microorganisms to survive under very harsh conditions, such as very low temperature, drought, starvation, and high radiation [121,122]. For instance, *Chlamydomonas nivalis* turns red in response to environmental stress, where it becomes a cyst (also named “aplanospore” or “hypnospore”) [120,121]. In *Haematococcus pluvialis*, similar encystment has been shown to be triggered by stress conditions [123], including nutrient deprivation [124], high light [125], salinity [126,127], or high or low temperatures [128]. The red pigmentation is mainly due to the accumulation of astaxanthin [129] which is produced from β -carotenes through the xanthophyll cycle using the beta-carotene ketolase (BKT) [130,131]. The very large amount of cytoplasmic astaxanthin esters acts like a filter that absorbs the excess of light that could lead to photoinhibition and photooxidative damages [121,122,132,133]. A homologue of the BKT gene exists in *Chlamydomonas*, although its expression level and the amount of astaxanthin are very low [134,135]; therefore, the link between BKT, astaxanthin, and stress responses, remains to be investigated. A first step may have been taken by Perozeni and colleagues, who managed to produce astaxanthin in *Chlamydomonas reinhardtii* by overexpressing a re-designed version of BKT [134].

4.3. Zygospore: When Sex Comes to the Rescue

In environmental stress conditions, *Chlamydomonas* haploid cells can differentiate into gametes which can mate to form diploid zygotes (Figure 2). In *Chlamydomonas*, gametogenesis have been shown to be triggered by nitrogen starvation and light variations [136], but in related organisms such as Volvox, ROS can also induce sexual behavior [137], suggesting that a greater variety of stresses could induce this differentiation in *Chlamydomonas*. The zygote-specific wall is better adapted to stress, as it is thicker and reinforced by isodityrosine cross-linking of proteins [138], and transglutamination linking lysine to glutamine [139]. Additionally, its cell wall is composed of different HPRGs [140,141], some of which are only present in the zygote, such as ZSP1 and ZSP2 (zygotic serine-proline rich) [142,143]. Recently, a giant type I polyketide synthase (PKS1) was shown to be involved in zygospore maturation [143]. The *PKS1* gene is strongly overexpressed within a few days after the mating. The *pks1* mutant does not survive desiccation but is still able to germinate, suggesting that PKS1 is rather involved in stress resistance of the zygospore rather than in mating. PKS1 is mandatory for the formation of knob-like structures on the cell surface and contributes to the construction of the cell wall central layer [143,144]. This cell wall organization allows the cells to survive hostile environments, such as darkness, desiccation, starvation, and freezing [143,145–147]. For instance, zygospores can allow survival during the winter and can germinate when temperatures increase to release haploid cells [146]. Moreover zygospores can aggregate into clumps (Figure 2) that are extremely difficult to break up [142,144,148], and could provide additional resistance to extreme environmental stresses.

5. Conclusions

A better knowledge of the mechanisms controlling stress responses in *Chlamydomonas* is important both for basic research and biotechnological applications. Fundamental research may help in understanding how unicellular algae are able to withstand very unfavorable environmental conditions. We have seen specific socialization mechanisms implied, for which next to nothing is known, although this process may be central in the transition from uni to multicellularity. It would be interesting to understand which genes and signals are involved in controlling the dialogue between cells that results in multicellular structure formation but also PCD. A major goal would be to identify the molecules released into the medium by dying cells to help other cells survive unfavorable conditions. These molecules could be of great interest for many fields and applications. Understanding stress responses in *Chlamydomonas* may allow engineering microalgae for improved growth under harsh industrial conditions or high light intensities, and thereby increase the productivity and economic viability of large-scale cultures of microalgae. Cell aggregation could also prove to be a very interesting process to develop alternate and cheap methods for harvesting microalgae [149,150].

Author Contributions: All authors contributed to the writing of the review.

Funding: This research and the APC were funded by Centre national de la Recherche Scientifique, Sorbonne Université, Université Paris-Saclay and Agence Nationale de la Recherche LABEX DYNAMO ANR-LABX-011.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Dickman, M.; Williams, B.; Li, Y.; de Figueiredo, P.; Wolpert, T. Reassessing apoptosis in plants. *Nat. Plants* **2017**, *3*, 773–779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Prasad, A.; Ferretti, U.; Sedlářová, M.; Pospíšil, P. Singlet oxygen production in *Chlamydomonas reinhardtii* under heat stress. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 20094. [[CrossRef](#)]
3. Du, Z.-Y.; Lucker, B.F.; Zienkiewicz, K.; Miller, T.E.; Zienkiewicz, A.; Sears, B.B.; Kramer, D.M.; Benning, C. Galactoglycerolipid Lipase PGD1 Is Involved in Thylakoid Membrane Remodeling in Response to Adverse Environmental Conditions in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **2018**, *30*, 447–465. [[CrossRef](#)]

4. Nagy, V.; Vidal-Meireles, A.; Podmaniczki, A.; Szentmihályi, K.; Rákhely, G.; Zsigmond, L.; Kovács, L.; Tóth, S.Z. The mechanism of photosystem-II inactivation during sulphur deprivation-induced H₂ production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **2018**, *94*, 548–561. [[CrossRef](#)]
5. Stoiber, T.L.; Shafer, M.M.; Armstrong, D.E. Induction of reactive oxygen species in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to contrasting trace metal exposures. *Environ. Toxicol.* **2013**, *28*, 516–523. [[CrossRef](#)]
6. Laloi, C.; Apel, K.; Danon, A. Reactive oxygen signalling: The latest news. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2004**, *7*, 323–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Erickson, E.; Wakao, S.; Niyogi, K.K. Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **2015**, *82*, 449–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Jokel, M.; Johnson, X.; Peltier, G.; Aro, E.-M.; Allahverdiyeva, Y. Hunting the main player enabling *Chlamydomonas reinhardtii* growth under fluctuating light. *Plant J.* **2018**, *94*, 822–835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Ledford, H.K.; Chin, B.L.; Niyogi, K.K. Acclimation to singlet oxygen stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* **2007**, *6*, 919–930. [[CrossRef](#)]
10. Wakao, S.; Chin, B.L.; Ledford, H.K.; Dent, R.M.; Casero, D.; Pellegrini, M.; Merchant, S.S.; Niyogi, K.K. Phosphoprotein SAK1 is a regulator of acclimation to singlet oxygen in *Chlamydomonas reinhardtii*. *eLife* **2014**, *3*, e02286. [[CrossRef](#)]
11. Fischer, B.B.; Eggen, R.I.; Niyogi, K.K. Characterization of singlet oxygen-accumulating mutants isolated in a screen for altered oxidative stress response in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Plant. Biol.* **2010**, *10*, 279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Tilbrook, K.; Dubois, M.; Crocco, C.D.; Yin, R.; Chappuis, R.; Alloreant, G.; Schmid-Siegert, E.; Goldschmidt-Clermont, M.; Ulm, R. UV-B Perception and Acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **2016**, *28*, 966–983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Meijer, H.J.G.; van Himbergen, J.A.J.; Musgrave, A.; Munnik, T. Acclimation to salt modifies the activation of several osmotic stress-activated lipid signalling pathways in *Chlamydomonas*. *Phytochemistry* **2017**, *135*, 64–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Charles, E.D.; Muhamadali, H.; Goodacre, R.; Pittman, J.K. Biochemical signatures of acclimation by *Chlamydomonas reinhardtii* to different ionic stresses. *Algal Res.* **2019**, *37*, 83–91. [[CrossRef](#)]
15. Laloi, C.; Stachowiak, M.; Pers-Kamczyc, E.; Warzych, E.; Murgia, I.; Apel, K. Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 672–677. [[CrossRef](#)]
16. Fischer, B.B.; Ledford, H.K.; Wakao, S.; Huang, S.G.; Casero, D.; Pellegrini, M.; Merchant, S.S.; Koller, A.; Eggen, R.I.L.; Niyogi, K.K. SINGLET OXYGEN RESISTANT 1 links reactive electrophile signaling to singlet oxygen acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, E1302–E1311. [[CrossRef](#)]
17. Liang, T.; Yang, Y.; Liu, H. Signal transduction mediated by the plant UV-B photoreceptor UVR8. *New Phytol.* **2019**, *221*, 1247–1252. [[CrossRef](#)]
18. Budenholzer, L.; Cheng, C.L.; Li, Y.; Hochstrasser, M. Proteasome Structure and Assembly. *J. Mol. Biol.* **2017**, *429*, 3500–3524. [[CrossRef](#)]
19. Smalle, J.; Vierstra, R.D. The Ubiquitin 26s Proteasome Proteolytic Pathway. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **2004**, *55*, 555–590. [[CrossRef](#)]
20. Heredia-Martínez, L.G.; Andrés-Garrido, A.; Martínez-Force, E.; Pérez-Pérez, M.E.; Crespo, J.L. Chloroplast Damage Induced by the Inhibition of Fatty Acid Synthesis Triggers Autophagy in *Chlamydomonas*. *Plant. Physiol.* **2018**, *178*, 1112–1129. [[CrossRef](#)]
21. Valledor, L.; Furuhashi, T.; Hanak, A.-M.; Weckwerth, W. Systemic Cold Stress Adaptation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12*, 2032–2047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Jamers, A.; Van der Ven, K.; Moens, L.; Robbens, J.; Potters, G.; Guisez, Y.; Blust, R.; De Coen, W. Effect of copper exposure on gene expression profiles in *Chlamydomonas reinhardtii* based on microarray analysis. *Aquat. Toxicol.* **2006**, *80*, 249–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Chamari, W.; Harry, K.; Belinda, W.; Robert, W. Differential Proteome Analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* Response to Arsenic Exposure. *Am. J. Plant. Sci.* **2012**, *3*, 764.
24. Simon, D.F.; Domingos, R.F.; Hauser, C.; Hutchins, C.M.; Zerges, W.; Wilkinson, K.J. Transcriptome sequencing (RNA-seq) analysis of the effects of metal nanoparticle exposure on the transcriptome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 4774–4785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Vallentine, P.; Hung, C.-Y.; Xie, J.; Van Hoewyk, D. The ubiquitin–proteasome pathway protects *Chlamydomonas reinhardtii* against selenite toxicity, but is impaired as reactive oxygen species accumulate. *AoB Plants* **2014**, *6*, plu062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Shang, F.; Taylor, A. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 5–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Stone, S.L. Role of the Ubiquitin Proteasome System in Plant Response to Abiotic Stress. In *International Review of Cell and Molecular Biology*; Galluzzi, L., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; Volume 343, pp. 65–110.
28. Lyzenga, W.J.; Stone, S.L. Abiotic stress tolerance mediated by protein ubiquitination. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 599–616. [[CrossRef](#)]
29. Wang, C.; Youle, R.J. The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* **2009**, *43*, 95–118. [[CrossRef](#)]
30. Nakatogawa, H.; Suzuki, K.; Kamada, Y.; Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: Lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 458–467. [[CrossRef](#)]
31. Avin-Wittenberg, T. Autophagy and its role in plant abiotic stress management. *Plant. Cell Environ.* **2019**, *42*, 1045–1053. [[CrossRef](#)]
32. Izumi, M.; Ishida, H.; Nakamura, S.; Hidema, J. Entire Photodamaged Chloroplasts Are Transported to the Central Vacuole by Autophagy. *Plant. Cell* **2017**, *29*, 377–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Broda, M.; Millar, A.H.; Van Aken, O. Mitophagy: A Mechanism for Plant Growth and Survival. *Trends Plant. Sci.* **2018**, *23*, 434–450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kajikawa, M.; Yamauchi, M.; Shinkawa, H.; Tanaka, M.; Hatano, K.; Nishimura, Y.; Kato, M.; Fukuzawa, H. Isolation and Characterization of *Chlamydomonas* Autophagy-Related Mutants in Nutrient-Deficient Conditions. *Plant. Cell Physiol.* **2019**, *60*, 126–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Pérez-Pérez, M.E.; Couso, I.; Heredia-Martínez, L.G.; Crespo, J.L. Monitoring Autophagy in the Model Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cells* **2017**, *6*, 36. [[CrossRef](#)]
36. Wesselborg, S.; Stork, B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: From hierarchies to networks. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 4721–4757. [[CrossRef](#)]
37. Pérez-Pérez, M.E.; Florencio, F.J.; Crespo, J.L. Inhibition of Target of Rapamycin Signaling and Stress Activate Autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. Physiol.* **2010**, *152*, 1874–1888. [[CrossRef](#)]
38. Goodenough, U.; Blaby, I.; Casero, D.; Gallaher, S.D.; Goodson, C.; Johnson, S.; Lee, J.-H.; Merchant, S.S.; Pellegrini, M.; Roth, R.; et al. The Path to Triacylglyceride Obesity in the sta6 Strain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* **2014**, *13*, 591–613. [[CrossRef](#)]
39. Pérez-Martín, M.; Pérez-Pérez, M.E.; Lemaire, S.D.; Crespo, J.L. Oxidative Stress Contributes to Autophagy Induction in Response to Endoplasmic Reticulum Stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. Physiol.* **2014**, *166*, 997–1008. [[CrossRef](#)]
40. Tran, Q.-G.; Cho, K.; Park, S.-B.; Kim, U.; Lee, Y.J.; Kim, H.-S. Impairment of starch biosynthesis results in elevated oxidative stress and autophagy activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9856. [[CrossRef](#)]
41. Pérez-Martín, M.; Blaby-Haas, C.E.; Pérez-Pérez, M.E.; Andrés-Garrido, A.; Blaby, I.K.; Merchant, S.S.; Crespo, J.L. Activation of Autophagy by Metals in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* **2015**, *14*, 964–973. [[CrossRef](#)]
42. Pérez-Pérez, M.E.; Couso, I.; Crespo, J.L. Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Autophagy* **2012**, *8*, 376–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Pérez-Pérez, M.E.; Lemaire, S.D.; Crespo, J.L. Reactive Oxygen Species and Autophagy in Plants and Algae. *Plant. Physiol.* **2012**, *160*, 156–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Pérez-Pérez, M.E.; Zaffagnini, M.; Marchand, C.H.; Crespo, J.L.; Lemaire, S.D. The yeast autophagy protease Atg4 is regulated by thioredoxin. *Autophagy* **2014**, *10*, 1953–1964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pérez-Pérez, M.E.; Lemaire, S.D.; Crespo, J.L. Control of Autophagy in *Chlamydomonas* Is Mediated through Redox-Dependent Inactivation of the ATG4 Protease. *Plant. Physiol.* **2016**, *172*, 2219–2234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Harris, E.H. *The Chlamydomonas Sourcebook*; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1989; ISBN 978-0-12-326880-8.
47. Iwasa, K.; Murakami, S. Palmelloid Formation of *Chlamydomonas* I. Palmelloid Induction by Organic Acids. *Physiol. Plant.* **1968**, *21*, 1224–1233. [[CrossRef](#)]

48. Pančić, M.; Kiørboe, T. Phytoplankton defence mechanisms: Traits and trade-offs. *Biol. Rev.* **2018**, *93*, 1269–1303. [[CrossRef](#)]
49. Fisher, R.M.; Bell, T.; West, S.A. Multicellular group formation in response to predators in the alga *Chlorella vulgaris*. *J. Evol. Biol.* **2016**, *29*, 551–559. [[CrossRef](#)]
50. Lurling, M.; Beekman, W. Palmelloids formation in *Chlamydomonas reinhardtii*: Defence against rotifer predators? *Ann. Limnol. Int. J. Limnol.* **2006**, *42*, 65–72. [[CrossRef](#)]
51. Iwasa, K.; Murakami, S. Palmelloid Formation of *Chlamydomonas* II. Mechanism of Palmelloid Formation by Organic Acids. *Physiol. Plant.* **1969**, *22*, 43–50. [[CrossRef](#)]
52. Olsen, Y.; Knutsen, G.; Lien, T. Characteristics of Phosphorus Limitation in *Chlamydomonas reinhardtii* (chlorophyceae) and Its Palmelloids. *J. Phycol.* **1983**, *19*, 313–319. [[CrossRef](#)]
53. Samadani, M.; Dewez, D. Cadmium accumulation and toxicity affect the extracytoplasmic polyphosphate level in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *166*, 200–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Takouridis, S.J.; Tribe, D.E.; Gras, S.L.; Martin, G.J.O. The selective breeding of the freshwater microalga *Chlamydomonas reinhardtii* for growth in salinity. *Bioresour. Technol.* **2015**, *184*, 18–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Khona, D.K.; Shirolikar, S.M.; Gawde, K.K.; Hom, E.; Deodhar, M.A.; D'Souza, J.S. Characterization of salt stress-induced palmelloids in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res.* **2016**, *16*, 434–448. [[CrossRef](#)]
56. Neelam, S.; Subramanyam, R. Alteration of photochemistry and protein degradation of photosystem II from *Chlamydomonas reinhardtii* under high salt grown cells. *J. Photochem. Photobiol. B* **2013**, *124*, 63–70. [[CrossRef](#)]
57. Visviki, I.; Santikul, D. The pH tolerance of *Chlamydomonas applanata* (Volvocales, Chlorophyta). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2000**, *38*, 147–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Nakamura, K.; Bray, D.F.; Wagenaar, E.B. Ultrastructure of *Chlamydomonas eugametos* palmelloids induced by chloroplatinic acid treatment. *J. Bacteriol.* **1975**, *121*, 338–343.
59. Nakamura, K.; Sakon, M.; Hatanaka, M.K. Chemical Factors Affecting Palmelloid-Forming Activity of Chloroplatinic Acid on *Chlamydomonas eugametos*. *Physiol. Plant.* **1976**, *36*, 293–296. [[CrossRef](#)]
60. Sathe, S.; Durand, P.M. Cellular aggregation in *Chlamydomonas* (Chlorophyceae) is chimaeric and depends on traits like cell size and motility. *Eur. J. Phycol.* **2016**, *51*, 129–138. [[CrossRef](#)]
61. Fan, J.; Zheng, L.; Bai, Y.; Saroussi, S.; Grossman, A.R. Flocculation of *Chlamydomonas reinhardtii* with Different Phenotypic Traits by Metal Cations and High pH. *Front. Plant. Sci.* **2017**, *8*, 1997. [[CrossRef](#)]
62. Goff, K.L.; Headley, J.V.; Lawrence, J.R.; Wilson, K.E. Assessment of the effects of oil sands naphthenic acids on the growth and morphology of *Chlamydomonas reinhardtii* using microscopic and spectromicroscopic techniques. *Sci. Total Environ.* **2013**, *442*, 116–122. [[CrossRef](#)]
63. Day, J.G.; Gong, Y.; Hu, Q. Microzooplanktonic grazers—A potentially devastating threat to the commercial success of microalgal mass culture. *Algal Res.* **2017**, *27*, 356–365. [[CrossRef](#)]
64. Porter, K.G. Viable gut passage of gelatinous green algae ingested by *Daphnia*. *SIL Proc. 1922–2010* **1975**, *19*, 2840–2850. [[CrossRef](#)]
65. Wilson, W.W.; Wade, M.M.; Holman, S.C.; Champlin, F.R. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *J. Microbiol. Methods* **2001**, *43*, 153–164. [[CrossRef](#)]
66. Banerjee, C.; Ghosh, S.; Sen, G.; Mishra, S.; Shukla, P.; Bandopadhyay, R. Study of algal biomass harvesting through cationic cassia gum, a natural plant based biopolymer. *Bioresour. Technol.* **2014**, *151*, 6–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Díaz-Santos, E.; Vila, M.; de la Vega, M.; León, R.; Vigarà, J. Study of bioflocculation induced by *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* and flocculating protein factors in microalgae. *Algal Res.* **2015**, *8*, 23–29.
68. Ogata, T.; Izumikawa, M.; Kohno, K.; Shibata, K. Chromosomal location of Lg-FLO1 in bottom-fermenting yeast and the FLO5 locus of industrial yeast. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *105*, 1186–1198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Soares, E.V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *110*, 1–18. [[CrossRef](#)]
70. Merchant, S.S.; Prochnik, S.E.; Vallon, O.; Harris, E.H.; Karpowicz, S.J.; Witman, G.B.; Terry, A.; Salamov, A.; Fritz-Laylin, L.K.; Maréchal-Drouard, L.; et al. The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science* **2007**, *318*, 245–250. [[CrossRef](#)]
71. Díaz-Santos, E.; Vila, M.; Vigarà, J.; León, R. A new approach to express transgenes in microalgae and its use to increase the flocculation ability of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Appl. Phycol.* **2016**, *28*, 1611–1621. [[CrossRef](#)]

72. Musgrave, A.; van der Steuyt, P.; Ero, L. Concanavalin A binding to *Chlamydomonas eugametos* flagellar proteins and its effect on sexual reproduction. *Planta* **1979**, *147*, 51–56. [[CrossRef](#)]
73. Millikin, B.E.; Weiss, R.L. Localization of concanavalin A binding carbohydrate in *Chlamydomonas* flagella. *J. Cell Sci.* **1984**, *68*, 211–226. [[PubMed](#)]
74. Boyd, M.; Rosenzweig, F.; Herron, M.D. Analysis of motility in multicellular *Chlamydomonas reinhardtii* evolved under predation. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Wheeler, G.L.; Miranda-Saavedra, D.; Barton, G.J. Genome Analysis of the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* Indicates an Ancient Evolutionary Origin for Key Pattern Recognition and Cell-Signaling Protein Families. *Genetics* **2008**, *179*, 193–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Lowder, L.G.; Herbert, S.K. Heterologous expression of a *Volvox* cell adhesion molecule causes flocculation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Appl. Phycol.* **2015**, *27*, 721–731. [[CrossRef](#)]
77. Seifert, G.J. Fascinating Fasciclins: A Surprisingly Widespread Family of Proteins that Mediate Interactions between the Cell Exterior and the Cell Surface. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1628. [[CrossRef](#)]
78. Johnson, K.L.; Jones, B.J.; Bacic, A.; Schultz, C.J. The Fasciclin-Like Arabinogalactan Proteins of Arabidopsis. A Multigene Family of Putative Cell Adhesion Molecules. *Plant. Physiol.* **2003**, *133*, 1911–1925. [[CrossRef](#)]
79. Grosberg, R.K.; Strathmann, R.R. The Evolution of Multicellularity: A Minor Major Transition? *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2007**, *38*, 621–654. [[CrossRef](#)]
80. Prochnik, S.E.; Umen, J.; Nedelcu, A.M.; Hallmann, A.; Miller, S.M.; Nishii, I.; Ferris, P.; Kuo, A.; Mitros, T.; Fritz-Laylin, L.K.; et al. Genomic Analysis of Organismal Complexity in the Multicellular Green Alga *Volvox carteri*. *Science* **2010**, *329*, 223–226. [[CrossRef](#)]
81. Olson, B.J. From brief encounters to lifelong unions. *eLife* **2013**, *2*, e01893. [[CrossRef](#)]
82. Ratcliff, W.C.; Herron, M.D.; Howell, K.; Pentz, J.T.; Rosenzweig, F.; Travisano, M. Experimental evolution of an alternating uni- and multicellular life cycle in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2742. [[CrossRef](#)]
83. Herron, M.D.; Borin, J.M.; Boswell, J.C.; Walker, J.; Chen, I.-C.K.; Knox, C.A.; Boyd, M.; Rosenzweig, F.; Ratcliff, W.C. *De novo* origins of multicellularity in response to predation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2328. [[CrossRef](#)]
84. Boraas, M.E.; Seale, D.B.; Boxhorn, J.E. Phagotrophy by a flagellate selects for colonial prey: A possible origin of multicellularity. *Evol. Ecol.* **1998**, *12*, 153–164. [[CrossRef](#)]
85. Kerr, J.F.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **1972**, *26*, 239–257. [[CrossRef](#)]
86. Earnshaw, W.C.; Martins, L.M.; Kaufmann, S.H. Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 383–424. [[CrossRef](#)]
87. He, B.; Lu, N.; Zhou, Z. Cellular and Nuclear Degradation during Apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 900–912. [[CrossRef](#)]
88. Zhivotosky, B.; Orrenius, S. Assessment of apoptosis and necrosis by DNA fragmentation and morphological criteria. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2001**, *12*, 18.3.1–18.3.23.
89. Fuchs, Y.; Steller, H. Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell* **2011**, *147*, 742–758. [[CrossRef](#)]
90. Bayles, K.W. Bacterial programmed cell death: Making sense of a paradox. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 63–69. [[CrossRef](#)]
91. Bidle, K.D. Programmed Cell Death in Unicellular Phytoplankton. *Curr. Biol.* **2016**, *26*, R594–R607. [[CrossRef](#)]
92. Carmona-Gutierrez, D.; Eisenberg, T.; Büttner, S.; Meisinger, C.; Kroemer, G.; Madeo, F. Apoptosis in yeast: Triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ.* **2010**, *17*, 763–773. [[CrossRef](#)]
93. Sirisha, V.L.; Sinha, M.; D'Souza, J.S. Menadione-induced caspase-dependent programmed cell death in the green chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Phycol.* **2014**, *50*, 587–601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Yordanova, Z.P.; Woltering, E.J.; Kapchina-Toteva, V.M.; Iakimova, E.T. Mastoparan-induced programmed cell death in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ann. Bot.* **2013**, *111*, 191–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Vavilala, S.L.; Gawde, K.K.; Sinha, M.; D'Souza, J.S. Programmed cell death is induced by hydrogen peroxide but not by excessive ionic stress of sodium chloride in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Phycol.* **2015**, *50*, 422–438. [[CrossRef](#)]

96. Ge, Y.; Cai, Y.-M.; Bonneau, L.; Rotari, V.; Danon, A.; McKenzie, E.A.; McLellan, H.; Mach, L.; Gallois, P. Inhibition of cathepsin B by caspase-3 inhibitors blocks programmed cell death in Arabidopsis. *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 1493–1501. [[CrossRef](#)]
97. Hatsugai, N.; Yamada, K.; Goto-Yamada, S.; Hara-Nishimura, I. Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Front. Plant. Sci.* **2015**, *6*, 234. [[CrossRef](#)]
98. Coll, N.S.; Vercammen, D.; Smidler, A.; Clover, C.; Van Breusegem, F.; Dangl, J.L.; Epple, P. Arabidopsis type I metacaspases control cell death. *Science* **2010**, *330*, 1393–1397. [[CrossRef](#)]
99. Tsiatsiani, L.; Van Breusegem, F.; Gallois, P.; Zaviyalov, A.; Lam, E.; Bozhkov, P.V. Metacaspases. *Cell Death Differ.* **2011**, *18*, 1279–1288. [[CrossRef](#)]
100. Murik, O.; Elboher, A.; Kaplan, A. Dehydroascorbate: A possible surveillance molecule of oxidative stress and programmed cell death in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *New Phytol.* **2014**, *202*, 471–484. [[CrossRef](#)]
101. Zuo, Z.; Zhu, Y.; Bai, Y.; Wang, Y. Acetic acid-induced programmed cell death and release of volatile organic compounds in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. Physiol. Biochem. PPB* **2012**, *51*, 175–184. [[CrossRef](#)]
102. Moharikar, S.; D'Souza, J.S.; Kulkarni, A.B.; Rao, B.J. Apoptotic-Like Cell Death Pathway Is Induced in Unicellular Chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (chlorophyceae) Cells Following Uv Irradiation: Detection and Functional Analyses1. *J. Phycol.* **2006**, *42*, 423–433. [[CrossRef](#)]
103. Durand, P.M.; Rashidi, A.; Michod, R.E. How an organism dies affects the fitness of its neighbors. *Am. Nat.* **2011**, *177*, 224–232. [[CrossRef](#)]
104. Ferris, P.J.; Woessner, J.P.; Waffenschmidt, S.; Kilz, S.; Drees, J.; Goodenough, U.W. Glycosylated Polyproline II Rods with Kinks as a Structural Motif in Plant Hydroxyproline-Rich Glycoproteins. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2978–2987. [[CrossRef](#)]
105. Macfie, S.M.; Tarmohamed, Y.; Welbourn, P.M. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1994**, *27*, 454–458. [[CrossRef](#)]
106. Macfie, S.M.; Welbourn, P.M. The Cell Wall as a Barrier to Uptake of Metal Ions in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2000**, *39*, 413–419. [[CrossRef](#)]
107. Prasad, M.N.V.; Draj, K.; Skawińska, A.; Stralka, K. Toxicity of Cadmium and Copper in *Chlamydomonas reinhardtii* Wild-Type (WT 2137) and Cell Wall Deficient Mutant Strain (CW 15). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1998**, *60*, 306–311. [[CrossRef](#)]
108. Baba, M.; Suzuki, I.; Shiraiwa, Y. Proteomic analysis of high-CO₂-inducible extracellular proteins in the unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. Cell Physiol.* **2011**, *52*, 1302–1314. [[CrossRef](#)]
109. Takahashi, H.; Braby, C.E.; Grossman, A.R. Sulfur Economy and Cell Wall Biosynthesis during Sulfur Limitation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. Physiol.* **2001**, *127*, 665–673. [[CrossRef](#)]
110. Davies, J.P.; Yildiz, F.H.; Grossman, A. Sac1, a putative regulator that is critical for survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur deprivation. *EMBO J.* **1996**, *15*, 2150–2159. [[CrossRef](#)]
111. Van Donk, E.; Lüring, M.; Hessen, D.O.; Lokhorst, G.M. Altered cell wall morphology in nutrient-deficient phytoplankton and its impact on grazers. *Limnol. Oceanogr.* **1997**, *42*, 357–364. [[CrossRef](#)]
112. van Donk, E.; Hessen, D.O. Grazing resistance in nutrient-stressed phytoplankton. *Oecologia* **1993**, *93*, 508–511. [[CrossRef](#)]
113. Lüring, M.; Van Donk, E. Life history consequences for *Daphnia pulex* feeding on nutrient-limited phytoplankton. *Freshw. Biol.* **1997**, *38*, 693–709. [[CrossRef](#)]
114. Porter, K.G. Selective Grazing and Differential Digestion of Algae by Zooplankton. *Nature* **1973**, *244*, 179. [[CrossRef](#)]
115. Scholz, M.; Hoshino, T.; Johnson, D.; Riley, M.R.; Cuello, J. Flocculation of wall-deficient cells of *Chlamydomonas reinhardtii* mutant cw15 by calcium and methanol. *Biomass Bioenergy* **2011**, *35*, 4835–4840. [[CrossRef](#)]
116. Mini, P.; Demurtas, O.C.; Valentini, S.; Pallara, P.; Aprea, G.; Ferrante, P.; Giuliano, G. Agrobacterium-mediated and electroporation-mediated transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A comparative study. *BMC Biotechnol.* **2018**, *18*, 11. [[CrossRef](#)]
117. Segawa, T.; Matsuzaki, R.; Takeuchi, N.; Akiyoshi, A.; Navarro, F.; Sugiyama, S.; Yonezawa, T.; Mori, H. Bipolar dispersal of red-snow algae. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3094. [[CrossRef](#)]

118. Darwin, C. *Journal of Researches into the Natural History and Geology of the Countries Visited during the Voyage of HMS Beagle Round the World, under the Command of Capt. Fitz Roy, R.N.*, 2nd ed.; Cambridge University Press: London, UK, 1860.
119. Procházková, L.; Remias, D.; Holzinger, A.; Řezanka, T.; Nedbalová, L. Ecophysiological and morphological comparison of two populations of *Chlainomonas* sp. (Chlorophyta) causing red snow on ice-covered lakes in the High Tatras and Austrian Alps. *Eur. J. Phycol.* **2018**, *53*, 230–243. [[CrossRef](#)]
120. Müller, T.; Bleiß, W.; Martin, C.-D.; Rogaschewski, S.; Fuhr, G. Snow algae from northwest Svalbard: Their identification, distribution, pigment and nutrient content. *Polar Biol.* **1998**, *20*, 14–32. [[CrossRef](#)]
121. Remias, D.; Lütz-Meindl, U.; Lütz, C. Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. *Eur. J. Phycol.* **2005**, *40*, 259–268. [[CrossRef](#)]
122. Gorton, H.L.; Vogelmann, T.C. Ultraviolet Radiation and the Snow Alga *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille. *Photochem. Photobiol.* **2003**, *77*, 608–615. [[CrossRef](#)]
123. Boussiba, S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiol. Plant.* **2000**, *108*, 111–117. [[CrossRef](#)]
124. Kakizono, T.; Kobayashi, M.; Nagai, S. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* **1992**, *74*, 403–405. [[CrossRef](#)]
125. Li, Y.; Sommerfeld, M.; Chen, F.; Hu, Q. Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Appl. Phycol.* **2010**, *22*, 253–263. [[CrossRef](#)]
126. Li, Y.; Sommerfeld, M.; Chen, F.; Hu, Q. Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: A protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Plant. Physiol.* **2008**, *165*, 1783–1797. [[CrossRef](#)]
127. Sarada, R.; Tripathi, U.; Ravishankar, G.A. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process. Biochem.* **2002**, *37*, 623–627. [[CrossRef](#)]
128. Tjahjono, A.E.; Hayama, Y.; Kakizono, T.; Terada, Y.; Nishio, N.; Nagai, S. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnol. Lett.* **1994**, *16*, 133–138. [[CrossRef](#)]
129. Režanka, T.; Nedbalová, L.; Sigler, K.; Cepák, V. Identification of astaxanthin diglucoside diesters from snow alga *Chlamydomonas nivalis* by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 479–490. [[CrossRef](#)]
130. Grossman, A.R.; Lohr, M.; Im, C.S. *Chlamydomonas reinhardtii* in the Landscape of Pigments. *Annu. Rev. Genet.* **2004**, *38*, 119–173. [[CrossRef](#)]
131. Lemoine, Y.; Schoefs, B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: A multifunctional response to stress. *Photosynth. Res.* **2010**, *106*, 155–177. [[CrossRef](#)]
132. Bidigare, R.R.; Ondrusek, M.E.; Kennicutt, M.C.; Iturriaga, R.; Harvey, H.R.; Hoham, R.W.; Macko, S.A. Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. *J. Phycol.* **1993**, *29*, 427–434. [[CrossRef](#)]
133. Scibilia, L.; Girolomoni, L.; Berteotti, S.; Alboresi, A.; Ballottari, M. Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Res.* **2015**, *12*, 170–181. [[CrossRef](#)]
134. Perozeni, F.; Cazzaniga, S.; Baier, T.; Zanoni, F.; Zoccatelli, G.; Lauersen, K.J.; Wobbe, L.; Ballottari, M. Turning a green alga red: Engineering astaxanthin biosynthesis by intragenic pseudogene revival in *Chlamydomonas reinhardtii*. *bioRxiv* **2019**, 535989. [[CrossRef](#)]
135. Strenkert, D.; Schmollinger, S.; Gallaher, S.D.; Salomé, P.A.; Purvine, S.O.; Nicora, C.D.; Mettler-Altmann, T.; Soubeyrand, E.; Weber, A.P.M.; Lipton, M.S.; et al. Multiomics resolution of molecular events during a day in the life of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 2374–2383. [[CrossRef](#)]
136. Zou, Y.; Wenzel, S.; Müller, N.; Prager, K.; Jung, E.-M.; Kothe, E.; Kottke, T.; Mittag, M. An Animal-Like Cryptochrome Controls the *Chlamydomonas* Sexual Cycle. *Plant. Physiol.* **2017**, *174*, 1334–1347. [[CrossRef](#)]
137. Nedelcu, A.M.; Marcu, O.; Michod, R.E. Sex as a response to oxidative stress: A twofold increase in cellular reactive oxygen species activates sex genes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2004**, *271*, 1591–1596. [[CrossRef](#)]
138. Waffenschmidt, S.; Woessner, J.P.; Beer, K.; Goodenough, U.W. Isodityrosine cross-linking mediates insolubilization of cell walls in *Chlamydomonas*. *Plant. Cell* **1993**, *5*, 809–820.
139. Waffenschmidt, S.; Kusch, T.; Woessner, J.P. A Transglutaminase Immunologically Related to Tissue Transglutaminase Catalyzes Cross-Linking of Cell Wall Proteins in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. Physiol.* **1999**, *121*, 1003–1015. [[CrossRef](#)]

140. Lopez, D.; Hamaji, T.; Kropat, J.; De Hoff, P.; Morselli, M.; Rubbi, L.; Fitz-Gibbon, S.; Gallaher, S.D.; Merchant, S.S.; Umen, J.; et al. Dynamic Changes in the Transcriptome and Methyome of *Chlamydomonas reinhardtii* throughout Its Life Cycle. *Plant. Physiol.* **2015**, *169*, 2730–2743. [[CrossRef](#)]
141. Joo, S.; Nishimura, Y.; Cronmiller, E.; Hong, R.H.; Kariyawasam, T.; Wang, M.H.; Shao, N.C.; El Akkad, S.-E.-D.; Suzuki, T.; Higashiyama, T.; et al. Gene Regulatory Networks for the Haploid-to-Diploid Transition of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. Physiol.* **2017**, *175*, 314–332. [[CrossRef](#)]
142. Suzuki, L.; Woessner, J.P.; Uchida, H.; Kuroiwa, H.; Yuasa, Y.; Waffenschmidt, S.; Goodenough, U.W.; Kuroiwa, T. A Zygote-Specific Protein with Hydroxyproline-Rich Glycoprotein Domains and Lectin-Like Domains Involved in the Assembly of the Cell Wall of *Chlamydomonas reinhardtii* (chlorophyta). *J. Phycol.* **2000**, *36*, 571–583. [[CrossRef](#)]
143. Heimerl, N.; Hommel, E.; Westermann, M.; Meichsner, D.; Lohr, M.; Hertweck, C.; Grossman, A.R.; Mittag, M.; Sasso, S. A giant type I polyketide synthase participates in zygospore maturation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. J.* **2018**, *95*, 268–281. [[CrossRef](#)]
144. Cavalier-Smith, T. Electron microscopy of zygospore formation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protoplasma* **1976**, *87*, 297–315. [[CrossRef](#)]
145. VanWinkle-Swift, K.P.; Rickoll, W.L. The Zygospore Wall of *Chlamydomonas Monoica* (chlorophyceae): Morphogenesis and Evidence for the Presence of Sporopollenin1. *J. Phycol.* **1997**, *33*, 655–665. [[CrossRef](#)]
146. Suzuki, L.; Johnson, C. Photoperiodic control of germination in the unicell *Chlamydomonas*. *Naturwissenschaften* **2002**, *89*, 214–220. [[CrossRef](#)]
147. Trainor, F.R.; Gladych, R. Survival of algae in a desiccated soil: A 35-year study. *Phycologia* **1995**, *34*, 191–192. [[CrossRef](#)]
148. Suzuki, L.; Yuasa, Y.; Kuroiwa, T. Transcription and Translation involved in Pellicle Formation in the *Chlamydomonas reinhardtii* Zygote. *Cytologia* **1997**, *62*, 421–425. [[CrossRef](#)]
149. Avnimelech, Y.; Troeger, B.W.; Reed, L.W. Mutual Flocculation of Algae and Clay: Evidence and Implications. *Science* **1982**, *216*, 63–65. [[CrossRef](#)]
150. Salim, S.; Bosma, R.; Vermuë, M.H.; Wijffels, R.H. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *J. Appl. Phycol.* **2011**, *23*, 849–855. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1.2 Comportements multicellulaires chez les organismes unicellulaires

1.2.1 Différentes structures multicellulaires

La coopération est partie intégrante de la vie des animaux, des plantes et des microorganismes. D'aucuns pourraient penser que la théorie darwinienne implique une compétition absolue, rien n'est plus faux (Pennisi, 2009). Même les microorganismes les plus simples sont capables de comportements altruistes et collectifs parmi lesquels la PCD et la formation de structures multicellulaires. De nombreux organismes unicellulaires sont capables de se regrouper pour former de telles structures. Plusieurs architectures de groupes multicellulaires existent en environnement liquide, on peut les classer en fonction de leurs propriétés d'adhésion (Figure 1A). Si les cellules n'adhèrent à rien, elles restent seules en suspension dans le liquide, elles sont dites planctoniques. Si elles adhèrent entre elles, on obtient des agrégats (aussi appelés « flocc ») ou des flor. La différence est que les agrégats sont en suspension dans le liquide et que les flor flottent à la surface en contact avec l'air. Enfin si les cellules adhèrent entre elles et à une surface solide, il s'agit d'un biofilm. La force d'adhésion des biofilms dépend de l'espèce mais aussi de la nature physico-chimique de la surface solide. Ces différentes architectures sont adoptées par des microorganismes de tous types, aussi bien des bactéries que des levures ou des microalgues (Figure 1 B, C et D) (Brückner and Mösch, 2012; Lürling, 2021; Whiteley et al., 2017).

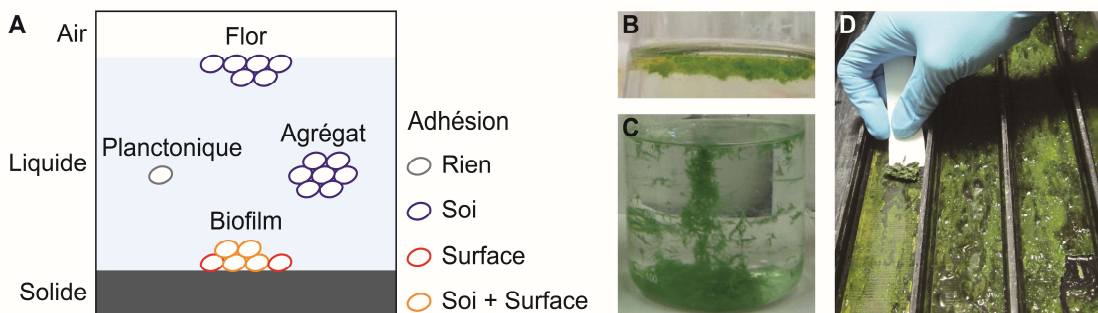


Figure 1. Architecture des structures multicellulaires chez les microorganismes unicellulaires. (A) Les cellules peuvent adopter un mode de vie solitaire (planctonique), regroupées en flottaison à la surface air-liquide (flor), regroupées en suspension dans le liquide (agrégat) ou collées à une surface solide (biofilm). Schéma adapté de Brückner and Mösch, 2012. Ces trois comportements multicellulaires peuvent être induits chez des organismes unicellulaires photosynthétiques : (B) flor du chlorophyte *Chlorella vulgaris*, (C) agrégats de la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa* et (D) biofilms de cyanobactéries et chlorophytes (Boelee, 2013; Low and Lau, 2017; Shao et al., 2012).

La formation de structures multicellulaires n'est pas toujours optimale pour un unicellulaire, cela peut diminuer, par exemple, son accès aux ressources ou sa dispersion. S'il adopte ce comportement, c'est qu'il offre une protection contre l'environnement néfaste ou permet de coopérer avec une autre espèce. Par exemple, les biofilms bactériens sont induits par un stress, comme les antibiotiques, et les cellules en sont ainsi protégées (Lewis, 2001).

Chez *Chlamydomonas* et d'autres microalgues des structures multicellulaires sont formées en réponse au stress abiotique et à la prédation (se référer à 1.1). Nous mettrons en perspective ces observations avec d'autres organismes unicellulaires comme la levure ou la bactérie.

1.2.2 Structures multicellulaires en réponse au stress abiotique et la prédation

Chez *Chlamydomonas*, la formation de palmelloïdes (colonies de 4 à 16 cellules) ou d'agrégats est déclenchée par une variété de stress comme des acides, des métaux et des variations de pH (se référer à 1.1.2). En revanche, à notre connaissance, aucune publication n'a encore montré la présence d'agrégats de grande taille en réponse au stress abiotique. Chez d'autres microalgues comme *Chlorella*, *Dunaliella* et *Scenedesmus*, les quelques études disponibles confirment que de gros agrégats sont formés en réponse au pH basique, aux nanoparticules d'argent et à l'aluminium qui induit un stress oxydatif (Ameri et al., 2020; Oukarroum et al., 2012; Yang et al., 2016). Une variété de stress induisent donc des structures multicellulaires chez les microalgues. Mais la manière dont ce processus est contrôlé et son rôle restaient à être caractérisés au début de ma thèse, qui aura donc été dédiée à une meilleure compréhension de ce sujet chez l'espèce modèle *Chlamydomonas*.

La prédation est un élément majeur qui forge l'évolution, les équilibres écologiques et les comportements des espèces (Calsbeek and Cox, 2010). La formation de structures multicellulaires en réponse à la prédation a été observée chez les bactéries et les levures mais aussi chez les microalgues (Khong et al., 2019; Pentz et al., 2015). Les observations faites chez ces dernières sont synthétisées dans le Tableau 1. Le développement d'agrégats ou de colonies est induit par des prédateurs chez les chlorophytes (algues vertes) et les haptophytes (algues brunes) qui sont des groupes très éloignés, ce qui montre que cette réponse n'est pas spécifique à un groupe. Il concerne aussi bien des cellules mobiles comme *Chlamydomonas* ou non mobiles comme les espèces de *Scenedesmus* (Kapsetaki et al., 2017). En revanche, les espèces de *Chlamydomonas* nageant le moins vite agrègent plus, certainement car elles sont moins efficaces pour fuir (Sathe and Durand, 2016). Les prédateurs sont aussi des groupes très variés, allant de multicellulaires comme les crustacés *Daphnia* ou des rotifères aux unicellulaires comme des dinoflagellés, ciliés ou alvéolés. Certains prédateurs comme *Daphnia magna* aient un effet sur plusieurs espèces différentes (Tableau 1). La formation de structures multicellulaires est donc une réponse largement répandue chez les microalgues. Enfin, l'agrégation en réponse aux prédateurs est visible dans le milieu naturel montrant qu'il ne s'agit pas d'un artéfact de laboratoire (Lürling and Van Donk, 1997).

Tableau 1. Comportements multicellulaires des microalgues induits par les prédateurs (vivants ou milieu) et les en protégeant (Protec.).

Type	Proie		Prédateur		Multi.		Protec.	Référence
	Type	Espèce	Type	Espèce	Vivant	Milieu		
Chlorophyta	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Rotifère	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Oui		Oui	Lurling and Beekman, 2006	
		Euglenoidea	<i>Peranema trichophorum</i>	Oui	Oui	Oui	Sathe and Durand, 2016	
	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Crustacés	<i>Daphnia magna</i>	Oui	Oui	Non	Kapsetaki and West, 2019;	
		Chrysophyceae	<i>Ochromonas danica</i>	Oui		Oui	Kapsetaki et al., 2017	
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Crustacés	<i>Daphnia magna</i>	Oui	Oui		Kapsetaki et al., 2017	
		Ciliés	<i>Tetrahymena thermophila</i>	Oui	Oui		Fisher et al., 2016	
		Rotifère	<i>Brachionus calyciflorus</i>		Oui			
	<i>Scenedesmus acutus</i>		<i>Daphnia pulex</i>		Oui	Non		
			<i>Daphnia cucullata</i>		Non	Oui		
			<i>Daphnia magna</i> , <i>Eudiaptomus gracilis</i> or <i>Bosmina longirostris</i>			Oui		
			<i>Daphnia galeata</i>	Oui	Oui			
			<i>Daphnia magna</i>	Oui	Oui	Oui		
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Crustacés	<i>Daphnia cucullata</i>			Oui		
			<i>Desmodesmus subspicatus</i>	<i>Daphnia magna</i>	Oui	Non		
	<i>Scenedesmus dimorphus</i>		<i>Daphnia magna</i>		Oui			
			<i>Moina macrocopa</i>		Oui			
	<i>Sphaerocystis Schroeteri</i>		<i>Daphnia galeata</i> or <i>Daphnia hyalina</i>	Oui	Non	Oui	Kampe et al., 2007	
		Haptophyta	Dinoflagellata	<i>Noctiluca scintillans</i>	Oui		Non	Jakobsen and Tang, 2002
				<i>Gyrodinium dominans</i>	Oui		Oui	
		Ciliés	<i>Euplotes</i> sp.	Oui	Oui	Oui	Long et al., 2007	

Les prédateurs des unicellulaires s'en nourrissent généralement par phagotrophie, c'est-à-dire en les ingérant entiers pour ensuite les digérer. Si les cellules forment des groupes de taille suffisante, les prédateurs deviennent incapables de les ingérer. La taille relative de la structure multicellulaire et du prédateur détermine si la proie sera protégée ou non. Chez les microalgues, la forme multicellulaire apporte une protection dans la majorité des cas (Tableau 1), si bien que cela peut amener à l'extinction du prédateur (Jakobsen and Tang, 2002). En revanche, parfois la taille des agrégats n'est pas suffisante pour assurer une protection. Par exemple, les gros *Daphnia magna* et *Daphnia pulex* sont capables d'ingérer des colonies alors que les petits *Daphnia cucullata* ne le sont pas (Lürling and Van Donk, 1996). Cependant, les deux premiers (*Daphnia magna* et *Daphnia pulex*) induisent tout de même la production de colonies, certainement pour désavantager le troisième (*Daphnia cucullata*) (Lürling et al., 1997).

1.2.3 Mutualisme et agrégation inter-espèces

La formation de structures multicellulaires est un moyen de défense contre les agressions mais permet aussi la coopération entre espèces. Des microalgues peuvent s'associer avec des organismes aussi divers que des salamandres (Burns et al., 2017, 2020), des éponges, des polychètes, des cnidaires (Baulina et al., 2016), des foraminifères (Lee, 2006), des bactéries ou des champignons (Cooper and Smith, 2015). Plusieurs associations impliquant *Chlamydomonas* et d'autres microorganismes ont été décrites. Par exemple, *Chlamydomonas* ne peut pas se développer avec certains acides aminés et peptides comme seule source d'azote. Cependant, en association avec *Methylobacterium* spp., *Chlamydomonas* pousse sur ces substrats grâce à un mutualisme obligatoire carbone-azote (Figure 2 A et B).

Chlamydomonas fixe le CO₂ et le transmet à *Methylobacterium* sous forme de carbone organique qui en retour minéralise les peptides contenant de la glycine, proline et hydroxyproline (Figure 2B) (Calatrava et al., 2018). Plusieurs bactéries entretiennent un mutualisme facultatif en augmentant la fixation du CO₂ par *Chlamydomonas*, comme *Azospirillum brasilense* ou des *Azotobacter* (Preininger et al., 2006). De même, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* et *Rhizobium etli* permettent un développement accéléré de *Chlamydomonas* en lui transmettant de l'acide acétique (Fakhimi et al., 2019). *Chlamydomonas* est aussi capable d'échanger de l'azote pour du carbone avec de nombreux champignons filamenteux ou unicellulaires, comme *Saccharomyces cerevisiae*. Le mutualisme *Chlamydomonas*-*Saccharomyces* peut être obligatoire en absence de CO₂ et en présence de glucose et KNO₂ (Figure 2 A et B) (Hom and Murray, 2014). Dans certains cas, le mutualisme s'accompagne de contact physique. Dans la nature, il a été observé des biofilms mixtes stratifiés avec des microalgues et des cyanobactéries en surface qui ont ainsi accès à la lumière (Kublanovskaya et al., 2020). Sur milieu gélosé, *Chlamydomonas* se développe en contact de la bactérie *Azotobacter* (Preininger et al., 2006) et du champignon *Alternaria* (Figure 2C) (Lőrincz et al., 2010). En conditions liquides, *Chlamydomonas* peut s'agréger avec des bactéries comme *Methylobacterium* (Figure 2C et (Calatrava et al., 2018)). De même, certaines bactéries s'agrègent avec la microalgue *Chlorella vulgaris* (Figure 2D) (Lee et al., 2013). *Chlamydomonas* peut aussi s'agréger avec les champignons filamenteux *Neurospora crassa* et *Aspergillus nidulans* (Figure 2C). Cette interaction physique est d'autant plus forte chez des mutants de *N. crassa* et *A. nidulans* incapables de réduire le nitrite et formant donc un mutualisme obligatoire

avec *Chlamydomonas*. À notre connaissance, rien ne permet d'affirmer que l'agrégation impliquant des microalgues améliore la résistance au stress. Les associations microalgues-champignons pourraient être à l'origine du développement des lichens (Hom and Murray, 2014).

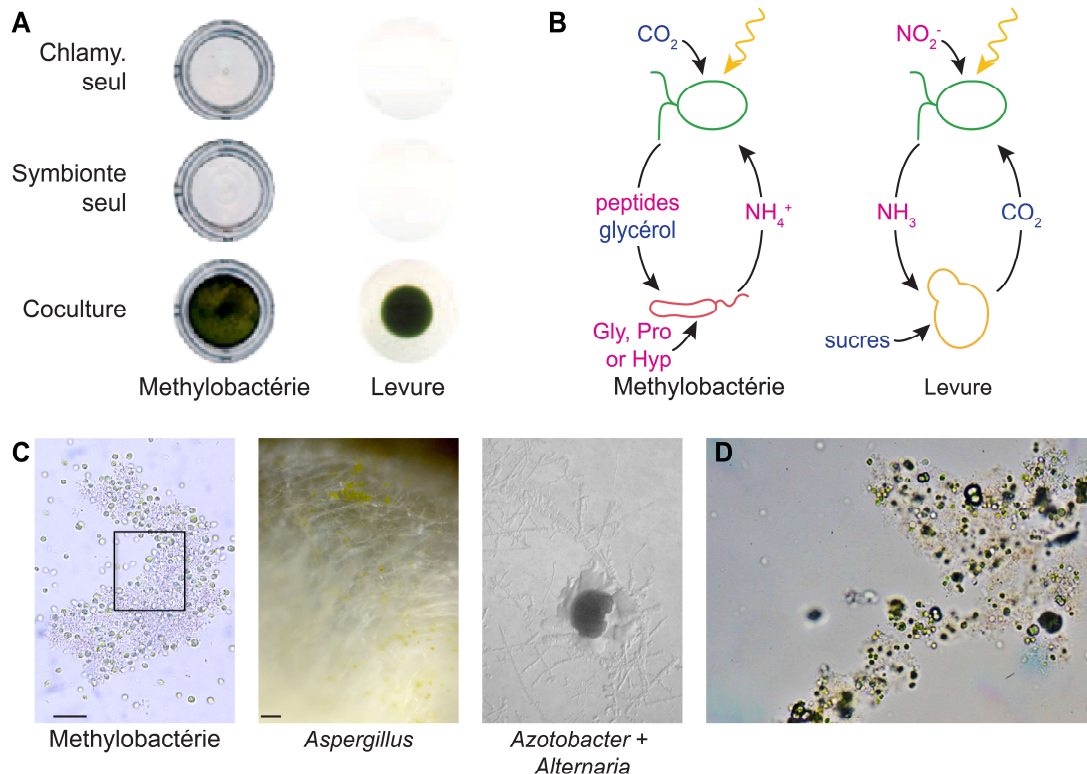


Figure 2. Mutualisme et agrégation entre *Chlamydomonas* et d'autres organismes. (A) Avec certains acides aminés comme seule source de carbone et d'azote, *Chlamydomonas* ne pousse qu'en coculture avec des methylobactéries et inversement. De même, en l'absence de CO_2 , *Chlamydomonas* et *Saccharomyces cerevisiae* ne peuvent pousser l'un sans l'autre. (B) En présence de CO_2 *Chlamydomonas* fournit du carbone en échange d'azote et inversement en absence de CO_2 . (C) *Chlamydomonas* s'agrège avec des methylobactéries et des champignons filamenteux (*Neurospora crassa* et *Aspergillus nidulans*) en conditions liquides et avec des azotobacter et le champignon *Alternaria* sur milieu gélosé (Calatrava et al., 2018; Hom and Murray, 2014; Lőrincz et al., 2010). (D) *Chlorella vulgaris* s'agrège très fortement avec des bactéries des genres *Flavobacterium*, *Terrirons* et *Sphingobacterium* (Lee et al., 2013).

1.3 Morphologie et régulation des structures multicellulaires

1.3.1 Perception du stress et communication

La première étape d'un comportement multicellulaire est la perception du danger. La perception du stress abiotique est mal connue chez les microalgues, en revanche la reconnaissance des prédateurs est mieux connue. En effet, le milieu de culture de prédateurs est suffisant pour induire la formation de colonies ou d'agrégats chez les microalgues (Tableau 1). Les kairomones responsables sont des sulfates aliphatiques et des sulfamates (Lüring, 2021). Dans certains cas, le prédateur vivant induit une réponse mais pas son milieu

de culture comme, par exemple, *Sphaerocystis schroeteri* en réponse à *Daphnia galeata* (Kampe et al., 2007). Il y aurait donc un autre moyen que les kairomones du prédateur pour induire le comportement multicellulaire. On ne peut que faire des hypothèses : contact physique, mort de certaines cellules ou signalisation entre les microalgues ?

Le *quorum sensing* permet aux cellules de sentir la densité de population au moyen de molécules spécifiques. Il a d'abord été découvert chez les procaryotes où il est impliqué, entre autres, dans la régulation des biofilms. Les molécules impliquées sont en majorité de la famille des homosérine lactones (Whiteley et al., 2017). Chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*, l'agrégation est aussi sous contrôle du *quorum sensing*, au moyen d'alcools aromatiques dont le tryptophol (Chen and Fink, 2006; Smukalla et al., 2008; Winters et al., 2019). À notre connaissance, un seul article fait référence au *quorum sensing* concernant l'agrégation chez les microalgues, dans lequel certaines homosérine lactones induisent la production d'EPS (*Extracellular polymeric substance*) dans des agrégats mixtes de bactéries et microalgues (Zhang et al., 2019). De plus, *Chlamydomonas* est capable de mimer un signal de *quorum sensing* en produisant du lumichrome qui active le récepteur à homosérine lactone LasR de *Pseudomonas aeruginosa* (Rajamani et al., 2008; Teplitski et al., 2004). De nouveaux travaux seraient cependant nécessaires pour évaluer un lien potentiel du *quorum sensing* dans l'agrégation chez *Chlamydomonas*.

1.3.2 Mode de formation des agrégats : clonal ou agrégatif

L'environnement toxique induit la formation d'agrégats chez les organismes unicellulaires, mais comment ces structures multicellulaires se forment-elles ? Deux mécanismes ont été identifiés (Pentz et al., 2020) (Figure 3A), les cellules peuvent :

- Se diviser et ne pas se séparer, c'est le mode **clonal** ;
- Une adhésion entre les cellules, c'est le mode **agrégatif**.

Le processus agrégatif à l'avantage d'être bien plus rapide ce qui permet à l'organisme de se protéger très vite d'une agression de l'environnement. Par exemple, l'amibozoaire *Dictyostelium* s'agrège en quelques heures en réponse au manque de nutriments et la levure peut flocculer en quelques secondes (Hashimura et al., 2019; Stratford and Keenan, 1988). Le développement clonal permet, d'un point de vue évolutif, une sélection plus rapide des caractères avantageux (West et al., 2021). Les levures, comme *Kluyveromyces lactis* ou *Saccharomyces cerevisiae*, sont des organismes modèles intéressants car elles sont capables de déclencher les deux types de processus (Brückner and Möscher, 2012; Driscoll and Travisano, 2017). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, des souches agrégeant spontanément ont été isolées. En particulier, *snowflake* (*ace2*) forme des agrégats avec des filaments en étoile rappelant un flocon de neige, d'où son nom, et *floc* (FLO^+), des agrégats irréguliers (Ratcliff et al., 2015; Smukalla et al., 2008). Dans des cultures de ces deux mutants, la moitié des cellules ont été marquées en rouge et l'autre en vert. Si les agrégats obtenus sont homogènes, c'est-à-dire d'une seule couleur, il s'agit de développement clonal, sinon d'agrégation. Ainsi, les auteurs ont déterminé que *snowflake* était clonal (agrégat homogène, Figure 3B) et *floc* agrégatif (agrégat hétérogène, Figure 3C) (Pentz et al., 2020). La souche sauvage peut s'agrèger avec les cellules *floc* mais ces dernières s'agrègent préférentiellement entre elles (Smukalla et al., 2008).

floc a donc un comportement « altruiste » avec les cellules sauvages « tricheuses ». Lorsqu'ils sont cultivés séparément, *floc* agrège beaucoup mieux que *snowflake*. En coculture, *snowflake* et *floc* agrègent ensemble fortement et d'avantage que chacune des souches seule. Lorsqu'ils sont mis en compétition, *snowflake* prend le dessus sur *floc* jusqu'à l'extinction de ce dernier (Pentz et al., 2020). Ces résultats montrent qu'en monoculture le développement agrégatif est supérieur au clonal, que les deux peuvent agréger en synergie et qu'en compétition le comportement clonal remplace l'agrégation.

Snowflake est muté pour le facteur de transcription *ace2* qui contrôle de nombreux gènes de la séparation des cellules mère et fille après la mitose (Oud et al., 2013; Ratcliff et al., 2015). La souche *floc* surexprime FLO1 et de manière générale le mode agrégatif est induit par les protéines FLO, des flocculines qui se fixent aux sucres de la paroi (Brückner and Mösch, 2012; Smukalla et al., 2008). Le comportement agrégatif est donc contrôlé par des protéines extracellulaires d'adhésion et le mode clonal par des protéines de la division cellulaire.

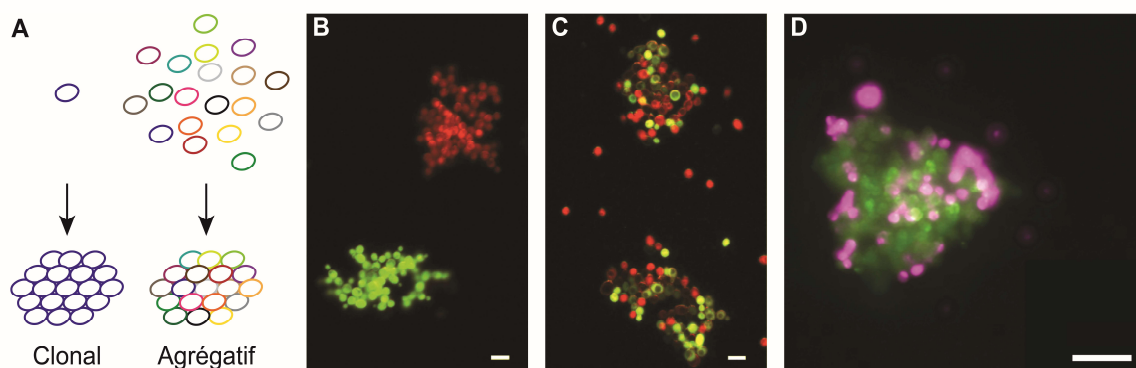


Figure 3. Processus clonal et agrégatif de la formation des structure multicellulaires. (A) Si une cellule se divise et que les cellules filles ne se séparent pas, il s'agit d'un développement clonal. Si, au contraire, plusieurs cellules se regroupent et restent collées, on parle de développement agrégatif. Chez *Saccharomyces cerevisiae* des mutants existent pour les deux processus, (B) *snowflake* est clonal alors que (C) *floc* est agrégatif (Pentz et al., 2020). (C) Comportement agrégatif de la microalgue *Chlorella sorokiniana*. (Kapsetaki et al., 2017). Les barres d'échelle représentent 10 μm (B et C) et 20 μm (D).

Comme nous l'avons vu précédemment (voir 1.1.2), les microalgues sont capables d'agréger en réponse au stress par deux moyens : les palmelloïdes ou les agrégats. Les palmelloïdes se forment par division d'une cellule mère dont les cellules filles restent dans la paroi (Khona et al., 2016), c'est la définition même d'un processus clonal. Pour les agrégats, peu d'études ont tenté de trancher entre les 2 hypothèses. Chez *Chlamydomonas*, en réponse au prédateur *Peranema*, les agrégats sont chimériques c'est-à-dire composés de plusieurs espèces différentes. De plus, le mélange d'une population marquée et d'une non-marquée de la même espèce donne des agrégats hétérogènes (Sathe and Durand, 2016). Cet article ne présente malheureusement pas d'illustration de ces résultats. À l'inverse, les agrégats induits par le rotifère *Brachionus* ne se forment qu'en présence de lumière, suggérant que la croissance serait nécessaire et qu'il s'agirait plutôt ici d'un processus de type clonal (Lürling and Beekman, 2006). Enfin, les zygotes (diploïdes) de *Chlamydomonas* forment spontanément une pellicule

très solides quelques heures après la reproduction sexuée. Dans ce cas, il s'agit forcément d'un développement agrégatif car les zygospores ne se divisent pas, ils vont être amenés à germer en nouvelles cellules végétatives (Suzuki et al., 2000). Hormis Chlamydomonas, quelques autres microalgues ont été étudiées pour leur façon de former des groupes multicellulaires : *Chlorella* et *Scenedesmus*. En présence de prédateur, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* ou *Scenedesmus obliquus* forment en majorité des structures multicellulaires par agrégation (Figure 3D) mais aussi de façon clonale. De plus, ces trois espèces agrègent ensemble deux à deux, par exemple *Chlorella sorokiniana* avec *Scenedesmus obliquus* ou *Chlorella sorokiniana* avec *Chlorella vulgaris*. Les microalgues sont donc capables de former des structures multicellulaires par un mode agrégatif ou clonal comme la levure. Enfin, le milieu de *Daphnia* n'induit que des agrégats alors que le prédateur vivant donne à la fois des agrégats et des colonies (Kapsetaki et al., 2017). Cette différence suggère que des régulations différentes pourraient être à l'origine de l'une ou l'autre des formes multicellulaires.

Les bases moléculaires de ces différentes régulations n'ont été étudiée que récemment. Rocuzzo et ses collègues ont identifié les protéines exprimées dans les développements clonaux et agrégatifs chez *Scenedesmus*. Le premier serait déclenché par la production d'ATP, de protéines de la photosynthèse et d'acides gras membranaires. A l'opposé, l'agrégation nécessite la production de composés extracellulaires dont des protéines avec des ponts disulfure, des carbohydrates et des lipides (Rocuzzo et al., 2020). Chez Chlamydomonas, l'agrégation des zygotes nécessite ZSP-2 (*Zygote Specific Protein*), une protéine riche en hydroxyproline avec un domaine lectine (Suzuki et al., 2000). C'est la seule protéine de Chlamydomonas connue comme impliquée dans l'agrégation. En outre, certaines lectines de plante, de levure ou de bactérie induisent l'agrégation en particulier la Concanavalin A qui se fixe à des résidus mannosyl et glucosyl (Díaz-Santos et al., 2015, 2016; Sharabi and Gilboa-Garber, 1980). On retrouve ici des mécanismes similaires à la levure avec une altération de la division cellulaire pour le développement clonal et une adhésion avec des protéines (lectines ?) et sucres pour l'agrégation.

1.3.3 Matrice extracellulaire

Chez les bactéries, la matrice extracellulaire (ECM) est un élément constitutif du biofilm. Elle est décrite dès la découverte des biofilms dans les années 1970 (Costerton et al., 1978). Dans la majorité des cas, les microorganismes composent moins de 10% de la masse du biofilm, les 90% restants étant de la matrice. L'ECM des biofilms bactériens est composée d'EPS qui sont des polysaccharides mais aussi des protéines ou des acides nucléiques. Sont aussi associés aux biofilms de nombreuses enzymes qui dégradent les sucres, protéines et lipides (Flemming and Wingender, 2010).

On peut se demander si une telle matrice existe chez les microalgues et quel serait alors son rôle dans la protection et/ou l'adhésion. Chez Chlamydomonas, il a été montré que les palmelloïdes induits par le stress avaient une matrice contenant des sucres (Khona et al., 2016). En réponse au cadmium et au plomb, Chlamydomonas développe une ECM qui protège les cellules en fixant ces métaux (Li et al., 2021). Les colonies de *Phaeocystis* contiennent une épaisse ECM qui leur apporte une protection supplémentaire contre la prédation (Dutz et al.,

2005). Les protéines et les sucres de la matrice ont une importance pour l'agrégation chez *Scenedesmus* (Rocuzzo et al., 2020) et l'adhésion aux surfaces chez *Nannochloropsis* (Soriano-Jerez et al., 2020), mais de nouvelles études seraient nécessaires pour comprendre leur rôle précis.

1.3.4 Réversibilité : retour à la forme planctonique

Pourquoi les microalgues ne restent-elles pas définitivement sous forme multicellulaire ? Chez *Scenedesmus* aucune différence n'a été observée en termes d'efficacité photosynthétique et de croissance mais les grosses particules sédimentent plus facilement. Cela les éloigne de la lumière et des températures clémentes (Lürling and Van Donk, 2000). Dès le retour à des conditions favorables, les microalgues retournent donc à leur état unicellulaire qui leur permet de se développer plus efficacement. Par exemple, les palmelloïdes de *Chlamydomonas* se dissocient en une heure après l'arrêt d'un stress salin (Khona et al., 2016). Le retour à la forme planctonique peut aussi être induit par un stimulus extérieur. En effet, contrairement à la majorité des prédateurs, *Acartia tonsa* préfère ingérer les colonies aux cellules planctoniques. En réponse à ce copépode, dont la présence est trahie par un composé lipide-soluble non volatil, les colonies de *Phaeocystis* ou de la diatomée *Skeletonema marinoi* se dissocient (Bjærke et al., 2015; Long et al., 2007).

Les processus moléculaires en jeu dans la dissociation impliquent une dégradation enzymatique de la matrice ou de la paroi retenant les cellules. En effet, la matrix métalloprotéinase MMP13 de *Chlamydomonas* est fortement surexprimée à ce moment-là (Khona et al., 2016). D'autres protéinases pourraient être impliquées dans la dégradation de la paroi comme des MMP, dont les gamétolysines (Luxmi et al., 2018), ou la subtilisine VLE1 (Kubo et al., 2009).

Les comportements multicellulaires et le retour à la forme planctonique sont donc des réponses physiologiques rapides et contrôlées.

1.4 Comment devenir multicellulaire et le rester ?

1.4.1 Innovations morphologiques et génétiques

Comme les organismes unicellulaires en réponse au stress, les organismes multicellulaires adoptent des développements agrégatifs et clonaux. En outre, les formes clonales sont bien plus fréquentes que les agrégatives (Figure 4A). Elles ont plusieurs morphologies comme des sphères organisées ou non, des filaments ou des syncytiums (cellules à plusieurs noyaux issues de la fusion de plusieurs cellules) (Brunet and King, 2017; Grosberg and Strathmann, 2007). Les Volvocales sont un ordre de chlorophytes contenant des espèces unicellulaires (*Chlamydomonas*), coloniales (*Gonium*) et multicellulaires (*Volvox*) (Figure 4B). Les espèces coloniales contiennent plusieurs cellules mais non différenciées. Les espèces multicellulaires ont au moins deux types de cellules, par exemple *Volvox* a des cellules somatiques et sexuelles (Yamashita et al., 2016). Ces éléments font du lignage des Volvocales un terrain formidable pour étudier la transition vers la multicellularité. L'espèce la plus simple est l'unicellulaire *Chlamydomonas* et les multicellulaires sont plus ou moins complexes allant de 4 à plusieurs

milliers de cellules comme suit : *Tetrabaena* (4 cellules), *Gonium* (8 ou 16), *Pandorina* (16), *Eudorina* (16 ou 32), *Astrephomene* (32 ou 64), *Pleodorina* (64 ou 128) et enfin *Volvox* (jusqu'à plusieurs milliers) (Yamashita et al., 2016).

Pour comprendre la transition vers la multicellularité chez les Volvocales, on peut étudier les différences morphologiques mais aussi génomiques. Quatre génomes ont été séquencés: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Tetrabaena socialis*, *Gonium pectorale* et *Volvox carteri* (Featherston et al., 2018; Hanschen et al., 2016; Merchant et al., 2007; Prochnik et al., 2010). De façon générale, les changements génétiques sont relativement faibles. Ce constat corrobore l'hypothèse selon laquelle la transition vers la multicellularité ne nécessite pas la modification d'un grand nombre de gènes (Pennisi, 2010). Les comparaisons de génomes montrent des modifications du cycle cellulaire, en particulier les cyclines et la voie du rétinoblastome. En effet, l'expression du rétinoblastome de *Gonium* chez *Chlamydomonas* induit un développement clonal (Hanschen et al., 2016). De plus, les familles de gènes qui s'expandent le plus chez *Volvox* sont les PHCs et les MMPs/gamétolysines qui agissent essentiellement au niveau du développement de l'ECM (Prochnik et al., 2010).

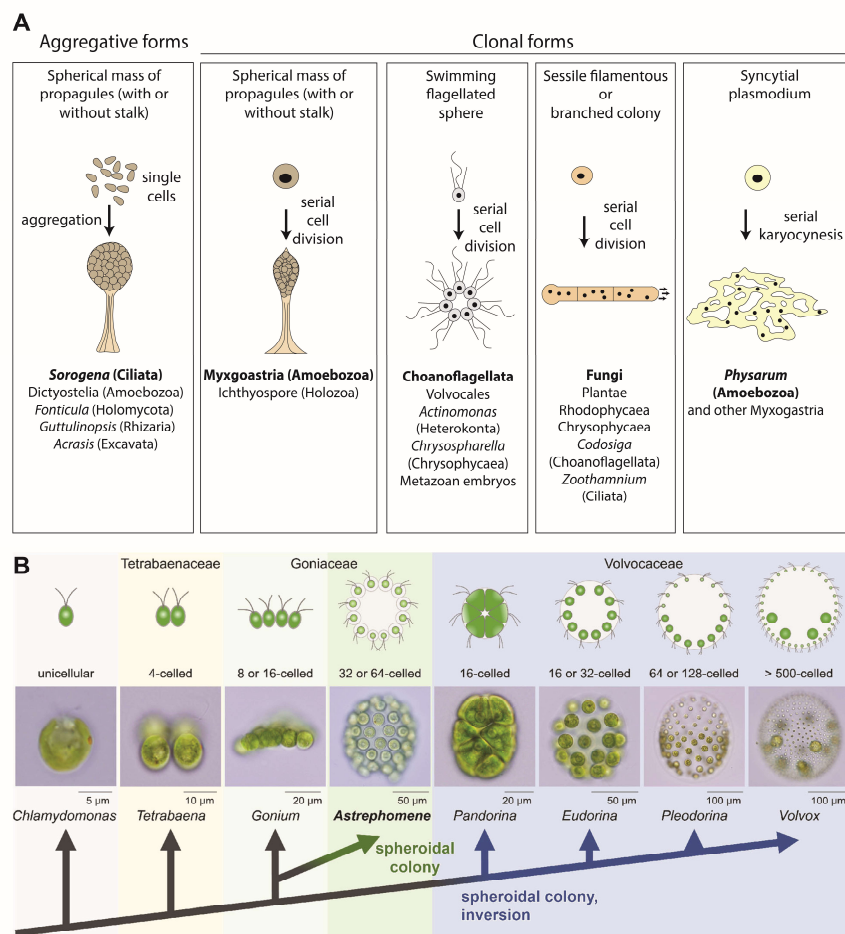


Figure 4. Différentes formes de multicellularité et morphologie des Volvocales. (A) Formes agrégatives et clonales de multicellularité dans le vivant (Brunet and King, 2017). (B) Formes unicellulaires, coloniales et multicellulaires de complexité croissante chez les Volvocales (Yamashita et al., 2016).

1.4.2 Evolution expérimentale de la multicellularité

La multicellularité est apparue de nombreuses fois dans le vivant, chez les procaryotes et les eucaryotes. Il est improbable qu'un phénomène si complexe soit apparu par chance si fréquemment, sous des formes variées et dans des groupes très différents (Grosberg and Strathmann, 2007). Quels sont les pressions évolutives qui amènent à cette convergence ? On peut se baser sur les réponses physiologiques amenant des comportements multicellulaires pour trouver ces pressions évolutives. La socialisation est une réponse adaptative qui ne nécessitent pas de sélection naturelle. Cependant, les causes de la formation des structures multicellulaires pourraient être les mêmes que celles de l'apparition de la multicellularité *stricto sensus*. Pour étudier ceci, des études d'évolution expérimentale en laboratoire ont permis de transformer des organismes unicellulaires en multicellulaires. Les premières expériences ont été faites en sélectionnant sur un grand nombre de générations les cellules sédimentant le plus. Cette pression de sélection artificielle a permis de générer des souches multicellulaires de *Saccharomyces cerevisiae* et *Chlamydomonas* (Moulton and Bell, 2013; Ratcliff et al., 2012, 2013). De façon plus intéressante, la prédation, qui est une pression de sélection présente dans la nature (voir 1.2.2), induit aussi une transition vers la multicellularité en quelques centaines de générations chez *Chlorella* et *Chlamydomonas* (Becks et al., 2010; Boraas et al., 1998; Herron et al., 2019). Les souches ainsi obtenues ont une ECM mais sont peu organisées et non motiles contrairement à *Tetrabaena* ou *Gonium* ce qui indique qu'il s'agit d'une forme coloniale primitive (Boyd et al., 2018). Les levures multicellulaires ont la morphologie clonale *snowflake*. En revanche, si la pression de sélection est plus intense, la levure évolue en énormes agrégats formés de *snowflakes* collés dans une matrice de protéines (Gulli et al., 2019). Cela montre que l'évolution d'une multicellularité agrégative est possible. Chez les microalgues, les formes multicellulaires obtenues par sédimentation ou prédation sont clonales. Ces souches montrent une expression différente de nombreux gènes dont ceux de la reproduction et du cycle cellulaire (Herron et al., 2018), ce qui est en corrélation avec le développement clonal en réponse au stress (se référer à 1.2.2).

En conclusion, les Volvocales ont développé une multicellularité qui peut être partiellement reproduite par évolution dirigée. Que ce soit dans la nature ou expérimentalement, la multicellularité est clonale et est due à des modifications du cycle cellulaire et de l'ECM. En réponse au stress, le comportement clonal est aussi dû à une modification du cycle cellulaire et de l'ECM (se référer à 1.2). En revanche, il a été proposé que la transition vers la multicellularité soit une combinaison de mécanismes clonaux et agrégatifs (Olson, 2013). Le scénario proposé est le suivant : dans des conditions défavorables, les cellules se regroupent. Si les périodes de stress persistent, l'agrégation devient un avantage évolutif. Par conséquent, le développement clonal devient aussi un avantage et est aussi sélectionné. Ainsi, les mécanismes clonaux et agrégatifs pourraient être à l'origine de la multicellularité.

2 Résultats

2.1 Bases de l'agrégation chez *Chlamydomonas*

2.1.1 Résumé de l'article

Historiquement, l'équipe de Stéphane Lemaire est experte dans la régulation redox de la fixation du carbone chez *Chlamydomonas* (Michelet et al., 2013). D'autres thématiques ont été développées plus récemment. D'une part, l'équipe contribue fortement aux prémices de la biologie synthétique chez *Chlamydomonas* avec en particulier la création d'un kit de clonage modulaire (voir Chapitre II.1, Crozet et al., 2018). D'autre part, plusieurs réponses au stress ont été étudiées comme l'autophagie (Pérez-Pérez et al., 2016) ou l'adaptation au manque de soufre (Mia et al., 2019). Pour étudier ces domaines, le laboratoire s'appuie sur une solide expertise en biochimie, protéomique et biologie moléculaire chez *Chlamydomonas*. Lorsqu'il a rejoint l'équipe, Antoine Danon mon directeur de thèse souhaitait étudier les mécanismes de la PCD chez un organisme unicellulaire. Pour induire la PCD, les cellules ont été soumises à des stress d'intensités variables (se référer à 1.1.2). Il a également pu constater que, comme ce qui était décrit dans la littérature, le milieu de culture de cellules mortes par PCD permettait de protéger les autres cellules de la population (Moharikar et al., 2006). C'est ainsi qu'il a initié les premières études de caractérisation du milieu de culture pour essayer de comprendre quelles étaient les molécules impliquées. Le pH est l'un des paramètres importants du milieu de culture, c'est pour cela qu'il a été analysé dans des conditions d'induction de la PCD. Les premières expériences ont montré que le pH du milieu de culture passait de 7 à 8,4 en quelques jours, non seulement dans les cultures pour lesquelles on avait induit la mort mais aussi pour les cultures contrôle. Pour voir si les cellules se développent mieux à pH 8,4, nous avons essayé les mettre directement en culture à ce pH. C'est alors que nous avons observé l'agrégation, en effet, les cellules forment dans ces conditions des agrégats visibles à l'œil nu. À la suite de cette observation, Antoine Danon a testé d'autres stress qui se sont montrés tout autant capables d'induire la formation d'agrégats, il a alors émis l'hypothèse que les cellules s'agrègeraient pour se protéger du stress. L'agrégation de *Chlamydomonas* est la plupart du temps perçue comme un artefact gênant les expériences (Harris, 1989). Au contraire, nous avons voulu étudier ce phénomène très peu décrit dans la littérature (voir 1.1.2). À cet égard, nous nous sommes posés plusieurs questions. Quelles conditions induisent l'agrégation ? Les cellules sont-elles protégées du stress dans les agrégats ? Les agrégats se forment-ils par agrégation ou de façon clonale ? Ce phénomène est-il contrôlé génétiquement ? Si oui, quels sont les gènes impliqués ?

Pour montrer la diversité des stress abiotiques pouvant aboutir à l'agrégation, nous avons mis *Chlamydomonas* en présence des stress oxydatif, nitrosatif et thermique. Face à des doses sublétales de ces stress, les cellules ont formé des structures multicellulaires visibles à l'œil nu composées de plusieurs milliers de cellules. Chez les unicellulaires, de telles structures multicellulaires peuvent être formées par un processus clonal ou agrégatif (voir 1.3.2 et Figure 3). Dans notre cas, nous avons montré qu'elles se formaient de façon agrégative. Nous avons ensuite caractérisé l'environnement des cellules agrégées en étudiant l'ECM et le milieu

extracellulaire. Une ECM riche en sucres a pu être détectée au sein des agrégats. Le milieu extracellulaire de cellules agrégées est suffisant pour induire l'agrégation. Enfin, nous avons montré que les agrégats protégeaient les cellules du stress. Pour identifier les régulateurs moléculaires de l'agrégation, la famille de mutants *socializer* (*saz*) agrégeant spontanément a été générée. Le fait que des mutants agrègent spontanément montre que ce phénomène est contrôlé génétiquement. Le mutant *saz1* est décrit en détail dans l'article ci-après, il est inactivé pour la subtilisine VLE1. Les agrégats de ce mutant et de la souche sauvage en réponse au stress ont des caractéristiques identiques. Ils ont une taille comparable, sont formés de façon agrégative, ont une ECM riche en sucres, protègent les cellules du stress et leur milieu induit l'agrégation. Pour identifier les régulateurs centraux de l'agrégation, une analyse multiomique a été menée sur six mutants *saz*. Les protéines du milieu ont été analysées en protéomique quantitative et l'expression des gènes a été mesurée en RNA-Seq. Ces deux analyses couplées nous ont permis d'identifier des gènes candidats régulateurs de l'agrégation. Pour certains d'entre eux nous avons caractérisé les mutants. Par cette stratégie de génétique inverse, nous avons obtenu des mutants incapables d'agréger et agrégeant spontanément confirmant que les gènes concernés sont impliqués dans l'agrégation. Cet article présente donc la première description de l'agrégation en réponse au stress abiotique chez *Chlamydomonas*. Nous y décrivons les bases moléculaires régulant ce processus.

2.1.2 Stress-induced collective behavior leads to the formation of multicellular structures and the survival of the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Stress-induced collective behavior leads to the formation of multicellular structures and the survival of the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Félix de Carpentier^{1,2,3}, Alexandre Maes¹, Christophe Marchand^{1,2}, Céline Chung¹, Cyrielle Durand¹, Pierre Crozet^{1,2}, Stéphane D. Lemaire^{1,2} and Antoine Danon^{1,2*}

¹ Institut de Biologie Physico-Chimique, UMR 8226, CNRS, Sorbonne Université, 75005 Paris, France

² Institut de Biologie Paris-Seine, UMR 7238, CNRS, Sorbonne Université, 75005 Paris, France

³ Université Paris-Saclay, 91190 Saint-Aubin, France

* Correspondence: antoine.danon@sorbonne-universite.fr

Summary

In response to hostile environments, unicellular organisms such as yeast or bacteria form multicellular structures known as biofilms as a protection mechanism. In the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, the formation of multicellular structures in response to stress remains poorly documented, and a potential protective role of these structures has never been described. We report in this paper the discovery of an abiotic stress response that *Chlamydomonas* can trigger to form large multicellular structures made of several thousand cells. We show that these aggregates constitute an effective bulwark within which the cells are efficiently protected from the toxic environment. We have generated the first family of mutants that aggregate spontaneously, the *socializer* mutants (*saz*), of which we describe here in detail *saz1*. We took advantage of the *saz* mutants to implement a large scale multiomics approach whose results shows that aggregation is not the result of passive agglutination, but rather genetic reprogramming and substantial modification of the protein composition of the extracellular compartment. The reverse genetic analysis we conducted on some of the most promising candidates allowed us to identify the first positive and negative regulators of aggregation and to make hypotheses on how this process is controlled in *Chlamydomonas*.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, abiotic stresses, aggregation, cooperation, multicellularity

Introduction

When confronted with environmental stress, multicellular organisms implement a set of reactions involving signaling and cooperation between cells from the same tissue. A typical example is the hypersensitive response triggered by plants against pathogens, during which certain cells will be led to self-destruction to enable the entire organism to survive (Saur, 2021).

In harsh environments, some unicellular organisms such as yeast or bacteria activate defense systems, which also favor the emergence of collective behaviors between cells. These mechanisms involve the formation of multicellular structures, such as biofilms, whose structure and function are well documented (Karatan and Watnick, 2009; Smukalla et al., 2008). Biofilms, as opposed to aggregates, are surface-anchored structures composed of an extracellular matrix (ECM) made of proteins and sugars, in which cells are embedded to better resist to environmental stresses (Flemming et al., 2016; Váchová and Palková, 2018).

In the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (hereafter named *Chlamydomonas*), the formation of multicellular structures has been observed, but the existence and the function of collective behavior mechanisms remain largely unknown. In response to abiotic stress or to predation, *Chlamydomonas* is able to form clonal assemblies up to 16 cells (palmelloids), or can passively flocculate by addition of destabilizing agents like multivalent cations or upon pH elevation (de Carpentier et al., 2019). Bigger multicellular structures have been reported in response to predators (Sathe and Durand, 2016), or by selection of sedimenting cells over a long period of time (Ratcliff et al., 2013). However, the function of these multicellular structures, their composition, and how their formation is controlled remain to be explored.

In this study, we unravel that the formation of large multicellular structures containing thousands of cells can be induced by a wide range of abiotic stresses, and that this process is a crucial pro-survival mechanism for *Chlamydomonas* cells. The formation of multicellular structures can be aggregative, when cells assemble together, or clonal when cells do not separate after division (de Carpentier et al., 2019). We demonstrate that in the conditions tested, aggregates are formed by an aggregative process, and that they include a sugar-rich ECM. To understand the genetic basis of this collective behavior, we have generated and screened 13,000 insertional mutants, and identified 16 *socializer* mutants (*saz*), which spontaneously form multicellular structures. We characterize here in detail the *saz1* mutant which is defective for the vegetative lytic enzyme (*VLE*) gene (Kubo et al., 2009). The aggregates formed by *saz1* result from an aggregative process, and they also contain a

sugar-rich ECM. Moreover, *sazI* was found to be more resistant to several abiotic stresses. For both *sazI* and stress-induced aggregates, the extracellular compartment had a central role in the formation of multicellular structures. Finally, a large scale multiomics approach taking advantage of the *saz* mutant collection revealed a network of regulators of aggregation in *Chlamydomonas*.

Results

Characterization of aggregation in response to stress

Wild-type cells from the D66 strain (CC4425) (Schnell and Lefebvre, 1993), were subjected to several stresses: S-Nitrosoglutathione (GSNO, nitrosative stress, Morisse et al., 2014), rose bengal (singlet oxygen, Fischer et al., 2005), paraquat (superoxide/H₂O₂, Laloï et al., 2007) and heat shock (Durand et al., 2011; Schroda et al., 2015). For all the stresses tested, at low intensity no impact could be visualized in the cultures, while at higher doses cells died. Nevertheless, at intermediate stress levels, large aggregates visible to the naked eye were detected and their surface area quantified (Figure 1A). Aggregates could be detected after one day and their size continued to increase steadily with time. To determine whether *Chlamydomonas* cells form multicellular structures through aggregation or clonal assembly under our conditions, we constructed a strain expressing mVenus, a cytosolic yellow fluorescent protein (YFP) (Crozet et al., 2018). The mVenus strain was grown together with the wild type and treated with rose bengal to induce aggregation. The multicellular structures obtained were then analyzed and found to be aggregative, since they were composed of mVenus and wild-type cells (Figure 1B). During our observations, we found that within the aggregates a translucent structure resembling ECM was very frequently visible (Figure 1E). Knowing that in bacteria and yeasts the ECM present in biofilms are rich in sugar (Flemming et al., 2016), we have tried to detect the presence of these compounds in our aggregates. We induced aggregation using rose bengal and stained the cells in the presence of fluorescently-labeled Concanavalin-A (ConA-FITC), that binds glucosyl and mannosyl residues (Cavada et al., 2018). In Figure 1C, it appears clearly that the structures we identified as ECM, exhibit a strong fluorescence showing the presence of sugar.

To test whether the formation of aggregates could enable increased stress resistance, we treated wild-type cultures with rose bengal, and stained dead cells using Evans blue (Vijayaraghavareddy et al., 2017). We observed that most of the time, within multicellular structures, cells were protected from the toxic environment, while the others were dead (Figure 1D). To quantify

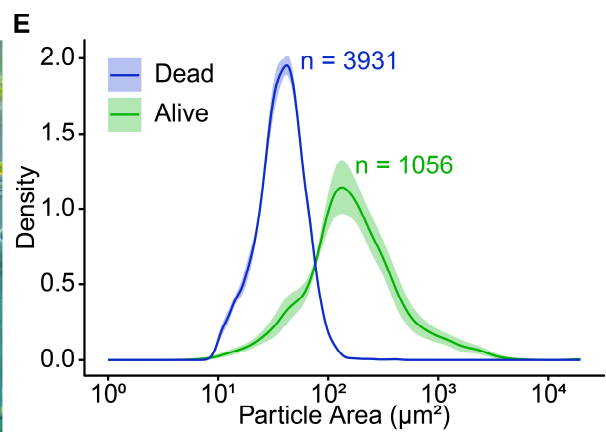
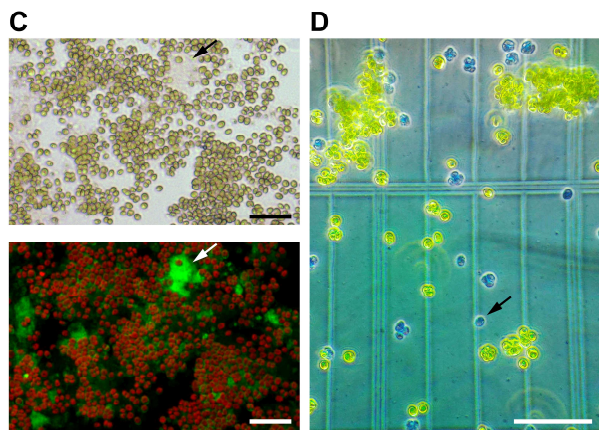
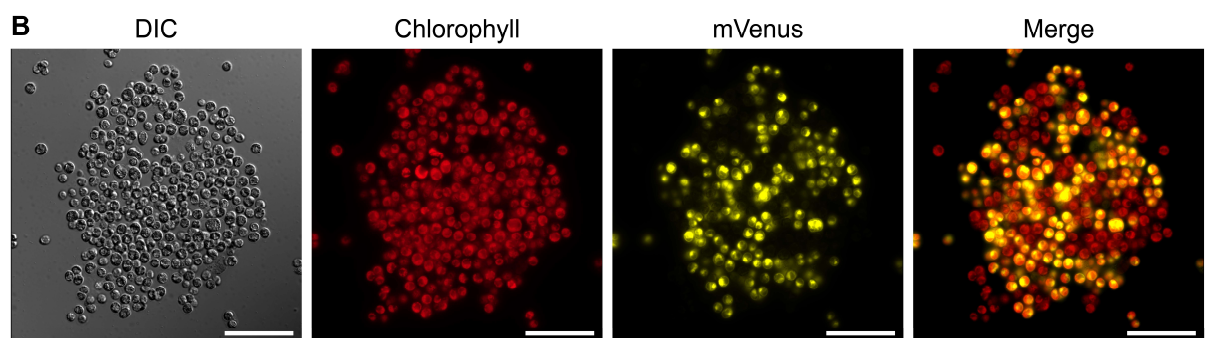
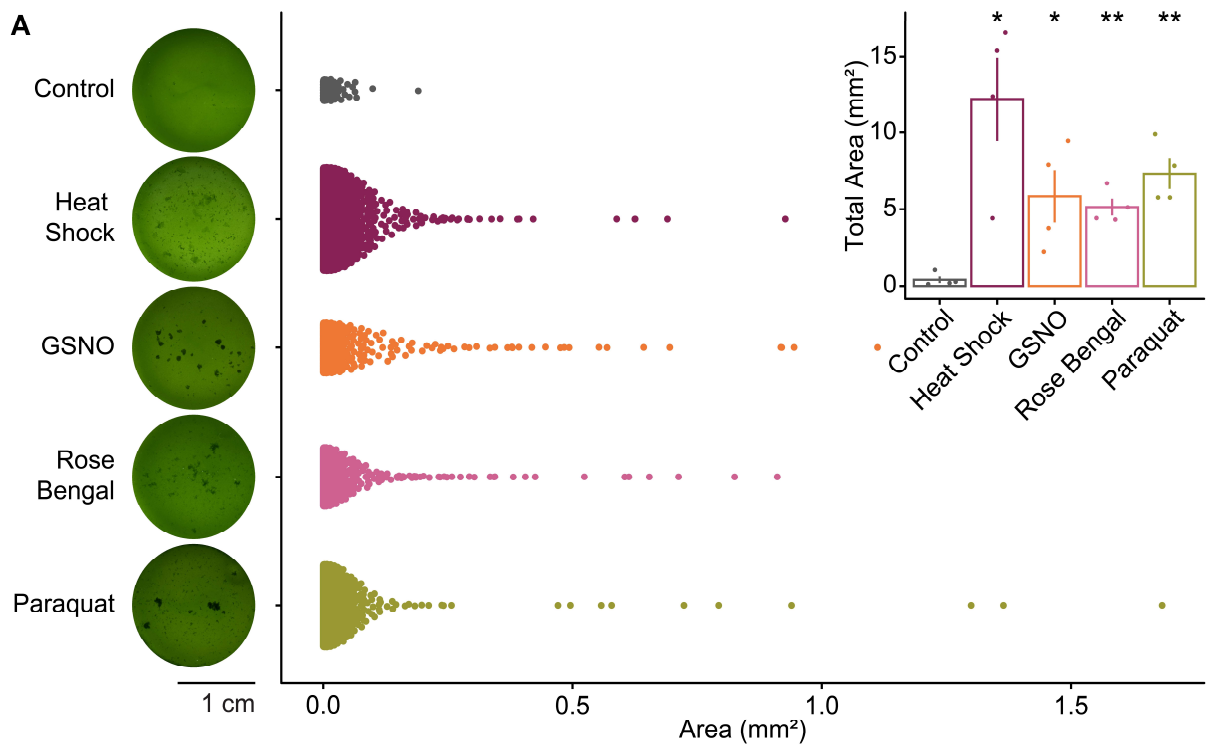


Figure 1. Protective aggregation in response to stress. (A) Wild-type (CC4425) cultures were exposed to heat shock (50°C, 3 min), GSNO (0.5 mM), rose bengal (2 μ M) and paraquat (0.1 μ M) and placed in a 24-well plate for 48 h. For each well aggregates were detected, and their surface measured. For each condition, all the aggregates detected in 4 independent wells are shown, each point represents an aggregate. The bar chart represents the average total surface area of the 4 wells. (B) Microscopic observations of a representative aggregate induced by heat shock (50°C, 3 min), consisting of a mixture of wild-type and mVenus (YFP) cells. Red fluorescence represents chlorophyll and yellow fluorescence represents mVenus. (C) Microscopic observations of sugar detection in extracellular matrix-like structures (arrow), within a rose bengal-induced representative aggregate, imaged in brightfield (upper panel), chlorophyll (red) and ConA-FITC fluorescence (green) (lower panel). (D) Labeling of dead cells with Evans blue (arrow) 48 hours after treatment with rose bengal (4 μ M). (E) Relationship between the viability of the structures detected and their surface after a 48-hour treatment with rose bengal (4 μ M), “n” values represent the total number of objects analyzed from four biological replicates. Error bars (A) and shaded area (D) indicates \pm SEM and for *t*-test: * $p \leq 0.05$ or ** $p \leq 10^{-2}$. Scale bars represents 50 μ m (B and E) and 100 μ m (C).

this phenomenon, we developed an image analysis process allowing detection of all the structures, their size and whether the cells are alive (green) or dead (blue). These analyses clearly showed that the larger the structures to which the cells belong, the more the phenomenon of protection is exacerbated (Figure 1E).

Socializer 1 mutant

To understand the genetic mechanisms that control the process of aggregation, we created and screened a library of 13,000 insertional transformants. This allowed identification of 16 mutants dubbed *socializer* (*saz*) for their ability to aggregate spontaneously. In The present study we have extensively characterized the mutant *saz1* which forms large multicellular structures visible to the naked eye and containing several thousand cells (Figure 2A). The size of *saz1* aggregates varied between 100 μ m² and several mm², in the same range as stress-induced aggregates of wild type cells (Figure 2C). When observed under the microscope, we saw that the cells form a homogeneous

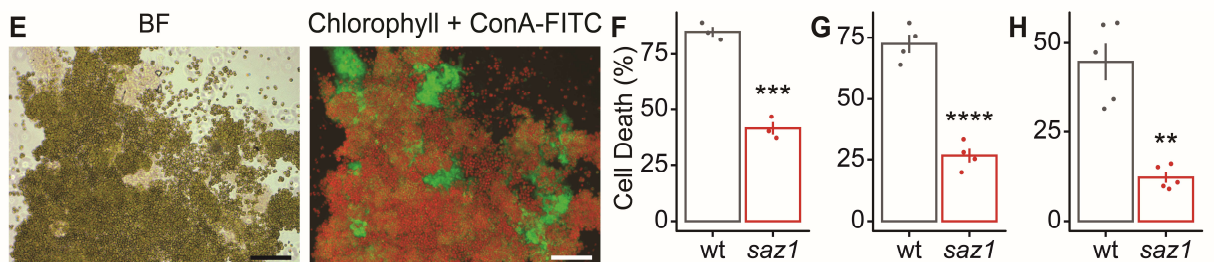
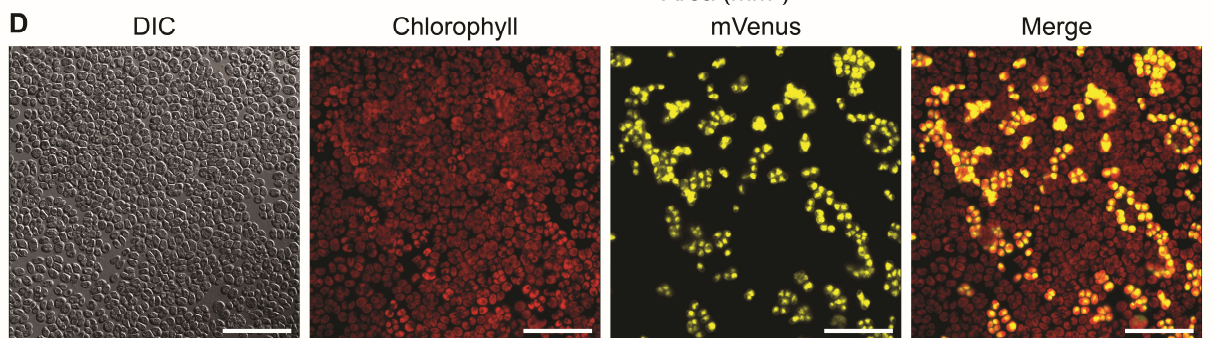
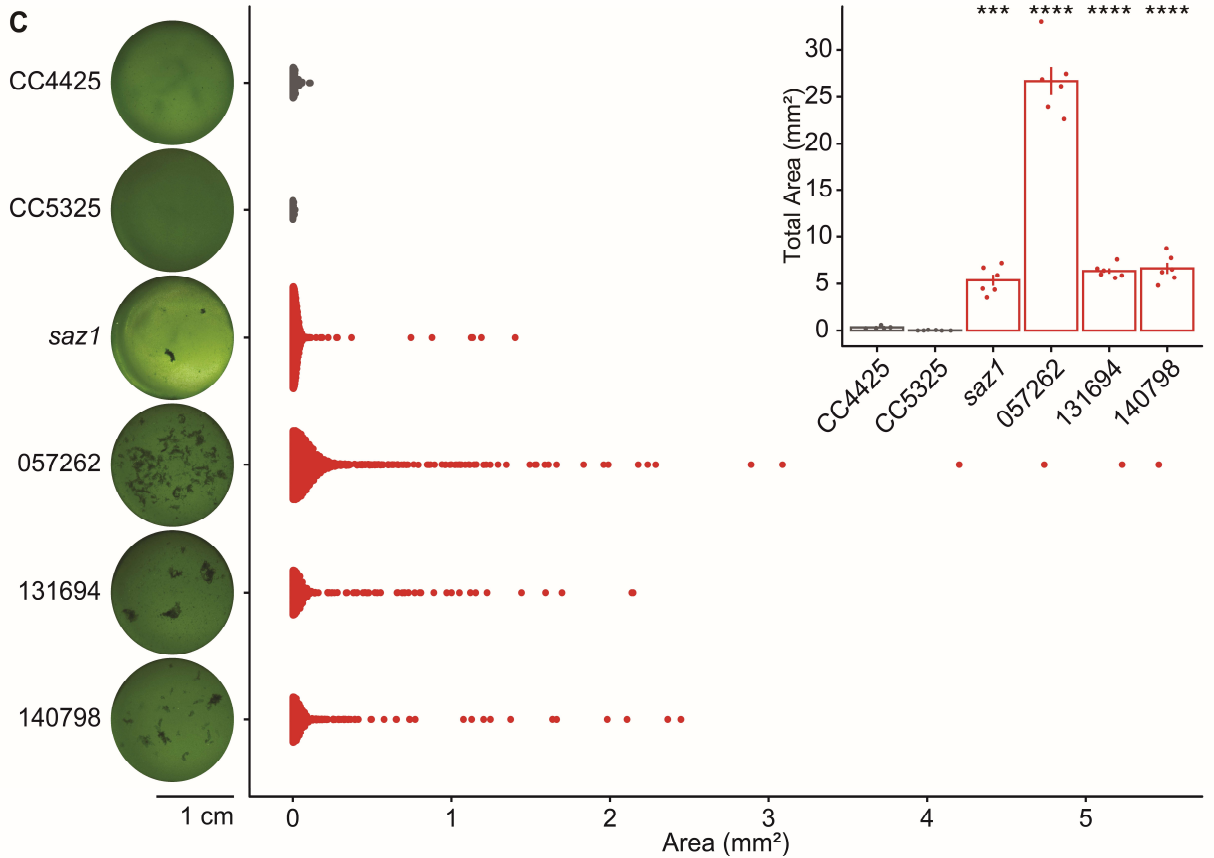
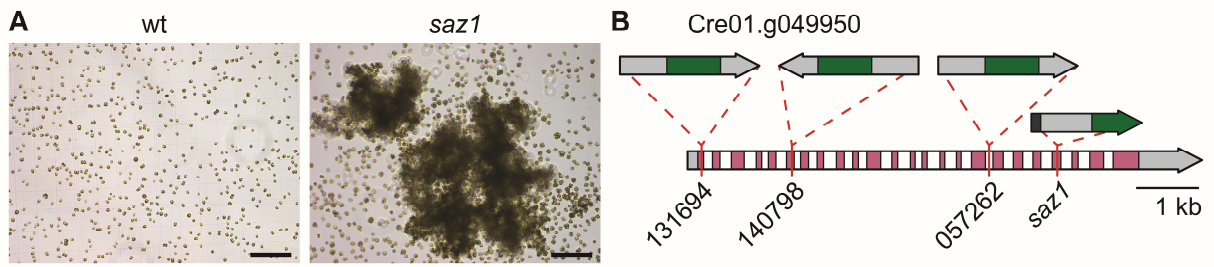


Figure 2. *Socializer1* characterization. (A) Representative microscopic observation of cultures of the wild type (CC4425) and *saz1* mutant under standard culture conditions. (B) Insertion sites of the cassette in the *VLE* gene (Cre01.g049950) in *saz1* and three CLiP mutants (LMJ.RY0402.131694, LMJ.RY0402.140798 and LMJ.RY0402.057262). (C) Cultures of *saz1*, the CLiP mutants and the corresponding wild-types, respectively CC4425 and CC5325, in 24 well plate. For each well aggregates were detected, and their surface measured. For each condition, all the aggregates detected in 6 independent wells are shown, each point represents an aggregate. The bar chart represents the average total surface area of the 6 wells. (D) Microscopic observations of a representative aggregate formed in a co-culture of wild-type and Venus (YFP) strains. Red fluorescence represents chlorophyll and yellow fluorescence represents mVenus. (E) Microscopic observations of sugar detection in extracellular matrix-like structures (arrow), within a representative *saz1* aggregate, imaged in brightfield (left panel), chlorophyll (red) and ConA-FITC fluorescence (green) (right panel). (F) Evaluation of dead cell percentage in wild-type and *saz1* cells using Evans blue staining, after heat shock (50°C - 4 min, 24 h), GSNO (1 mM, 24 h) (G) and rose bengal (4 μM, 8 h) (H) treatments. Error bars indicates ± SEM and for *t*-test: ** $p \leq 10^{-2}$; *** $p \leq 10^{-3}$ or **** $p \leq 10^{-4}$. Scale bars represents 50 μm (D) and 100 μm (A, H).

structure in which the cells appear to be attached to each other (Figure 2D). The SAZ1 locus was characterized using the protocol described in (González-Ballester et al., 2005). The *saz1* mutant harbors an insertion in the Cre01.g049950 gene (Figure 2B), previously named vegetative lytic enzyme (*VLE*) (Matsuda et al., 1995) or sporangin (*SPO*) (Kubo et al., 2009). We precisely localized the insertion in the exon 21 of Cre01.g049950 and verified that a wild-type copy of the corresponding mRNA was no longer expressed in *saz1* (Figure S1). To confirm that a mutation in the *VLE* gene leads to a spontaneous aggregation phenotype, we analyzed three additional insertional *vle* mutants obtained from the CLiP library (Li et al., 2019) (LMJ.RY0402.131694, LMJ.RY0402.140798 and LMJ.RY0402.057262). In these mutants with an insertion respectively in the 1st exon, the 6th exon and the 17th intron, the *VLE* mRNA could not be detected (Figure S1). Similarly to *saz1*, these three mutants aggregated spontaneously as opposed to the corresponding wild-type strain (CC5325) (Figure 2C).

To determine the way aggregates are formed in *saz1*, we grew cultures composed of a combination of *saz1* and the mVenus strain described in Figure 1B. As in the case of the aggregates

formed in response to stress by wild type cells, the multicellular structures spontaneously formed by *saz1* were heterogenous and therefore the result of an aggregative process (Figure 2D). A sugar-rich ECM could be detected in *saz1* aggregates using ConA-FITC (Figure 2E). The formation of wild type aggregates allowed increased resistance of the cells to stress conditions (Figure 1C-D). Consistently, *saz1*, which forms aggregates spontaneously, was also more resistant to stress. Indeed, *saz1* showed a higher resistance to all the stresses tested (GSNO, rose Bengal and heat shock), (Figure 2F-H), confirming the protective role of aggregates.

The culture medium is sufficient to induce aggregation.

Growing *saz1* with the mVenus strain that does not spontaneously aggregate, induces the formation of heterogenous multicellular structures (Figure 2D), suggesting a potential role of the culture medium in transmitting an aggregation signal. To test this hypothesis, we removed the cells from the culture medium by centrifugation and filtration. Wild-type cells were then grown in this culture medium, and the formation of multicellular structures was quantified. Remarkably, the culture medium of the mutant was able to induce a strong aggregation of wild-type cells (Figure 3A). There is therefore probably one or several molecules in the culture medium capable of inducing aggregation. To investigate the nature of this molecule we subjected the culture medium to different treatments. After boiling for two minutes, a treatment that denatures proteins, the culture medium was no longer able to induce aggregation (Figure 3A). Filtration of the culture medium revealed that only the fraction containing molecules above 30 kDa was capable of inducing aggregation (Figure 3A). These results are consistent with the hypothesis that one or several proteins in the culture medium might induce aggregation. To test whether the culture medium resulting from stress-induced aggregation could also induce the formation of aggregates, we induced aggregation using heat shock, as this treatment does not require incorporation of foreign molecules into the culture medium. This culture medium was just as capable as the medium of the *saz1* mutant to trigger aggregation of non-stressed cells (Figure 3B).

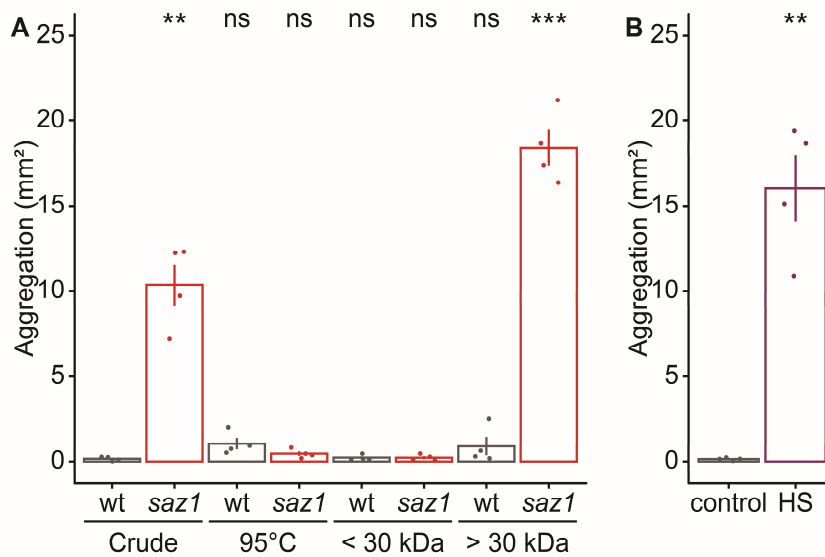


Figure 3. Induction of aggregation by the culture medium. (A) Medium from wild-type (CC4425) and *saz1* cultures were harvested by centrifugation and filtrated. Wild-type (grey) or *saz1* (red) medium were then used to start wild-type cultures in 24-well plates. Other cultures were initiated in wild-type (grey) or *saz1* (red) medium that were boiled for 2 minutes or fractionated using a 30 kDa filter. For each culture, aggregates were detected, and their surface measured. Values represent the average of total surface area of 4 independent wells. (B) Wild-type (CC4425) cells were grown in 24-well plates in control (grey), or heat shock (purple) medium. In both cases, values represent the average of total surface area of the aggregates detected in 4 independent wells. Error bars indicates \pm SEM and for the *t*-test ** $p \leq 10^{-2}$ or *** $p \leq 10^{-3}$.

Quantitative analysis of the secretome

As the culture medium is sufficient to induce aggregation in *Chlamydomonas*, possibly by way of proteins, we performed a quantitative proteomic analysis by comparing the culture media of 6 *saz* mutants with that of the wild type. For each strain, five biological replicates were prepared and analyzed by tandem mass spectrometry. In our seven samples we identified a total of 762 proteins in the culture medium (Table S1). The PredAlgo algorithm (Tardif et al., 2012), predicts that 341 (44.7%) of these proteins are exported, 108 (14.2%) are chloroplasic, 44 (5.8%) are mitochondrial while 269 (36.3%) of them have no prediction. Consistent with the fact that the culture medium was analyzed, a majority of the identified proteins are predicted to be secreted. The proteins whose content is altered in several mutants in comparison to the wild type, were classified into different categories, depending on whether their expression is altered in 6, 5, 4, 3 or 2 mutants (Figure 4A).

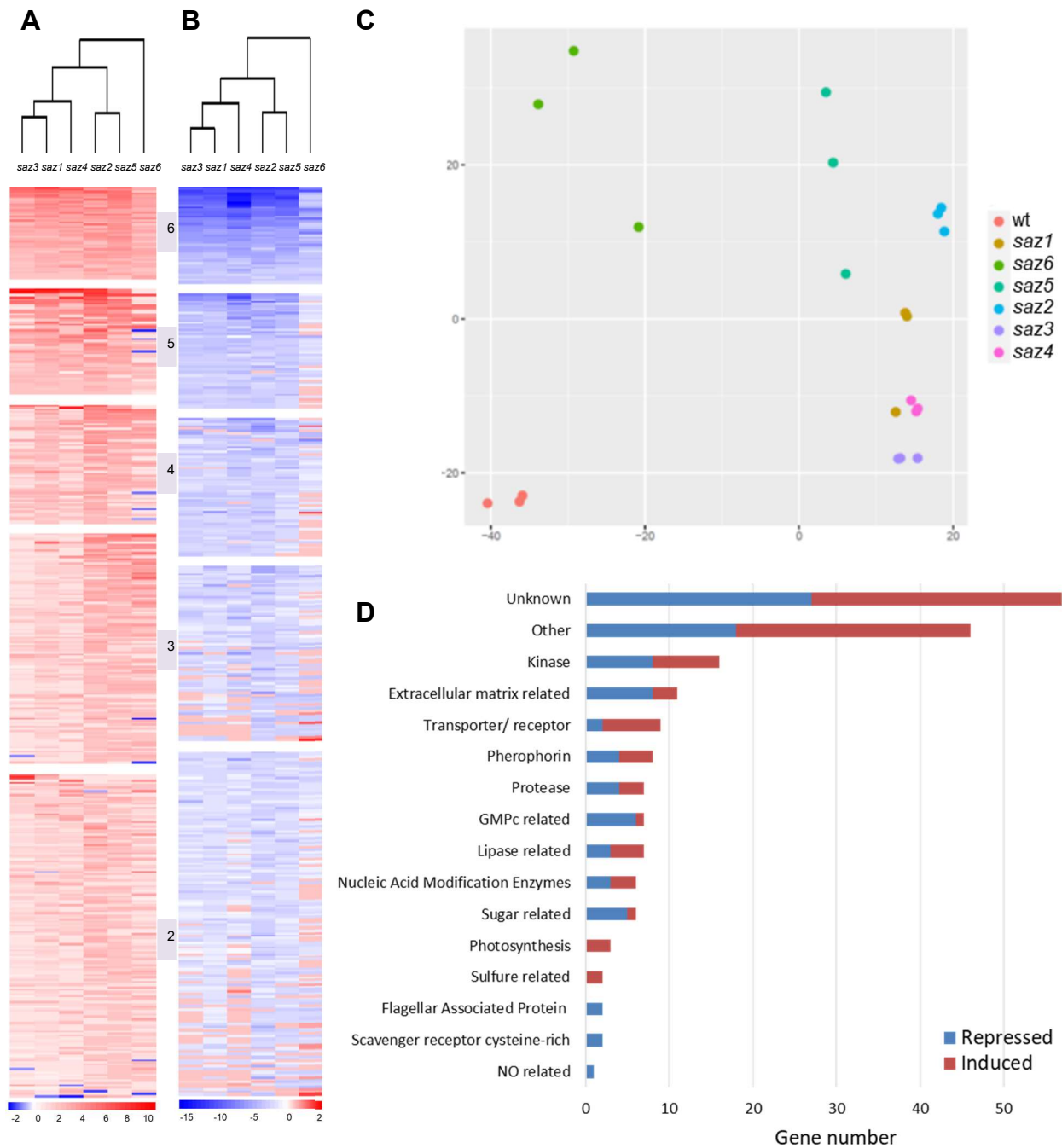


Figure 4. Quantitative proteomic analysis of the extracellular medium. We analyzed the protein content of the culture medium in the wild type in comparison to 6 different *saz* mutants. The results are expressed as a ratio (log2) of the different mutants compared to the wild type, we classified them according to whether the proteins are under-represented (A) or over-represented (B) in 6, 5, 4, 3 or 2 mutants. (C) We analyzed the function of the proteins deregulated in 5 or 6 mutants according to their description on the Phytozome v13.0 website or in the literature, and we divided them into

different categories according to the number of proteins represented. The list of these proteins is available in Table S3.

To identify common regulators of aggregation, we focused on the proteins deregulated in 6 but also in 5 mutants (208 proteins) to avoid missing interesting candidates. We classified the proteins into different categories according to their annotation on the JGI Phytozome v13.0 website (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>), and their descriptions in the literature (Figure 4B).

In this list perophorins hold an especially important place. These proteins are essential constituents of the ECM in *Volvox carteri*, a multicellular organism that belongs, like *Chlamydomonas* species, to the order of Volvocales (Hallmann, 2006). Among the most represented protein classes, we also found proteases, including the subtilisin VLE which is absent in *saz1* as expected, and interestingly downregulated in the medium of all the other *saz* mutants. We also detected several matrix metalloproteinases (MMPs), such as gametolysins which are known to degrade the cell wall during mating in *Chlamydomonas* (Abe et al., 2004; Kinoshita et al., 1992), but also to contribute to the destruction of the ECM in *Volvox carteri* (Nishimura et al., 2017) and animals (Zaragoza et al., 2002). Other proteins related to the ECM were also detected, such as VSPs (vegetative, SP rich) (Waffenschmidt et al., 1993), lysyl oxidases (LOX) containing scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domains, which are necessary for ECM formation in animals (Laczko and Csiszar, 2020), or formin which influences ECM stability through the control of actin polymerization (Alieva et al., 2019; Eisenmann et al., 2007). We also found many sugar-related proteins, mainly involved in catabolism (e.g., Glucan 1,3- β -glucosidase or β -galactosidase), glycosylation or sugar binding (lectins). Interestingly, we found four ephrin A/B receptor-like proteins that are known in animals to mediate cell-cell adhesion (Niethamer and Bush, 2019). Two of them share similarities with mastigonemes which have been proposed to play a role in adhesion through an interaction with the transient receptor potential cation channel PKD2 (polycystic kidney disease 2) (Liu et al., 2020). The latter mediates flagellar agglutination during mating (Huang et al., 2007). Altogether this suggests that adhesion mechanisms could also have a role in the assembly of multicellular structures. Hydroxylation and glycosylation of proline residues are associated with protein secretion (Duruflé et al., 2017). In our secretome, eight enzymes linked to these post-translational modifications, were upregulated in *saz* mutants. We identified members of another protein family also capable of modifying prolines residues, the peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (PPI), which contribute to

protein folding by catalyzing the cis/trans-isomerization of peptidyl-prolyl bonds (Singh et al., 2020). Finally, we found several lipases that are downregulated in *saz* mutants, suggesting that lipids may be important for the aggregation process (Figure 4C). The entire list of the 208 proteins is shown in Table S2.

Transcriptomic analysis of the *saz* mutants

We completed our systemic approach by analyzing the transcriptome of the same six *saz* mutants in comparison with the wild type, using an RNA-Seq approach. During this analysis, a total of 16,829 messenger RNAs were detected (Table S3). Principal component analysis (PCA) showed that each of the biological triplicates used for the different strains are homogenous and that the different strains analyzed are clearly distinct (Figure 5B). However, the gene expression profile of one of the strains, *saz6*, was quite different compared to the other 5 mutants (Figure 5A-B). As we did for our proteomics analysis, we focused on genes deregulated in 6 but also in 5 mutants, to avoid missing important genes that would not be affected in one mutant. This subset corresponds to the 192 genes up- or down-regulated at least 4-fold in at least 5 *saz* mutants (Table S4).

Strikingly, many genes belong to the main families identified during our proteomic analysis including several genes encoding phosphorins, proteases, lipases, as well as proteins linked to the ECM (Figure 5C). We also identified several genes encoding lectins, that bind specifically to sugars. Beyond these families also found in our secretome, this transcriptomic analysis uncovered additional gene families that may be involved in the intracellular signaling controlling aggregation. Sixteen genes encode kinases, which are key players in cellular signaling. Interestingly, six genes related to cyclic guanosine monophosphate (cGMP), which can act as a second messenger controlling kinase activities (Kim and Sharma, 2021), are downregulated in *saz* mutants, including four guanylate cyclases. Other interesting genes with a potential role in sensing or signaling include several ion channels, receptors, or transporters (Figure 5C).

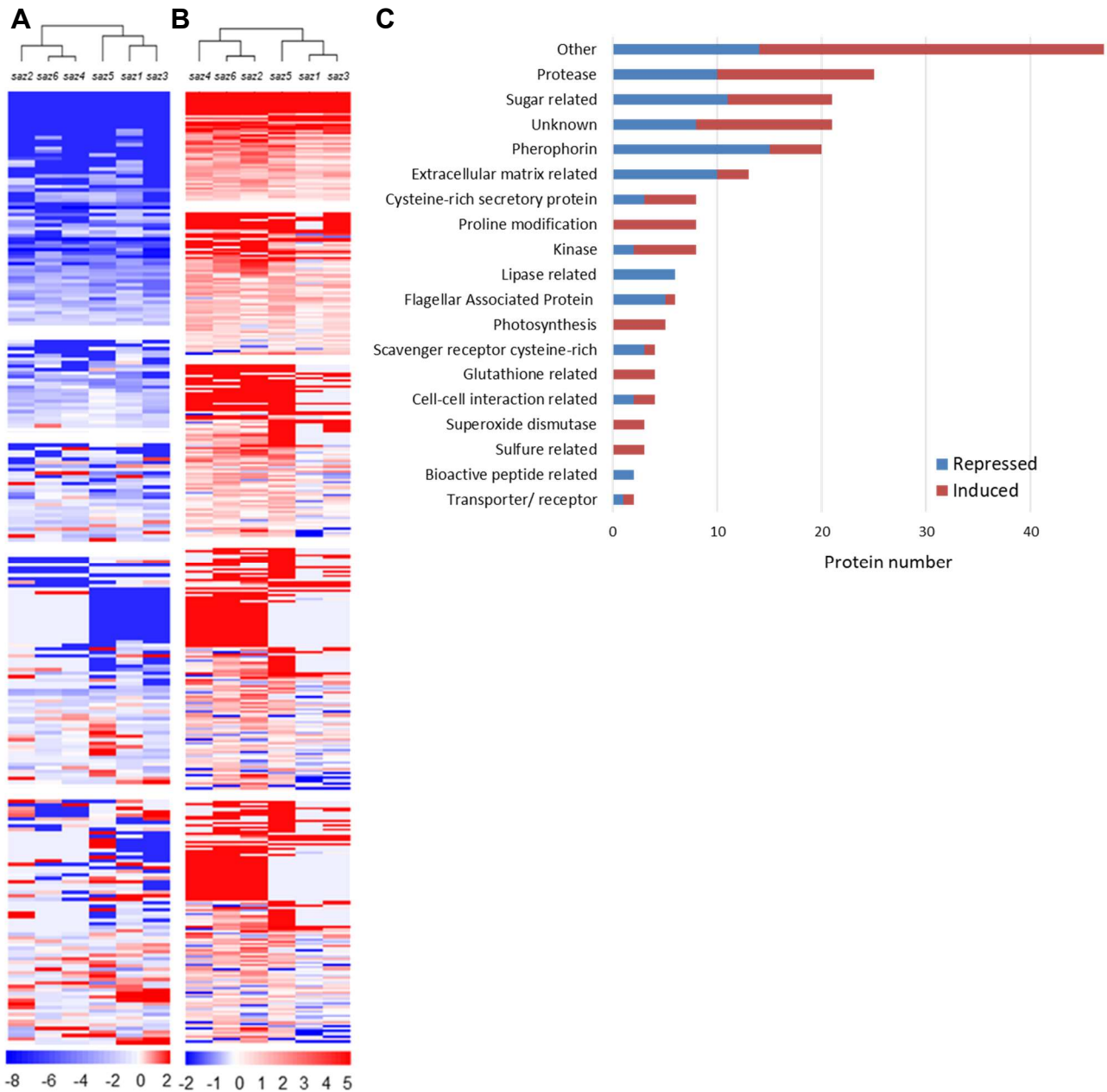


Figure 5. Transcriptomic analysis of the *saz* mutants. We analyzed the transcriptome of the wild type in comparison to 6 different *saz* mutants. The results are expressed as a ratio (\log_2) of the different mutants compared to the wild type, we classified them according to whether the genes are repressed (A) or induced (B) in 6, 5, 4, 3 or 2 mutants. (C) Principal component analysis (PCA) of the transcript levels, for each strain 3 biological replicates were analyzed. (D) We analyzed the function of the genes that are deregulated in 5 or 6 mutants according to their description on the Phytozome v13.0 website or in the literature, and we divided them into different categories according to the number of gene represented. The list of these genes is available in Table S4.

Cross-analysis of the transcriptomic and proteomic analyses

To determine whether correlations exist between changes in protein abundance in the medium and gene expression profiles, we have cross-analyzed our results, focusing on the 42 pherophorins and the 15 MMPs that were detected in the extracellular compartment. For many members of these two families, we find both under-expressed and over-expressed representatives, illustrating the complexity of the signaling pathways induced during aggregation (Figure 6A-B). We observed that the variation in the amount of protein in the extracellular compartment is not always accompanied by a variation in the expression of the corresponding gene. For a few genes, such as *PHC30* or *PHC75*, the changes in gene and protein expression are even opposite. In such cases, other mechanisms than transcription are attributable to this difference like changes in mRNA or protein stability, in translation or subcellular localization. Nevertheless, for a vast majority of genes, the variation in the expression of a gene and the amount of the corresponding protein are correlated (Figure 6A-B).

Identification of new regulators of aggregation

Our multiomic analysis allowed identification of candidates potentially involved in the control of aggregation. To assess this possible function, we analyzed insertion mutants of the CLiP library (Li et al., 2019), for some of the genes of the main categories identified. We selected several pherophorins, MMPs, VSPs and Glucan 1,3-Beta-Glucosidases (GBGs), from our proteomic or transcriptomic analyses. Among the selected mutants, several exhibit a phenotype related to aggregation, which we have characterized in more detail. For each mutant strain, we confirmed the presence of the insertion sequence at the expected locus identified by the CLiP library (Figure S2). The ability of each mutant to aggregate in response to stress was investigated. Three mutants affected in pherophorin genes (*PHC30*, *PHC41* and *PHC50*), which are all up regulated in *saz* mutants, are no longer able to aggregate in response to rose bengal (Figure 7A). This suggests that the corresponding proteins have a pro-aggregation role. Conversely, several mutants spontaneously form aggregates, indicating that the corresponding proteins probably have an anti-aggregation role (Figure 7B). For all these mutants, except *mmp23*, the pro-aggregation role is consistent with the downregulation of the corresponding protein (*PHC28*, *PHC35*, *MMP32*, *VSP4*, *GBG*) or mRNA (*PHC28*, *PHC35*) revealed by our multiomic analysis (Figure 7B).

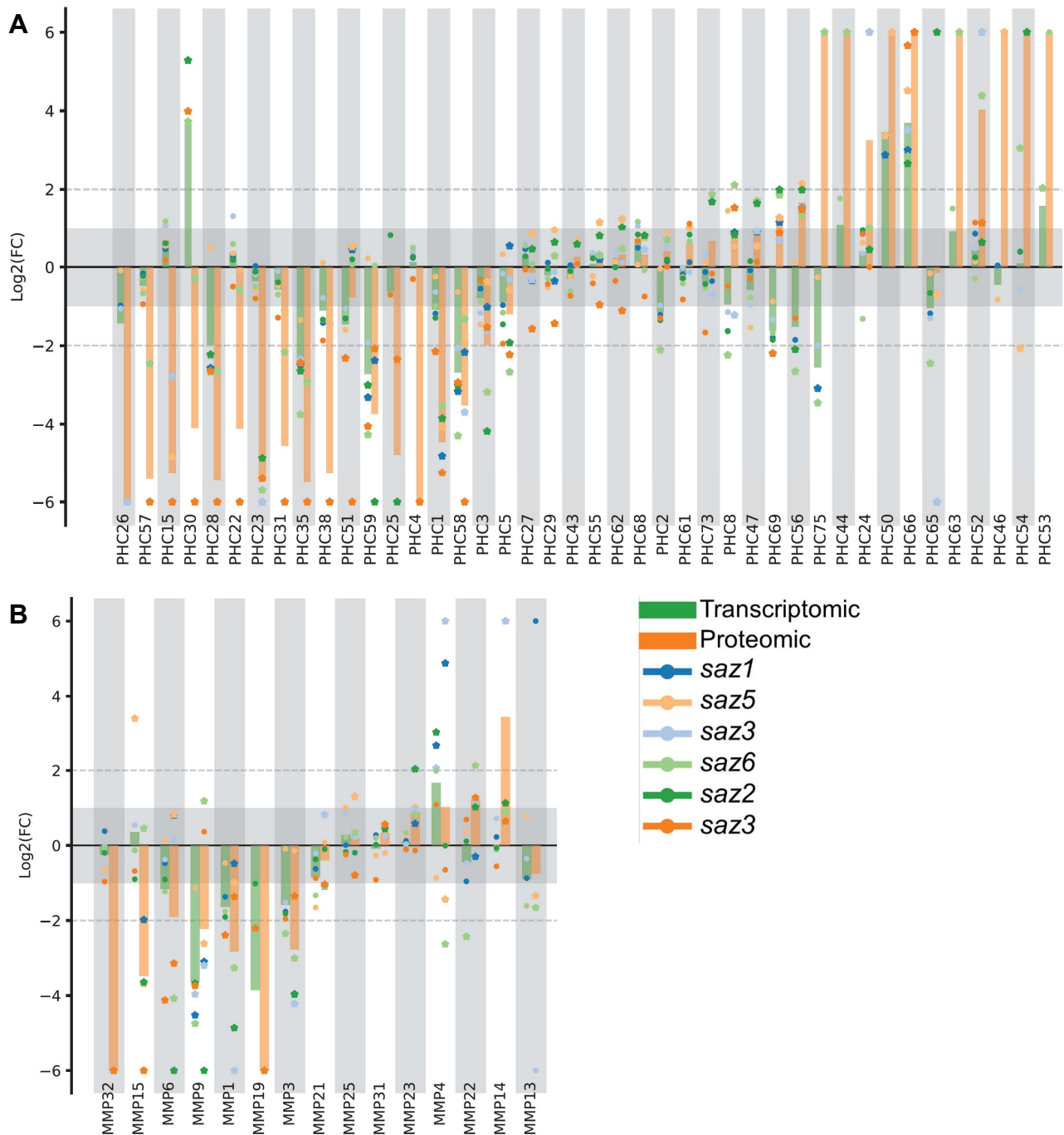


Figure 6. Cross-analysis of our multiomic study for pherophorins and MMPs. We have compiled the results obtained during our proteomics and transcriptomics studies for all pherophorins (PHC), (A) or matrix metalloproteinases (MMP), (B) that were detected in the culture medium. The bars represent the ratio between the average expression of the six mutant and the expression of the wild type, the green bars represent the results of the transcriptomics analysis and the orange bars represent the results of the proteomic analysis. Each point according to its color represents the ratio

associated with a particular mutant.

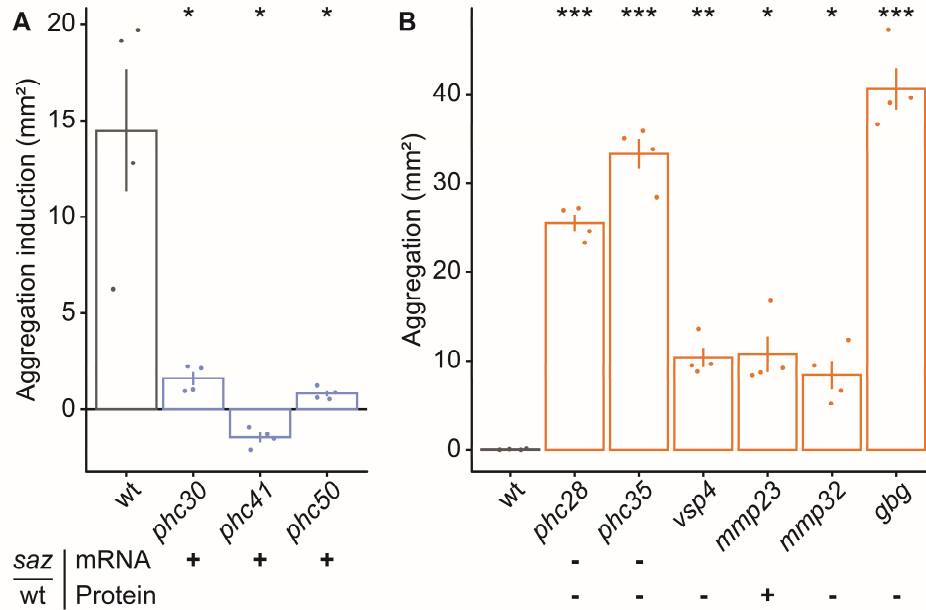


Figure 7. Reverse genetic analysis. From our multiomics analysis, we have selected and characterized CLiP mutants of genes of potential interest, strains exhibiting an aggregation-related phenotype are presented here. These strains were grown in 24-well plates and aggregates were detected and their surface measured. For each condition, values represent the average of total surface area of 4 independent wells. Some of the mutants we analyzed are no longer able to form aggregates in response to rose bengal (A), other mutants spontaneously form aggregates under standard culture conditions (B). When a gene or protein is down- or up-regulated in *saz* mutants, the symbols (-) or (+) is notified under its name.

Discussion

Several responses to abiotic stress have been reported in *Chlamydomonas* including acclimation, palmelloid formation and programmed cell death (de Carpentier et al., 2019). Here we report the discovery of a mechanism of abiotic stress response involving collective behavior and the formation of large multicellular structures visible to the naked eye (Figure 1A). This phenomenon appears as a general stress response since aggregation is induced and can confer resistance to stresses of different nature. The mode of aggregate formation is not simply the result of the non-separation of cells after division (clonal mode), but rather a complex process that may involve communication between cells, a change in their ability to interact and a sugar-rich ECM (Figure 1B-C). We show

here that the formation of aggregates is an efficient way for *Chlamydomonas* to survive abiotic stress, and that the size of aggregates correlates with the capacity to survive under stress conditions (Figure 1D-E).

To understand how this complex process is genetically controlled, we have identified the first family of mutants exhibiting a spontaneous aggregation phenotype, the socializer (*saz*) mutants. A large scale multiomic analysis of these mutants revealed the existence of a common genetic program and the importance of the secretome to implement cellular aggregation. Spontaneous aggregation of *saz* mutants appears comparable to stress-induced aggregation including the same mode of aggregate formation, a sugar-rich ECM (Figure 2D-E), a pro-aggregative culture medium (Figure 3), and increased resistance to stress (Figure 2D-E). The *saz* mutant collection therefore constitutes an invaluable tool for the understanding of this phenomenon.

In the present study, we further characterized the *saz1* mutant and showed that inactivation of the Cre01.g049950 gene induces a spontaneous aggregation phenotype (Figure 2A-C). This gene has already been described in the literature as vegetative lytic enzyme (*VLE*) (Matsuda et al., 1995) or sporangin (*SPO*) (Kubo et al., 2009). Because of its expression profile, its spatio-temporal localization and its biochemical function, it was suggested that VLE was responsible for sporangial cell wall degradation during cell division (Kubo et al., 2009; Matsuda et al., 1995). However, this hypothesis has never been validated by the characterization of a VLE mutant. If the sole function of VLE was to release cells during division, a culture of the *vle* mutant would likely consist only of cells in sporangia or possibly in larger multicellular structures resulting from a clonal formation process. By contrast, for the four *vle* mutants analyzed, we observed both free cells, as well as large aggregates (Figure 1A), which we showed to be heterogeneous and therefore not the result of a clonal formation process (Figure 2D). This would suggest that not only VLE, but several enzymes are capable of releasing cells during division, and that VLE has at least one other function in controlling aggregation in *Chlamydomonas*. Other authors have suggested that VLE could be a gametolysin activator (Luxmi et al., 2018). Gametolysins are MMPs that are responsible for cell wall removal during mating and need to be activated by a still unknown serine protease (Snell et al., 1989). Therefore VLE, which was the only serine endoprotease identified in the mating secretome, might be responsible for the cleavage activation of gametolysins during this process (Luxmi et al., 2018). MMPs are also known to control the degradation of the ECM in plants (Marino and Funk, 2012) and animals (Fanjul-Fernández et al., 2010; Zaragoza et al., 2002). The possible MMP activation

function of VLE could explain how it contributes to the control of aggregation in *Chlamydomonas*, as ECMs are present in all the aggregates we analyzed (Figure 2E). Another argument in favor of the importance of MMPs in the control of the aggregation process is that several of them are deregulated in *saz* mutants, at the gene and/or the protein level (Figure 6B). To investigate the potential involvement of the selected MMPs, the corresponding mutants were characterized. Two mutants exhibit a spontaneous aggregation phenotype (MMP23 and MMP32), giving them an anti-aggregation role in this process (Figure 7). Beyond MMPs which are known to target ECM proteins (Fanjul-Fernández et al., 2010; Marino and Funk, 2012), we identified other protein controlling ECM formation in other organisms. Pherophorins are a family of extracellular hydroxyproline rich glycoproteins, whose function remains poorly known in *Chlamydomonas*. In *Volvox carteri*, pherophorins are known to be necessary for the formation of the ECM (Hallmann, 2006). A pherophorin was also proposed to participate in the signaling process leading to sexual reproduction in *Volvox carteri* (Sumper et al., 1993). In both our transcriptomic and proteomic analyses, we found many pherophorins which are over- or underexpressed in *saz* mutants. The role of pherophorins in relation to aggregation in *Chlamydomonas* appears complex. Indeed, while some are present in all *saz* mutants and absent in the wild type, which one would expect from a protein necessary for the formation of the ECM, the opposite situation is also true and even more frequent (Figure 6A). There would thus exist pherophorins having a pro-aggregative or anti-aggregative role. This hypothesis has been confirmed by our reverse genetic analysis, which shows that when pherophorins are absent in *saz* mutants and present in the wild type (PHC28, PHC35), the corresponding mutants spontaneously aggregate, whereas when they are absent in the mutants and present in the wild type (PHC30, PHC41, PHC50), their mutants are no longer able to aggregate in response to stress (Figure 7). Pherophorins have A and B globular domains similar to plant lectins, suggesting that beside being glycosylated, they may also have sugar-binding functions (Hallmann, 2006), such as an interaction with the sugar-rich ECM we detected in aggregates (Figure 1C-2E). Sugar-related proteins, whether in terms of metabolism (*e.g.* beta-galactosidase, glucanase), transfer (*e.g.* glycosyltransferase) or affinity (lectins), represent an important category of the candidates we identified in our multiomic analysis. Sugars could have a role in the ECM, or in modifying the properties of the cell wall which contains many glycoproteins (Voigt and Frank, 2003). We focused our attention on Glucan 1,3-Beta-Glucosidase (GBG), of which 5 members are deregulated in *saz* mutants. β -glucans are glucose polymers that play a role in the response to pathogens in both plants (Fesel and Zuccaro, 2016) and

animals (Hopke et al., 2019). These sugars are mostly present in fungal cell wall and act as elicitors perceived by specific receptors which trigger the immune response against these pathogens (Rivera, 2020). In plants, 1-3 β -glucans are also able to trigger stress responses at the transcriptome level and to modify the antioxidant system of cells and induce an increased ability to resist abiotic stress (Gauthier et al., 2014; Wu et al., 2016). One mutant of a GBG whose protein abundance is down-regulated in the culture medium of all mutants, exhibits a spontaneous aggregation phenotype, suggesting that 1-3 β -glucan might have a pro-aggregation role in *Chlamydomonas* (Figure 7B). The role of 1-3 β -glucan in stress signaling is still unknown in *Chlamydomonas*, but several 1,3- β -glucan synthases exist in its genome and we have shown that the corresponding degradation enzymes are present in the extracellular compartment in *Chlamydomonas*. Finally, we analyzed a family of extracellular proteins, the VSPs (vegetative, SP rich) which are hydroxyproline and Serine-Proline (SP) rich proteins enriched during the vegetative stage of *Chlamydomonas* cycle (Waffenschmidt et al., 1993). Three VSP proteins (VSP4, VSP6 and VSP7) are downregulated in the culture medium of all *saz* mutants (Table S2). We further show here that an insertion in *VSP4* induces the formation of multicellular structures (Figure 7B) suggesting an anti-aggregative function for VSP4.

The protein content of *Chlamydomonas* medium has already been analyzed in the context of saline stress inducing the formation of palmelloids (Khona et al., 2016). Cross-analysis of these results with ours, shows that the formation of palmelloids and large aggregates involves specific sets of proteins. Indeed, even if MMPs or pherophorins are found in the secretome during palmelloid formation, their identities are distinct from those identified in the medium of aggregates. Moreover, among the 62 proteins identified during the formation or dislocation of palmelloids, only one (MMP3) is common to our list of 208 proteins of interest, showing that the formation of aggregates involves a protein network completely specific to this process.

Genes possibly involved in intracellular signaling during aggregation were suggested by our transcriptomic study. Several genes related to cGMP are inhibited in *saz* mutants, including four guanylate cyclase genes, which are responsible for its synthesis (Table S2). This suggests that this secondary messenger could participate in the signaling pathway leading to aggregation. Interestingly, in animals the destruction of ECM is mediated by MMPs that are activated by a signaling pathway involving cGMP and nitric oxide (NO) (Denninger and Marletta, 1999; Dey and Lincoln, 2012). This activation occurs through the activation of kinases, which regulate gene expression, and may also involve the MAP kinase signaling pathway (Zaragoza et al., 2002).

Moreover, the two most represented families in our transcriptomic analysis are those of ECM-related proteins and kinases, among which we identified a MAP kinase kinase (MAP2K), whose gene is under-expressed in *saz* mutants. The fact that the signaling pathway known in animals to destroy the ECM through the activation of MMPs is inhibited in *saz* mutants is consistent with an important role of MMPs and ECM regulation for the establishment of multicellular structures in *Chlamydomonas*. We now plan to investigate the role of cGMP as a secondary messenger in the signaling pathway leading to aggregation.

In conclusion, we describe in this study the discovery of a new mode of adaptation of *Chlamydomonas* in response to stress, which involves the formation of multicellular structures that can comprise several thousand cells. We show that this process is fundamental, since within these aggregates the cells can survive environmental stresses. VLE seems to play a particularly important role in this process, since its absence leads to aggregation in *saz1* and it is downregulated in the extracellular compartment of the five other *saz* mutants we analyzed. We detected within the aggregates a sugar-rich ECM which, based on the results of our multiomics and reverse genetic analyses, appears to be central to the formation of the aggregates. We hypothesize that an intracellular signaling pathway partly involving the regulation of gene expression leads to an equilibrium in the extracellular compartment between pro- and anti-aggregative proteins such as phosphatases, MMPs, or glucanases, to control the establishment of protective multicellular structures.

The description of the dynamics of aggregation will inform us about the directions of causality in the gene regulation network that underpins aggregate formation. This knowledge is a prerequisite to optimize the aggregation process in biotechnological applications involving the harvesting of *Chlamydomonas* cells (Singh and Patidar, 2018). Now that we have demonstrated that in response to harsh conditions, *Chlamydomonas* is capable of forming multicellular structures to survive, it is conceivable to postulate that this process played a role for the transition to multicellularity in evolution over long periods of stress, as the hypotheses classically formulated for this transition, is the formation of an intermediate stage of aggregation (Olson, 2013). The order of Volvocales is particularly well adapted to study this phenomenon (Hallmann, 2006), given that it extends over a relatively short evolutionary distance, from the unicellular *Chlamydomonas* to the multicellular *Volvox carteri*.

Materials and Methods

Strains, media, and growth condition

The D66 strain (CC-4425) (Schnell and Lefebvre, 1993), was used as a wild type for this study in addition to the wild-type strain of the CLiP library CMJ030 (CC-4533) (Li et al., 2019), when necessary. We used the following CLiP (www.chlamylibrary.org) mutants for *VLE* (Cre01.g049950): *vle1* (LMJ.RY0402.057262), *vle2* (LMJ.RY0402.131694) and *vle3* (LMJ.RY0402.140798). For the reverse genetic analysis, we used : *gbg* (Cre16.g693600, LMJ.RY0402.168539), *mmp23* (Cre07.g333400, LMJ.RY0402.185101), *mmp32* (Cre14.g625850, LMJ.RY0402.170721), *phc28* (Cre17.g717950, LMJ.RY0402.116054), *phc30* (Cre09.g404201, LMJ.RY0402.246644), *phc35* (Cre05.g238687, LMJ.RY0402.201505), *phc41* (Cre12.g506750, LMJ.RY0402.152127), *phc50* (Cre06.g292249, LMJ.RY0402.121429), *vsp4* (Cre09.g391801, LMJ.RY0402.176992). Cells were grown in liquid cultures mixotrophically in Tris acetate phosphate (TAP) medium (Gorman and Levine, 1965) on a rotary shaker (120 rpm) under continuous light (40-60 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), at 25°C. Aggregation assay and stress treatments were done in 24-well plates in a 1 mL volume at a concentration of $4\text{-}8 \times 10^6$ cells.mL⁻¹. Rose bengal (330000) and paraquat (856177) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). S-Nitrosoglutathione (GSNO) was synthesized as described in (Hart, 1985).

Aggregate area and cell death image analysis

Multi-well plates were imaged with the Perfection V800 scanner (Epson, Suwa, Japan) and micrograph were taken using the BX43 (Olympus, Tokyo, Japan) and Axio Observer (Zeiss, Oberkochen, Germany) microscopes. The software used were Fiji / ImageJ 1.52a (Schindelin et al., 2012) and R Studio 1.2.5 (tidyverse, ggpubr and PlotsOfData) (Postma and Goedhart, 2019; Wickham, 2016). The particle areas were determined from 24-well plate scans using a Fiji macro (github.com/fdecarpentier/ParticleWell). The quantification of cell death was done following the previously published method (de Carpentier et al., 2020), using a final concentration of 0.2% w/v Evans Blue (E2129, Sigma-Aldrich). The percentage of dead cells was calculated on a minimum of 100 individuals. To quantify the area and viability of each particle, we created a Fiji macro (github.com/fdecarpentier/PlantDeath) based on the CIELAB color space.

mVenus plasmid construction

Unless otherwise specified, the enzymes were bought from New England BioLabs (Ipswich, USA). The level one plasmid pCM1-034 was constructed by cloning the parts P_{PSAD} (pCM0-016), mVenus (pCM0-086) and T_{PSAD} (pCM0-114) (Crozet et al., 2018) in the acceptor plasmid pICH47732 (Weber et al., 2011) by a Golden Gate reaction. pCM1-034 was then assembled with the blasticidin resistance transcription unit pCM1-029 (de Carpentier et al., 2020) and the empty linker pICH50881 in the level M acceptor plasmid pAGM8031 (Weber et al., 2011) yielding pCMM-23.

Chlamydomonas transformation and generation of *saz* mutants

i72 cassette conferring paromomycin resistance was excised from pSL72 plasmid (Pollock et al., 2004) using *Xho*I and *Eco*RI, isolated on agarose gel and purified with the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Bethlehem, USA). Transformants were generated using electroporation as previously described (de Carpentier et al., 2020), and selected on agar plates containing paromomycin at a concentration of 20 mg/L. The transformants were then grown in 96-well plates from which were selected the *saz* mutants that aggregated spontaneously.

For the generation of the mVenus strain, pCMM-23 was electroporated in D66 as previously described (Onishi and Pringle, 2016). Transformants were selected agar plates using with 50 mg/L blasticidin (de Carpentier et al., 2020). After 6 days of growth, the plates were scanned with a Typhoon FLA 9500 laser scanner (GE Healthcare, Chicago, USA) at 473 nm excitation with the filters BPG1 for YFP and LPG for chlorophyll, to select a fluorescent strain called the mVenus.

Insert localization in *saz1* and CLiP mutants

Genomic DNA purification method was adapted from (Danon and Gallois, 1998). The insertion locus of *i72* was determined by RESDA-PCR (Restriction Enzyme Site-Directed Amplification PCR) (González-Ballester et al., 2005). PCR were performed with Quick-Load[®] *Taq* 2x Master Mix (New England BioLabs) according to the manufacturer recommendations with the primer displayed in Table S5. We used the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) for band purification and sequencing was performed by Eurofins Genomics.

Medium purification and protein quantitation by tandem mass spectrometry

Culture medium was harvested after for 5 days of culture in TAP medium and cleared of cells by centrifugation (2500 x *g*, 5 min) and 0.45 μm filtration. For quantitative proteomics, 50 mL medium

was concentrated 125 times at a 10 kDa cutoff (4000 x g, 4°C). The concentrated medium was centrifugated (10 min, 17000 x g, 4°C) to pellet the insoluble debris. 20 µg of protein were denatured, separated by a short migration (< 0.5 cm), and stained with Coomassie blue. Whole protein tracks were trypsin-digested in gel according to Marchand et al., 2010. For each strain, five biological replicates were prepared and split in 2 x 30 µL which were hereafter analyzed as technical replicates. The samples were analyzed in label free LC-MS/MS quantitative analysis with the Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) and the MS/MS spectra were quantified following the method published in Morisse et al., 2014 with Progenesis QI (Waters, Milford, USA) and MaxQuant (Tyanova et al., 2016) against the *Chlamydomonas reinhardtii* genome v.5.6 (Blaby et al., 2014). Proteins detected in at least three biological replicates and with a Wilcoxon-Mann-Whitney non parametrical test p-value above 0.05 were regarded as differently present in comparison with the wild type.

RNA analysis

Total RNA of *Chlamydomonas* was extracted from 10 mL cultures at $5-6 \times 10^6$ cells/mL according to the protocol described in Cavaiuolo et al., 2017. RNAs were treated with DNase I (New England BioLabs) according to the manufacturer recommendations. RNA quality was checked on agarose gel and with the TapeStation System (Agilent, Santa Clara, USA), three samples per strain with a RIN^e (RNA integrity number equivalent) above 5.5 were kept. Library preparation and sequencing were performed by the iGenSeq genotyping and sequencing core facility (ICM Institute - Hôpital Pitié-Salpêtrière AP-HP, Paris, France) using KAPA HyperPrep Kits (Roche, Basel, Switzerland) and the NovaSeq 6000 sequencer (Illumina, San Diego, USA). Paired-end reads were mapped against the *Chlamydomonas reinhardtii* genome v.5.6 using Bowtie2 v2.3.4.3 (Blaby et al., 2014; Langmead and Salzberg, 2012). We kept the 16,829 genes with above 30 reads. Differential analysis was performed according to DEseq2 v1.30.0 (Love et al., 2014). Genes were regarded as differentially expressed than the wild type for adjusted p-values < 0.05 and $\log_2(\text{Fold Change}) > 2$. For quantitative reverse transcription PCR analysis, the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (ThermoFisher Scientific) was used for both DNase treatment and reverse-transcription according to the manufacturer recommendations. Quantitative PCR were performed with the iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) and the primer displayed in Table S5. Relative mRNA, abundance was calculated using the comparative

delta-Ct method, and normalized to the corresponding *RACK1 (CBLP)* (Cre06.g278222) gene levels.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author contributions

A.D. and F.C. designed the study, A.D., F.C., and S.D.L. wrote the manuscript, A.D., F.C., A.M., C.M., C.C. and C.D. performed experiments and analyzed the data, P.C. assisted with modular cloning experiments.

Funding

This work was supported by CNRS, Sorbonne Université and Université Paris-Saclay, by Agence Nationale de la Recherche Grant 17-CE05-0001 CalvinDesign and by LABEX DYNAMO ANR-LABX-011.

Acknowledgments

We acknowledge Marion Hamon of the mass spectrometry platform of the Institut de Biologie Physico-Chimique (Paris, France) for the mass spectrometer running and data collection. We thank Oliver Caspari for his help in the fluorescent protein expression, and Marina Cavaiuolo, Lionel Bénard, and Sébastien Chamois for their highly valuable advices about RNA extraction. Finally, we thank Nicolas D. Boisset, Théo Le Moigne, and Julien Henri for stimulating discussions and suggestions.

References

- Abe, J., Kubo, T., Takagi, Y., Saito, T., Miura, K., Fukuzawa, H., and Matsuda, Y. (2004). The transcriptional program of synchronous gametogenesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet* 46, 304–315.
- Alieva, N.O., Efremov, A.K., Hu, S., Oh, D., Chen, Z., Natarajan, M., Ong, H.T., Jégou, A., Romet-Lemonne, G., Groves, J.T., et al. (2019). Myosin IIA and formin dependent mechanosensitivity of filopodia adhesion. *Nat Commun* 10, 3593.
- Blaby, I.K., Blaby-Haas, C.E., Tourasse, N., Hom, E.F.Y., Lopez, D., Aksoy, M., Grossman, A., Umen, J., Dutcher, S., Porter, M., et al. (2014). The *Chlamydomonas* genome project: a decade on. *Trends in Plant Science* 19, 672–680.
- de Carpentier, F., Lemaire, S.D., and Danon, A. (2019). When Unity Is Strength: The Strategies Used by *Chlamydomonas* to Survive Environmental Stresses. *Cells* 8, 1307.
- de Carpentier, F., Le Peillet, J., Boisset, N.D., Crozet, P., Lemaire, S.D., and Danon, A. (2020). Blastocidin S Deaminase: A New Efficient Selectable Marker for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Front. Plant Sci.* 11.
- Cavada, B., Pinto-Junior, V., Osterne, V., and Nascimento, K. (2018). ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. *IJMS* 20, 30.
- Cavaiuolo, M., Kuras, R., Wollman, F.-A., Choquet, Y., and Vallon, O. (2017). Small RNA profiling in *Chlamydomonas*: insights into chloroplast RNA metabolism. *Nucleic Acids Res* 45, 10783–10799.
- Crozet, P., Navarro, F.J., Willmund, F., Mehrshahi, P., Bakowski, K., Lauersen, K.J., Pérez-Pérez, M.-E., Auroy, P., Gorchs Rovira, A., Sauret-Gueto, S., et al. (2018). Birth of a Photosynthetic Chassis: A MoClo Toolkit Enabling Synthetic Biology in the Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS Synth. Biol.* 7, 2074–2086.
- Danon, A., and Gallois, P. (1998). UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 437, 131–136.

- Denninger, J.W., and Marletta, M.A. (1999). Guanylate cyclase and the cNO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 334–350.
- Dey, N.B., and Lincoln, T.M. (2012). Possible involvement of Cyclic-GMP-dependent protein kinase on matrix metalloproteinase-2 expression in rat aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem* 368, 27–35.
- Durand, P.M., Rashidi, A., and Michod, R.E. (2011). How an Organism Dies Affects the Fitness of Its Neighbors. *The American Naturalist* 177, 224–232.
- Duruflé, H., Hervé, V., Balliau, T., Zivy, M., Dunand, C., and Jamet, E. (2017). Proline Hydroxylation in Cell Wall Proteins: Is It Yet Possible to Define Rules? *Front. Plant Sci.* 8, 1802.
- Eisenmann, K.M., West, R.A., Hildebrand, D., Kitchen, S.M., Peng, J., Sigler, R., Zhang, J., Siminovitch, K.A., and Alberts, A.S. (2007). T Cell Responses in Mammalian Diaphanous-related Formin mDial Knock-out Mice. *J. Biol. Chem.* 282, 25152–25158.
- Fanjul-Fernández, M., Folgueras, A.R., Cabrera, S., and López-Otín, C. (2010). Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803, 3–19.
- Fesel, P.H., and Zuccaro, A. (2016). β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology* 90, 53–60.
- Fischer, B.B., Krieger-Liszkay, A., and Eggen, R.I.L. (2005). Oxidative stress induced by the photosensitizers neutral red (type I) or rose bengal (type II) in the light causes different molecular responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science* 168, 747–759.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* 14, 563–575.
- Gauthier, A., Trouvelot, S., Kelloniemi, J., Frettinger, P., Wendehenne, D., Daire, X., Joubert, J.-M., Ferrarini, A., Delledonne, M., Flors, V., et al. (2014). The Sulfated Laminarin Triggers a Stress Transcriptome before Priming the SA- and ROS-Dependent Defenses during Grapevine's Induced Resistance against *Plasmopara viticola*. *PLoS ONE* 9, e88145.

- González-Ballester, D., de Montaigne, A., Galván, A., and Fernández, E. (2005). Restriction enzyme site-directed amplification PCR: A tool to identify regions flanking a marker DNA. *Analytical Biochemistry* 340, 330–335.
- Gorman, D.S., and Levine, R.P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54, 1665–1669.
- Hallmann, A. (2006). The pherophorins: common, versatile building blocks in the evolution of extracellular matrix architecture in Volvocales. *The Plant Journal* 45, 292–307.
- Hart, T.W. (1985). Some observations concerning the S-nitroso and S-phenylsulphonyl derivatives of L-cysteine and glutathione. *Tetrahedron Letters* 26, 2013–2016.
- Hopke, A., Brown, A.J.P., Hall, R.A., and Wheeler, R.T. (2019). Dynamic fungal cell wall architecture in stress adaptation and immune evasion. 19.
- Huang, K., Diener, D.R., Mitchell, A., Pazour, G.J., Witman, G.B., and Rosenbaum, J.L. (2007). Function and dynamics of PKD2 in *Chlamydomonas reinhardtii* flagella. *Journal of Cell Biology* 179, 501–514.
- Karatan, E., and Watnick, P. (2009). Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 310–347.
- Khona, D.K., Shirolikar, S.M., Gawde, K.K., Hom, E., Deodhar, M.A., and D'Souza, J.S. (2016). Characterization of salt stress-induced palmelloids in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research* 16, 434–448.
- Kim, C., and Sharma, R. (2021). Cyclic nucleotide selectivity of protein kinase G isozymes. *Protein Science* 30, 316–327.
- Kinoshita, T., Fukuzawa, H., Shimada, T., Saito, T., and Matsuda, Y. (1992). Primary structure and expression of a gamete lytic enzyme in *Chlamydomonas reinhardtii*: similarity of functional domains to matrix metalloproteases. *PNAS* 89, 4693–4697.
- Kubo, T., Kaida, S., Abe, J., Saito, T., Fukuzawa, H., and Matsuda, Y. (2009). The *Chlamydomonas*

Hatching Enzyme, Sporangin, is Expressed in Specific Phases of the Cell Cycle and is Localized to the Flagella of Daughter Cells Within the Sporangial Cell Wall. *Plant Cell Physiol* *50*, 572–583.

Laczko, R., and Csiszar, K. (2020). Lysyl Oxidase (LOX): Functional Contributions to Signaling Pathways. *Biomolecules* *10*, 1093.

Laloi, C., Stachowiak, M., Pers-Kamczyc, E., Warzych, E., Murgia, I., and Apel, K. (2007). Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 672–677.

Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* *9*, 357–359.

Li, X., Patena, W., Fauser, F., Jinkerson, R.E., Saroussi, S., Meyer, M.T., Ivanova, N., Robertson, J.M., Yue, R., Zhang, R., et al. (2019). A genome-wide algal mutant library and functional screen identifies genes required for eukaryotic photosynthesis. *Nat Genet* *51*, 627–635.

Liu, P., Lou, X., Wingfield, J.L., Lin, J., Nicastro, D., and Lehtreck, K. (2020). *Chlamydomonas* PKD2 organizes mastigonemes, hair-like glycoprotein polymers on cilia. *Journal of Cell Biology* *219*.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* *15*, 550.

Luxmi, R., Blaby-Haas, C., Kumar, D., Rauniyar, N., King, S.M., Mains, R.E., and Eipper, B.A. (2018). Proteases Shape the *Chlamydomonas* Secretome: Comparison to Classical Neuropeptide Processing Machinery. *Proteomes* *6*.

Marchand, C.H., Vanacker, H., Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Maréchal, P.L., and Decottignies, P. (2010). Thioredoxin targets in *Arabidopsis* roots. *PROTEOMICS* *10*, 2418–2428.

Marino, G., and Funk, C. (2012). Matrix metalloproteinases in plants: a brief overview. *Physiologia Plantarum* *145*, 196–202.

Matsuda, Y., Koseki, M., Shimada, T., and Saito, T. (1995). Purification and characterization of a vegetative lytic enzyme responsible for liberation of daughter cells during the proliferation of

Chlamydomonas reinhardtii. *Plant Cell Physiol.* *36*, 681–689.

Morisse, S., Zaffagnini, M., Gao, X.-H., Lemaire, S.D., and Marchand, C.H. (2014). Insight into Protein S-nitrosylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Antioxidants & Redox Signaling* *21*, 1271–1284.

Niethamer, T.K., and Bush, J.O. (2019). Getting direction(s): The Eph/ephrin signaling system in cell positioning. *Dev. Biol.* *447*, 42–57.

Nishimura, M., Nagashio, R., Sato, Y., and Hasegawa, T. (2017). Late Somatic Gene 2 disrupts parental spheroids cooperatively with *Volvox* hatching enzyme A in *Volvox*. *Planta* *245*, 183–192.

Olson, B.J. (2013). From brief encounters to lifelong unions. *ELife* *2*, e01893.

Onishi, M., and Pringle, J.R. (2016). Robust Transgene Expression from Bicistronic mRNA in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* *6*, 4115–4125.

Pollock, S.V., Prout, D.L., Godfrey, A.C., Lemaire, S.D., and Moroney, J.V. (2004). The *Chlamydomonas reinhardtii* proteins Ccp1 and Ccp2 are required for long-term growth, but are not necessary for efficient photosynthesis, in a low-CO₂ environment. *Plant Mol Biol* *56*, 125–132.

Postma, M., and Goedhart, J. (2019). PlotsOfData—A web app for visualizing data together with their summaries. *PLOS Biology* *17*, e3000202.

Ratcliff, W.C., Herron, M.D., Howell, K., Pentz, J.T., Rosenzweig, F., and Travisano, M. (2013). Experimental evolution of an alternating uni- and multicellular life cycle in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature Communications* *4*.

Rivera, A. (2020). Dectin-1 Promotes Type I and III Interferon Expression to Support Optimal Antifungal Immunity in the Lung. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* *10*, 10.

Sathe, S., and Durand, P.M. (2016). Cellular aggregation in *Chlamydomonas* (Chlorophyceae) is chimaeric and depends on traits like cell size and motility. *European Journal of Phycology* *51*, 129–138.

Saur, I.M.L. (2021). Recognition and defence of plant-infecting fungal pathogens. *Journal of Plant*

Physiology 14.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *Nat Methods* 9.

Schnell, R.A., and Lefebvre, P.A. (1993). Isolation of the *Chlamydomonas* Regulatory Gene *NIT2* by Transposon Tagging. *Genetics* 134, 737–747.

Schroda, M., Hemme, D., and Mühlhaus, T. (2015). The *Chlamydomonas* heat stress response. *The Plant Journal* 82, 466–480.

Singh, G., and Patidar, S.K. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management* 217, 499–508.

Singh, H., Kaur, K., Singh, M., Kaur, G., and Singh, P. (2020). Plant Cyclophilins: Multifaceted Proteins With Versatile Roles. *Front. Plant Sci.* 11, 585212.

Smukalla, S., Caldara, M., Pochet, N., Beauvais, A., Guadagnini, S., Yan, C., Vinces, M.D., Jansen, A., Prevost, M.C., Latgé, J.-P., et al. (2008). *FLO1* Is a Variable Green Beard Gene that Drives Biofilm-like Cooperation in Budding Yeast. *Cell* 135, 726–737.

Snell, W.J., Eskue, W.A., and Buchanan, M.J. (1989). Regulated secretion of a serine protease that activates an extracellular matrix-degrading metalloprotease during fertilization in *Chlamydomonas*. *Journal of Cell Biology* 109, 1689–1694.

Sumper, M., Berg, E., Wenzl, S., and Godl, K. (1993). How a sex pheromone might act at a concentration below 10^{-16} M. *EMBO J* 12, 831–836.

Tardif, M., Atteia, A., Specht, M., Cogne, G., Rolland, N., Brugière, S., Hippler, M., Ferro, M., Bruley, C., Peltier, G., et al. (2012). PredAlgo: A New Subcellular Localization Prediction Tool Dedicated to Green Algae. *Molecular Biology and Evolution* 29, 3625–3639.

Tyanova, S., Temu, T., and Cox, J. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols* 11, 2301–2319.

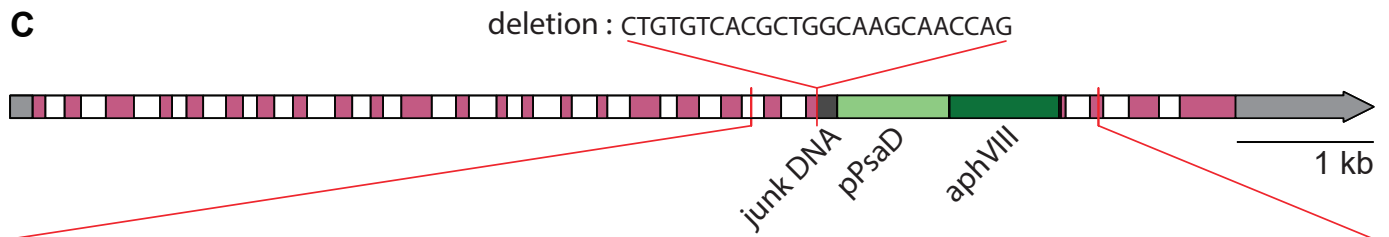
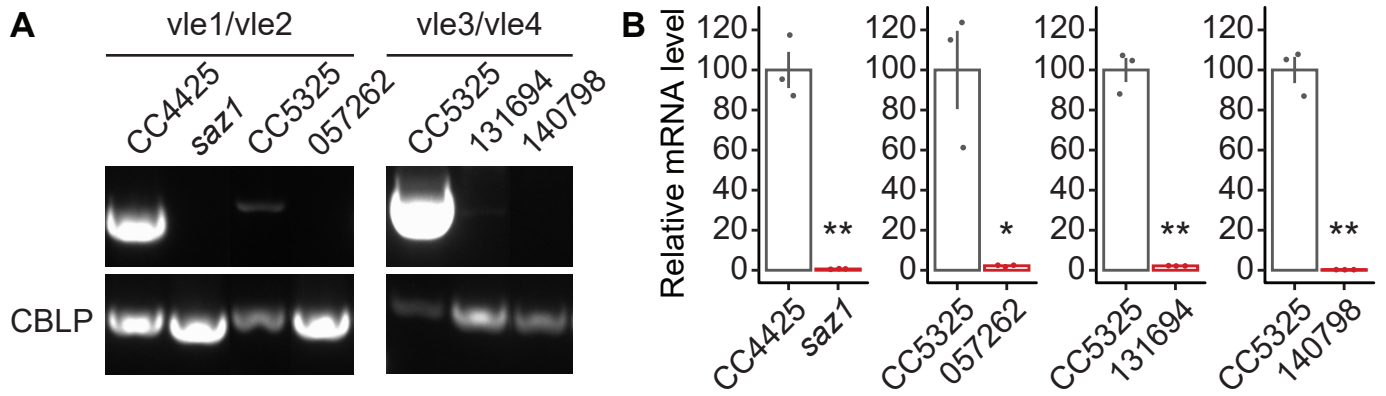
- Váchová, L., and Palková, Z. (2018). How structured yeast multicellular communities live, age and die? *FEMS Yeast Research* 18.
- Vijayaraghavareddy, P., Adhinarayanreddy, V., Vemanna, R.S., Sreeman, S., and Makarla, U. (2017). Quantification of Membrane Damage/Cell Death Using Evan's Blue Staining Technique. *Bio-Protocol* 7, e2519–e2519.
- Voigt, J., and Frank, R. (2003). 14-3-3 Proteins Are Constituents of the Insoluble Glycoprotein Framework of the *Chlamydomonas* Cell Wall. *Plant Cell* 15, 1399–1413.
- Waffenschmidt, S., Woessner, J.P., Beer, K., and Goodenough, U.W. (1993). Isodityrosine cross-linking mediates insolubilization of cell walls in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 5, 809.
- Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., and Marillonnet, S. (2011). A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. *PLoS ONE* 6, e16765.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (Springer).
- Wu, Y.-R., Lin, Y.-C., and Chuang, H. (2016). Laminarin modulates the chloroplast antioxidant system to enhance abiotic stress tolerance partially through the regulation of the defensin-like gene expression. *Plant Science* 247, 83–92.
- Zaragoza, C., Soria, E., López, E., Browning, D., Balbín, M., López-Otín, C., and Lamas, S. (2002). Activation of the Mitogen Activated Protein Kinase Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 by the Nitric Oxide–cGMP–cGMP-Dependent Protein Kinase Axis Regulates the Expression of Matrix Metalloproteinase 13 in Vascular Endothelial Cells. *Mol Pharmacol* 62, 927–935.

Supplementary material

Figure S1 : Genotype analysis of *saz1*, LMJ.RY0402.131694, LMJ.RY0402.140798 and LMJ.RY0402.057262 strains mutated for *VLE* (Cre01.g049950). (A) Inserts locus confirmation by PCR amplification with primers of the flanking genomic regions. The pairs *vle1/vle2* and *vle3/vle4* leads to fragments of respectively 1694 and 2521 bp in the wild types CC4425 and CC5325. CBLP amplification (Cre06.g278222) was used as a positive control for the PCR (de Carpentier et al., 2020). (B) VLE expression in *saz1* and the CLIP mutants quantified by RT-qPCR. For each strain, the flanking region was amplified with highly specific primers: *vle5/vle6* for *saz1*; *vle1/vle7* for LMJ.RY0402.057262; *vle8/vle9* for LMJ.RY0402.131694 and *vle10/vle11* for LMJ.RY0402.140798. mRNA levels were calculated with CBLP amplification as a reference. Values are mean of 3 biological replicates with 2 technical replicates. Error bars indicates \pm SEM and symbols correspond to t-test p-values of * ≤ 0.05 or ** $\leq 10^{-2}$. (C) Sanger sequencing of paromomycin resistance gene (*i72*) flanking region in *saz1* with primers from the gene and the cassette (González-Ballester et al., 2005; Li et al., 2019). A junk DNA fragment made of Cre07.g350600 and Cre16.g671250 was found at the 5' end of *i72*. Primers sequences can be found in Table S1.

Figure S2 : Genotype analysis of reverse genetics mutants. (A) CLIP mutant name, gene bearing the insertion CIB1 and strain number (Li et al., 2019). (B) PCR performed with primers on both sides of the respective insertion locus. Only the wild-type gDNA allowed amplification of the expected products of 930 (*gbg.1/gbg.2*), 775 (*mmp23.1/mmp23.2*), 328 (*mmp32.1/mmp32.2*), 225 (*phc28.1/phc28.2*), 339 (*phc30.1/phc30.2*), 216 (*phc35.1/phc35.2*), 392 (*phc41.1/phc41.2*), 192 (*phc50.1/phc50.2*) and 365 nt (*vsp4.1/vsp4.2*). The control was made by amplification of the CBLP gene (Cre06.g2782221) leading to a 633 nt fragment. Primers sequences can be found in Table S1.

Table S1. Primers used in this study.



5'-acgcgccacacaagctgcagctcaagggtgtgtaccgtagtcccgtgcattaaggccatgtccattcgcttttgcctttccaccttgagCTTCGAAGCG
 GTCTCTATGGCACCGGCACCGCCATGCTCAACCCCGCCAACCTATGTGGTGTATGGCTATGCCCGCACCAACCTT
 GCGCCGAGGGCCTTCAGCCAGGGCGTGGCCTTCCGCCTGCGCgtgagtgcaaaatgtccgcgccgcacacatctggccttttaa
 aagagaaaccgatgtaaaggcgtgctgtgtggccactgttatgcaaaagcctcttctgaataacgtgcaaatgtcccactgtagctgcgcttagcgttccctgtgcg
 cgtgtgctgcttcaaccgaccacagGGCCCGCACACGCGCTGTTTCATCAACGGGCAGTTGGTCTATGACTTCCAGTCC
 ACGTCCGTGTTCCAGACCGTACGCGCTTGCCTGCTGGCCAGCTGGTCTGGCCGCGCAGCAATCAGTCTCT
 CTGAGCAGATGTCGGCCACCAACGGCAACCGGTTCCGCTGGCTGCAGGATAGCCAGGCGCGGACAGCAAG
 GCTGGCTGTGTTCCAGCGGTTCCACGGTTCAGCACACACCTGCCCGTCTGCCTGACAGGAAGTGAACGCATG
 TCGAGGGAGGCCTACCAATCGTCACACGAGCCCTCGTCAGAAACACGTCTCCGCCACGCTCTCCCTCTCAC
 GGCCGACCCCGCAGCCCTTTTGCCTTTCTAGGCCACCGACAGGACCCAGGCGCTCTCAGCATGCCTCAAC
 AACCCGTAATCGTGCAGCGGTGCCCTTGTGCTGGTGTGCTGGAAGCGCATGCGAAGACGAAGGGGCGG
 AGCAGGCGGCCTGGCTGTTCAAGGGCTCGCCGCCAGTTCGGGTGCCCTTCTCCACGCGCGCCTCCACACC
 TACCGATGCGTGAAGGCAGGCAAATGCTCATGTTGCCCGAAGTCCGAGTCCCTAAAGCCGCTTCTTGTGCT
 CGTTCGAGACATGTTAGCAGATCGCAGTGCCACCTTTCCTGACGCGCTCGGCCCATATTCGGACGCAATTG
 TCATTTGTAGCACAAATCGGACAAATCTGGCAGGCGAGTAGGCTTTAAGTTGCAAGCCGAGAGAGCAAAGT
 GGACCGCGGCTGATTATTGGTATTACGCGACGCGCCGCGCTTAGCGGGCCTTCCCCAGGCCAGGGACG
 ATTATGTATCAATATTGTTGCGTTCGGGCACTCGTGCAGGGCTCCTGCGGGCTGGGGAGGGGGATCTGGGAA
 TTGGAGGTACGACCGAGATGGCTTGGCTCGGGGGGAGGTTTCTCGCCGAGCAAGCCAGGGTTAGGTGTTGCG
 CTCTTGACTCGTTGTGCATTCTAGGACCCACTGCTACTCACAACAAGCCATATGACGATGCGTTGCGTGCA
 CTGCGGGGTGCGTATCCCGTTGTGAGTGGGTTGTTGTGGAGGATGGGGCCTCGGGGGCTGGTGTATATCGG
 CTTCCGGGTGGTGGGCGGGAGTTGTTGTCAAGGTGGCAGCTCTGGGGGCCGGGGTGGGCTTGTGGGTGA
 GGCTGAGCGGCTGGTGTGGTTGGCGGAGGTGGGGATTCCCGTACCTCGTGTGTTGGAGGGTGGTGGGGACG
 AGAGGGTCGCTGGTGGTCAACGAAGCGGTTCCGGGGCGTCCGGCCAGTGCAGCGGTGGCCGCGGGAGCA
 GCGGCTGGACGTGGCGGTGGCGCTCGCGGGGCTCGCTCGTTCGCTGCACGCGCTGGACTGGGAGCGGTGT
 CCGTTCGATCGAGTCTCGCGGTGACGGTGCCGAGGCGCGCCGCTGCTGCTGCTGCAAGGAGCGTGCAGT
 GGAGGATCTGGACGAGGAGCGGAAGGGTGGTCCGGGGAGCGGCTTCTCGCCGAGCTGGAGCGGACTCGG
 CCTGCGGACGAGGATCTGGCGGTTTGCACGGTACCTGTGCCCGGACAACGTGCTGCTCGACCCTCGTACC
 TCGAGGTGACCGGGCTGATCGACGTGGGGCGGGTCCGGCGTGCAGGACCGGCACTCCGATCTCGCGCTGG
 TGCTGCGGAGCTGGCCACGAGGAGGACCCGTGGTTCGGGCGGAGTGTTCGCGGCGTTCCTGCGGGA
 GTACGGGCGCGGTGGGATGGGGCGGTATCGGAGGAAAAGCTGGCGTTTTACCGGCTGTTGGACGAGTTCTT
 CTGAGATATCGAATTCTCGCACGAGATCTACCTTACTTTCGCTGCAATGgtgctgatgcagcaacgcagcaaggcagactg
 ccacggcgtgggtcttgggtcggtgcagggcattgtgtacgtgctcagtgggcctcatcatgctgcccaggtcgtagccatgcgatgaacctgctgttag
 cccggttgcctgtccccgcgcttctctgcagCTCAACAACACCGCGCCTGTGGGCATTAGTGGGCCAACTGCAGCTCGCC
 CAACCAGCCCGCG-3'

Features :

5' flanking sequence : [5410 : 5889]

junk DNA : [5890 : 6037]

Cre07.g350600 : [5916 : 6006]

Cre16.g671250 : [6007 : 6025]

i72 : [6038 : 7671]

pPSAD : [6039 : 6852]

AphVIII : [6859 : 7656]

3' flanking sequence : [7672 : 7944]

A	name	gene	CLIP strain
	<i>gbg</i>	Cre16.g693600	LMJ.RY0402.168539
	<i>mmp23</i>	Cre07.g333400	LMJ.RY0402.185101
	<i>mmp32</i>	Cre14.g625850	LMJ.RY0402.170721
	<i>phc28</i>	Cre17.g717950	LMJ.RY0402.116054
	<i>phc30</i>	Cre09.g404201	LMJ.RY0402.246644
	<i>phc35</i>	Cre05.g238687	LMJ.RY0402.201505
	<i>phc41</i>	Cre12.g506750	LMJ.RY0402.152127
	<i>phc50</i>	Cre06.g292249	LMJ.RY0402.121429
	<i>vsp4</i>	Cre09.g391801	LMJ.RY0402.176992

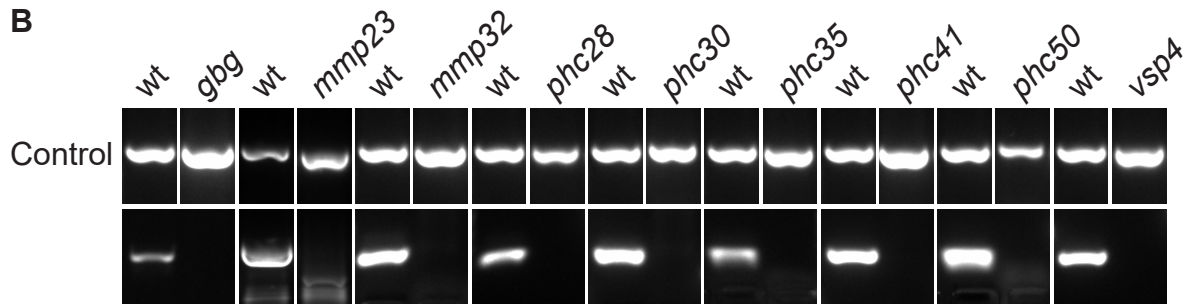


Table S1.

target	name	sequence	gDNA (nt)	cDNA (nt)
Cre01.g049950	vle1	CCTCCAACATGCAAATCGG	1694	
	vle2	CGGAAGAGAAGGACACGTAG		
	vle3	TGTCAGTGAATCTTGCTGGC	2521	
	vle4	CCTGTTCTGTTTTGGCCAGT		
	vle5	CGTGGATATAACCAGTACGGC	465	
	vle2	CGGAAGAGAAGGACACGTAG		
	vle1	CCTCCAACATGCAAATCGG	519	
	vle6	CGAAGTTGAAGTCAGGCACA		
	vle7	CCTGGAAAGGAGCGACGCAG	327	
	vle8	TCTGCACCCGTGATGTGTAT		
vle9	TGAATGACCCGCAACTGAGC	332		
vle10	AGCGAATGTGTTTTTGCCGATG			
Cre06.g278222	CBLP.5	GACGTCATCCACTGCCTGTG	633	403
	CBLP.3	CGACGCATCCTCAACACACC		
i72	oMJ005	GCTGGCACGAGTACGGGTTG		
	RB4	TGGTTCGGGCCGGAGTGTTT		
Cre16.g693600	gbg.1	TCGCACCTATTTTTACAGCAC	930	
	gbg.2	GGCATCAAACCAGAGATGAG		
Cre07.g333400	mmp23.1	TGGCACTTCTGGGTCTACAG	775	
	mmp23.2	GTCCACAACATGCAAACACAC		
Cre14.g625850	mmp32.1	GCAGGTTTCAGATTGTTTGTGG	328	
	mmp32.2	AGCATGACGATGGATGTGATG		
Cre17.g717950	phc28.1	AGTCAACTTCAATAGCTTCCG	225	
	phc28.2	TGTTTCATCCATTATCTATGGCG		
Cre09.g404201	phc30.1	ACAGTTGGTGGGGTTTGAG	339	
	phc30.2	TGCGGTTGTGATAGGTAGAAG		
Cre05.g238687	phc35.1	CGTGAAGTTCTCGATCATTCC	216	
	phc35.2	TCGCCACAAATTGTCATGTAG		
Cre12.g506750	phc41.1	ACCTCCACTTCTCGGTATG	392	
	phc41.2	TTCAGAACGTGTGATGACG		
Cre06.g292249	phc50.1	TCTTCACAGCACCATCGCTC	192	
	phc50.2	ACAACCCACGTAGAAGTCGC		
Cre09.g391801	vsp4.1	GCACTCGTTCGTTACGCAATG	365	
	vsp4.2	CAAGTGTGGAAACGATTGCGC		

2.2 Caractérisation des autres mutants *socializer*

2.2.1 Création de la banque de mutants *saz*

Pour identifier les mécanismes contrôlant l'agrégation, nous avons créé des mutants agrégeant spontanément. Cette banque de mutants a été générée avant mon arrivée au laboratoire par transformation de la souche sauvage avec le gène de résistance à la paromomycine *i72* (*Paro*^R). Cette cassette est composée du promoteur constitutif *P_{PSAD}* mais d'aucun terminateur (Pollock et al., 2004). Cette absence de terminateur permet d'augmenter la fréquence d'insertion dans les séquences codantes. L'électroporation peut induire de multiples insertions (Li et al., 2019), par conséquent uniquement 40 ng d'ADN ont été utilisés par transformation, quantité que nous avons déterminée comme minimale pour générer des transformants. La souche sauvage D66 (CC4425) a été utilisée car on peut la transformer efficacement (Schnell and Lefebvre, 1993). Plus de 13,000 transformants ont été obtenus et criblés en plaque 96 puits pour sélectionner les mutants agrégeant sans stress. Ainsi 16 mutants agrégeant spontanément ont été isolés, ils ont été appelés *socializer* (*saz*). Les mutants *saz* ont été mis en culture en plaque 24 puits pour confirmer leur phénotype. On voit que tous forment des agrégats visibles à l'œil nu (Figure 5) semblables à ceux induits en réponse au stress (se référer à 2.1.2 Figure 1A).

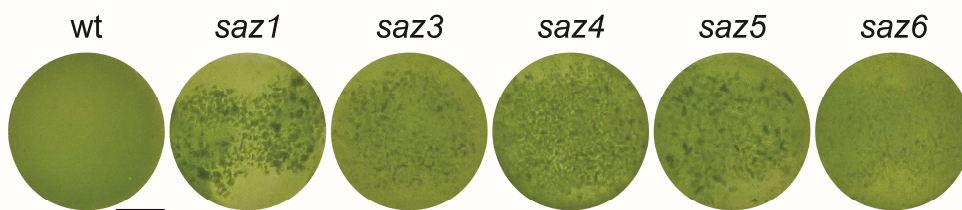


Figure 5. Exemples de phénotypes d'agrégation des mutants *saz*. Les mutants *saz* et la souche sauvage ont été cultivés en condition liquide en plaque 24 puits. La barre d'échelle correspond à 0,5 cm.

2.2.2 Morphologie des mutants *saz*

La morphologie des mutants *saz* a été observée plus en détail pour étudier les différences qui pourraient exister entre mutants. Au microscope, tous les mutants *saz* forment des cellules planctoniques et des agrégats de taille variable allant jusqu'à plusieurs milliers de cellules (Figure 6). *Saz2* et *saz7* ont des agrégats plus petits et moins nombreux que les autres mutants. Les agrégats de *saz3* et *saz6* sont de taille intermédiaire et ceux dont la taille est la plus importante sont observés chez *saz1*, *saz4* et *saz5*. Les mutants *saz* ont aussi des différences de morphologie au niveau des agrégats eux-mêmes. Les mutants *saz1* à *saz7* forment toujours des agrégats irréguliers, c'est-à-dire sans forme particulière (Figure 6). Ils sont comparables aux agrégats observés en réponse au stress chez la souche sauvage (voir 2.1.2 Figure 1 C et D). Les mutants *saz8* et *saz9* font des agrégats irréguliers mais aussi des agrégats « sphériques » réguliers (Figure 6). Certains mutants sont aussi enrichis en palmelloïdes (voir 1.1.2). On observe ces derniers chez les mutants *saz1* à *saz7* mais ils sont presque absents des cultures de *saz8* et *saz9*. Quoiqu'il en soit dans les cultures de tous les mutants étudiés on distingue aussi un grand nombre de cellules seules.

Certains mutants peuvent donc former des agrégats de taille particulière. Les palmelloïdes sont peut-être en lien avec l'agrégation, en effet certains mutants en forment en plus des agrégats. En revanche, ils ne semblent pas nécessaires à l'agrégation puisque des mutants agrégeant en sont presque ou totalement dépourvus. Ces observations au microscope chez les mutants *saz* restent qualitatives. C'est pourquoi nous avons développé des outils pour quantifier l'agrégation.

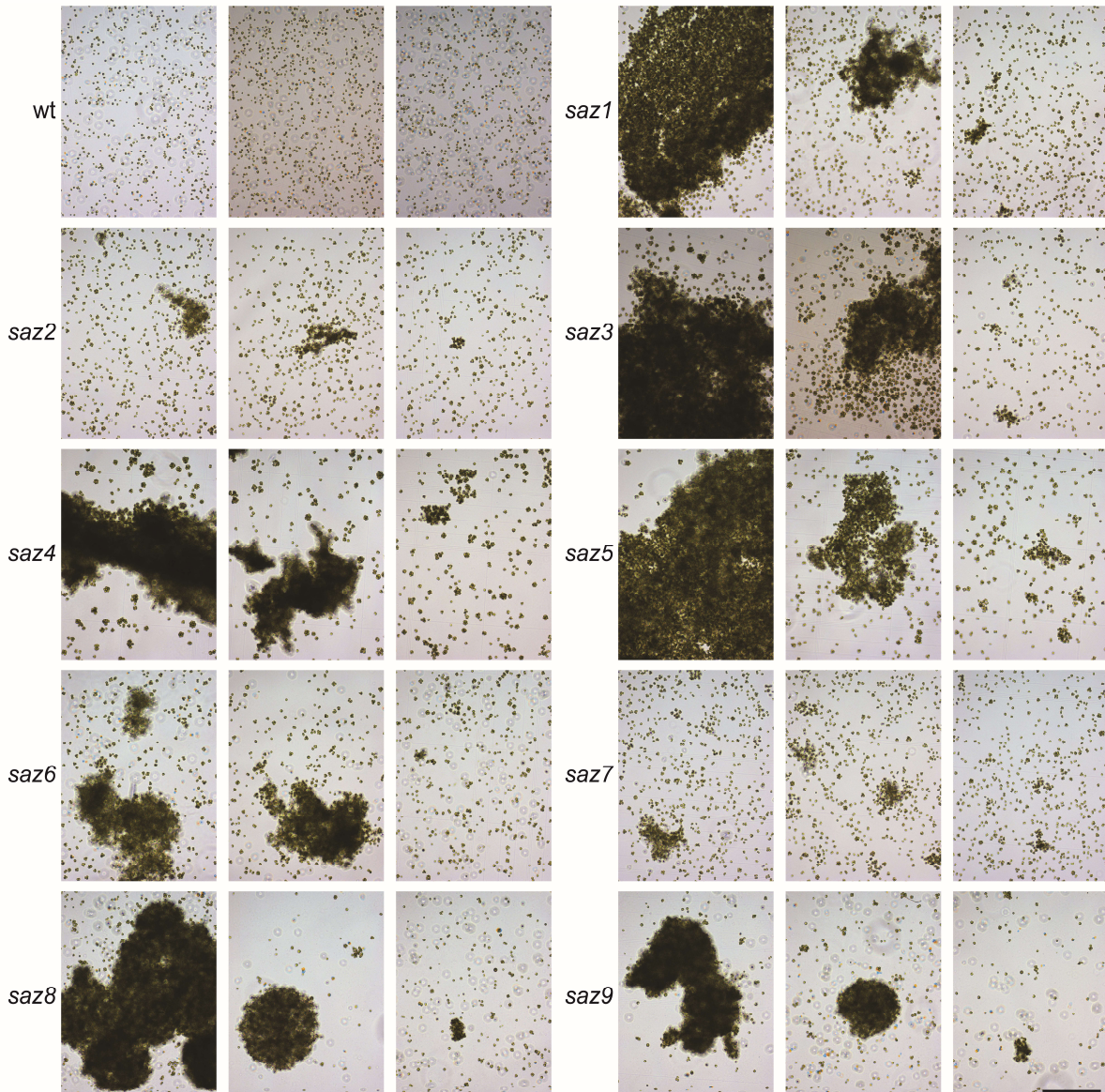


Figure 6. Observation microscopique des agrégats générés chez les mutants *saz*. Photos représentatives prises après 5 jours de croissance sans stress en plaque 24 puits. La barre d'échelle correspond à 200 μm .

2.3 Quantification de l'agrégation

2.3.1 Analyse d'image

Pour quantifier l'agrégation, beaucoup d'études utilisent la vitesse de sédimentation se basant sur le fait que plus une particule est grosse plus elle va sédimenter vite (Salim et al., 2011). Cependant, cette méthode indirecte ne renseigne pas sur la distribution de taille des particules et la motilité des cellules pourrait entraîner des erreurs (Chen et al., 2020). En effet, chez *Chlamydomonas*, le stress peut avoir un effet sur le flagelle et donc la motilité (Wakabayashi et al., 2011). Pour ces raisons, nous avons mis en place des mesures directes de l'agrégation en imagerie microscopique et macroscopique.

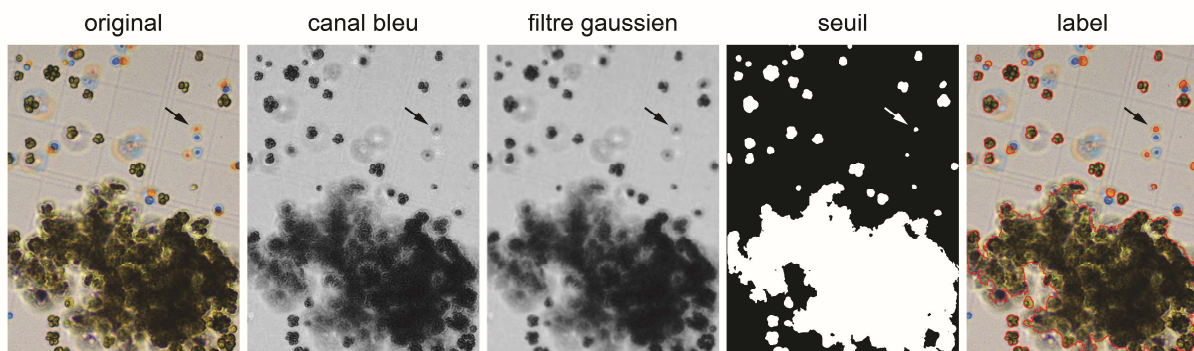


Figure 7. Les cellules agrégées ou non sont visibles au microscope. Elles sont détectées grâce au canal bleu, qui permet de sélectionner une seule copie des cellules en mouvement rapide apparaissant dédoublées (flèche), puis avec un filtre gaussien et un seuil. Enfin, l'image originale peut être labellisée (ligne rouge) et l'aire des particules mesurée.

Les cellules et agrégats de *Chlamydomonas* sont visibles en microscopie ce qui permet de les décrire qualitativement (Figure 6). Cependant, quantifier ce phénomène permet de décrire de façon plus fine des souches qui agrègent plus ou moins. La quantification des particules permet aussi d'obtenir la distribution de taille et d'étudier différentes populations riches en palmelloïdes ou en agrégats (se référer à 1.1.2). Nous appelons ici « particules » les cellules seules, les palmelloïdes et les agrégats. On peut quantifier l'aire des particules avec ImageJ (Schindelin et al., 2012). Ce logiciel permet non seulement d'effectuer du traitement d'images mais aussi de faire des mesures d'aire, de forme ou de couleur. Le principe général consiste à transformer une image couleur en noir et blanc afin de détecter automatiquement les particules en fonction de leur valeur de gris (Figure 7). Cependant, les cellules en mouvement rapide induisent un artefact de mesure, c'est-à-dire qu'elles sont imagées deux fois par la caméra, une fois en orange et une fois en bleu (Figure 7, flèche). Pour éviter de compter deux fois ces cellules, uniquement le canal bleu de l'image couleur est gardé. Ensuite, plusieurs mesures étaient inexactes car le logiciel détectait parfois les chloroplastes au lieu des cellules entières. C'est pour cela que nous avons ajouté un filtre gaussien qui permet une détection précise des particules d'intérêt. Le traitement a été automatisé dans une macro ImageJ (github.com/fdecarpentier/ParticleArea).

Les observations et quantifications d'images de microscope apportent des informations importantes sur la morphologie et l'aire des particules. Cependant, certains agrégats sont si

gros qu'ils sortent du champ de vision (Figure 6). De plus, au microscope les images sont prises arbitrairement par l'expérimentateur, elles ne représentent pas toutes les cellules présentes sur la lame et ne sont donc pas complètement représentatives. Pour mesurer de façon représentative les agrégats de toutes tailles, les cultures ont été effectuées en plaque 24 puits qui ont été imagées entières par le dessous au moyen d'un scanner. Les agrégats sont ensuite détectés avec ImageJ (Schindelin et al., 2012) suivant le même principe que pour les photographies de microscope. Cependant, du fait de la faible différence de couleur entre les agrégats et l'arrière-plan, l'éclairage ou répartition inégale induit une détection aspécifique de certaines zones (Figure 8, flèche). Pour résoudre ce problème, nous avons généré un arrière-plan artificiel avec un filtre gaussien que nous avons soustrait à l'image d'origine. Cette correction permet de détecter efficacement les agrégats et surtout de ne pas détecter de zone aspécifique dans le contrôle non agrégé (Figure 8). Une fois que les particules ont été détectées, l'aire de chaque particule est mesurée. On peut ensuite représenter graphiquement toutes les particules et l'aire totale agrégée pour chaque puit (se référer à 2.1.2, Figures 1A et 2B). Nous avons automatisé cette technique avec une macro ImageJ (github.com/fdecarpentier/ParticleWell), ce qui permet de comparer rapidement de nombreuses cultures (se référer à 2.1.2 Figures 1, 2, 3 et 7).

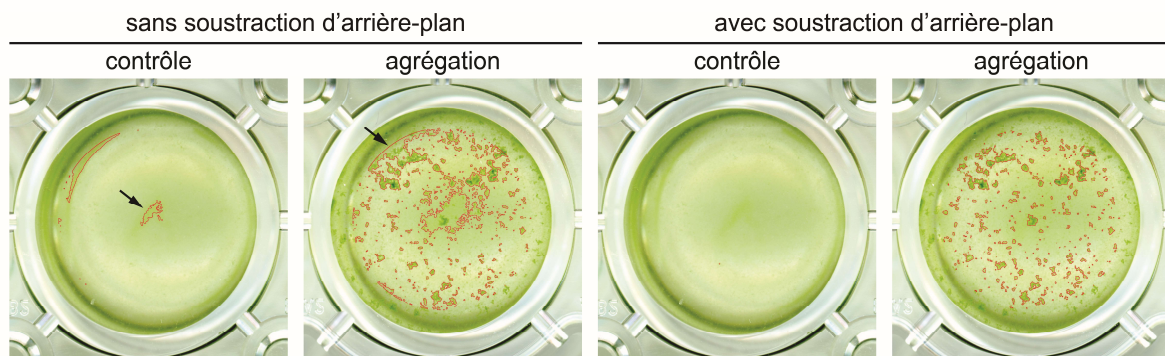


Figure 8. Détection des agrégats en plaque 24 puits dans une culture agrégée (*saz1*) et le sauvage non agrégé (contrôle). La répartition des cellules et l'éclairage inégal sont responsables de détections aspécifiques (flèches). Ce problème est résolu en appliquant une soustraction de l'arrière-plan obtenu par un filtre gaussien.

En conclusion, nous avons développé des outils d'imagerie qui permettent de quantifier l'agrégation au niveau microscopique et macroscopique. Les photos au microscope sont adaptées aux particules jusqu'à une taille d'environ 1 mm^2 ce qui comprend les cellules seules, les palmelloïdes et certains agrégats. Les scans cultures en plaque 24 puits permettent de détecter tous les agrégats, les deux techniques sont donc complémentaires pour caractériser les structures multicellulaires.

2.3.2 Quantification de l'agrégation des mutants *saz*

La taille des agrégats est variable selon les mutants et certains produisent aussi des palmelloïdes (voir 2.2.2). En premier lieu, nous avons mesuré l'aire des cellules seules ($n = 948$) et des palmelloïdes ($n = 1414$). Cela nous a permis d'estimer les intervalles de taille

correspondant à ces deux types de particules (Figure 9A). L'aire des particules chez la souche sauvage et chez les mutants *saz* a ensuite été quantifiée.

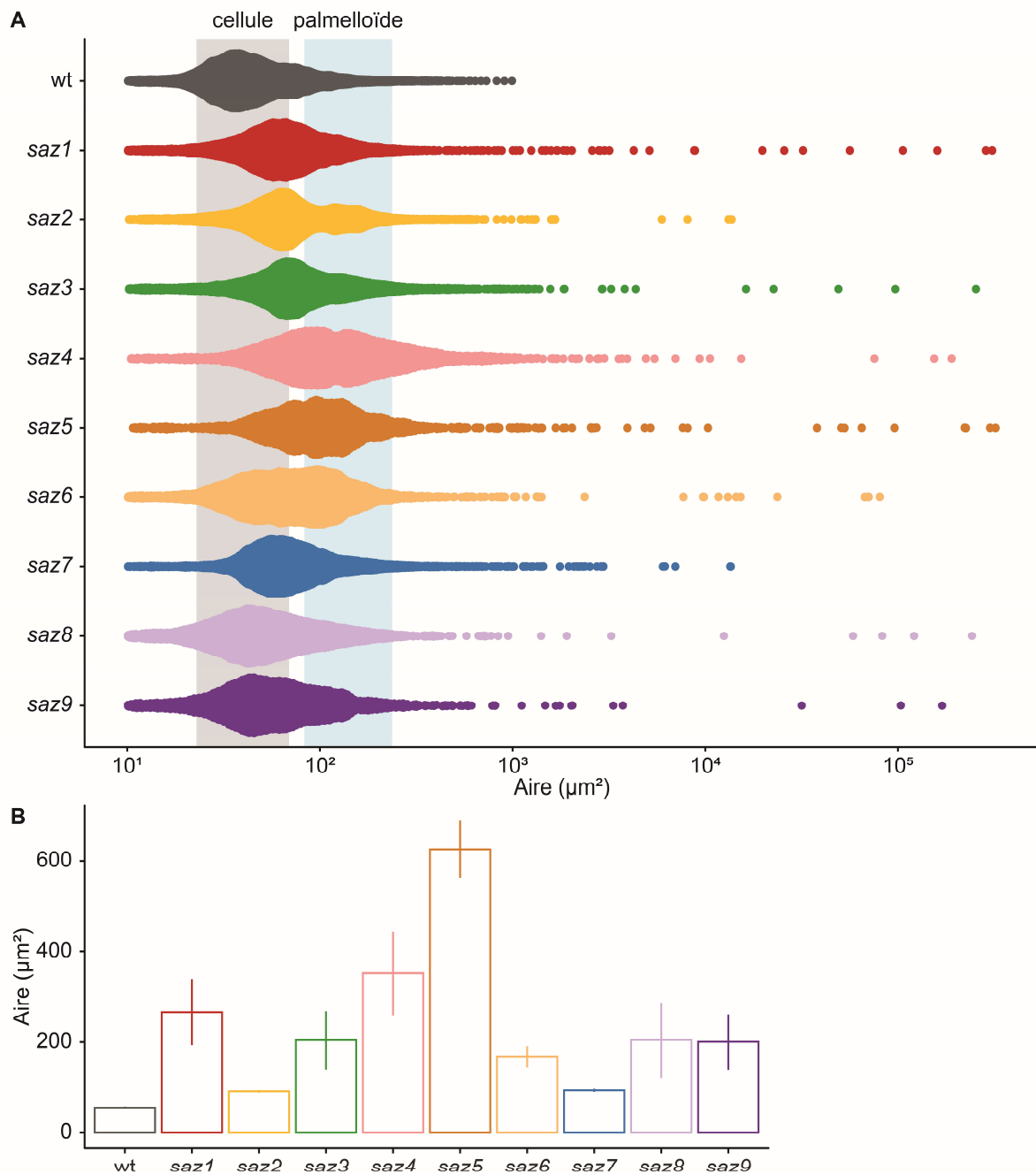


Figure 9. Distribution de l'aire des particules chez les mutants *saz* et chez la souche sauvage. (A) Chaque point correspond à une particule, c'est-à-dire une cellule, un palmelloïde ou un agrégat. Les aires de référence correspondent à l'intervalle entre les quartiles 5 et 95 de populations de cellules seules ou de palmelloïdes. (B) Aire moyenne des particules ($n = 4$). Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type.

Les différences entre les mutants sont visibles au niveau de la distribution des aires des particules (Figure 9A) et de l'aire moyenne (Figure 9B). En termes de taille et de nombre, *saz2* est le mutant qui agrège le moins et *saz4* le plus. Les mutants qui forment le plus de gros agrégats supérieurs à $10^4 \mu\text{m}^2$ sont *saz1*, *saz3*, *saz4* et *saz5*. Certains ont beaucoup d'agrégats

de taille intermédiaire entre 10^3 et $10^4 \mu\text{m}^2$ comme *saz7*. Ces mesures sont cohérentes avec les photographies au microscope (Figure 6).

Comme nous l'avons vu précédemment certains mutants *saz* forment aussi des palmelloïdes ce qui est confirmé par la quantification (Figure 9A). Les mutants qui en forment le plus sont *saz4*, *saz5* et *saz6*. Les mutants *saz8* et *saz9* ont une distribution très similaire au sauvage pour les particules d'aire inférieure à $100 \mu\text{m}^2$ (Figure 9A). Cela est cohérent avec le fait que *saz8* et *saz9* ne forme pas ou très peu de palmelloïdes. Cette absence de palmelloïdes est peut-être la raison pour laquelle *saz8* et *saz9* forment des agrégats plus réguliers. Ces résultats montrent que les mutants forment plus ou moins de palmelloïdes en plus d'agrégats de tailles variable.

2.4 Agrégation et résistance au stress

2.4.1 Analyse d'image

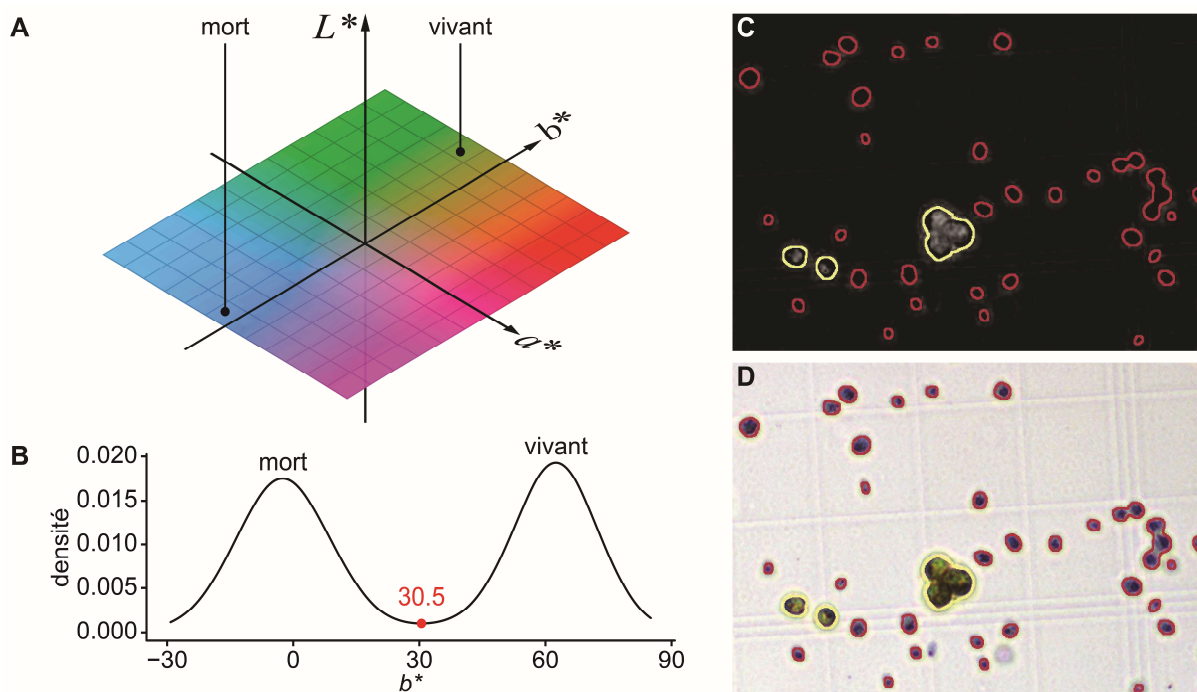


Figure 10. Quantification de l'agrégation et la mort cellulaire. (A) Positionnement schématique de la couleur des cellules colorées au bleu d'Evans dans l'espace de couleur CIELAB. (C) Canal b^* et (D) photographie couleur au microscope de cellules soumises à $4 \mu\text{M}$ de rose bengale. (B) Valeur maximum b^* de 804 cellules, la moitié vivantes et la moitié mortes. Le pic de gauche correspond aux cellules mortes et celui de droite aux vivantes, l'abscisse du minimum local de 30,5 est utilisée pour discriminer les deux populations. (C et D) La couleur du contour correspond à la viabilité des cellules déterminée en fonction de la valeur b^* : en beige les cellules vivantes ($b^* > 30,5$) et en rouge les mortes ($b^* < 30,5$).

Pour analyser le rôle des agrégats dans la résistance au stress nous avons détecté les cellules mortes avec du bleu d'Evans (Vijayaraghavareddy et al., 2017). Nos observations microscopiques ont permis de montrer que les agrégats survivent alors que les cellules seules meurent (se référer à 2.1.2 Figure 1D). Cependant, une description précise demande la

quantification de ce phénomène, c'est-à-dire de l'aire des particules vivantes et mortes. Dans l'espace de couleur CIELAB (Commission Internationale de l'Eclairage) (Connolly and Fleiss, 1997), les cellules mortes bleues et vivantes vertes peuvent être discriminées selon leur valeur b^* (Figure 10A). L'ensemble des particules est détecté puis l'image est transposée en CIELAB et le canal b^* isolé. Par exemple, sur une échelle de valeur de gris, les valeurs hautes de b^* apparaissent en blanc alors que les valeurs basses en noir (Figure 10C). Pour déterminer la valeur discriminante de b^* , une culture vivante a été comparée avec une culture tuée avec 16 μM de rose bengale. La valeur b^* maximale de 402 cellules vivantes et 402 mortes donne une double gaussienne dont l'abscisse du minimum local est 30,5 (Figure 10C). Ainsi, les particules vertes peuvent être discriminées des bleues et l'efficacité vérifiée sur l'image d'origine (Figure 10E). Pour une exécution plus rapide, le traitement a été automatisé dans une macro ImageJ disponible ici : github.com/fdecarpentier/PlantDeath. Cette méthode a permis d'établir la corrélation entre aire des particules et mort cellulaire (voir 2.1.2 Figure 1E).

2.4.2 Résistance au stress des mutants *saz*

Chez la souche sauvage, les cellules des agrégats survivent mieux au stress que les cellules planctoniques (voir 2.1.2 Figure 1 D et E). Nous avons montré aussi que le mutant *saz1* résistait mieux au rose bengale, au GSNO (S-Nitrosoglutathion) et au choc thermique (se référer à 2.1.2 Figure 2 F, G et H). Chez *Chlamydomonas*, le rose bengale induit un stress oxydatif par la production d'oxygène singulet en présence de lumière (Fischer et al., 2005) et le GSNO provoque un stress nitrosatif par nitrosylation des protéines, entre autres (Corpas and Barroso, 2013; Morisse et al., 2014). L'agrégation confère donc une meilleure résistance à ces stress chez le sauvage et *saz1*. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons testé la résistance au stress oxydatif et nitrosatif des 8 autres mutants *saz*. En conditions liquides en présence de rose bengale (4 μM) ou de GNSO (1 mM), la culture de la souche sauvage meurt ce qui est visible par la perte de la chlorophylle (Figure 11A). À l'inverse, tous les mutants *saz* résistent au stress oxydatif et nitrosatif comme *saz1*. La quantification précise du taux de mortalité est illustrée ici par l'exemple de *saz3* et du GSNO. Les cultures du sauvage et de *saz3* ont été soumises à un traitement de 1 mM de GSNO pendant 24 h puis colorées au bleu d'Evans. La mortalité du sauvage atteint plus de 70% des cellules alors que celle *saz3* n'est que de 13% (Figure 11B). Ces résultats confirment que l'agrégation permet aux cellules de survivre au stress oxydatif et nitrosatif.

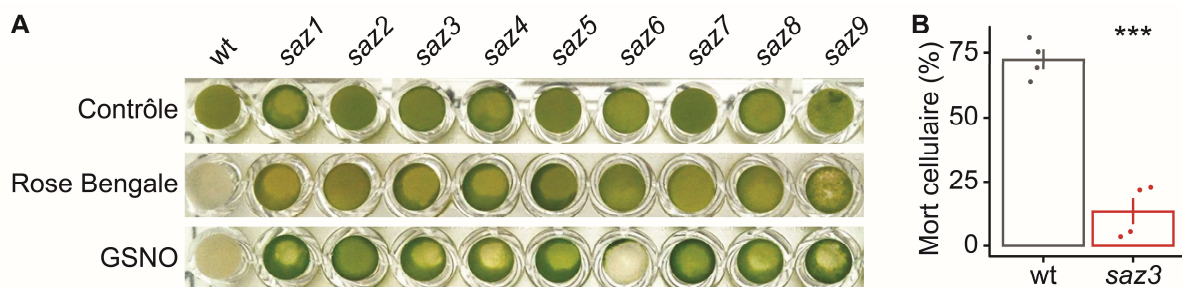


Figure 11. Résistance au stress des mutants *saz*. (A) Culture liquide en plaque 96 puits de la souche sauvage et des mutants *saz* en présence de rose Bengale (4 μM) ou de GSNO (1 mM). (B) Mort cellulaire chez la souche sauvage et *saz3* après un traitement de 24h au GSNO (1 mM).

Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type et la valeur p est calculée avec un test de Student, *** : $p \leq 0.001$.

2.5 Mode de formation des agrégats : clonal ou agrégatif

2.5.1 Création d'une souche rapportrice

Chez les unicellulaires, les agrégats peuvent se former de façon agrégative ou clonale (voir 1.3.2, Pentz et al., 2020). On peut donc se demander quel mécanisme est à l'origine des agrégats induits par le stress abiotique chez *Chlamydomonas*. Pour répondre à cette question, il nous faut mélanger deux populations de cellules, l'une marquée (rapportrice) et l'autre non. Nous avons choisi d'utiliser une souche rapportrice exprimant mVenus, une YFP (*Yellow Fluorescent Protein*). Pour cette raison, nous avons donc créé une souche CC4425 exprimant mVenus. Le plasmide pCMM-23, composé de P_{PSAD} -mVenus- T_{PSAD} lié à la résistance à la blasticidine $P_{A/R}$ -*BSR*- T_{RBCS2} (Figure 12A), a été généré grâce au kit MoClo de *Chlamydomonas* (se référer au Chapitre II 1). Le détail du clonage de pCMM-23 et du développement de *BSR* sont explicités en 2.1.2 et au Chapitre II 2.3.2. pCMM-23 a été digéré, la cassette a été purifiée et enfin insérée par électroporation dans la souche sauvage (CC4425). La souche Venus sera utilisée pour visualiser des cellules dans les agrégats, il faut donc que les cellules fluorescentes soient bien visibles. Il est aussi important que la souche Venus ait une fluorescence constante dans la population, c'est-à-dire que toutes les cellules soient détectables. En effet, chez *Chlamydomonas* l'extinction de l'expression des gènes est forte (Schroda, 2019) et nous ne souhaiterions pas confondre une cellule sauvage avec une cellule où le transgène mVenus serait éteint. C'est pour ces raisons qu'un grand nombre de colonies (40) ont été striées sur boîte et scannées pour la fluorescence jaune ainsi que celle de la chlorophylle (Figure 12B). La souche CC5325-mVenus fluoresce en jaune, elle est donc utilisée ici comme contrôle positif. Les transformants expriment mVenus à différents niveaux et surtout certains de façon plus constante que d'autres. Par exemple, les transformants 3 et 10 présentent certaines zones fluorescentes et d'autres non. À l'opposé, le transformant 8 est fortement fluorescent et ceci sur l'entièreté de sa population, il a donc été sélectionné et renommé wt-mVenus. Cette souche a ensuite été vérifiée au microscope et toutes les cellules sont bien fluorescentes ($n = 390$) (Figure 12C). mVenus est localisée dans le cytoplasme, en dehors du chloroplaste qui est bien visible grâce à la chlorophylle. Les réglages utilisés ne donnent aucun signal aspécifique dans la souche sauvage ce qui permet de différencier avec certitude les cellules fluorescentes ou non (Figure 12C), ceci est important car elles seront mélangées.

Si les agrégats sont composés d'un mélange de cellules fluorescentes et non fluorescentes (agrégat mixte), il s'agit d'un mode de formation agrégatif sinon c'est un mode clonal. La mise au point de la souche mVenus nous a permis de montrer que le mélange des cellules sauvages et mVenus donnent des agrégats mixtes en réponse au choc thermique et au stress oxydatif (voir 2.1.2 Figure 1B). Ceci indique que les agrégats se forment par un mode agrégatif en réponse au stress. On peut alors se demander si le mécanisme de formation est identique chez les mutants *saz*.

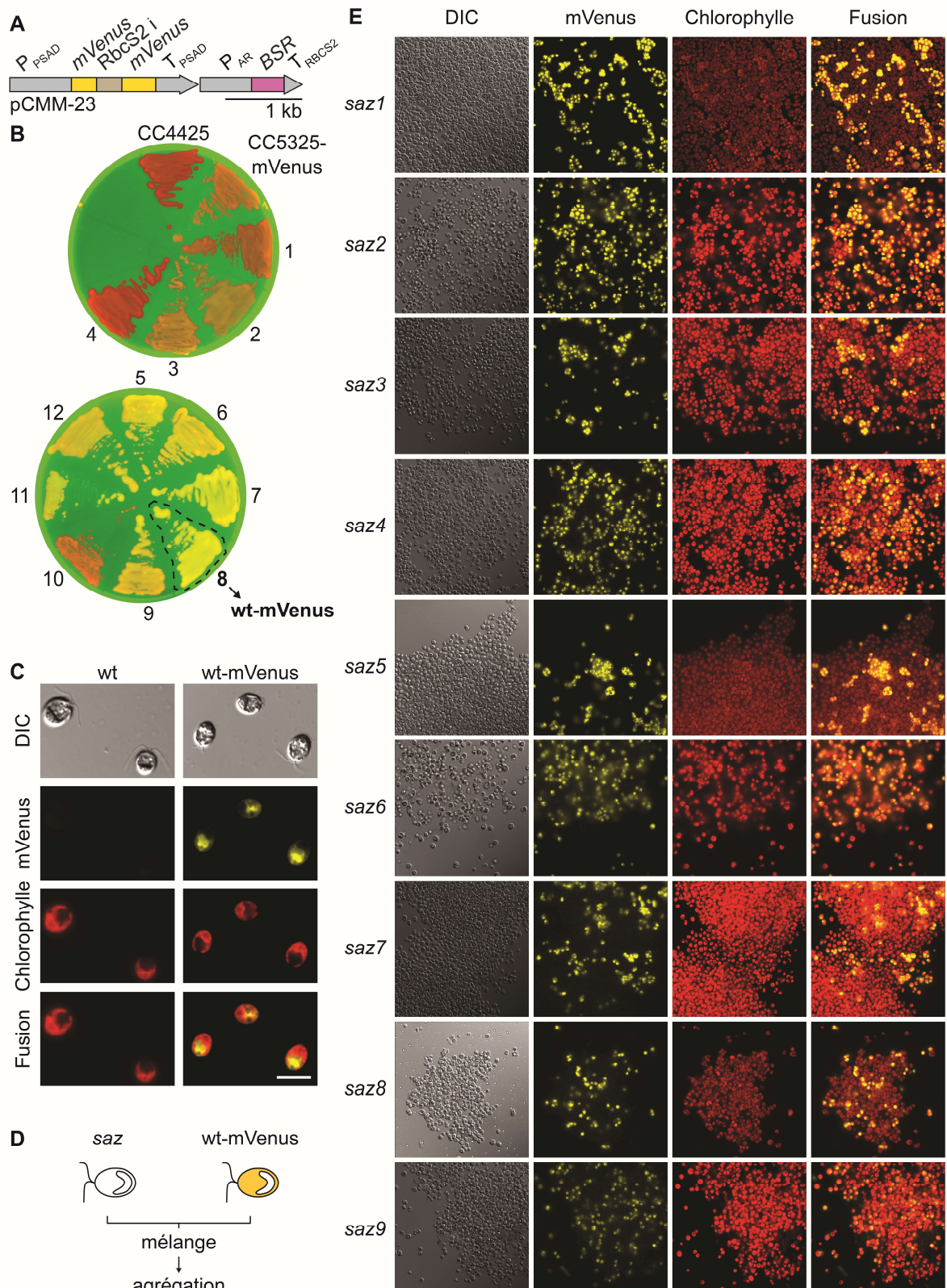


Figure 12. Souche mVenus et mutants *saz*. (A) Construction utilisée dans le but d'exprimer la YFP mVenus dans le cytoplasme de *Chlamydomonas*. pCMM-23 contient l'unité de transcription de mVenus (P_{PSAD} -mVenus(intron de RbcS2)- T_{PSAD}) et la résistance à la blasticidine ($P_{A/R}$ -*BSR*- T_{RBCS2}) (voir Chapitre II 2.3). (B) Transformants obtenus avec la cassette pCMM-23 imagés au scanner à fluorescence. CC4425 et CC5325-mVenus sont les contrôles négatif et positif, et les transformants sont numérotés de 1 à 12. Les images sont un composite de la

chlorophylle en rouge et de la YFP en vert, la superposition de ces deux signaux donne donc du jaune-orange. (C) Image au microscope de la souche sauvage (CC4425) et wt-mVenus en DIC, YFP (mVenus), chlorophylle et composite YFP-chlorophylle. (D) Les mutants *saz* ont été mélangés à la souche wt-mVenus puis les agrégats ont été observés au microscope. (E) Images représentatives d'agrégats obtenus pour les mutants *saz*. Les canaux utilisés sont DIC, YFP (mVenus) et Chlorophylle. Les barres d'échelle représentent 10 μm (C) et 50 μm (E).

2.5.2 Mode d'agrégation des mutants *saz*

La souche wt-mVenus a été mélangé avec chacun des 9 mutants *saz*, puis mise en culture (Figure 12D). Les agrégats ainsi obtenus ont été visualisés en lumière visible ainsi qu'en fluorescence pour mVenus (jaune) et la chlorophylle (rouge) (Figure 12E). On peut constater que les agrégats obtenus sont hétérogènes pour tous les mutants. Dans chaque cas, il y a des cellules fluorescentes seules au cœur des agrégats. Cette observation montre que ces dernières ne sont pas uniquement une agglutination de palmelloïdes. Cependant, certains ilots fluorescents sont visibles chez *saz1*, *saz2*, *saz3*, *saz5* et *saz7*, ce qui pourrait être des palmelloïdes agrégés. En effet, ces mutants forment des palmelloïdes en plus des agrégats, (voir 2.2.2), ils pourraient aussi induire la formation de palmelloïdes de la souche sauvage fluorescente. Une autre hypothèse est que des cellules continuent à se diviser dans les agrégats. En conclusion, les structures multicellulaires chez les mutants *saz* se forme par agrégation comme en réponse au stress chez la souche sauvage. Il est intéressant de noter que le sauvage s'agrège avec chacun des mutants *saz* sans besoin d'un stress. Cela nous amène à nous intéresser au rôle du milieu extracellulaire dans l'agrégation.

2.6 Rôle du compartiment extracellulaire dans l'agrégation

2.6.1 Effet du milieu extracellulaire des mutants *saz*

Nous avons vu que le milieu de cellules sauvages agrégées était suffisant pour induire l'agrégation (voir 2.1.2 Figure 3). Ce constat nous amène donc à nous intéresser au rôle du milieu extracellulaire des mutants *saz*. Les cellules sauvages ont donc été mises en culture en plaque 24 puits dans le milieu purifié des 9 mutants *saz*. Le milieu des mutants est capable d'induire une forte agrégation de la souche sauvage à l'exception de *saz8* et *saz9* (Figure 14). Le milieu de *saz8* n'induit aucune agrégation et le milieu de *saz9* induit quelques gros agrégats comme les autres mutants mais très peu de petits, ce qui donne une agrégation totale faible. C'est pour ces raisons que ces deux mutants n'ont pas été inclus dans l'analyse de protéomique. Nous verrons plus tard que ces 2 mutants sont effectivement particuliers et se distinguent des autres *saz*. Le milieu de la majorité des mutants *saz* est capable d'induire l'agrégation. Ces résultats apportent une solide confirmation du rôle primordial du milieu extracellulaire dans l'agrégation. Les protéines du milieu de 6 mutants *saz* ont ensuite été identifiées en protéomique quantitative, et analysées (voir 2.1.2 Figure 4).

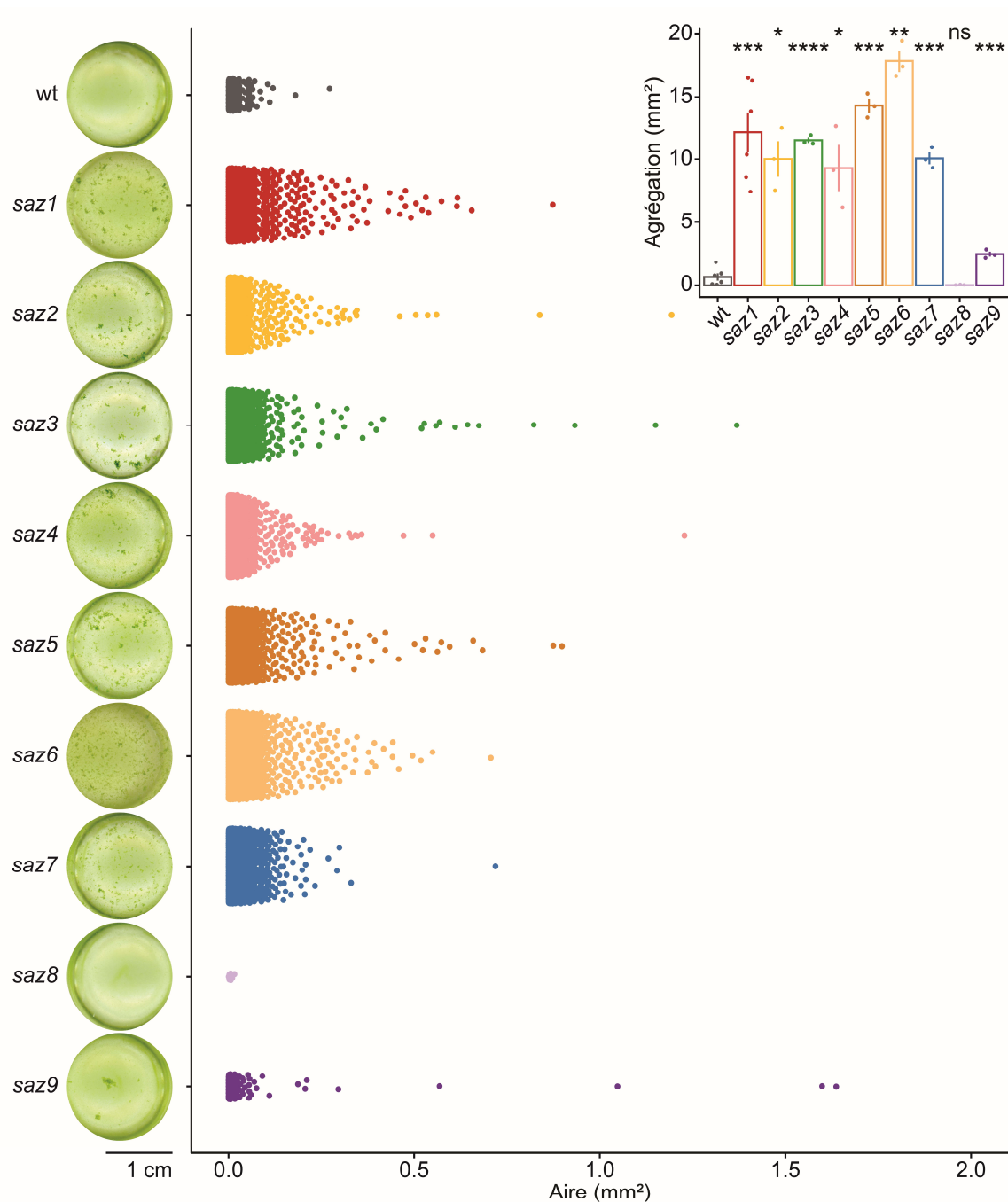


Figure 13. Agrégation induite par le milieu de culture des mutants *saz*. La souche sauvage a été mise en culture pendant 5 jours, en plaque 24 puits, dans le milieu purifié des mutants *saz*. L'aire de chacun des agrégats identifiés dans 6 puits est représenté par un point. Le diagramme en barres correspond à l'aire totale agrégée par puit. Les barres d'erreur représentent l'erreur type et la statistique est obtenue par un test de Student (ns : $p > 0.05$; * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 10^{-2}$; *** : $p \leq 10^{-3}$; **** $p \leq 10^{-4}$).

2.6.2 Tentative d'identification du type de molécules pro-agrégatives

Nous avons montré que l'activité agrégative du milieu était annulée par une dénaturation thermique. Cela est vrai pour le milieu issu de *saz1* ou de cellules sauvages agrégées ou mortes (voir 2.1.2 Figure 3) (Figure 13). Les molécules responsables de cette activité sont thermolabiles, une caractéristique des protéines. D'autre part, les protéines sont abondantes dans le milieu

ce qui est visible sur gel SDS-Page (Figure 14A) mais aussi en protéomique quantitative où nous en avons identifié 762 (voir 2.1.2). Il semble donc possible que les molécules responsables de l'agrégation soient des protéines. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons voulu voir l'impact de l'absence de protéines dans le milieu de culture sur l'agrégation. Pour cela nous avons traité le milieu à la protéinase K. Le pH du milieu extracellulaire de *Chlamydomonas* est de pH 8.4, c'est pourquoi nous avons choisi cette peptidase qui a une activité optimale entre pH 7.5 et pH 12.0 contrairement à la pepsine qui fonctionne à pH acide par exemple (Cornish-Bowden and Knowles, 1969; Ebeling et al., 1974). Cette enzyme pouvant être toxique pour les cellules, nous avons cherché la dose minimale pour digérer les protéines du milieu. Pour cela le milieu de la souche sauvage a été digéré avec des quantités croissantes de protéinase K (Figure 14A). Nous avons choisi une concentration de protéinase K de 2,5 mg/L, ce qui est suffisant pour digérer toutes les protéines du milieu en 3h. Le milieu de cellules sauvages a été traité à la protéinase K puis de nouvelles cellules sauvages y ont été incubées pendant 48h. Nous avons constaté qu'à cette faible concentration la protéinase K reste très toxique puisqu'elle tue une grande partie des cellules, celles qui survivent étant agrégées et accrochant très fortement au fond des puits (Figure 14D). Un traitement à la protéinase n'est donc pas adapté dans le contexte de nos études sur l'agrégation induite par le stress, ou alors il faudrait pouvoir l'inactiver avant de tester les milieux. Nous n'avons donc pas pu déterminer avec certitude si l'activité agrégative du milieu était due à des protéines.

Les molécules du milieu induisant l'agrégation pourraient aussi être des acides nucléiques (Flemming and Wingender, 2010). Pour tester cette hypothèse, nous avons traité le milieu à la RNase A et la DNase I. Comme la protéinase K, ces deux enzymes sont actives à pH 8,4 (Tanford and Hauenstein, 1956; Yasuda et al., 2004). La DNase I nécessite la présence de cations divalents métalliques qui sont déjà présents dans le TAP en quantité suffisante à hauteur de 0,34 mM pour Ca^{2+} et 0,41 mM pour Mg^{2+} (Campbell and Jackson, 1980; Gorman and Levine, 1965). Les quantités d'acides nucléiques du milieu sont très faibles, à peine visibles sur gel d'agarose (Figure 14 B et C). On observe un dégradé continu sur toute la longueur de la bande contrôle avec une prévalence entre 0.1 et 0.5 kb, autour de 1.5 kb et au-dessus de 10 kb. Le dégradé continu et la bande de haut poids moléculaire sont facilement digérés par la DNase, il s'agit donc vraisemblablement d'ADN (Figure 14C). La présence ou l'absence de tampon ne semble pas affecter l'efficacité de la digestion. De grandes quantités de RNase A, induisent également la digestion de l'ADN (Figure 14B). Nous avons donc utilisé la RNase A et la DNase I à des concentrations de 75 mg/L et 10 U/mL, respectivement. Ces quantités sont suffisantes pour digérer l'ARN et l'ADN présents dans le milieu. Le milieu de la souche sauvage a été traité la RNase A ou la DNase I, puis de nouvelles cellules sauvages y ont été mises en culture. Dans les conditions testées, ces deux enzymes n'induisent pas la mort des cellules mais une légère agrégation a été observée (Figure 14 D et E). Pour rappel, le milieu de *saz1* induit l'agrégation des cellules sauvages, nous l'avons donc aussi traité à la RNase et la DNase (Figure 14E). Si l'agrégation induite par milieu de *saz1* avait été réduite par le traitement à la RNase ou la DNase, nous aurions pu conclure que l'ARN ou l'ADN avait un rôle. Or, ces deux traitements induisent l'agrégation dans le milieu sauvage et n'ont pas d'influence sur l'agrégation du milieu de *saz1*. Nous ne pouvons donc pas conclure concernant le potentiel effet des acides nucléiques du milieu de culture sur l'agrégation. En outre, ces résultats

montrent qu'une attention particulière doit être portée au milieu de culture pour tirer des conclusions solides sur l'agrégation en réponse au stress.

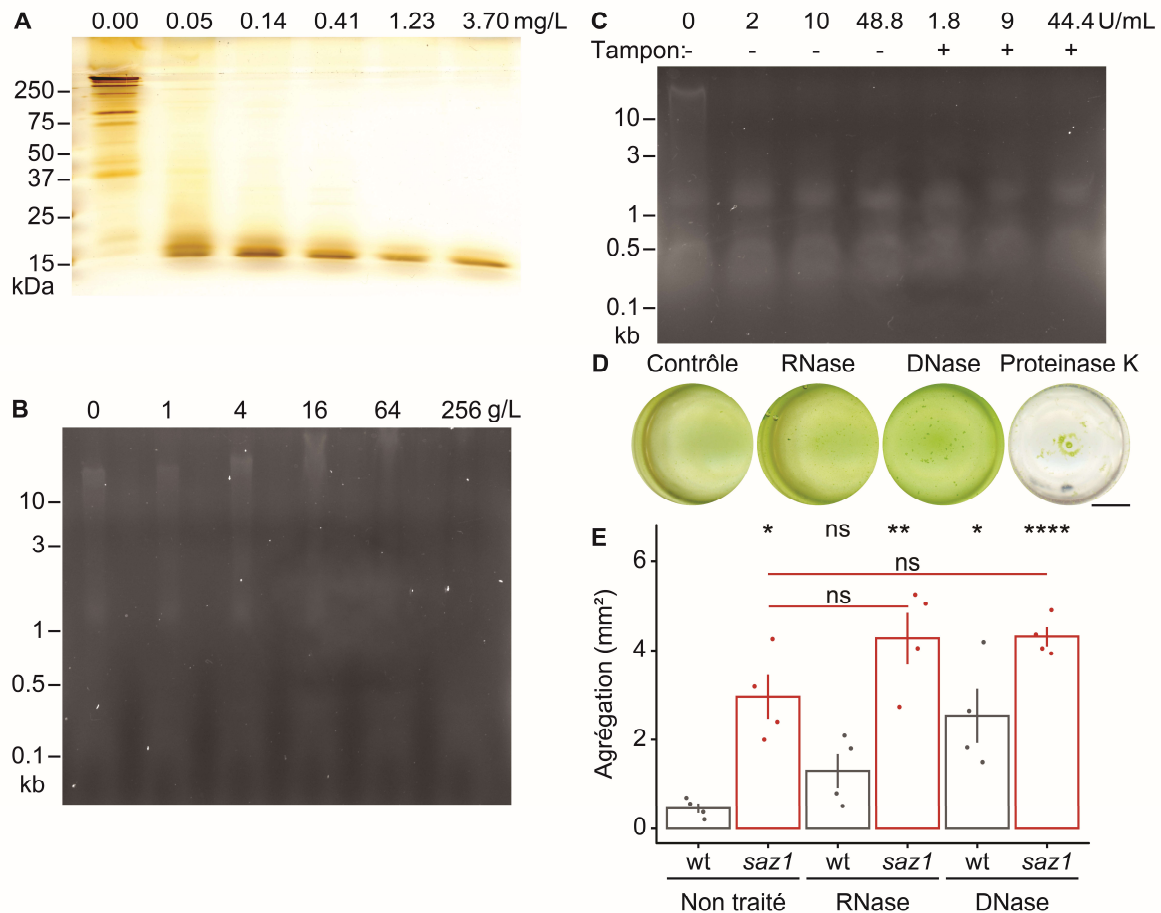


Figure 14. Nature des molécules pro-agrégatives du milieu extracellulaire. Le milieu de culture sauvage a été traité avec des doses croissantes de (A) protéinase K, (B) RNase A et (C) DNase I et visualisées sur SDS-Page (A) par une coloration au nitrate d'argent ou gel d'agarose (B et C). (C) La digestion de l'ADN a été effectuée avec ou sans tampon. (D) Effet de la RNase A, DNase I ou protéinase K sur les cellules sauvages en plaque 24 puits après 4 jours de croissance. Images représentatives de 4 cultures indépendantes. La barre d'échelle correspond à 0.5 cm. (E) Agrégation de cellules sauvages induite par le milieu de culture du sauvage et de *saz1* traités à la RNase ou la DNase en plaque 24 puits. Les valeurs représentent l'aire totale agrégée par puits, les barres d'erreur sont \pm l'erreur type et les symboles représentent la valeur p calculée avec un test de Student selon les correspondances suivantes : ns : $p > 0.05$; * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 10^{-2}$; *** : $p \leq 10^{-3}$; **** $p \leq 10^{-4}$.

2.7 Analyse transcriptomique des mutants *saz*

Etant donné que les mutants *saz* agrègent tous spontanément, les gènes sur ou sous exprimés chez tous ces mutants pourraient être des régulateurs centraux de l'agrégation. Dans cette perspective, nous avons séquencé l'ARN des mutants *saz*. L'ARN a été extrait avec du phénol acide (Schmitt et al., 1990) car la technique classique au Trizol ne donnait pas une pureté suffisante (Pinto et al., 2009). Après un traitement à la RNase, l'intégrité des ARN a été vérifiée

par électrophorèse sur gel et en capillaire (TapeStation). Sur gel, les bandes des ARN ribosomiques 18S et 25S doivent être intenses et fines. La TapeStation utilise aussi l'abondance de ces deux ARNr pour calculer le RINe (RNA integrity number equivalent). Pour les mutants *saz1* à *saz9*, trois réplicats ayant un RINe supérieur à 5,5 ont été séquencés. L'alignement des séquences contre le génome de *Chlamydomonas* (Merchant et al., 2007) et la quantification des ARNn a été faite par Alexandre Maes. L'analyse transcriptomique des mutants *saz1* à *saz6* a été décrite en détail dans la partie 2.1.2. Dans cette partie (pour l'article) nous nous sommes limités à ces mutants car la reproductibilité de *saz7* n'est pas suffisante (Figure 15A). De plus, *saz8* et *saz9* ont une morphologie différente des autres (voir 2.2.2) et leur milieu extracellulaire n'induit pas ou peu d'agrégation (voir 2.6.1).

Suivant la PCA (Analyse en Composante Principale) résumant les variations de transcrits dans chaque souche (Figure 24B), les mutants ont des profils différents. *saz1*, *saz2*, *saz3*, *saz4*, *saz5* et *saz7* forment un premier groupe éloigné de la souche sauvage, *saz8* et *saz9* un second très proche de cette dernière. *saz6* est distinct de tous les autres mutants et de la souche sauvage.

Pour se concentrer sur les gènes importants dans l'agrégation, nous avons sélectionné des 100 gènes ayant la variance la plus élevée entre la souche sauvage et les 9 mutants *saz* (Figure 15B). Pour ce sous-ensemble de gènes on retrouve des groupes similaires avec d'une part *saz1*, *saz2*, *saz3*, *saz4*, *saz5* et *saz7* et d'autre part *saz8* et *saz9*. Ici *saz6* est plus proche de *saz8* et *saz9* ce qui n'est pas évident sur la PCA (Figure 15). Certains gènes exprimés différemment chez les mutants *saz1* à *saz6* et que nous avons identifiés comme importants pour l'agrégation (voir 2.1.2) ne sont pas dérégulés chez *saz8* et *saz9*. Parmi ces gènes, ceux codant pour la phérophorine *PHC18* (Cre24.g755997), la protéine associée au flagelle *FAP41* (Cre10.g452250), une lipase (Cre09.g399400) et deux protéines SRCR (*Scavenger Receptor Cysteine Rich*, Cre09.g404750 et Cre10.g458850) sont surexprimés uniquement chez *saz1* à *saz6*. Ces deux mutants ont un profil d'expression de gènes totalement différent des autres mutants *saz*. Pour rappel, ces deux mutants ont une morphologie différente des autres mutants *saz* et leur milieu de culture n'est pas capable d'induire l'agrégation (voir 2.2.2 et 2.6.2). Il y a donc une corrélation entre le phénotype de ces mutants et l'expression de leurs gènes.

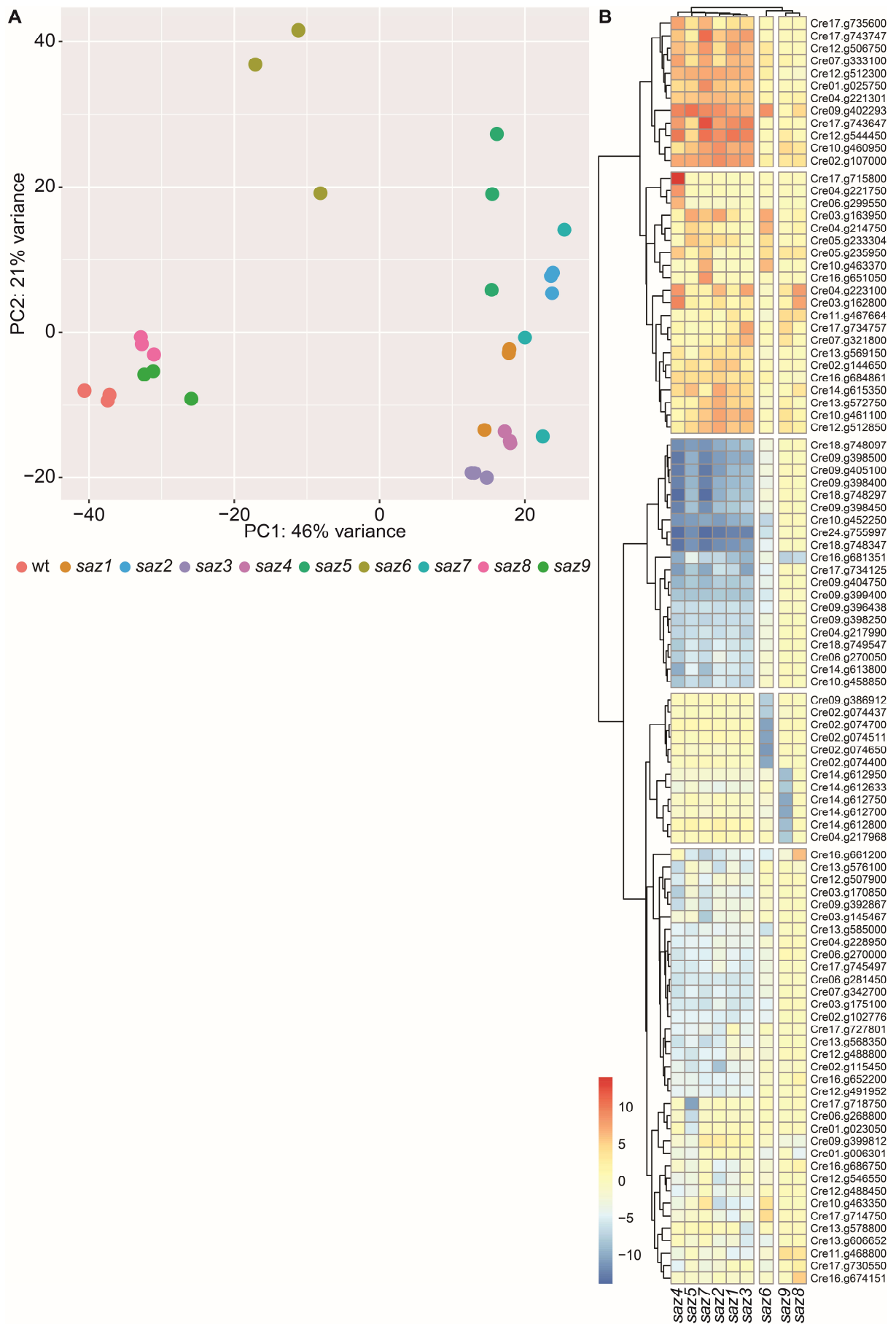


Figure 15. Analyse transcriptomique des mutants *saz*. (A) Analyses en composante principale

résumant les niveaux d'expression des gènes obtenus par une analyse en RNAseq. (B) Sélection des 100 gènes les plus variants. Les couleurs représentent le log2 du ratio entre la souche sauvage et les mutants *saz*.

2.8 Génotype des mutants *saz*

2.8.1 Identification des gènes inactivés chez les mutants *saz*

Nous avons identifié une famille de 16 mutants *saz* à la suite d'une mutagenèse insertionnelle aléatoire en utilisant la cassette de résistance à la paromomycine (Paro^R - i72) (voir 2.2.1). Nous avons tenté de localiser l'insertion de la cassette chez les mutants *saz*, pour déterminer les gènes dont l'inactivation est potentiellement responsable du phénotype d'agrégation de ces mutants. Pour cela, nous avons utilisé la RESDA-PCR (Restriction enzyme site-directed amplification PCR) dont le principe est décrit en Figure 16A (González-Ballester et al., 2005). Pour chaque mutant *saz*, l'ADN génomique de la souche sauvage et du mutant *saz* ont été purifiés et deux PCR successives ont été effectuées pour amplifier la zone flanquante de la cassette Paro^R. Les produits spécifiques, c'est-à-dire présents uniquement dans le mutant d'intérêt, ont été purifiés sur gel et séquencés. En alignant les séquences obtenues avec le génome de *Chlamydomonas* par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Merchant et al., 2007), nous avons pu localiser les insertions dans les mutants *saz1*, *saz3*, *saz4* and *saz5* (Figure 17A). Cependant, pour le reste des mutants, la RESDA-PCR n'a pas donné de résultats, nous avons donc utilisé la méthode adaptateur-PCR décrite en Figure 16B (Pollock et al., 2017). Dans ce cas, l'ADN génomique de la souche sauvage et du mutant a été entièrement digéré par des enzymes de restriction, des adaptateurs ont été liés aux fragments et deux PCR imbriquées ont été effectuées avec des amorces spécifiques de Paro^R et des adaptateurs. Les produits de PCR spécifiquement présents dans le mutant *saz* d'intérêt ont finalement été séquencés. Cette technique a permis d'identifier les locus d'insertion chez *saz2*, *saz6* and *saz7* (Figure 17A).

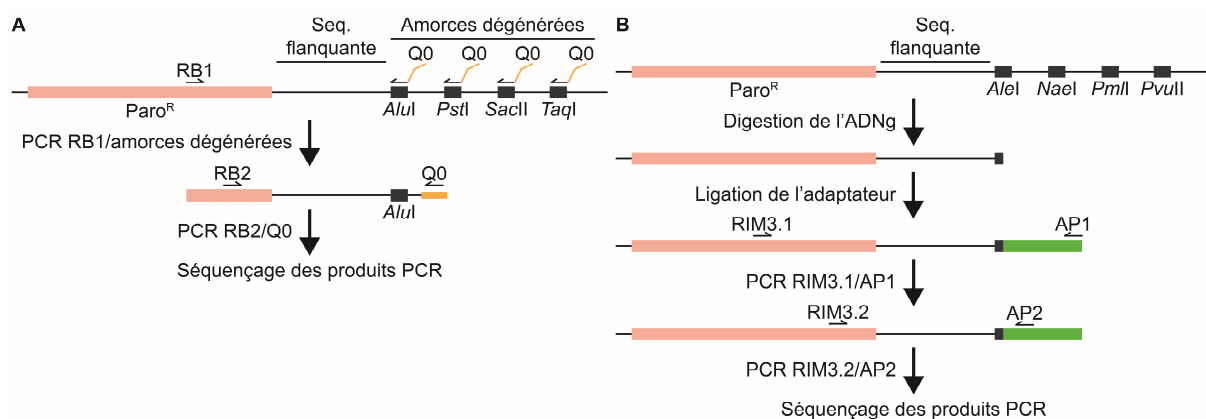


Figure 16. Techniques de localisation de la cassette de résistance à la paromomycine chez *Chlamydomonas*. (A) La RESDA-PCR consiste en une amplification avec une amorce spécifique de Paro^R (RB1) et des amorces dégénérées contenant le site Q0 (en jaune) et s'hybridant à des sites de restriction courants du génome. S'en suit une PCR avec les amorces RB2 et Q0 dont les produits sont séquencés (González-Ballester et al., 2005). (B) La méthode adaptateur-PCR consiste en une digestion complète du génome avec 4 enzymes (dont les sites de restriction sont courants) suivie de la ligature d'un adaptateur double brin (en vert) aux extrémités des

fragments ainsi obtenus. Deux PCR successives avec des amorces spécifiques de Paro^R (RIM3.1 et RIM3.2) et de l'adaptateur (AP1 et AP2) permettent ensuite d'obtenir des produits qui sont séquencés (Pollock et al., 2017).

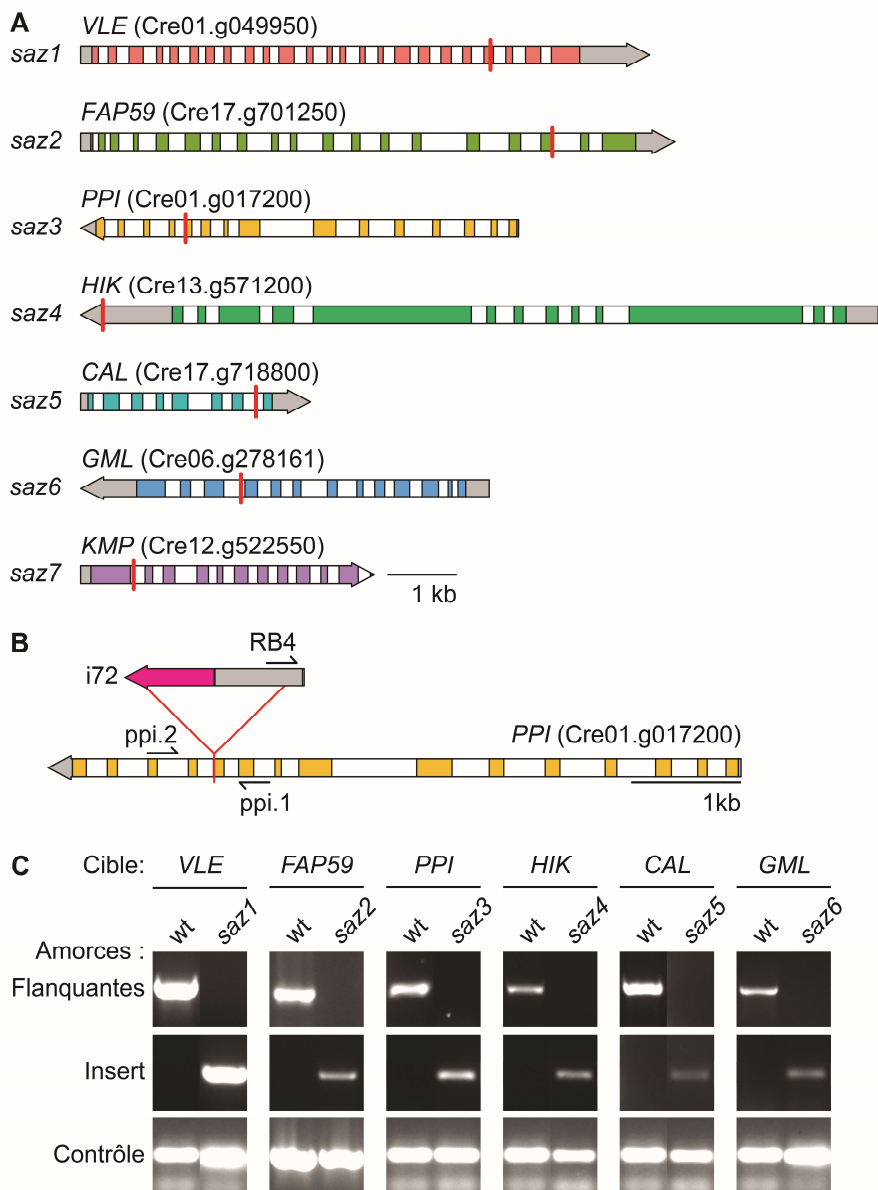


Figure 17. Génotype des mutants *saz*. (A) Gènes mutés par l'insertion Paro^R (i72, trait rouge) dans les mutants *saz1* à *saz7*. Les exons sont représentés en couleur et les régions non traduites (UTR) en gris. (B) Position schématique des amorces spécifiques de *PPI* (ppi.1 et ppi.2) et de la cassette Paro^R i72 (RB4) utilisées pour les PCR de vérification chez *saz3*. (C) PCR de vérification du locus d'insertion sur l'ADNg des mutants *saz1* à *saz6*. La zone flanquante correspond aux PCR avec des amorces de part et d'autre de l'insertion. Les bandes obtenues ont les tailles attendues pour *VLE* (984 pb), *FAP59* (521 pb), *PPI* (329 pb), *HIK* (882 pb), *CAL* (798 pb) et *GML* (1806 pb). Les PCR avec l'insert ont été faites avec l'amorce RB4, s'hybridant sur Paro^R, et une amorce du gène (González-Ballester et al., 2005). Le contrôle est une amplification de 633 pb du gène *CBLP* (Cre06.g278222).

Les insertions de la cassette ParoR dans les mutants *saz1* à *saz7* sont localisés dans des gènes différents (Figure 17A), la fonction de ces gènes sera décrite ci-après. L'insertion est située dans la séquence codante à part pour *saz4* où elle est dans le 3'UTR (Figure 17A). Pour 3 mutants, l'insertion est dans un exon et pour 3, dans un intron. Pour confirmer que les insertions sont bien au locus identifié, nous avons effectué des amplifications spécifiques des locus d'intérêt par PCR. Si l'insert est au locus identifié on s'attend à ce que des amorces de part et d'autre du locus donnent un fragment de taille attendue chez le sauvage et aucun fragment chez le mutant. C'est, par exemple, ce qui a été fait chez *saz3* avec les amorces ppi.1 et ppi.2 (Figure 17B). Ensuite, pour vérifier la nature (ParoR), le sens et la position de la cassette, une PCR avec des amorces spécifiques de Paro^R et du gène est effectuée. Cela donne une amplification chez les mutants *saz* mais pas chez la souche sauvage. Dans l'exemple de *saz3*, cette dernière PCR a été effectuée avec les amorces ppi.1 et RB4 (Figure 17B) (González-Ballester et al., 2005). Ces deux PCR ont aussi été effectuées avec les amorces appropriées chez les mutants *saz1* à *saz6* (Figure 17C). On confirme ainsi que l'insert Paro^R est situé à l'endroit identifié dans les mutants *saz*.

Le locus d'insertion a aussi été séquencé pour certains des mutants *saz*. Pour cela, la zone de l'insert a entièrement été amplifiée en allongeant le temps d'élongation de la PCR. La bande correspondante obtenue après migration par électrophorèse a ensuite été purifiée et séquencée avec les amorces du gène et de l'insert. Pour *saz1*, les deux côtés de l'insert ont été séquencés (voir 2.1.2 Figure S1). De même, le gène *PPIa* a été séquencé en partie dans le mutant *saz3* (Figure 18). Nous avons ainsi pu déterminer le locus de l'insertion au nucléotide près. On peut constater beaucoup de disparités entre notre séquence et celle du génome de référence. Cela s'explique par le fait que nous utilisons la souche sauvage D66 (CC4425) alors que la souche de référence du génome est CC-503 et que les disparités entre les souches sont importantes chez *Chlamydomonas* (Gallaher et al., 2015).



Figure 18. Séquençage de la zone flanquant l'insertion Paro^R (i72) dans le gène *PPI*. Le locus de l'insertion a été déterminé avec précision par 3 séquençages successifs.

2.8.2 Fonction des gènes identifiés chez les mutants *saz*

La fonction putative de protéines peut être déduite par leur séquence (Blaby et al., 2014). Les gènes que nous avons trouvés comme inactivés chez les mutants *saz* ont des fonctions liées à la signalisation cellulaire, la protéolyse ou la sécrétion.

Chez *saz4*, l'insertion est dans le 3'UTR du gène *HIK* (Cre13.g571200) qui code pour une histidine kinase. Une insertion dans cette zone n'inactive pas forcément le gène, nous avons donc mesuré l'expression de *HIK* en qPCR. Dans *saz4*, *HIK* s'exprime 15 fois moins que dans la souche sauvage, il s'agit donc d'un mutant *knock down* et non *knock out*. Cette famille de protéines a pour rôle de transmettre un signal au travers de la membrane cytoplasmique. La signalisation médiée par les histidine kinases est très peu connue chez *Chlamydomonas*. HIK a une structure similaire à l'histidine kinase rhodopsin 1 qui est un photorécepteur (Luck and Hegemann, 2017). A l'extrémité C-terminale, est prédit un domaine de type régulateur de réponse (*Response regulator receiver domain* en anglais) qui permet de sonder

l'environnement extracellulaire. Il y a deux domaines HisKA et H-ATPase putatifs d'histidine kinase dans *HIK*. Leur rôle est de transférer un phosphate inorganique de l'ATP vers un régulateur protéique qui active ainsi une cascade de signalisation intracellulaire (Zschiedrich et al., 2016). On peut postuler de ces différentes caractéristiques que HIK est un senseur de l'environnement capable de percevoir le stress, qui phosphoryle un régulateur de l'agrégation. La diminution de HIK dans le mutant *saz4* pourrait conduire à l'expression différentielle de gènes pro ou anti-agrégatifs.

Le gène inactivé chez *saz5* code aussi pour une protéine de la signalisation : une calcineurine (*CAL*) (Cre17.g718800). Les calcineurines sont des serine/thréonine phosphatase activées par le calcium et les calmodulines. Ces protéines déphosphorylent des facteurs de transcription qui activent l'expression de certains gènes (Kumar et al., 2020). L'inactivation de *CAL* dans le mutant *saz5* arrête possiblement une cascade de signalisation qui aboutit à une expression différentielle de gènes de l'agrégation. Chez les plantes le calcium a un rôle dans la perception mécanique et l'adhésion, en particulier au moyen du canal Ca^{2+} DEK1 (Tran et al., 2017). Chez *Chlamydomonas*, le stress osmotique entraîne un influx rapide de calcium (Bickerton et al., 2016). Le calcium et la signalisation associée pourrait donc avoir un rôle dans l'agrégation en réponse au stress chez *Chlamydomonas*.

Deux mutants (*saz1* et *saz6*) sont mutés pour des protéases. *saz1* est muté pour le gène Cre01.g049950 qui code pour VLE, une proprotéine convertase subtilisine/kexine (Luxmi et al., 2018). Le détail de l'insertion et du rôle de VLE sont présentés dans la partie 2.1.2. Dans la littérature, VLE a d'abord été identifiée comme une enzyme responsable de la dégradation de la paroi lors de la division cellulaire (Kubo et al., 2009; Matsuda et al., 1995). Or le mutant *saz1* forme des agrégats par un mode agrégatif. Si VLE avait uniquement un rôle dans la division, on s'attendrait à avoir des agrégats formés de façon clonale. Cela montre que VLE a aussi un rôle dans l'agrégation. Il a été proposé que VLE1 soit un homologue de prohormone convertases (PC) qui sont impliquées dans la machinerie des neuropeptides chez les animaux. Dans notre analyse protéomique nous avons trouvé dans le milieu de culture deux peptides similaire à ceux des animaux, il serait intéressant d'analyser leur rôle dans l'agrégation. VLE1 est sécrétée dans le compartiment extracellulaire comme les MMPs (Wood et al., 2013). Le rôle de VLE pourrait également être d'activer des MMPs en les clivant (Luxmi et al., 2018). Or nous avons trouvé un mutant inactivé pour une gamétolysine : *saz6*.

Le mutant *saz6* est muté pour une gamétolysine (*GML*) (Cre06.g278161). Les gamétolysines font partie des MMPs qui sont des protéases impliquées dans la dégradation de l'ECM chez les plantes et les animaux (Marino-Puertas et al., 2017). Chez *Chlamydomonas*, les gamétolysines sont responsables de la dégradation de la paroi ce qui permet la fusion des deux gamètes lors de la reproduction sexuée (Joo et al., 2017). De plus ces enzymes pourraient avoir un rôle dans le maintien de la paroi des cellules végétatives et des zygotes (Cronmiller et al., 2019; Kubo et al., 2001). La paroi de *Chlamydomonas* est composée de glycoprotéines riches en hydroxyprolines (HPRGP) dont les PHCs. Une des cibles des MMPs sont les HPRGPs qui sont aussi des constituants importants de la matrice de *Volvox* (Hallmann, 2006). Par des expériences de génétique inverse, nous avons montré que certaines PHCs étaient pro-agrégatives (PHC30, PHC41 et PHC50) et d'autres anti-agrégatives (PHC28 et PHC35) (voir 2.1.2

Figure 7). La séquence de *GML* a été analysées avec l'algorithme PredAlgo (Tardif et al., 2012) et est prédite sécrétée. On peut supposer que *GML* est sécrétées dans le milieu et y dégrade des HPRGP (PHCs ?) pour empêcher l'agrégation. Lorsque *GML* est inactivé, les HPRGPs ne sont plus dégradées et forment donc une matrice permettant l'agrégation.

L'insertion chez *saz3* est dans le gène Cre01.g017200 qui code une Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerase (PPI). Les protéines de cette famille permettent d'interconvertir les isomères *cis* et *trans* des liens peptidiques avec une proline (Lang and Schmid, 1988). PPI pourrait donc catalyser des modifications post traductionnelles qui auraient pour effet de moduler les propriétés (activité, stabilité, structure) de protéines (Theuerkorn et al., 2011). De plus PPI possède trois domaines de types FKBP (*FK506 Binding Protein*) qui sont impliqués dans la signalisation de réponse au stress de type TOR (*Target Of Rapamycin*) chez les plantes et *Chlamydomonas* (Fu et al., 2020; Pérez-Pérez et al., 2017). Nous avons donc identifié trois candidats relatifs à la signalisation : *HIK* serait un senseur du signal extracellulaire, *CAL* peut moduler la signalisation intracellulaire et *PPI* pourrait être responsable de modification post traductionnelles et/ou de signalisation.

Les mutations chez *saz2* et *saz7* concernent des protéines du flagelle de *Chlamydomonas*. *Saz2* comporte une insertion dans le gène Cre17.g701250 qui correspond à *FAP59 (Flagellar Associated Protein)*, une protéine du flagelle au rôle inconnu. Chez *saz7*, le gène muté est Cre12.g522550 qui code une protéine du transport intraflagellaire appelé *KMP* pour *Kinesin Motor Protein* (Miller et al., 2005). Chez *Chlamydomonas* les protéines sécrétées transitent par les flagelles jusqu'à leur extrémité, où elles sont majoritairement sécrétées dans des microvésicules appelées ectosomes (Wood and Rosenbaum, 2015). Le transport intraflagellaire pourrait donc réguler la sécrétion de protéines comme *VLE* ou *GML* et ainsi modifier le contenu du compartiment extracellulaire.

2.8.3 Complémentation de *saz3* avec *PPI*

Lorsqu'un gène est identifié comme inactivé chez un mutant, il faut confirmer que c'est bien cette mutation qui est responsable du phénotype observé. Pour cela, la meilleure stratégie est de compléter le mutant d'intérêt. La complémentation d'un mutant consiste à restaurer le phénotype sauvage par l'introduction dans le génome d'une nouvelle copie sauvage du gène candidat. L'insertion dans le mutant *saz3* a été localisée au niveau de l'exon 11 du gène Cre01.g017200 codant pour une Peptidylprolyl cis-trans isomerase (PPI) (Figure 17B). Pour cloner *PPI*, nous utilisons le kit de clonage modulaire de *Chlamydomonas* que nous avons développé (voire Chapitre II 1). La séquence codante a été réencodée selon le biais de codon de *Chlamydomonas* car cela est censé améliorer son expression (Schroda, 2019). Le clonage *golden gate* utilise les enzymes de type II *S BsaI* et *BbsI*, nous avons donc retiré les sites de ces enzymes, de la séquence du gène, par des mutations silencieuses. Enfin, nous utilisons le standard MoClo plantes, nous avons donc ajouté des sites de fusion des positions B3-B4 aux extrémités des séquences (Patron et al., 2015). Ces sites de fusion de quatre bases sont digérés par *BsaI* ce qui donne une extrémité en surplomb qui s'assemble ensuite de façon directionnelle permettant l'assemblage directionnel (voir Chapitre II 1). Le plasmide de niveau 0 p0-257 contenant la séquence codante de *PPI* a ensuite été assemblé avec le promoteur

constitutif P_{PSAD} (pCM0-007), un tag 3xHA (pCM0-093) et le terminateur T_{PSAD} (pCM0-114) pour ainsi obtenir le plasmide de niveau 1 p1-167. L'étiquette HA (*Human influenza Hemagglutinin*) a été ajoutée en prévision d'une éventuelle détection avec anticorps ou purification de PPI dans le futur. Ce dernier plasmide a enfin été assemblé avec l'unité de transcription de résistance à l'hygromycine pCM1-031 ($P_{A/R}$ -*aph7''*- T_{RBCS2}) pour obtenir le plasmide de niveau M pM-127 (Figure 20B). La combinaison de promoteur et de terminateur P_{PSAD} + T_{PSAD} a été choisie car elle permet théoriquement une expression forte des transgènes et elle est différente de $P_{A/R}$ + T_{RBCS2} qui a été utilisée pour la résistance à l'hygromycine (Schroda, 2019).

Pour transformer la souche sauvage et *saz3* nous avons d'abord utilisé le protocole d'électroporation Lemaire (voir Chapitre II 2.2.3, de Carpentier et al., 2020) mais si celui-ci fonctionne très bien avec la souche sauvage, il induit la mort des cellules des mutant *saz* (Figure 19). La raison pour laquelle les mutants *saz* sont moins résistants est inconnue. Peut-être qu'ils ont une paroi différente qui leur permet d'agréger mais est plus sensible aux pores induits par l'électroporation. La composition particulière du milieu de culture pourrait aussi jouer un rôle. Nous avons néanmoins opté pour un autre protocole d'électroporation adapté de Onishi and Pringle, 2016 qui a permis de transformer les mutants *saz* efficacement.

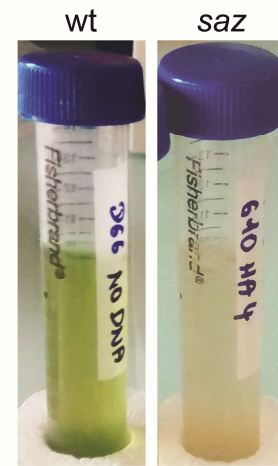


Figure 19. Mort des mutants *saz* 18h après électroporation avec le protocole Lemaire.

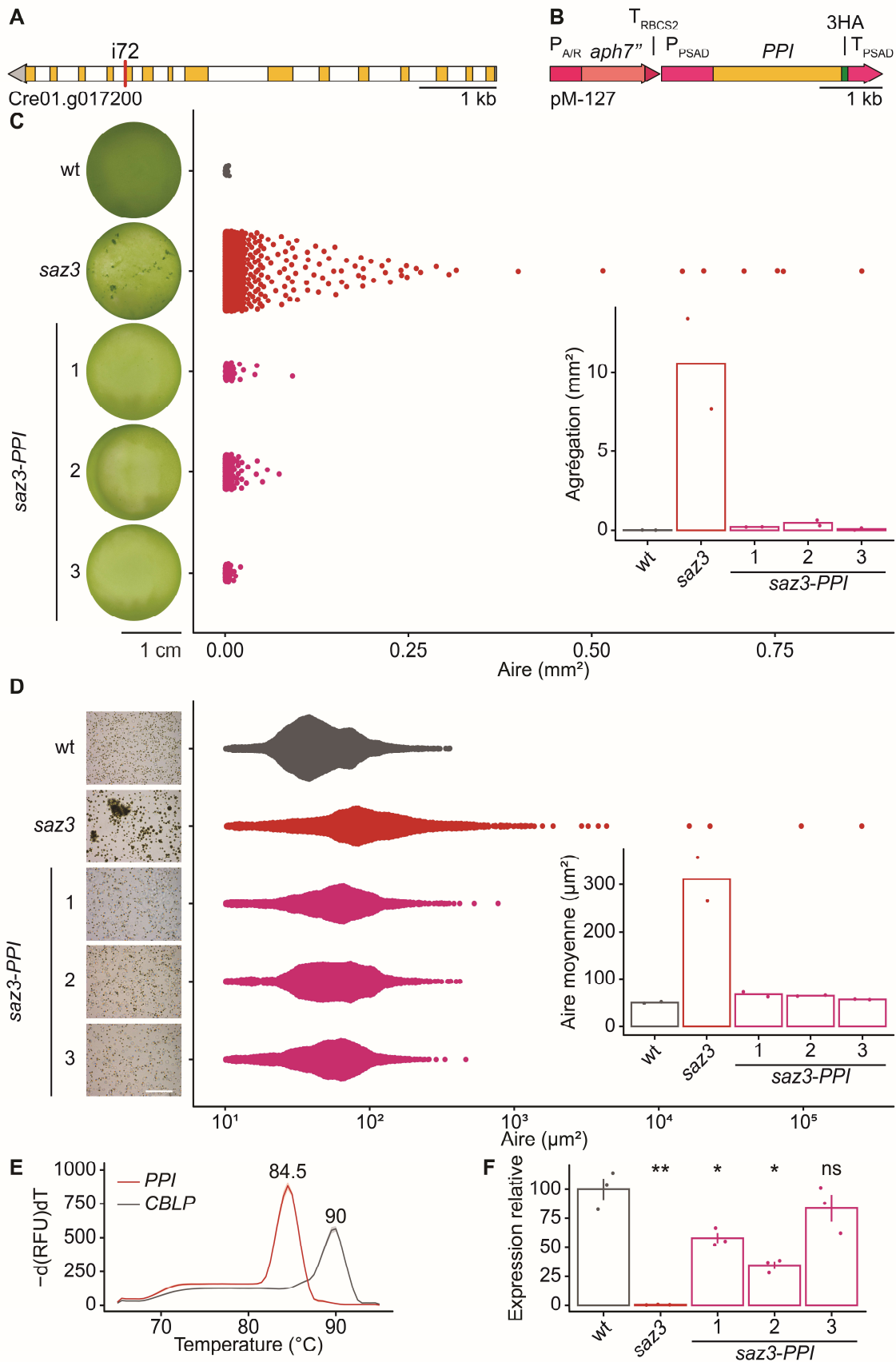


Figure 20. Complémentation de *saz3* avec le gène *PPI* (PeptidylProlyl cis-trans Isomerase). (A) Gène *PPI* portant la cassette de résistance à la paromomycine i72 chez le mutant *saz3*. (B) Construction utilisée pour la complémentation de *saz3* contenant la résistance à

l'hygromycine ($P_{A/R}$ -*aph7''*- T_{RBCS2}) ainsi que l'unité de transcription de *PPI* (P_{PSAD} -*PPI*-3HA- T_{PSAD}). (C) Culture en plaque 24 puits de la souche sauvage (CC4425), du mutant *saz3* et de trois transformants *saz3*-ppi. Les images ont été analysées pour déterminer la taille de chaque agrégat qui est représentée par un point. Le diagramme en barres représente l'aire total agrégée par puit (n = 2). (D) Photos au microscope des mêmes souches où l'aire de chaque particule a été quantifiée. Le diagramme en barres représente l'aire moyenne des particules dans chaque souche (n = 2 avec 5 photos par réplicat). (E) Courbe de fusion des amorces ppi.3 / ppi.4 et *CBLP* sur l'ADNc de la souche sauvage en fonction de la température mesurée en qPCR. (F) Expression de *PPI* chez la souche sauvage, *saz3* et *saz3*-ppi 1 à 3 avec les amorces ppi.3 et ppi.4, 100 étant la référence pour la souche sauvage. Les barres d'erreur représentent l'erreur type et la statistique est obtenue par un test de Student (ns : p > 0.05 ; * : p ≤ 0.05 ; ** : p ≤ 0.01).

L'électroporation Onishi est faite à 1500 V/cm, dans un tampon CHES-sucrose-sorbitol après incubation à 15°C alors que le protocole Lemaire utilise 2000 V/cm, un tampon sucrose et une incubation à 4°C. Le protocole Onishi est moins stressant pour les cellules ce qui explique la survie des mutants *saz*. Le plasmide pM-127 a été excisé avec *BsaI*, purifié puis transformé dans *saz3*. Une quarantaine de transformants ainsi générés ont été testés pour le phénotype d'agrégation en plaque 24 puits ce qui a permis d'obtenir 3 mutants complémentés *saz3*-ppi. La capacité d'agrégation de ces souches a été quantifiée (voir 2.3.1), la souche sauvage n'agrège quasiment pas contrairement à *saz3* qui forme de nombreux agrégats de toutes tailles (Figure 20C). Les trois souches *saz3*-ppi n'agrègent que très faiblement, ne forment aucun gros agrégat et leur aire agrégée par puit est identique à celle du sauvage. Ces observations macroscopiques ont été confirmées en microscopie (Figure 20C).

Nous avons ensuite vérifié l'expression du transgène *PPI* dans les souches *saz3*-ppi. Pour cela, des amorces spécifiques de *PPI* ont été conçues et testés en qPCR. Les amorces *CBLP* ainsi que ppi.3 / ppi.4 ne s'hybrident qu'à une unique température précise ce qui montre qu'elles sont spécifiques (Figure 20E). Après transcription inverse de l'ARN, l'expression de *PPI* dans la souches sauvages, *saz3*, et *saz3*-ppi a été quantifiée (Figure 20F). On confirme ici que *PPI* est bien inactivé dans *saz3* et les souches complémentées l'expriment entre 35% et 84% du niveau du sauvage. Nous n'avons pas observé de différence phénotypique notable entre *saz3*-ppi 1, 2 et 3, il semblerait donc que 35% d'expression soit suffisant à éviter le phénotype d'agrégation. L'expression de *PPI* dans *saz3* permet donc de restaurer le phénotype sauvage ce qui confirme bien que ce gène est responsable de l'agrégation dans ce mutant.

2.8.4 Tentatives de complémentation de *saz1* avec *VLE*

Sachant que nous avons réussi à compléter *saz3*, nous avons essayé d'appliquer la même stratégie pour *saz1* avec le gène *VLE* (Cre01.g049950) (Figure 17A). *VLE* a été cloné de la même façon que *PPI* avec le kit MoClo de Chlamydomonas (Annexe 3). La séquence codante de *VLE* a été réencodée selon le biais de codon de Chlamydomonas et clonée pour obtenir le plasmide p0-*VLE*. Ce dernier a été assemblé avec P_{PSAD} (pCM0-007), 3xHA (pCM0-093) et T_{PSAD} (pCM0-114) donnant p1-*VLE* qui a été lié à la résistance à l'hygromycine pCM1-031 ($P_{A/R}$ -*aph7''*- T_{RBCS2}) pour obtenir enfin pVLE1 (Figure 21A). Après purification, la cassette VLE1 a été transformée

dans *saz1*. Une centaine de transformants ont été mis en culture et aucun n'a perdu sa capacité d'agrégation. La présence de la cassette VLE1 a été détectée par PCR dans une dizaine de transformants (Figure 21B). L'expression du gène *VLE* dans ces transformants a été estimée par RT-PCR et seulement une amplification très faible a été détectée pour trois transformants.

Chez *Chlamydomonas*, l'expression de transgènes est souvent difficile. Même si le transgène est situé à côté du marqueur de sélection et que la pression est maintenue, il se peut qu'il ne s'exprime jamais. Cela est dû à une extinction des transgènes au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Les raisons pour lesquelles elle est si efficace chez *Chlamydomonas* n'est pas connue (Schroda, 2019). Plusieurs éléments sont importants pour améliorer l'expression des transgènes. En premier lieu, les séquences ayant le biais de codon de *Chlamydomonas* s'expriment mieux (Barahimipour et al., 2015). Dans notre cas, la séquence codante de *VLE* a été réencodée selon ce biais de codon, ça ne serait donc pas la raison de notre échec. Ensuite, les promoteurs et terminateurs sont importants pour l'expression des transgènes. Les promoteurs les plus efficaces chez *Chlamydomonas* sont $P_{A/R}$ et P_{PSAD} et le meilleur terminateur est T_{PSAD} (Crozet et al., 2018). La contribution des terminateurs dans l'expression est plus importante que celle des promoteurs, dans les conditions testées par Crozet et al., 2018. Cependant selon les cas, l'un ou l'autre des promoteurs ou terminateurs sera plus ou moins efficace pour exprimer un transgène (Schroda, 2019). Enfin, la présence d'introns permet d'exprimer les transgènes de façon plus efficace. Cela s'explique car les introns ont des séquences qui améliorent l'initiation de la transcription et l'élongation par l'ARN polymérase II (Schroda, 2019). Nous avons donc essayé de faire varier ces éléments régulateurs (promoteur, terminateur et intron) pour tenter d'exprimer *VLE*.

Nous avons tiré profit de l'efficacité du clonage modulaire pour faire varier aléatoirement le promoteur, le terminateur et la présence d'un intron. Le clonage modulaire permet en une seule réaction d'assembler plusieurs briques dans un ordre voulu (se référer au Chapitre II.1). Il est donc possible d'utiliser plusieurs versions d'une brique, comme différents promoteurs, dans la même réaction. Le principe consiste à créer plusieurs versions d'une construction en une réaction, de les transformer en même temps et de chercher des transformants où le gène serait exprimé. Cette technique est appelée le *Golden Gate Shuffling* (Engler et al., 2009). Ainsi p0-VLE a été assemblé avec les promoteurs (+5'UTR) P_{PSAD} , P_{AR} ou $P_{A'R}$ et les terminateurs (+3'UTR) T_{PSAD} , T_{RBCS2} ou $T_{\beta TUB2}$ (Annexe 3). On obtient un mélange de plasmides contenant la séquence codante de *VLE* flanquée de combinaisons différentes de promoteurs et terminateurs (Figure 21A). Ce mélange a enfin été assemblé avec la résistance à l'hygromycine pCM1-031 ($P_{A/R}$ -*aph7'*- T_{RBCS2}) donnant les plasmides pVLE2. Nous avons vu que la présence d'un intron pouvait améliorer l'expression des transgènes (Schroda, 2019). De la même façon que pour pVLE1, les mélanges de plasmides pVLE3 et pVLE4 ont été générés en ajoutant l'intron $\beta TUBi2$ après ou avant la séquence codante de *VLE* (Crozet et al., 2018). Les mixes pVLE2, 3 et 4 ont été transformés chez *saz1* et cinquante transformants de chaque ont été criblés pour leur capacité d'agrégation (Figure 21A). Cependant cette stratégie n'a pas permis d'obtenir des transformants n'agrégeant plus et donc de compléter *saz1*.

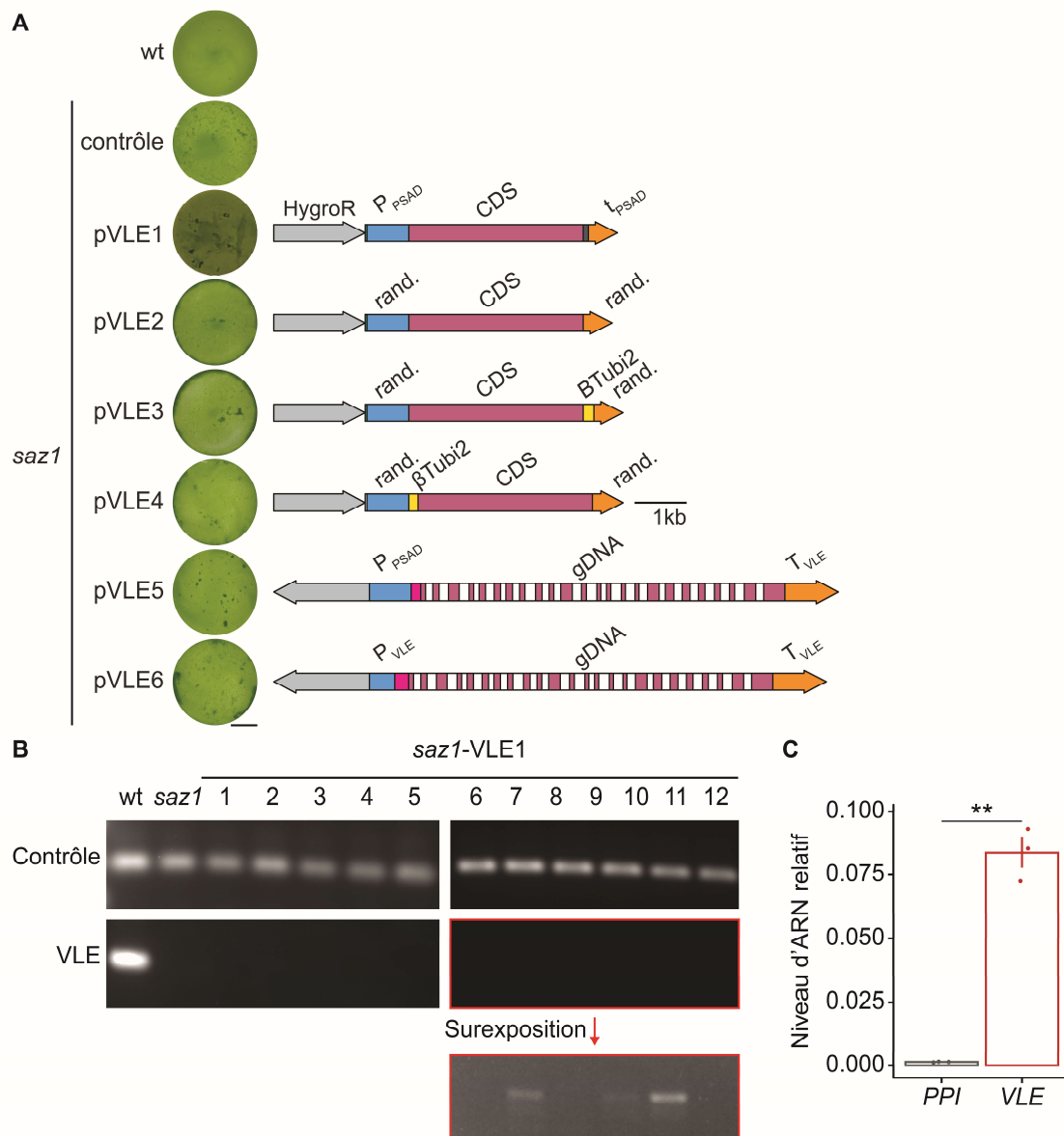


Figure 21. Tentative de complémentation de *saz1* avec *VLE*. (A) Les photos sont représentatives de cultures en plaque 24 puits de la souche sauvage, de *saz1* et de transformants obtenus avec les plasmides pVLE représentés schématiquement. Le gène *VLE* est en rose et ses introns en blanc. pVLE2, 3 et 4 sont des mix contenant plusieurs versions de la construction (rand.) avec les promoteurs(+5'UTR) P_{PSAD}, P_{AR} ou P_{A'R} et les terminateurs(+3'UTR) T_{PSAD}, T_{RBCS2} ou T_{βTUB2} (Crozet et al., 2018). La barre d'échelle correspond à 0,5 cm. (B) Expression de *VLE* dans la souche sauvage, *saz1* et 12 transformants obtenus avec pVLE1. L'amplification du gène *VLE* permet d'obtenir un produit de taille attendue (465 pb) avec l'ADNc de la souche sauvage mais pas chez les transformants *saz1*-VLE1, hormis 7, 9 et 10 où des bandes d'intensité extrêmement faible sont visibles en surexposant le gel. Le contrôle est une amplification de 207 pb du gène *MAT3* (Cre06.g255450). (C) Expression de *PPI* et de *VLE* dans la souche sauvage mesurée par qPCR avec *CBLP* (Cre06.g278222) comme gène de référence. Les barres d'erreur représentent l'erreur type et la statistique est obtenue par un test de Student ; ** : p ≤ 0.01.

Enfin, nous avons essayé d'exprimer *VLE* avec sa séquence génomique qui contient ses propres introns. La séquence génomique de *VLE* contient les sites de restriction des enzymes

BsaI et *BbsI* qui sont utilisées en clonage modulaire ce qui rend ce dernier difficilement utilisable. Les clonages suivants ont donc été effectués par la technique de la *Gibson assembly* (Gibson et al., 2009). Le gène a été amplifié par PCR du début de la prédiction de son 5'UTR à la fin de son terminateur, puis cloné dans le plasmide pSL-Hyg ayant la résistance à l'hygromycine. Ainsi la séquence génomique de VLE est mise sous contrôle du promoteur P_{PSAD} dans le plasmide pVLE5. De même, VLE a été cloné avec son propre promoteur dans pSL-Hyg excisé de P_{PSAD} pour donner pVLE6. La transformation de ces deux plasmides dans *saz1* et l'analyse des transformants n'a pas permis de compléter ce dernier.

Aucune des constructions testées n'a permis de compléter le mutant *saz1*. De plus nous avons essayé de compléter d'autres mutants *saz*, en particulier *saz4*, *saz5* et *saz6* sans succès. Ceci confirme les difficultés d'exprimer les transgènes chez *Chlamydomonas* (Schroda, 2019). Nous avons réussi à compléter le mutant *saz3* (Figure 20), comment expliquer cette différence ? L'expression de *PPI* et de *VLE* dans la souche sauvage a été mesurée par qPCR (Figure 21C). *VLE* s'exprime 60 fois plus que *PPI*, ce qui peut expliquer pourquoi nous avons réussi à exprimer le second et non le premier. Pour confirmer que l'inactivation de *VLE* est bien responsable du phénotype de *saz1*, nous avons opté pour une autre stratégie : plusieurs mutants indépendants inactivés pour *VLE* ont été caractérisés.

2.8.5 Épissage de la cassette chez un mutant CLiP *v/e*

La complémentation par le gène *VLE* ayant échoué chez *saz1*, nous avons essayé une autre stratégie. Nous nous sommes procuré, dans la banque CLiP (Li et al., 2019), des mutants générés indépendamment et comportant des insertions à différents endroits de *VLE*. Leur capacité d'agrégation a été quantifiée, et nous avons montré que pour trois d'entre eux (131694, 140798 et 057262), ils agrégeaient comme *saz1*. La caractérisation phénotypique et génotypique de ces mutants est détaillée dans la partie 2.1.2 (Figures 2B, 2C et S1). Ces résultats montrent que l'inactivation de *VLE* induit l'agrégation chez *Chlamydomonas*.

Cependant, un quatrième mutant *v/e* de la banque CLiP (159901), a semé le doute dans notre étude puisqu'il n'agrège pas ce qui est visible en plaque 24 puits (Figure 22A). La souche 131694 est montrée ici comme contrôle positif, et nous pouvons constater que 159901 a un phénotype proche du sauvage sans gros agrégats et une surface agrégée par puits très faible. Ce résultat est étonnant, nous avons donc voulu vérifier que l'insertion était bien à l'endroit indiqué par la banque CLiP (Li et al., 2019). Pour cela, une PCR avec des amorces de part et d'autre des insertions prédites chez les mutants a été effectuée (Figure 22B). L'amplification a généré un fragment de taille attendue dans la souche sauvage et aucun chez le mutant 131694 ni 159901 (Figure 22C). Cela montre que l'insertion est bien à l'endroit attendu dans 159901. On peut imaginer que malgré une insertion, on obtienne une protéine tronquée mais fonctionnelle. Cependant, cette hypothèse est peu probable car l'insert est à des positions très proche dans 131694 et 159901, et de surcroît au début de la séquence codante. Il nous reste donc une hypothèse : l'épissage de la cassette de résistance qui induirait une expression normale de *VLE*. En effet, l'insertion chez 131694 est dans un exon alors que chez 159901 elle est dans le deuxième intron (Figure 22B). Pour vérifier cette hypothèse, l'expression de *VLE* dans 159901 a été quantifiée par qPCR. Des amorces spécifiques ont été conçues de part et d'autre des locus mutés chez 131694 et 159901 (Figure 22D). Dans le contrôle 131694, *VLE* est bien inactivé mais il s'exprime chez 159901 au même niveau que le sauvage voire plus (Figure

22E). Cela montre que l'insert positionné dans un intron est éliminé au cours de l'épissage et qu'un ARNm correct est obtenu et traduit normalement. Nous avons donc mis en évidence un phénomène assez rare mais qui existe chez les mutants d'insertion. Cela nous rappelle qu'il faut prendre beaucoup de précautions avant de conclure sur la fonction d'une protéine en fonction de l'analyse d'un mutant d'insertion du gène correspondant. Nous pouvons donc bien conclure qu'une inactivation de *VLE* provoque un phénotype d'agrégation spontanée.

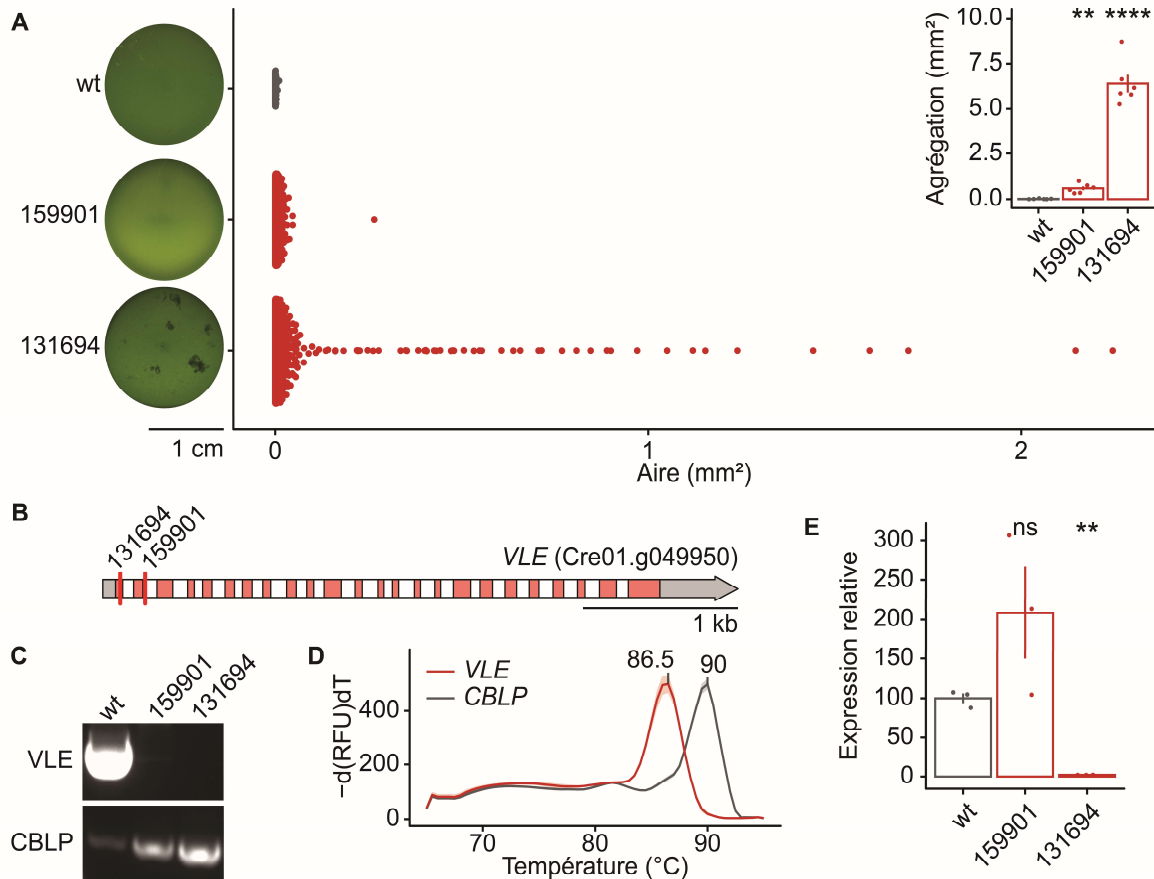


Figure 22. Phénotype et génotype des mutants *v/e* 131694 et 159901. (A) Les cultures en plaque 24 puits de la souche sauvage (CC5325) et des mutants *v/e* 159901 et 131694 montrent leur phénotype d'agrégation (n = 6). 131694 est utilisé ici comme contrôle positif de l'agrégation. Chaque point du graphique représente un agrégat et l'aire totale agrégée par puits est présentée sur le diagramme en barres. (B) Locus d'insertion de la cassette de résistance à la paromomycine CIB1 dans *VLE* chez les mutants 159901 et 131694 (Li et al., 2019). (C) PCR sur l'ADN génomique de la souche sauvage, 159901 et 131694 avec les amorces *vle3* et *vle4* situées de part et d'autre des locus d'insertion. Les bandes obtenues ont les tailles attendues de 2521 pb pour *vle* et 633 pb pour *CBLP*. (D) Hybridation des amorces *vle7/vle8* et *CBLP* sur l'ADNc de sauvage en fonction de la température mesurée en qPCR. Une paire d'amorces spécifiques s'hybrident à une température précise. (E) Expression de *VLE* chez la souche sauvage, 159901 et 131694 fixée à 100 pour la souche sauvage. Les barres d'erreur représentent l'erreur type et la statistique est obtenue par un test de Student (ns : $p > 0.05$; ** : $p \leq 10^{-2}$; **** : $p \leq 10^{-4}$).

2.8.6 Cluster d'agrégation du chromosome 6

Le mutant *saz6* est muté pour une gamétolysine (*GML*) dont le gène est positionné sur le chromosome 6. De façon intéressante, de nombreux gènes voisins de cette gamétolysine, dans une zone de 98 kb, appartiennent à des familles liées à l'agrégation (Figure 23A). En premier lieu cette zone contient 6 gènes codant pour des gamétolysines qui sont des protéases extracellulaires. Ces gamétolysines ont une très forte homologie de séquence, il pourrait donc s'agir d'une duplication de gènes. Cette concentration de gamétolysines est d'autant plus surprenante que, le chromosome 6 en compte 7 et le génome entier 48 (Merchant et al., 2007). Deux autres protéines prédites comme sécrétées dans le compartiment extracellulaire sont présentes dans cette zone. Une protéine de la famille des fasciclins qui sont impliquées dans l'adhésion chez les animaux et les plantes (Huber and Sumper, 1994). Enfin, le gène codant pour la phérophorine *PHC3* est située juste à côté de *GML*. Les *PHCs* sont des HPRGPs constituant la paroi et de la matrice chez *Volvox* (voir 1.4.1 et 2.1.2, Hallmann, 2006). Nous avons donc commandé un mutant *CLiP* muté pour *PHC3* dont nous avons montré qu'il agrège spontanément (Figure 23B). Il reste cependant à confirmer que l'insertion a bien les effets escomptés sur l'expression du gène.

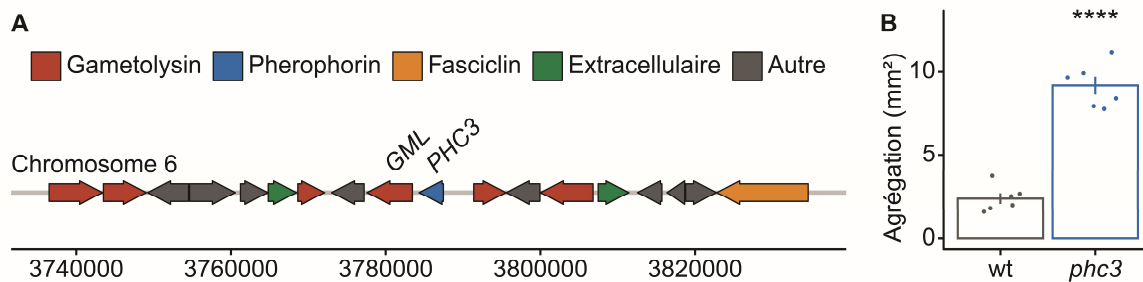


Figure 23. Ensemble de gènes liés à l'agrégation sur le chromosome 6. (A) La zone autour de *GML*, qui est muté chez *saz6*, comporte de nombreux gènes liés à l'agrégation. (B) Agrégation spontanée du mutant *phc3* par rapport au sauvage (CC5325). Les valeurs correspondent à l'aire totale agrégée par puits. La statistique est calculée par un test de Student avec **** : $p \leq 10^{-4}$.

3 Discussion

3.1 Mécanismes de l'agrégation

Dans l'introduction, nous avons vu que les éléments les plus importants du processus d'agrégation étaient la perception de l'environnement, la communication, le mode de formation (clonal ou agrégatif) et le développement d'une ECM (voir 1.3). L'étude que nous avons menée chez *Chlamydomonas* nous apporte des réponses sur nombre de ces éléments.

La première étape de la formation de structures multicellulaires est la perception des conditions environnementales. *Chlamydomonas* agrège face à des prédateurs dont la présence est trahie par un signal chimique composé de sulfamates et sulfates aliphatiques (voir 1.3.1, Lüring, 2021). Nous avons induit l'agrégation en présence de ROS (oxygène singulet, H₂O₂ et superoxyde) et de GSNO (se référer à 2.1.2). Ces substances soit pénètrent dans la cellule, soit y sont produites. En effet en présence de lumière, le paraquat bloque la chaîne de transfert d'électrons ce qui entraîne une production de ROS (Laloi et al., 2007). Chez les plantes, le choc thermique induit aussi la production de ROS dans la cellule (Pucciariello et al., 2012). De nombreux stress induisent la production de ROS chez les organismes photosynthétiques en perturbant l'efficacité de la photosynthèse (Danon, 2012). Il serait donc intéressant d'investiguer un éventuel rôle de la signalisation rédox dans la transmission du signal menant à l'agrégation.

L'agrégation implique plusieurs individus, on peut donc se demander si les cellules communiquent entre elles (voir 1.3.1). Nous avons soumis des cellules à un choc thermique qui induit l'agrégation (voir 2.1.2 Figure 1A). Le milieu de ces cellules, une fois purifié, est suffisant pour induire l'agrégation de nouvelles cellules (voir 2.1.2 Figure 3). De plus, le milieu des mutants *saz1* à *saz7* est aussi pro-agrégatif (Figure 13). Il existe donc une interaction entre les cellules qui provoque l'agrégation de la population. Il y a probablement dans le milieu de culture une ou des molécules capables de transmettre le signal de l'agrégation (voir 1.3.1). Chez *Volvox*, le sexe est déclenché par une PHC qui agit comme une phéromone à des concentrations très faibles (Sumper et al., 1993). Nous avons trouvé plusieurs PHCs impliquées dans l'agrégation dans le milieu. Il est possible que ces glycoprotéines soient des phéromones de l'agrégation. Il se peut aussi que ce soit une activité enzymatique qui modifie les propriétés d'adhésion des autres cellules. En effet, nous avons trouvé de nombreuses protéines extracellulaires qui ont un rôle dans le maintien de la paroi ou de l'ECM (se référer à 2.1.2).

Nous avons tenté d'identifier la nature des molécules responsables de l'activité agrégative du milieu. Cette activité est annulée par une dénaturation thermique et uniquement la fraction au-dessus de 30 kDa la conserve. Les molécules qui nous intéressent ici sont donc thermolabiles de taille supérieure à 30 kDa. Nous avons tenté de les caractériser plus avant en traitant le milieu à la protéinase K. Malheureusement cette endopeptidase, même utilisée à des concentrations très faibles, tue une grande majorité des cellules et fait adhérer le reste au récipient ce qui la rend inutilisable seule. Cependant, il existe des inhibiteurs spécifiques de la protéinase K (peptides modifiés) commercialement disponibles que nous pourrions utiliser après digestion du milieu pour contrer les effets néfastes de cette enzyme (Kore et al., 2010).

Nous avons aussi digéré l'ADN et l'ARN présents dans le milieu mais les enzymes utilisées induisent une légère agrégation des cellules (Figure 14). Pour ces expériences, les quantités d'enzymes ont été fixées pour digérer les acides nucléiques en 3h à 25°C avant d'inoculer les cellules. Etant donné que *Chlamydomonas* pousse à cette température et que l'agrégation est mesurée après 48h, il doit être possible ajouter des quantités plus faibles d'enzymes mais suffisantes juste avant l'inoculation. Ainsi, l'effet négatif d'agrégation de la RNase et la DNase serait limité. Dans le milieu, nous avons trouvé de nombreuses protéines régulant l'agrégation. Il est donc probable que les molécules du milieu impliquées dans l'agrégation soient des protéines. Le plus vraisemblable étant toutefois que des protéines soient responsables de la signalisation de l'agrégation dans le milieu de culture, puisque nous avons trouvé plusieurs protéines du compartiment extracellulaire régulant l'agrégation dans nos expériences de génétique et de génétique inverse.

Il existe des formes multicellulaires clonales et agrégatives chez les organismes unicellulaires comme *Saccharomyces cerevisiae* (voir 1.3.2 Pentz et al., 2020). Chez *Chlamydomonas*, les prédateurs peuvent induire des palmelloïdes et des gros agrégats (Lüring and Beekman, 2006; Sathe and Durand, 2016). L'exposition au stress abiotique induit des palmelloïdes qui par définition résultent d'un mode clonale (Khona et al., 2016). Nous montrons pour la première fois que d'imposantes structures multicellulaires sont induites par une variété de stress abiotiques. Nous avons, en outre, montré que ces structures étaient formées par un mode agrégatif en réponse au stress et chez les mutants *saz* (voir 2.1.2 Figure 1B), (Figure 12). Pour étudier la dynamique de formation des agrégats, nous avons mis en place une collaboration avec l'équipe de Nicolas Desprat au laboratoire de physique de l'Ecole Normale Supérieure qui est experte en microscopie et biophysique. Comme en réponse aux prédateurs, le stress abiotique est donc à l'origine de formes clonales ou agrégatives. Le milieu extracellulaire des mutants *saz* induit la formation d'agrégats mais aussi de quelques palmelloïdes mais nous n'avons pas quantifié ce phénomène. Il serait intéressant d'étudier la formation de palmelloïdes en présence du milieu de cellules agrégées obtenu par un stress. Notre analyse multiomique des mutants *saza* permis d'identifier des protéines impliquées dans l'agrégation qui sont différentes des protéines identifiées dans les palmelloïdes induits par un stress salin (Khona et al., 2016) ce qui montre qu'il s'agit de phénomènes régulés différemment.

Le stress implique la formation de structures multicellulaires mais quel bénéfice les cellules en tirent-elles ? Nous avons montré que les agrégats protégeaient *Chlamydomonas* du stress abiotique. Dans nos conditions, les palmelloïdes survivent moins bien que les agrégats (voir 2.1.2 Figure D et E). Cela montre que ces derniers sont supérieurs pour protéger *Chlamydomonas*. Il serait intéressant de quantifier l'aire des particules survivantes avec une gamme de faible incrémentation. Ainsi on pourrait déterminer dans quelles gammes de stress les palmelloïdes ou les agrégats sont efficaces pour protéger les cellules. Cette corrélation entre la taille des particules et la mortalité peut être quantifiée avec une macro ImageJ que nous avons développée. C'est, à notre connaissance, la première détection automatique du bleu d'Evans avec un outil d'analyse d'image. Il existe d'autres marqueurs de la viabilité qui sont fluorescents dans les cellules vivantes (Haire et al., 2018). La quantification basée sur le bleu d'Evans est plus simple car une seule prise de vue est nécessaire alors que pour les marqueurs

fluorescents une image en lumière visible et une en fluorescence sont nécessaires. Les cellules de *Chlamydomonas* étant mobiles, le temps entre les prises de vue peut engendrer des erreurs d'identification de particules. ImageJ est un logiciel extrêmement populaire chez les biologistes, notre système pourrait donc être aussi utile à d'autres chercheurs travaillant chez les microalgues ou les plantes (Schindelin et al., 2012).

Chez les bactéries la matrice est un élément très important des biofilms (voir 1.3.3). Les sphéroïdes de *Volvox* et les palmelloïdes de *Chlamydomonas* sont aussi composés d'ECM riche en sucres (se référer à 1.3.2 et 1.4). Nous avons identifié une ECM riche en sucre au sein des agrégats formés en réponse au stress et chez *saz7*. La matrice peut permettre l'adhésion des cellules ou leur protection du stress (voir 2.1.2 Figures 1C et 2E). Pour étudier ce phénomène, il serait intéressant de tenter de digérer cette ECM dans les agrégats avec des enzymes dégradant les sucres ou des protéases comme des MMPs (Cronmiller et al., 2019). Il serait aussi possible de la purifier et d'en identifier les constituants (Flemming and Wingender, 2010).

Pour découvrir les régulations de l'agrégation, nous avons généré la première banque de mutants agrégeant spontanément chez *Chlamydomonas*. L'étude de la banque de mutants *saz* nous a permis de la diviser en deux classes. La première est la classe MA (« Milieu Actif ») qui comprend les mutants de *saz1* à *saz7*. Ces mutants forment des agrégats irréguliers et quelques palmelloïdes et leur milieu extracellulaire est pro agrégatif (Figures 6, 9 et 13). Les agrégats de la souche sauvage en réponse au stress ont toutes les caractéristiques des agrégats de classe MA (voir 2.1.2 Figure 1 C et D). Les mutants *saz8* et *saz9* font partie de la classe MI (« Milieu Inactif »). On y trouve des agrégats réguliers sphériques, pas de palmelloïdes et leur milieu n'a pas d'activité agrégative (Figures 6, 9 et 13). Peut-être que le fait que ces mutants ne produisent pas de palmelloïdes est à l'origine de la régularité des agrégats. Notre analyse transcriptomique montre aussi que les classes MA et MI sont très différentes sauf pour *saz6* (Figure 15). Nous avons aussi constaté que l'expression des gènes chez *saz6* est très différente de tous les autres mutants *saz*. Une analyse plus approfondie serait nécessaire pour comprendre la spécificité de *saz6*. Enfin, les gènes inactivés par l'insertion de la résistance à la paromomycine dans les souches *saz8* et *saz9* n'ont pu être identifiés ni par RESDA ni par adaptateur-PCR (Figure 16, González-Ballester et al., 2005; Pollock et al., 2017). Nous avons prévu de les identifier en séquençant ces souches entièrement avec un séquenceur nanopore que nous avons acquis récemment (O'Donnell et al., 2020). Les analyses microscopiques et macroscopiques sont très complémentaires pour la caractérisation de l'agrégation induite chez les mutants *saz*, puisqu'elles permettent de détecter des palmelloïdes de petite taille mais aussi l'ensemble du processus sur une grande surface. Pour quantifier l'aire des agrégats au cours d'une analyse macroscopique, les cultures en plaque 24 puits sont scannées puis analysées avec un programme que nous avons développé (Figure 8). Cette macro ImageJ est très efficace pour caractériser de nombreuses conditions rapidement mais pourrait être améliorée. En particulier, le filtre gaussien pourrait être remplacé par un filtre médian qui n'a pas d'effet sur les bords des particules et du puit. Ce filtre permet donc d'analyser une plus grande surface, actuellement uniquement 62% de la surface du puit est analysable. Le filtre médian est très lent c'est pourquoi il faut utiliser la carte graphique au lieu du processeur ce qui sera bientôt possible avec le package CLIJ2 encore en développement (clij.github.io).

3.2 Régulation de l'agrégation

Pour identifier les régulateurs importants de l'agrégation, nous nous sommes concentrés sur les mutants de classe MA car leur morphologie d'agrégats est identique à la souche sauvage en réponse au stress. En outre, ils sont plus nombreux donc, peut-être, impliqués dans un processus plus courant. Pour identifier des protéines candidates, nous avons d'abord identifié les gènes inactivés par l'insertion de la cassette de résistance à la paromomycine. L'inactivation de ces gènes est suffisante pour induire l'agrégation, ils codent donc pour des protéines anti-agrégatives. Pour deux d'entre eux, *VLE* et *PPI*, leur implication dans le phénotype d'agrégation a été prouvée par la complémentation ou l'utilisation de mutants CLiP (voir 2.8).

D'autre part, l'analyse multiomique à grande échelle que nous avons menée sur plusieurs mutants *saz*, nous a permis d'identifier d'autres régulateurs importants de l'agrégation. L'implication de certains gènes a pu être confirmée grâce à une approche de génétique inverse. Nous avons ainsi obtenu de nouveaux mutants agrégeant spontanément ainsi que des mutants incapables d'agréger en réponse au stress (se référer à 2.1.2 Figure 7). L'ensemble de ces résultats nous a permis d'identifier les premières protéines pro- et anti-agrégatives chez *Chlamydomonas*. Nous les avons placées dans un modèle de travail, en fonction de l'état actuel de nos connaissances (Figure 24).

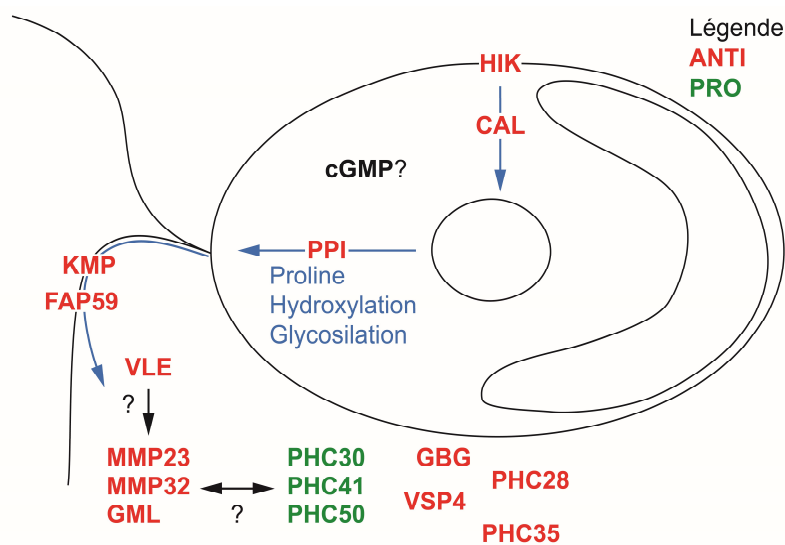


Figure 24 : Modèle de travail de la régulation de l'agrégation chez *Chlamydomonas*.

En réponse au stress ou à un signal d'agrégation une signalisation intracellulaire semble se mettre en place. En premier lieu HIK étant une histidine kinase dont le rôle putatif est de transmettre un signal au travers de la membrane cytoplasmique (Zschiedrich et al., 2016), elle pourrait être impliquée dans la perception du stress à l'origine de la signalisation aboutissant à l'agrégation. Nous avons identifié deux inhibiteurs de l'agrégation impliqués dans la signalisation. La calcineurine (CAL) qui est une phosphatase dépendante du calcium et des calmodulines. Une fois activée les calcineurines phosphorylent des facteurs de transcription qui activent l'expression de gènes. Chez *Chlamydomonas*, une seule calcineurine a été caractérisée, les auteurs ont montré qu'elle était bien activée par le Ca^{2+} (Kumar et al., 2020). De plus, elle a été trouvée au niveau de la membrane plasmique en contact avec des canaux à Ca^{2+} et elle est

différentiellement exprimée en réponse au stress abiotique, dont le paraquat, l'H₂O₂ et la chaleur. Ces résultats montrent que la calcineurine que nous avons identifiée pourrait participer à la signalisation aboutissant à l'agrégation. Nous avons aussi identifié une PPI, protéines qui sont connues pour changer la conformation des protéines au niveau des prolines. Les PPI peuvent influencer sur l'expression des gènes en modifiant des facteurs de transcription (Shaw, 2007). Enfin six gènes liés à la guanosine monophosphate cyclique (cGMP) dont des guanylate cyclases sont sous exprimés chez les mutants *saz*. La cGMP contrôle l'activité de kinases dont certaines sont aussi fortement dérégulées en transcriptomique. Ces régulateurs pourraient permettre de réguler l'expression de gènes liés à l'agrégation.

Un grand nombre de protéines liées à l'agrégation que nous avons identifiées sont extracellulaires et riches en proline comme les MMPs et les PHCs (Figure 24). Ces prolines sont hydroxylées et glycosylées pour permettre la sécrétion (Ramos-Martinez et al., 2017). Les protéines impliquées dans l'agrégation sont certainement sécrétées puisqu'on les retrouve dans le milieu. La sécrétion chez *Chlamydomonas* se fait par le transport intraflagellaire dont nous avons identifié deux protéines (KMP et FAP59) comme anti-agrégatives. Il est possible que dans le milieu, les protéines interagissent. En premier lieu nous avons identifié plusieurs PHCs qui sont des HPRGPs. PHC30, PHC41 et PHC50 sont pro agrégatives et, d'autre part, PHC28 et PHC35 sont anti-agrégatives (voir 2.1.2 Figure 7). Chez *Chlamydomonas*, les HPRGPs sont dégradées par les gamétolysines qui sont des MMPs. Et, nous avons identifié des MMPs anti-agrégatives. Les régulations de l'agrégation dans le milieu semblent donc complexes. Il a été proposé que la subtilisine VLE1 soit une activatrice de MMPs (Luxmi et al., 2018). L'absence de VLE1 induirait donc une inactivité de certaines MMPs qui ne dégraderaient donc pas les PHCs pro agrégatives. Enfin, nous avons identifié des GBGs (Glucane 1,3-β-Glucosidases) dont l'un des mutants agrège très fortement (voir 2.1.2 Figure 7). Chez les plantes, les β-glucanes sont des polymères de glucose qui sont impliqués dans la réponse aux pathogènes, peuvent induire un transcriptome de réponse au stress et permettre une meilleure résistance (Fesel and Zuccaro, 2016; Wu et al., 2016). Les GBGs pourraient réguler l'agrégation au niveau de la signalisation extracellulaire ou des sucres de l'ECM.

Ce modèle est cohérent mais l'implication de certains des gènes responsables des phénotypes que nous avons identifiés chez les mutants *saz* reste à confirmer. L'implication de certains gènes a pu être confirmée mais nous avons vu qu'il est difficile d'exprimer des transgènes chez *Chlamydomonas*. Les différentes stratégies que nous avons testées chez *saz1* n'ont pas fonctionné, mais d'autres solutions existent. En premier lieu nous avons utilisé l'intron βTUBi2 mais une étude récente a montré qu'il n'était pas efficace pour améliorer l'expression. Les auteurs ont aussi identifié de nouveaux introns que nous pourrions adapter au MoClo et tester (Baier et al., 2020). L'expression des transgènes peut aussi être améliorée en mettant le gène d'intérêt et le marqueur de sélection sous le contrôle d'un unique promoteur. Ainsi en maintenant ou augmentant la pression de sélection, le gène de résistance s'exprime et le transgène aussi. Pour cela les deux séquences codantes sont séparées par une courte séquence qui permet d'arrêter la transcription et d'en initier une nouvelle juste dans la continuité, au niveau du second gène (Onishi and Pringle, 2016). On appelle cela une construction bicistronique qui pourrait être faite avec nos gènes d'intérêt dans le kit MoClo (Crozet et al.,

2018). Enfin il existe des souches modifiées pour l'expression de transgènes chez *Chlamydomonas* (Neupert et al., 2020). Cependant, il faudrait générer les mutants *saz* dans ces souches et nous ne pourrions pas utiliser la banque CLiP (Li et al., 2019). Finalement, nous nous sommes procuré des mutants CLiP (Li et al., 2019) pour les gènes *CAL*, *HIK* et *GML* et leur caractérisation phénotypique et génotypique est en cours.

Chapitre II
Nouveaux outils génétiques pour
Chlamydomonas reinhardtii

1 Introduction au Clonage Modulaire

Chlamydomonas est un organisme modèle en recherche fondamentale et biotechnologique (Salomé and Merchant, 2019). De puissants outils moléculaires y sont, en effet, disponibles. Premièrement, les systèmes CRISPR (Ferenczi et al., 2017; Greiner et al., 2017; Kao and Ng, 2017) sont efficaces pour éditer le génome de façon précise et ciblée. De plus, d'autres outils génétiques ont été regroupés dans le kit MoClo de Chlamydomonas que nous avons développé au sein de l'équipe avec des collaborateurs. Ce kit est composé de 119 briques d'ADN, parmi lesquelles des promoteurs, terminateurs, marqueurs, tags, peptides d'adressages, etc (Figure 25 C et D, Annexe 3). Toutes ces briques peuvent être assemblées de façon directionnelle et rapide par clonage *Golden Gate* (Figure 25). Grâce à la puissance du MoClo nous avons terminé la construction d'un senseur d'activité protéasique impliquées dans la PCD et développé un nouveau marqueur de sélection.

La majorité de ces outils génétiques requièrent la transformation des cellules et la sélection d'une résistance à un antibiotique ou un herbicide. Chez Chlamydomonas, il existe des marqueurs de restauration de l'autotrophie, des marqueurs de résistance nécessitant des mutants ou non (Salomé and Merchant, 2019). Nous nous intéresserons à cette dernière catégorie qui est la plus pratique car utilisable dans toute souche. Il existe dix marqueurs de sélection positive pour Chlamydomonas dont six sont couramment utilisés et ont été intégrés au kit MoClo (Tableau 2) (Crozet et al., 2018). Dans le cas de transformations successives, de nombreux marqueurs de sélection indépendants sont nécessaires. Pour cela, nous avons identifié dans la littérature des candidats intéressants : les trichothécènes et la blasticidine.

Tableau 2 : Marqueurs de sélection positive disponibles chez Chlamydomonas (adapté de Salomé and Merchant, 2019).

Marqueur	Origine du marqueur	Antibiotique	Référence
<i>OxR2</i> ^b	<i>Chlamydomonas</i>	oxyfluorfen	Bruggeman et al., 2014
<i>aphVIII</i> ^a	<i>Streptomyces rimosus</i>	paromomycine	Sizova et al., 2001, 1996
<i>aadA</i> ^{a, b}	<i>E. coli</i>	spectinomycine	Meslet-Cladière and Vallon, 2011
<i>ble</i> ^a	<i>Streptoalloteichus hindustanus</i>	bléomycine ou zéocine ^c	Stevens et al., 1996
<i>aph7</i> ^{''a}	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	hygromycine	Berthold et al., 2002
<i>NPTII</i> ^{a, b}	<i>E. coli</i> Tn5 transposon	kanamycine	Barahimipour et al., 2016
<i>NAT</i> ^b	<i>Streptomyces noursei</i>	nourséothricine	Yang et al., 2019
<i>sul</i> ^b	<i>Enterobacteriaceae</i>	sulfadiazine	Tabatabaei et al., 2019
<i>tetX</i> ^b	<i>Enterobacteriaceae</i>	tétracycline	Garcia-Echauri and Cardineau, 2015
<i>CRTIop</i> ^{b, d}	<i>Pantotea ananatis</i>	norflurazon	Molina-Márquez et al., 2019

^a Présent dans le Kit MoClo de Chlamydomonas (Crozet et al., 2018)

^b Encodé selon l'usage de codons du génome nucléaire de Chlamydomonas

^c Induit des cassures de l'ADN (Chankova et al., 2007; Gatignol et al., 1988)

^d Modifie les caroténoïdes de Chlamydomonas (Molina-Márquez et al., 2019)

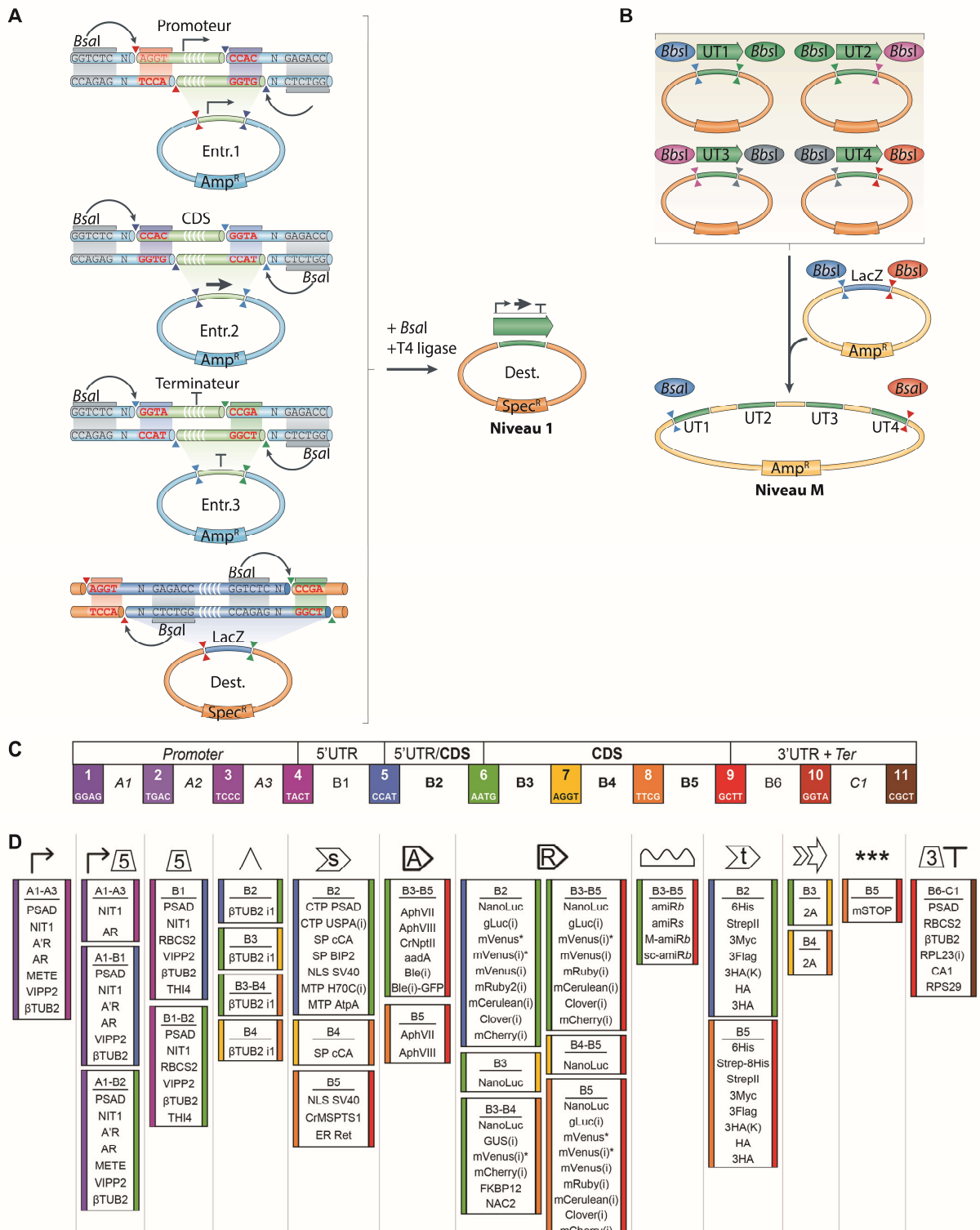


Figure 25. Clonage modulaire. (A) Le clonage modulaire utilise les enzymes de restriction de type II S qui coupent l'ADN en dehors de leur site de reconnaissance. Ainsi les sites de coupeure de *BsaI* appelés sites de fusion (en rouge) peuvent être standardisés pour assembler des fragments. Les briques sont flanquées de sites de fusion adaptés et des sites de *BsaI* et clonés dans des plasmides de niveau 0 (Entr.). Le plasmide de destination (Dest.) possède aussi les sites de fusion et les sites *BsaI*. Ces plasmides sont assemblés en une seule réaction avec *BsaI* et de la ligase. Le plasmide de niveau 1 ainsi obtenu possède une résistance à la spectinomycine mais n'a pas LacZ. On peut donc le sélectionner en prenant les colonies banches résistantes à

la spectinomycine sur X-Gal. (B) De même, des plasmides de niveau 1 peuvent être assemblés avec *Bbs*I pour donner un plasmide multigénique de niveau M. Schémas adaptés de Casini et al., 2015, Amp^R : résistance à l'ampicilline, Spec^R : résistance à la spectinomycine, UT : unité de transcription. (C) Différentes positions disponibles (A1 à C1) et sites de fusion standardisé (couleurs) permettant l'assemblage des briques chez *Chlamydomonas* (Patron et al., 2015). (C) Liste des briques disponibles classées par fonction et position. Les symboles correspondent au code visuel SBOL2.0 (Roehner et al., 2016). Pour plus d'informations, se référer à Crozet et al., 2018 (Annexe 3).

2 Biosenseur d'activités métacaspases

Notre équipe s'intéresse à la réponse au stress sous l'angle de l'agrégation mais aussi de la mort cellulaire programmée. En parallèle de l'étude de l'agrégation, j'ai participé à la caractérisation moléculaire de la PCD chez *Chlamydomonas* avec les stagiaires Cyrielle Durand (Master 2) et Thomas Clerc (Master 1). Chez les mammifères, la PCD est mise en place par des protéases appelées caspases. Chez *Chlamydomonas*, il n'y a pas de caspases mais des métacaspases qui sont des homologues distants (voir 1.1.2, Choi and Berges, 2013). Nous avons comme projet de développer un biosenseur des activités caspases et métacaspases. Pour cela nous avons adapté un système existant chez les mammifères (Tebo and Gautier, 2019). Ce biosenseur, basé sur le rapporteur FAST (*Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag*), émet une fluorescence verte dans le noyau lorsque le substrat d'une (méta)caspase est coupé (Figure 30). Les caspases et les métacaspases ont des substrats différents qui sont présentés dans le Tableau 3 (Tsiatsiani et al., 2011). La puissance du MoClo permet de construire rapidement des nouveaux assemblages. Nous pouvons donc construire un biosenseur pour chaque substrat et donc chaque (méta)caspase. Pour le moment, nous avons pu construire les plasmides avec les substrats GRR et DEVD, mais du fait des conditions sanitaires, nous n'avons pas encore pu les tester (Figure 30A). Nous avons pour projet de détecter les activités (méta)caspases *in vivo* en conditions de stress, dans des mutants de métacaspases et à moyen terme d'effectuer un crible pour trouver de nouveaux candidats contrôlant la PCD chez *Chlamydomonas*. C'est un bon exemple de système complexe et modulaire qui peut être construit rapidement grâce au MoClo.

Tableau 3. Substrats des métacaspases et caspases

Protéase	Substrats
Métacaspase	VRPR
	IISK
	EGR
	GRR
	GGR
	FESR
Caspase	DEVD
	YVAD
	WEDH

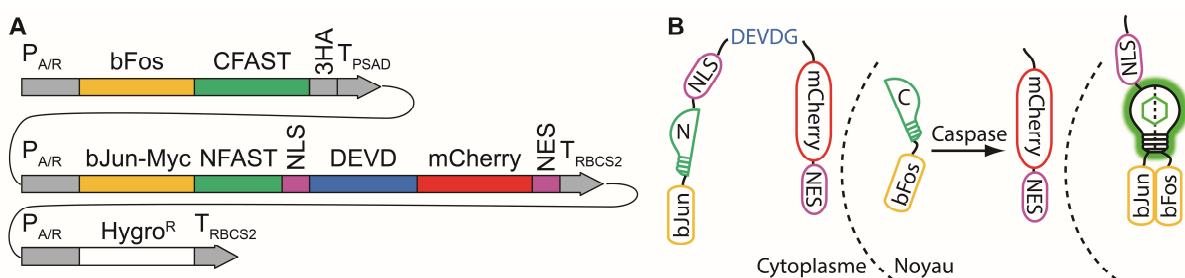


Figure 26. Biosenseur d'activité caspase ou métacaspase. (A) Construction MoClo permettant d'exprimer les deux parties du biosenseur : (B) bFos-CFAST-3HA dans le noyau et bJun-Myc-NFAST-NLS-DEVD-mCherry-NES qui est adressé au cytoplasme grâce au NES (Nuclear Export Signal). La coupure d'une caspase au niveau du substrat (ici DEVD) induit une délocalisation de bJun-NFAST-NLS dans le noyau grâce au NLS (Nuclear Localization Signal). L'affinité de bJun pour bFos permet de rassembler les parties N- et C de la protéine FAST qui induit une fluorescence dans le noyau en présence de son substrat : HBR (hydroxybenzylidene rhodan). Le substrat de (méta)caspase peut être changé pour détecter différentes activités caspase ou métacaspase (Tableau 3). mCherry sert de contrôle positif dans le cytoplasme. Constructions et schémas adapté de Tebo and Gautier, 2019.

3 Nouveaux marqueurs de sélection

3.1 Chlamydomonas est sensible Trichothécènes

Plusieurs résistances à des antibiotiques semblent adaptables chez *Chlamydomonas*. En premier lieu, nous nous sommes intéressés à la famille des trichothécènes (Figure 27A). *Chlamydomonas* est sensible à certains trichothécènes, en particulier le deoxynivalenol (DON), le 3,15-diacetoxyscirpenol (DAS) et la toxine T2 qui ont tous un groupement OH en C3 (R1 sur la Figure 27A). La toxicité est sensiblement réduite pour les équivalents avec un acétyle (3ADON, TAS et 3-acetyl T-2) ou un glucoside (deoxynivalenol-3-glucoside - DON3G) à cette position (Figure 27 B et C) (Alexander et al., 1999; Suzuki and Iwahashi, 2015). Nous avons effectué des expériences préliminaires confirmant que *Chlamydomonas* est sensible au DAS et que 10 mg/L sont suffisants pour une sélection (Figure 27D). Il nous faudrait désormais une enzyme capable de transférer un acétyle ou un glucoside en C3 (Figure 27A). De telles enzymes ont été isolées en nombre ce qui rend l'étude complexe (voir 4). De plus, elles n'ont pas été utilisées comme marqueurs de sélection et jamais exprimées chez des algues. C'est pourquoi nous avons opté pour un candidat plus simple à adapter chez *Chlamydomonas* car déjà utilisé chez les microalgues : la résistance à la blasticidine (Ortega-Escalante et al., 2018).

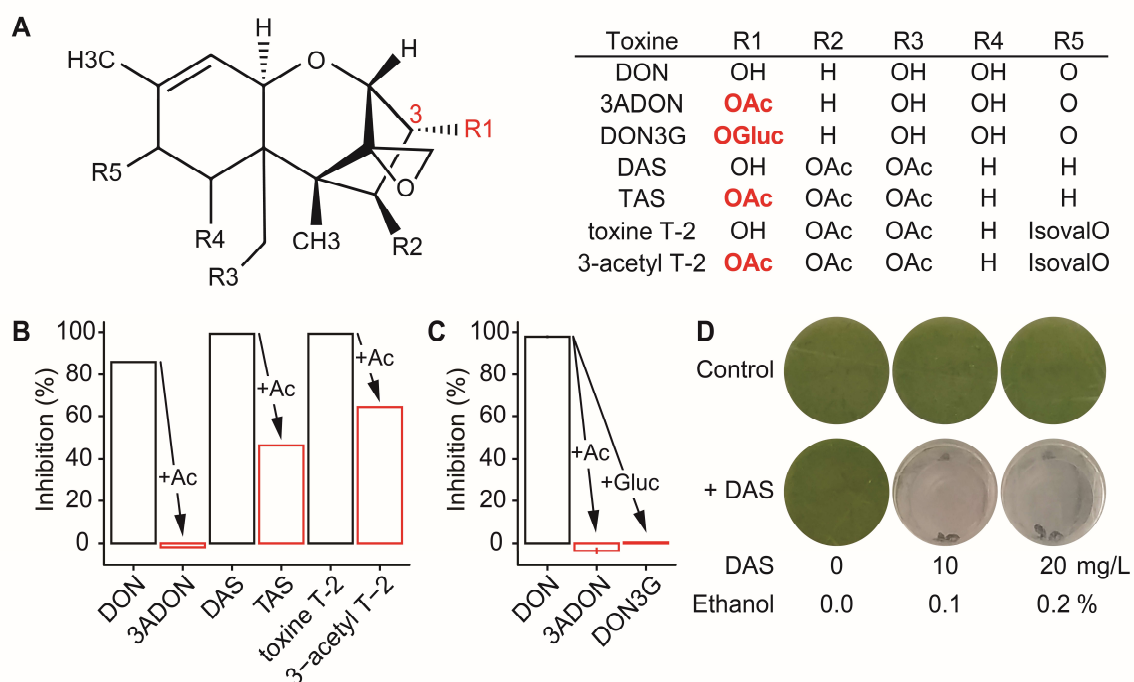


Figure 27. Toxicité des trichothécènes chez *Chlamydomonas*. (A) Structure chimique des trichothécènes. Les résidus R1 à R5 sont explicités dans le tableau pour deoxynivalenol (DON), 3-acetyldeoxynivalenol (3ADON), deoxynivalenol-3-glucoside (DON3G), 4,15-diacetoxyscirpenol (DAS), triacetoxyscirpenol (TAS), toxine T2 et 3-acétyle T-2. OAc = O-acétyle ; IsovalO = isovaleryl-O. Inhibition de croissance en présence de trichothécènes après (B) 192 h (adapté de Alexander et al., 1999) ou (C) 144 h (adapté de Suzuki and Iwahashi, 2015). (D) Culture de *Chlamydomonas* pendant 5 jours en plaque 24 puits, en lumière continue dans

du TAP en présence de quantités croissante de DAS. Le DAS est solubilisé dans l'éthanol et le control contient le même volume d'éthanol ce qui correspond aux pourcentages indiqués.

3.2 **BSR** comme marqueur de sélection chez *Chlamydomonas*

3.2.1 Résumé de l'article

La blasticidine peut être détoxifiée par une enzyme appelée blasticidine S désaminase (BSR) encodée par le gène *BSR* qui a été utilisé comme marqueur chez la levure (Fukuda and Kizaki, 1999), les mammifères (Izumi et al., 1991), les plantes (Kamakura et al., 1990), et les microalgues, en particulier *Phaeodactylum tricorutum* (Buck et al., 2018), *Nannochloropsis gaditana* (Ajjawi et al., 2017) et *Volvox carteri* (Ortega-Escalante et al., 2018).

Il était admis, dans la littérature, que *Chlamydomonas* était relativement résistant à la blasticidine (Harris, 1989; Picard-Bennoun and Bennoun, 1985). Au contraire, nous avons montré qu'une concentration de 50 mg/L de blasticidin permettait une sélection efficace de toutes les souches de *Chlamydomonas* couramment utilisées en laboratoire. Cette concentration est comparable à celles utilisées pour les autres antibiotiques. En comparaison avec d'autres microalgues, *Chlamydomonas* est moins sensible que *P. tricorutum* (4 à 10 mg/L) (Buck et al., 2018) ou *V. carteri* (10 mg/L) (Ortega-Escalante et al., 2018) mais plus que *N. gaditana* (100 mg/L) (Ajjawi et al., 2017).

La séquence codante de *BSR* de *Bacillus cereus* a été réencodée selon le biais de codon nucléaire de *Chlamydomonas* ce qui permet une meilleure expression des transgènes (Tableau 2) (Schroda, 2019). *BSR* a été ensuite clonée par *Golden Gate* avec d'autres briques du kit MoClo : le promoteur $P_{A/R}$ et le terminateur T_{RBCS2} (voir 1). Cette unité de transcription a permis d'obtenir des transformants stables résistants à la blasticidine. La présence de la cassette a été vérifiée par PCR dans plusieurs transformants. Chez *V. carteri*, un intron a été ajouté au sein de *BSR* mais ceci sans preuve de son utilité (Ortega-Escalante et al., 2018). Au contraire, la séquence codante de *BSR* seule est suffisante chez *Chlamydomonas* comme chez *P. tricorutum* et *N. gaditana* (Ajjawi et al., 2017; Buck et al., 2018).

L'intérêt de créer un nouveau marqueur de sélection est de pouvoir l'utiliser en combinaison avec d'autres. En effet, certaines études nécessitent des transformations successives avec différents marqueurs de sélection. Pour cela, nous avons montré que *BSR* ne confère pas de résistance à la zéocine, l'hygromycine, la kanamycine la paromomycine ou la spectinomycine. De plus les gènes de résistance à ces antibiotiques ne confèrent pas non plus de résistance à la blasticidine. Enfin, nous avons montré qu'une souche résistante à la blasticidine pouvait être retransformée et sélectionnée avec les gènes de résistance à la zéocine, l'hygromycine, la kanamycine la paromomycine ou la spectinomycine.

3.2.2 **Blasticidin S Deaminase: A New Efficient Selectable Marker for *Chlamydomonas reinhardtii***



Blasticidin S Deaminase: A New Efficient Selectable Marker for *Chlamydomonas reinhardtii*

Félix de Carpentier^{1,2†}, Jeanne Le Peillet^{1†}, Nicolas D. Boisset^{1,2}, Pierre Crozet¹, Stéphane D. Lemaire¹ and Antoine Danon^{1*}

¹ Institut de Biologie Physico-Chimique, UMR 8226, CNRS, Sorbonne Université, Paris, France, ² Université Paris-Saclay, Saint-Aubin, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Dimitris Petroustos,
UMR 5168 Laboratoire de Physiologie
Cellulaire Végétale (LPCV), France

Reviewed by:

Xenie Johnson,
Commissariat à l'Energie Atomique et
aux Energies Alternatives (CEA),
France
Véronique Larosa,
University of Liège, Belgium
Ryutaro Tokutsu,
National Institute for Basic Biology,
Japan

*Correspondence:

Antoine Danon
antoine.danon@ibpc.fr

[†] These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Biotechnology,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 13 November 2019

Accepted: 17 February 2020

Published: 05 March 2020

Citation:

de Carpentier F, Le Peillet J,
Boisset ND, Crozet P, Lemaire SD
and Danon A (2020) Blasticidin S
Deaminase: A New Efficient
Selectable Marker
for *Chlamydomonas reinhardtii*.
Front. Plant Sci. 11:242.
doi: 10.3389/fpls.2020.00242

Chlamydomonas reinhardtii is a model unicellular organism for basic or biotechnological research, such as the production of high-value molecules or biofuels thanks to its photosynthetic ability. To enable rapid construction and optimization of multiple designs and strains, our team and collaborators have developed a versatile *Chlamydomonas* Modular Cloning toolkit comprising 119 biobricks. Having the ability to use a wide range of selectable markers is an important benefit for forward and reverse genetics in *Chlamydomonas*. We report here the development of a new selectable marker based on the resistance to the antibiotic blasticidin S, using the *Bacillus cereus* blasticidin S deaminase (*BSR*) gene. The optimal concentration of blasticidin S for effective selection was determined in both liquid and solid media and tested for multiple laboratory strains. In addition, we have shown that our new selectable marker does not interfere with other common antibiotic resistances: zeocin, hygromycin, kanamycin, paromomycin, and spectinomycin. The blasticidin resistance biobrick has been added to the *Chlamydomonas* Modular Cloning toolkit and is now available to the entire scientific community.

Keywords: blasticidin, *Chlamydomonas reinhardtii*, antibiotic resistance, selectable marker, synthetic biology, modular cloning, algal biotechnology

INTRODUCTION

Chlamydomonas reinhardtii is a model microalga widely used for basic and biotechnological research such as photosynthesis, cilia/flagella, production of biofuels, or other molecules of interest (Georgianna and Mayfield, 2012; Barahimipour et al., 2016; Salomé and Merchant, 2019). In the last decades *Chlamydomonas* has been shown to be amenable to powerful genetic approaches including CRISPR-Cas9 gene editing (Jiang et al., 2014; Greiner et al., 2017; Kao and Ng, 2017). The creation of the *Chlamydomonas* Library Project (CLiP), which contains more than 62,000 mutants covering roughly 83% of *Chlamydomonas* genes (Li et al., 2019), has also greatly contributed to the development of *Chlamydomonas* reverse genetics. A wide range of molecular tools for engineering of the nuclear genome are also available in *Chlamydomonas*, most of which have been grouped in a Modular Cloning toolkit (*Chlamy* MoClo toolkit). This collection contains 119 biobricks (promoters, terminators, reporter genes, selectable markers, targeting peptides, antibiotic resistance genes, riboswitch, miRNA backbone, etc.), which can be easily assembled through Golden Gate cloning (Crozet et al., 2018). Most applications related to the manipulation

of nuclear gene expression require transformation of *Chlamydomonas* cells followed by selection of transformants on plates using a selectable marker, which is in most cases an antibiotic resistance gene enabling selection on a medium containing the appropriate antibiotic. In the case of multiple consecutive transformations several selectable markers are required. Therefore, it is essential for advanced genetic engineering to have as many selectable markers as possible. At the moment, six antibiotic resistances are commonly used in *Chlamydomonas* as selectable markers: zeocin (Stevens et al., 1996), hygromycin (Berthold et al., 2002), kanamycin (Barahimipour et al., 2016), paromomycin (Sizova et al., 2001), sulfadiazine (Tabatabaei et al., 2019), and spectinomycin (Meslet-Cladière and Vallon, 2011).

Blasticidin S (hereafter referred to as “blasticidin”) is an antibiotic that inhibits cytosolic protein synthesis by blocking ribosomal translation termination (Svidritskiy et al., 2013). Blasticidin S deaminase (BSR) detoxifies blasticidin by catalyzing its deamination (Seto et al., 1966; Endo et al., 1987). The BSR gene has been successfully used as a selectable marker in mammals (Izumi et al., 1991), plants (Kamakura et al., 1990), yeasts (Kimura et al., 1994; Fukuda and Kizaki, 1999), and algae, including the diatom *Phaeodactylum tricorutum* (Buck et al., 2018) and the *Chlamydomonas*-related volvocine alga *Volvox carterii* (Ortega-Escalante et al., 2018).

We report here that blasticidin can be used as an antibiotic in *Chlamydomonas*, for all six laboratory strains tested. We show that BSR is functional in *Chlamydomonas* and can be used as a selectable marker, without conferring resistance to the other commonly used antibiotics. We also show that BSR can be used in combination with all other antibiotic resistance genes available in *Chlamydomonas*.

MATERIALS AND METHODS

Strains, Media, and Growth Conditions

If not otherwise specified, the reference strain used in the present study is CC-4533 (CMJ030), the CLiP library recipient strain used to generate the insertional mutants (Li et al., 2019). We also used other common laboratory strains CC-4051 (4A+) (Kim et al., 2005), CC-400 (cw15) (Roy Davies, 1972), CC-4425 (D66) (Schnell and Lefebvre, 1993), UVM4 (Neupert et al., 2009), and CC-124 (137c) (Pröschold et al., 2005). *Chlamydomonas* cells were grown on agar plates or liquid medium, using Tris-acetate-phosphate (TAP) medium (Gorman and Levine, 1965) at 25°C, under continuous light (40–60 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and shaking (130 rpm). Growth analysis were performed in the Algem® lab-scale double photobioreactor systems (Algenuity, Stewartby, United Kingdom) under continuous light (200 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and 120 rpm agitation in TAP or high salt medium (HSM) (Sueoka, 1960), with bubbling air. The absorbance at 740 nm was recorded every 10 min using the built-in sensor. The maximal growth rate was determined as the maximal slope of the growth curve ($\Delta\text{abs}/\Delta\text{time}$). Linearity of the growth curve was estimated through linear regression every 200 min over a period of 13 h for TAP or 300 min over a period

of 40 h for HSM condition. The slopes of these linear regressions were selected only for regressions displaying an $R^2 < 99.5\%$. Finally, the maximal slope was chosen as the maximal growth rate (**Supplementary Figure S2B**). Antibiotics used were blasticidin S (Sigma-Aldrich: SBR00022), zeocin (Invitrogen: R25005), hygromycin B (Sigma-Aldrich: H9773), kanamycin (Sigma-Aldrich: K1377), paromomycin (Sigma-Aldrich: P8692), or spectinomycin (Sigma-Aldrich: S4014). *Chlamydomonas* multi-well plates and Petri dishes were scanned using a Perfection V800 scanner (Epson).

Cell Death Quantification

Dead cells were detected using Evans blue (Sigma-Aldrich: E2129) at a final concentration of 0.2% w/v. Dead cells appear in blue whereas living cells that are impermeable to Evans blue remain green (Gaff and Okong'o-Ogola, 1971). Cells were observed with a microscope (Olympus BX43, Tokyo, Japan). For each sample multiple microscopic fields were analyzed and Evans blue-positive cells scored. For each value the percentage of dead cells was calculated on a minimum of 100 individuals.

Plasmid Construction

Protein and nucleic acid designs were performed *in silico* on Serial Cloner 2.6.1 software. *Bacillus cereus* BSR protein sequence (NCBI accession number: WP_076871832.1) was reverse translated using *Chlamydomonas* nuclear genome codon usage table¹. The resulting BSR coding sequence was domesticated by removing *BbsI* restriction sites, designed for the position B3–B5 of the common Plant MoClo syntax (Patron et al., 2015), synthesized (Twist Bioscience), and cloned by Golden Gate reaction with *BsaI*-HFv2 (New England Biolabs) in pICH41308 (Weber et al., 2011) yielding plasmid pCM0-120, numbered according to the *Chlamydomonas* MoClo toolkit nomenclature (Crozet et al., 2018). Two other parts from the toolkit were used to build the BSR module (pCM1-029), the promoter $P_{A/R}$ coupled to the 5'UTR of RBCS2 (pCM0-020) and the 3'UTR of RBCS2 coupled to terminator T_{RBCS2} (pCM0-115) (Schroda et al., 2002; Crozet et al., 2018). The other antibiotic resistance genes were built using these same regulatory sequences and the coding sequence (CDS) from pCM0-077 (zeocin), pCM0-073 (hygromycin), pCM0-074 (paromomycin), pCM0-075 (kanamycin) and pCM0-076 (spectinomycin) generating the plasmids pCM1-030 (zeocin), pCM1-031 (hygromycin), pCM1-032 (kanamycin), pCM1-027 (paromomycin), and pCM1-033 (spectinomycin), respectively. All plasmid sequences are available in **Supplementary Files S1–S7**.

Chlamydomonas Transformation

Transformations were performed as previously described (Crozet et al., 2018). Briefly, *Chlamydomonas* cells were grown in TAP to early exponential phase ($1\text{--}2 \times 10^6$ cells/mL), concentrated 100 times in TAP + 60 mM sucrose. After incubation of 250 μL of cells with DNA (55 fmol of purified resistance module excised with *BbsI*-HF; New England Biolabs) at 4°C for 20 min, they were electroporated (2000 V/cm, 25 μF , no shunt resistance)

¹www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3055

and incubated for 16–20 h in 10 mL of TAP + 60 mM sucrose prior to be plated on TAP-agar complemented with appropriate antibiotic(s). Transformants were selected on TAP-agar medium containing blasticidin S (50 mg/L, unless otherwise specified), zeocin (15 mg/L), hygromycin B (20 mg/L), kanamycin (50 mg/L), paromomycin (20 mg/L), and/or spectinomycin (100 mg/L). Plates and transformants were analyzed after 5–7 days of growth in continuous light ($50 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 25°C.

Insert Detection

Cells were pelleted (5 min, $2500 \times g$, room temperature) and lysed in 400 μL of extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5; 200 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% SDS) for 10 min at 37°C under agitation (1400 rpm). After centrifugation (3 min, $17,000 \times g$, room temperature), the supernatant was harvested and the genomic DNA was precipitated with one volume of isopropanol for 10 min at room temperature, washed with 70% ethanol, dried and resuspended in water. PCR was performed using the Quick-Load® *Taq* 2 \times Master Mix (New England Biolabs) according to the manufacturer recommendations with the primers BSR.5 (5'-GCTGTACGAGGACAACAAGC-3'), TRBCS2.3 (5'-ACGGAGGATCGTTACAACC-3'), CBLP.5 (5'-GACGTCATCCACTGCCTGTG-3'), and CBLP.3 (5'-CGACGCATCCTCAACACACC-3').

RESULTS

Chlamydomonas Is Sensitive to Blasticidin

To test the sensitivity of *Chlamydomonas* to blasticidin, the cells were grown in the presence of increasing blasticidin concentrations (25, 50, or 75 mg/L) in both solid and liquid cultures. Blasticidin was very effective to kill *Chlamydomonas* cells and the minimum efficient concentration was 50 mg/L in both conditions (Figure 1A). Many reference strains are used within the community and they present an important genetic diversity and substantial phenotypic differences (Gallaher et al., 2015). Compared to the reference strain of this study (CC-4533), some strain specific phenotypes, such as the absence of the cell wall, could alter blasticidin resistance. To assess whether this genetic diversity among common reference strains affects their sensitivity to blasticidin, CC-4051 (4A+), CC-400 (cw15), CC-4425 (D66+), UVM4, and CC-124 (137c) were cultivated on a solid medium supplemented or not with blasticidin (50 mg/L). In all cases, none of the strains survived in the presence of blasticidin, regardless of the initial number of cells tested (Figure 1B).

Blasticidin S Deaminase Can Be Used as a Selectable Marker in *Chlamydomonas*

To test whether the *BSR* module could be used as a selectable marker in *Chlamydomonas*, we engineered *B. cereus* *BSR* coding sequence to fit the optimal codon bias of *Chlamydomonas* nuclear genome. This has been already shown to improve

transgene expression efficiency, including selection markers (Barahimipour et al., 2015, 2016). The engineered *BSR* coding sequence was then domesticated by removing *BbsI* and *BsaI* recognition motif and adding appropriate fusion sites of the Plant MoClo syntax (Patron et al., 2015). It was finally assembled with the parts $P_{A/R}$ (the hybrid promoter of *HSP70A* coupled to the 5'UTR of *RBCS2*) and T_{RBCS2} (coupling the 3'UTR and terminator of *RBCS2*) to form a functional module. $P_{A/R}$ is a chimeric constitutive promoter made up of *HSP70A* and *RBCS2* promoters that was proven to be very efficient in *Chlamydomonas* by significantly reducing gene silencing (Schroda et al., 2002). We also chose this promoter/terminator combination because it allows successful expression of the same *BSR* gene in *Volvox* (Ortega-Escalante et al., 2018). The resulting construct pCM1-029 (pCM stands for plasmid *Chlamydomonas* MoClo) is represented in Figure 2A using the MoClo nomenclature (Crozet et al., 2018). pCM0-120 and pCM1-029 plasmid sequences are available in Supplementary Files S1, S2, respectively. Cells transformed with pCM1-029 or an empty vector were incubated on plates containing blasticidin. Transformants appeared only when the cells were transformed with pCM1-029 (Blasticidin resistant cells are hereafter referred to as “Blast^R”), as shown in Figure 2B, indicating that *BSR* can be used as a selectable marker in *Chlamydomonas*. The insertion of the *BSR* module was confirmed by PCR in four independent Blast^R strains (Supplementary Figure S1).

To precisely evaluate the effect of blasticidin on the mortality of wild-type and Blast^R cells, we used Evans blue as a death marker (Gaff and Okong'o-Ogola, 1971). To avoid the heterogeneity that comes from the position of the transgene insertion locus, dozens of Blast^R colonies were collected from a Petri dish and then mixed in liquid culture (Blast^R culture). Wild-type and Blast^R cultures were grown in a 24-well plate with or without blasticidin, and the percentage of dead cells was evaluated several days after treatment. In the wild-type strain treated with blasticidin, the percentage of dead cells increased after 3 days and all the cells died after 5 days, while no significant levels of death was detected for Blast^R and untreated cells (Figure 2C). To assess a potential detrimental effect of *BSR* on *Chlamydomonas*, wild-type and Blast^R growth were quantified in a photobioreactor, in both mixotrophic (TAP) and autotrophic (HSM) conditions. No differences in the growth rate were observed suggesting that *BSR* does not affect growth or photosynthesis (Supplementary Figure S2).

Blasticidin Can Be Used in Combination With Other Antibiotics

To test the possible interactions of blasticidin with the other most commonly used selectable markers in *Chlamydomonas*, we first generated strains resistant to these antibiotics by transformation of wild-type cells with plasmids containing modules conferring resistance to zeocin (pCM1-030), hygromycin (pCM1-031), kanamycin (pCM1-032), paromomycin (pCM1-027), and spectinomycin (pCM1-033) under the control of the same regulatory sequences used for *BSR* in pCM1-029. Transformants were selected on plates containing the appropriate antibiotic

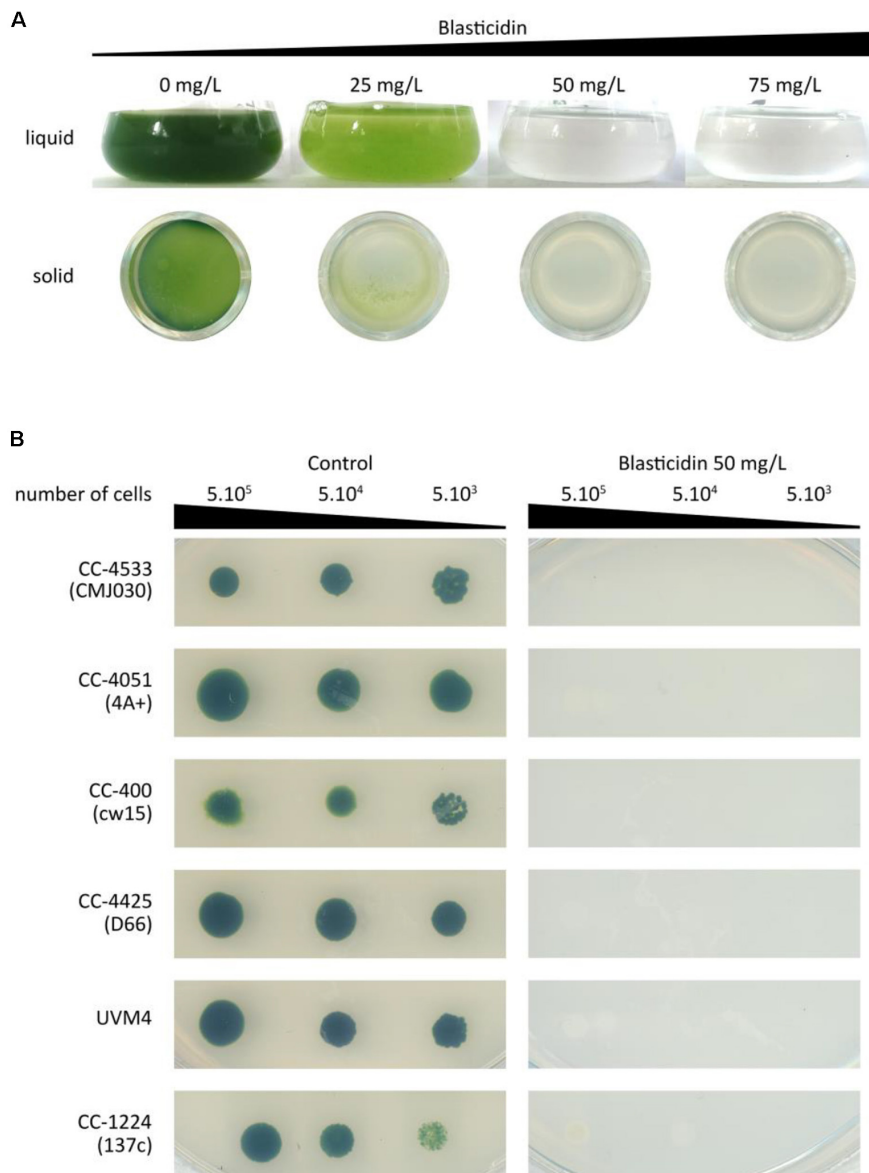
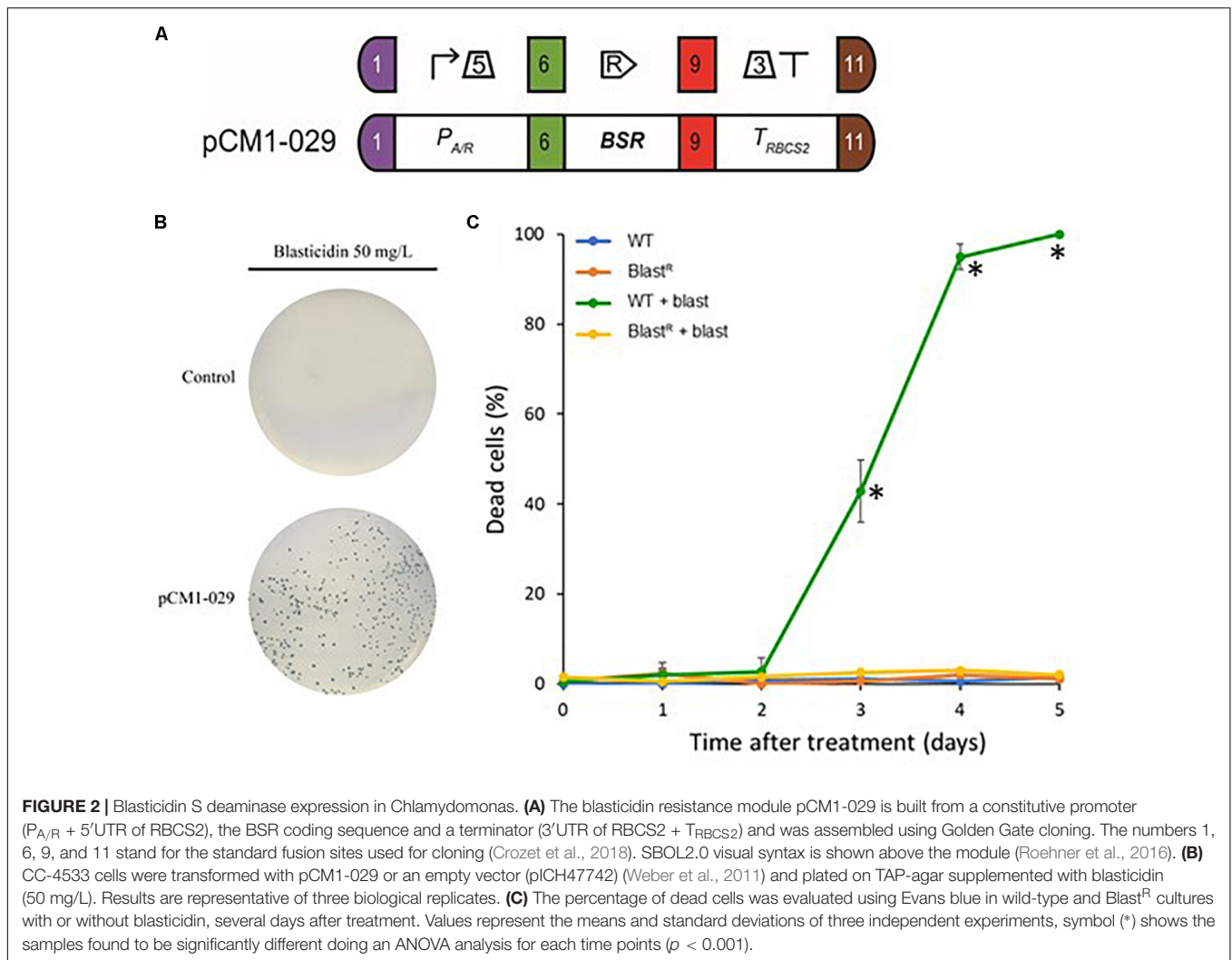


FIGURE 1 | Sensitivity of *Chlamydomonas* to blasticidin. **(A)** *Chlamydomonas* CC-4533 (CMJ030) was grown with increasing concentrations of blasticidin: 25, 50, or 75 mg/L, in both liquid and 24-well agar plates. For both liquid and solid media, cultures were photographed after 3 days of growth. **(B)** Spot tests were performed for six standard laboratory strains with or without blasticidin (50 mg/L). The results shown are representative of three biological replicates.

and pooled to take into account position effect, as for Blast^R culture. These cultures were called Zeo^R, Hygro^R, Kana^R, Paro^R, and Spec^R. The wild-type strain and the six antibiotic resistant cultures were cultivated in 96-well plates until exponential phase (5×10^6 cells/mL) prior to treatment with the different antibiotics. Five days after the addition of antibiotics, only the cells carrying the corresponding resistance gene survived the treatment, and importantly, only the Blast^R culture had survived upon blasticidin treatment (**Figure 3A**). It is to be noticed that Kana^R strains are also resistant to paromomycin (**Figure 3A**), as previously reported (Barahimipour et al., 2016).

If the resistance modules tested display no cross reactivity to one another, they can be combined to allow double selection. To use the BSR module and blasticidin in combination with another selectable marker, there must then be no interference between the different antibiotics and resistance modules. To verify possible interference, a single Blast^R strain was transformed with either pCM1-030 (zeocin resistance), pCM1-031 (hygromycin resistance), pCM1-032 (kanamycin resistance), pCM1-027 (paromomycin resistance), or pCM1-033 (spectinomycin resistance) (**Figure 3B**). Transformants were selected on plates containing both blasticidin and the appropriate antibiotic. For each combination tested, transformants resistant



to both antibiotics could be obtained (**Figure 3B**), indicating that no interference exists between the selectable markers tested.

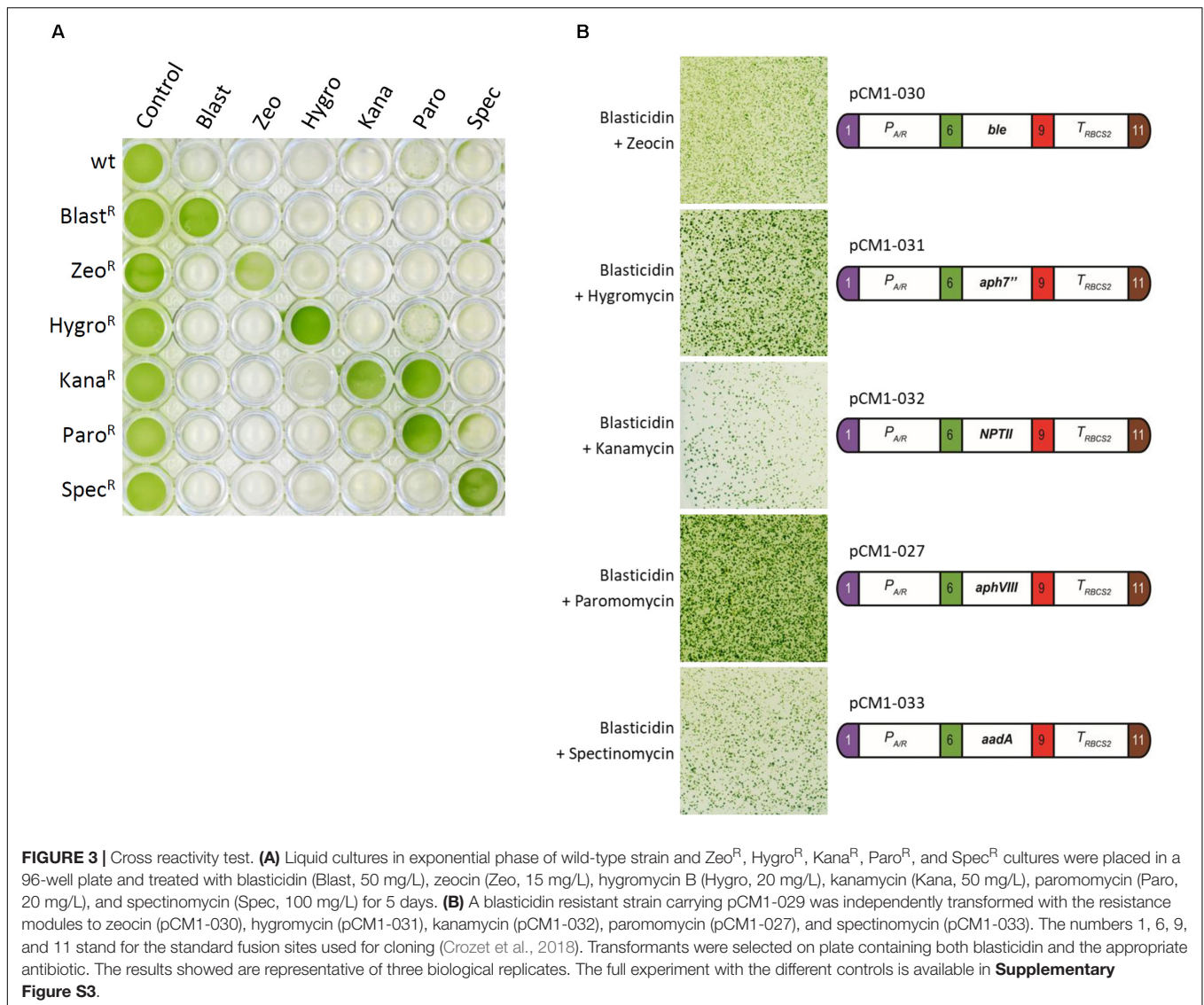
DISCUSSION

Here we report the development of a new selectable marker for *C. reinhardtii*. Our data show that using blasticidin at a concentration of 50 mg/L ensures proper selection for all common laboratory strains of *Chlamydomonas* (**Figure 2C**). This concentration is slightly higher than the efficient concentration reported for *V. carteri* (Ortega-Escalante et al., 2018) or diatoms (Buck et al., 2018), but remains comparable with other antibiotics used in *Chlamydomonas* (Crozet et al., 2018).

We successfully engineered BSR coding sequence to adapt it to *Chlamydomonas* and no addition of intron was necessary for efficient expression, contrary to what was reported for *V. carteri* (Ortega-Escalante et al., 2018). Now that we have developed the blasticidin resistance module, seven antibiotic-based selectable markers are available for *Chlamydomonas*. This new tool can become important for advanced synthetic biology

strategies requiring successive transformations of the same strain in combination with new engineering tools including the CLiP library (Li et al., 2019), the CRISPR/Cas technology (Jiang et al., 2014; Greiner et al., 2017; Kao and Ng, 2017) and the MoClo toolkit (Crozet et al., 2018). It is also important to increase the number of selectable markers available because the use of certain antibiotics should be taken with care. For instance zeocin is not always recommended since it can potentially cause DNA damages (Chankova et al., 2007; Čížková et al., 2019) and subsequent unwanted mutations. The kanamycin selectable marker *NPTII* is also conferring resistance to paromomycin (Barahimipour et al., 2015; **Figure 3A**) which makes it impossible to use in CLiP strains that are paromomycin resistant (Li et al., 2019). We show here that it is possible to use BSR and blasticidin in combination with all the other commonly used selectable markers in *Chlamydomonas*. BSR gene has been integrated as a new biobrick into the *Chlamydomonas* MoClo toolkit, and is now available to the entire community through the *Chlamydomonas* Resource Center².

²www.chlamycollection.org/



DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/Supplementary Material.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FC, JL, PC, SL, and AD designed the study and analyzed the data. FC, JL, NB, PC, SL, and AD wrote the manuscript. FC, JL, NB, and AD performed the experiments.

FUNDING

This work was supported in part by the CNRS, Sorbonne Université, and Université Paris-Saclay, by Agence Nationale de la Recherche Grant 17-CE05-0001 CalvinDesign and by LABEX DYNAMO ANR-LABX-011.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sandrine Bujaldon for providing the *Chlamydomonas reinhardtii* strains CC-4051, CC-400, and CC-124; Kevin Sarkissian for his help in the cloning; and Cyrielle Durand, Théo Le Moigne, Dr. Christophe Marchand, and Dr. Julien Henri for stimulating discussions and suggestions.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00242/full#supplementary-material>

FIGURE S1 | Detection of the *BSR* module. pCM1-029 plasmid and the genomic DNA of the wild type (CC-4533) and four independent transformants Blast^R were used to amplify by PCR a fragment of the *BSR* resistance module. A product at the expected size (546 bp) was amplified only for pCM1-029 (positive control) and

- and *Pyricularia oryzae*. *Mol. Gen. Genet.* 242, 121–129. doi: 10.1007/BF00391004
- Li, X., Patena, W., Fauser, F., Jinkerson, R. E., Saroussi, S., Meyer, M. T., et al. (2019). A genome-wide algal mutant library and functional screen identifies genes required for eukaryotic photosynthesis. *Nat. Genet.* 51, 627–635. doi: 10.1038/s41588-019-0370-376
- Meslet-Cladière, L., and Vallon, O. (2011). Novel shuttle markers for nuclear transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* 10, 1670–1678. doi: 10.1128/EC.05043-11
- Neupert, J., Karcher, D., and Bock, R. (2009). Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *Plant J.* 57, 1140–1150. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03746.x
- Ortega-Escalante, J. A., Kwok, O., and Miller, S. M. (2018). New Selectable Markers for *Volvox carteri* Transformation. *Protist* 170, 52–63. doi: 10.1016/j.protis.2018.11.002
- Patron, N. J., Orzaez, D., Marillonnet, S., Warzecha, H., Matthewman, C., Youles, M., et al. (2015). Standards for plant synthetic biology: a common syntax for exchange of DNA parts. *New Phytol.* 208, 13–19. doi: 10.1111/nph.13532
- Pröschold, T., Harris, E. H., and Coleman, A. W. (2005). Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 170, 1601–1610. doi: 10.1534/genetics.105.044503
- Roehner, N., Beal, J., Clancy, K., Bartley, B., Misirli, G., Grünberg, R., et al. (2016). Sharing structure and function in biological design with SBOL 2.0. *ACS Synth. Biol.* 5, 498–506. doi: 10.1021/acssynbio.5b00215
- Roy Davies, D. (1972). Cell wall organisation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.* 115, 334–348. doi: 10.1007/BF00333172
- Salomé, P. A., and Merchant, S. S. (2019). A series of fortunate events: introducing *Chlamydomonas* as a reference organism. *Plant Cell* 31, 1682–1707. doi: 10.1105/tpc.18.00952
- Schnell, R. A., and Lefebvre, P. A. (1993). Isolation of the *Chlamydomonas* regulatory gene NIT2 by transposon tagging. *Genetics* 134, 737–747.
- Schroda, M., Beck, C. F., and Vallon, O. (2002). Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 31, 445–455. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01371.x
- Seto, H., Ôtake, N., and Yonehara, H. (1966). Biological transformation of Blastocidin S by *Aspergillus fumigatus* sp. *Agric. Biol. Chem.* 30, 877–886. doi: 10.1080/00021369.1966.10858693
- Sizova, I., Fuhrmann, M., and Hegemann, P. (2001). A *Streptomyces rimosus aphVIII* gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene* 277, 221–229. doi: 10.1016/s0378-1119(01)00616-3
- Stevens, D. R., Purton, S., and Rochaix, J.-D. (1996). The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol. Gen. Genet.* 251, 23–30. doi: 10.1007/BF02174340
- Sueoka, N. (1960). Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 46, 83–91. doi: 10.1073/pnas.46.1.83
- Svidritskiy, E., Ling, C., Ermolenko, D. N., and Korostelev, A. A. (2013). Blastocidin S inhibits translation by trapping deformed tRNA on the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 12283–12288. doi: 10.1073/pnas.1304922110
- Tabatabaei, I., Dal Bosco, C., Bednarska, M., Ruf, S., Meurer, J., and Bock, R. (2019). A highly efficient sulfadiazine selection system for the generation of transgenic plants and algae. *Plant Biotechnol. J.* 17, 638–649. doi: 10.1111/pbi.13004
- Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., and Marillonnet, S. (2011). A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One* 6:e16765. doi: 10.1371/journal.pone.0016765

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 de Carpentier, Le Peillet, Boisset, Crozet, Lemaire and Danon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

4 Discussion

Nous avons développé un kit de clonage modulaire qui est déjà utilisé par la communauté travaillant avec *Chlamydomonas* (Mehrshahi et al., 2020). Pour l'étude de l'agrégation, ce kit nous a permis de construire rapidement de nombreux plasmides (voir Chapitre I). Nous avons ainsi effectué la construction complexe d'un biosenseur d'activités (méta)caspases pour étudier la PCD. Nous avons aussi développé un nouveau marqueur de résistance à la blasticidine. Augmenter le nombre de marqueurs disponibles est important pour les études moléculaires complexes d'autant plus que certains antibiotiques doivent être utilisés avec prudence. La zéocine crée des cassures de l'ADN et donc potentiellement des mutations non désirées (Chankova et al., 2007; Čížková et al., 2019; Gatignol et al., 1988). *CRTI* qui confère la résistance au norflurazon modifie les caroténoïdes de *Chlamydomonas* (Molina-Márquez et al., 2019). Le gène de résistance à la kanamycine (*NPTII*) confère aussi la résistance à la paromomycine ce qui rend *NPTII* inutilisable dans la banque CLiP résistante à la paromomycine (Barahimipour et al., 2016; Li et al., 2019). *BSR* est un marqueur de sélection efficace chez *Chlamydomonas* qui ne pose pas ces problèmes. De plus, *BSR* ne mesure que 423 pb ce qui en fait le plus petit marqueur de résistance chez *Chlamydomonas*. En effet, *ble*, *aph7''*, *NPTII*, *aphVIII*, *aadA*, *NAT*, *tetX*, *CRTIop* et *OxR2* mesurent respectivement 526, 999, 792, 804, 1026, 573, 1166, 1476 et 1124 pb (pour les références, voir le Tableau 2). La petite taille de *BSR* peut être un avantage pour de grands assemblages. Nous l'avons d'ores et déjà utilisé avec succès pour générer une souche exprimant *mVenus* (voir Chapitre I, Figure 12).

Pour continuer de développer le kit MoClo et apporter de nouveaux marqueurs de sélection, les trichothécènes sont de bons candidats. La littérature montre que *Chlamydomonas* est sensible à ces mycotoxines ce que nous avons confirmé pour le DAS (Figure 27). La détoxification des trichothécène peut se faire par ajout enzymatique d'un groupement en C3 (Figure 27). Des enzymes catalysant de telles réactions ont été isolées chez les organismes producteurs (*Fusarium spp.*) ou cibles (*H. vulgare*, *A. thaliana* et *O. sativa*) de ces toxines. Leur expression apporte une résistance au DON chez *H. vulgare*, *A. thaliana*, *O. sativa*, *T. aestivum* et *S. cerevisiae* (Khatibi et al., 2011; Li et al., 2015, 2017; Manoharan et al., 2006; Michlmayr et al., 2015; Muhitch et al., 2000; Poppenberger et al., 2003; Schweiger et al., 2010; Shin et al., 2012). Ces gènes pourraient être adaptés à *Chlamydomonas* en tant que marqueur de sélection. Enfin, il est possible de muter l'UDP-glycosyltransférase du riz pour moduler sa sélectivité pour le DON ou la toxine T2 (Wetterhorn et al., 2017). Il semble donc possible de mettre au point un marqueur spécifique à l'un ou l'autre des trichothécènes. De plus, les trichothécènes sont un problème phytosanitaire majeur en agriculture (Foroud and Eudes, 2009) et *Chlamydomonas* a déjà été proposé comme organisme modèle pour les étudier (Alexander et al., 1999).

Conclusion générale et perspectives

Dans la présente thèse, nous avons caractérisé un nouveau moyen de défense de *Chlamydomonas* contre le stress abiotique. Nous avons montré, pour la première fois, la formation de structures multicellulaires visibles à l'œil nu en réponse à une variété de stress. En outre, le rôle protecteur, les mécanismes et les bases génétiques de ce phénomène ont été décrits. Ces recherches pourraient permettre de mieux comprendre la physiologie de *Chlamydomonas* d'avoir des débouchés en biotechnologie mais aussi d'appréhender la transition vers la multicellularité.

1 Multicellularité

Une meilleure compréhension de la transition vers la multicellularité est un défi majeur de la biologie (Grosberg and Strathmann, 2007). *Chlamydomonas* fait partie du lignage des Volvocales qui est utilisé pour étudier cette transition. L'agrégation a été proposée comme un stade intermédiaire vers la multicellularité (Olson, 2013). Il est possible que les gènes impliqués dans l'agrégation aient évolué pour permettre la multicellularité. En effet, nous avons identifié des gamétolysines, MMPs et PHCs qui sont des familles potentiellement impliquées dans la transition vers la multicellularité chez *Volvox* (Prochnik et al., 2010). Les autres gènes impliqués dans l'agrégation comme ceux de la signalisation cellulaire pourraient donc être aussi important pour la transition vers la multicellularité. D'autre part, les agrégats produisent une matrice contenant des sucres et abondante comme celle de *Volvox*. L'étude de ces matrices pourrait permettre de comprendre leur rôle structural et de protection dans la réponse au stress et la multicellularité.

2 Biotechnologies

Chlamydomonas est une microalgue prometteuse pour le traitement des eaux (Escudero et al., 2020; Park et al., 2011) et la production de biocarburants, d'aliments pour le bétail ou de molécules à haute valeur ajoutée (Burgess et al., 2011; Lam et al., 2018). Aujourd'hui la production de biocarburants par des microalgues n'est pas compétitive économiquement et énergétiquement à cause des coûts de récolte. Par exemple, la récupération de la biomasse se fait souvent par centrifugation qui peut représenter jusqu'à 30% du coût. Une autre technique de récolte plus rentable a été proposée : la floculation/agrégation. Plusieurs substances induisent la floculation passive des cellules ce qui les fait sédimenter et permet ainsi de les récupérer (Salim et al., 2011). Les résultats que nous avons découverts sur l'agrégation peuvent permettre d'améliorer cette technique de récolte.

En premier lieu, les substances que nous avons utilisées induisant le stress oxydatif et nitrosatif font agréger les cellules ce qui les fait sédimenter. Ensuite, l'ingénierie génétique de *Chlamydomonas* pourrait permettre d'obtenir des souches avec les propriétés d'agrégation recherchées. Les mutants *saz* et de génétique inverse agrégeant spontanément pourraient être utilisés pour cela (voir 2.1.2 et 2.2). Peut-être que la surexpression de *PHC30*, *PHC41* ou *PHC50*

permettrait d'obtenir des souches qui agrègent comme ce qui a été fait, chez *Chlamydomonas*, avec la fascicine Algal-CAM de *Volvox* (Lowder and Herbert, 2015) ou la flocculine FLO5 de *Saccharomyces bayanus* (Díaz-Santos et al., 2016). Le problème de ces souches est qu'elles agrègeraient tout le temps. Ces gènes pourraient alors être mis sous le contrôle d'un promoteur inductible. Un gène pro-agrégation comme FLO5 devraient être exprimé dans le sauvage sous le contrôle d'un tel promoteur qui serait activé pour induire l'agrégation. Un gène anti-agrégatif comme *VLE* devraient alors être exprimé dans le mutant *saz1*, le promoteur inductible permettrait de le réprimer lorsque l'agrégation est voulue. Chez *Chlamydomonas*, il existe plusieurs promoteurs inductibles comme P_{NIT1} qui est induit par le nitrate ou P_{METE} qui est réprimé par la vitamine B₁₂ (Crozet et al., 2018).

De telles systèmes pourraient nécessiter plusieurs transformations de constructions complexes. Nous avons développé un kit de MoClo et un nouveau marqueur de sélection, la résistance à la blasticidine, qui faciliteront la mise au point de ces souches. Enfin, les avancées faites chez *Chlamydomonas* pourraient être transposées chez des microalgues plus performantes pour la production de lipides comme *Chromochloris zofingiensis* (Roth et al., 2017) et *Nannochloropsis gaditana* (Ajjawi et al., 2017) ou des consortia de microorganismes (Brenner et al., 2008). En conclusion, la compréhension de l'agrégation chez *Chlamydomonas* devrait permettre l'amélioration de la récolte de biomasse pour la production industrielle et le développement des biocarburants de troisième génération.

Matériel et Méthodes

1 Cultures et stress de *Chlamydomonas*

1.1 Souches et conditions de cultures

La souches de *Chlamydomonas reinhardtii* utilisées sont D66 (CC4425) (Schnell and Lefebvre, 1993) et la souche de référence de la banque CLiP CC5325 (Li et al., 2019). Nous avons aussi utilisé les mutants *vle1* (LMJ.RY0402.057262), *vle2* (LMJ.RY0402.131694), *vle3* (LMJ.RY0402.159901), *vle4* (LMJ.RY0402.140798) et *phc3* (LMJ.RY0402.224025) que nous nous sommes procuré sur www.chlamylibrary.org. Les souches de *Chlamydomonas* ont été cultivées en conditions mixotrophes dans du milieu TAP (Tris acetate phosphate) liquide sous lumière continue (40 à 60 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) à 25°C sous agitation (120 rpm). Les cultures solides ont été effectuées sur du TAP-agar dans les mêmes conditions de température et de lumière. Le diacetoxyiscirpenol (DAS) (Apollo Scientific, Stockport, UK) a été solubilisé dans l'éthanol pour la solution stock.

1.2 Stress

Les tests d'agrégation et de stress ont été fait en plaque 24 puits avec 1 mL de culture à 6×10^6 cellules/mL par puit supplémentés des doses appropriés stress. Sauf information contraire, les produits chimiques ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). Les stress chimiques ont été effectués avec du rose bengale (330000), du paraquat (856177) ou du GSNO (S-nitrosoglutathion). Le GSNO a été synthétisé à partir de glutathion commercial par la méthode de Hart de nitrosation acide-catalysée (Hart, 1985). En bref, 3,065g de glutathion ont été dissouts dans 21 mL d'acide chlorhydrique 476 mM et gardés sur glace. 0,691 g de nitrite de sodium ont été ajoutés en une fois, le mélange a été ensuite gardé sous agitation pendant 45 min protégé de la lumière. 10 mL d'acétone ont ensuite été ajoutés rouge et gardés sous agitation pour 10 min supplémentaires. La suspension rouge a été filtré sur entonnoir fritté en verre et le précipité a été lavé à l'eau (4 x 20 mL), l'acétone (3 x 20 mL) et éther diéthylique (3 x 20 mL). Les traces d'eau et de solvants ont été éliminés sous vide pendant 24 h et le GSNO en poudre a été conservé à -20°C en présence de déshydratant. La pureté du GSNO a été vérifiée par RMN du proton et spectrophotométrie avec les coefficients d'extinction molaire de $922.0 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (335 nm) et $15.9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (545 nm). Les solutions de GSNO ont été préparée fraîches dans l'eau avant usage et la concentration a été déterminée par absorbance à 355 nm.

2 Quantification de l'agrégation et de la mort cellulaire

2.1 Matériel de capture et logiciels

Les plaques 24 ou 96 puits ont été scannés avec le scanner Perfection V800 (Epson, Suwa, Japan). Les photos de cellules ont été effectuées avec les microscopes à fluorescence BX43 (Olympus, Tokyo, Japan) et Axio Observer (Zeiss, Oberkochen, Germany). Les images ont été

analysées grâce aux logiciels ImageJ 1.52a et Fiji (Schindelin et al., 2012) et les données traités sur R studio 1.2.5 avec les bibliothèques tidyverse, data.table, ggbeeswarm, ggpubr, cowplot, scales et PlotsOfData (Postma and Goedhart, 2019; Wickham, 2011).

2.2 Quantification de l'aire des particules

L'aire des particules, c'est-à-dire cellules seules ou agrégats, imagées au microscope a été quantifié avec une macro ImageJ (github.com/fdecarpentier/ParticleArea). Cette macro permet aussi discriminer les doubles images dues aux cellules en mouvement. Pour les plaques 24 puits, les puits sont séparés grâce à la macro split_plate.ijm puis l'aire des agrégats est quantifiée par la macro ParticleWell.ijm avec un seuil (*threshold*) manuel et le positionnement manuel de la zone d'intérêt circulaire (1,3 cm de diamètre) (github.com/fdecarpentier/ParticleWell).

2.3 Quantification de la mortalité

Les cellules mortes ont été colorées en bleu avec une concentration finale de 0,2% m/v de bleu d'Evans (E2129) selon la méthode précédemment publiée (de Carpentier et al., 2020; Gaff and Okong'o-Ogola, 1971). Pour chaque échantillon, plusieurs champs de microscope (Olympus BX43) ont été analysés et le pourcentage de mort a été calculé pour un minimum de 100 individus. Pour quantification simultanée de l'aire et du statut mort/vivant des particules colorés au bleu d'Evans nous avons créé une macro Fiji (github.com/fdecarpentier/PlantDeath). La différenciation entre les particules vivantes (vertes) et mortes (bleues) est faite selon la valeur b^* (axe bleu à jaune) de l'espace de couleur CIELAB (Commission Internationale de l'Eclairage) (Connolly and Fleiss, 1997). Les mesures ont été effectuées après l'application d'une balance des blancs automatique (adaptée de github.com/pascalchi/ImageJ-Auto-white-balance-correction).

3 Construction des plasmides

Sauf précision contraire, les enzymes ont été achetées chez New England Biolabs (Ipswich, USA) et les antibiotiques chez Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). Le travail *in silico* sur les protéines et acides nucléiques a été réalisé sur Genome Compiler, DSGene 15, Serial Cloner 2.6.1 et Phytozome13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>) (Blaby et al., 2014).

3.1 Clonage Modulaire

Les plasmides pCM1-034, pM-127, pVLE1, pVLE2, pVLE3 et pVLE4 ont été clonés en *golden gate* avec des plasmides du kit MoClo de Chlamydomonas avec la méthode publiée dans de Carpentier et al., 2020 et Crozet et al., 2018 avec les plasmides receveurs de (Weber et al., 2011). Les séquences codantes de *PPI* (Cre01.g017200.t1.2) et *VLE* (Cre01.g049950.t1.1) ont été réencodées selon le biais de codon de Chlamydomonas (www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3055), les sites de restriction de *Bsa*I et *Bbs*I ont été retirés, les sites de fusion et les sites *Bbs*I ont été ajoutés pour la position B3-B4 pour *PPI* et B3-B4 ou B3 pour *VLE* (Patron et al., 2015) et enfin synthétisées (Twist Bioscience, San Francisco, USA). Les séquences domestiquées de *PPI* (B3-B4) et *VLE* (B3-B4) ont été cloné dans pAGM1287 pour

donner p0-257 et p0-165 et *VLE*(B3) dans pICH41258 pour donner p0-258. p0-257 (*PPA*) et p0-165 (*VLE*) ont été assemblés avec P_{PSAD} (pCM0-007), 3xHA (pCM0-093) et T_{PSAD} (pCM0-114) dans pICH47742 pour ainsi obtenir les plasmid p1-168 et p1-169. Ces deux plasmides ont été assemblés avec la résistance à l'hygromycine pCM1-031 ($P_{A/R}$ -*aph7''*- T_{RBCS2}) et le linker pICH50881 dans pAGM8031 pour obtenir pM-127 et pM-128. P_{PSAD} (pCM0-016), $P_{A/R}$ (pCM0-020), $P_{A/R}$ (pCM0-017), *VLE* (B3-B4) (p0-165), mSTOP (pCM0-101), T_{PSAD} (pCM0-114), T_{RBCS2} (pCM0-115), $T_{\beta TUB2}$ (p0-118) dans pICH47732 pour donner p1-170. P_{PSAD} (pCM0-016), $P_{A/R}$ (pCM0-020), $P_{A/R}$ (pCM0-017), *VLE*(B3) (p0-258), β Tubi2 (pCM0-088), mSTOP (pCM0-101), T_{PSAD} (pCM0-114), T_{RBCS2} (pCM0-115), $T_{\beta TUB2}$ (p0-118) dans pICH47732 pour donner p1-171. Enfin, P_{PSAD} (pCM0-010), $P_{A/R}$ (pCM0-015), $P_{A/R}$ (pCM0-011), β Tubi2 (pCM0-041), *VLE*(B3-B4) (p0-165), mSTOP (pCM0-101), T_{PSAD} (pCM0-114), T_{RBCS2} (pCM0-115), $T_{\beta TUB2}$ (p0-118) dans pICH47732 pour donner p1-172. p1-170, p1-171 et p1-172 ont été assemblés avec la résistance à l'hygromycine (p1-050) et le linker pICH50881 dans pAGM8031 pour donner pM-129 (pVLE2), pM-130 (pVLE3) et pM-131 (pVLE4).

Le plasmide de niveau 1 pCM1-034 a été construit par assemblage du promoteur et 5'UTR P_{PSAD} (pCM0-016), du gène rapporteur *mVenus* (pCM0-086) et du terminateur et 3'UTR T_{PSAD} (pCM0-144) dans le plasmide accepteur pICH47732. L'unité de transcription de résistance à la blasticidine S pCM1-029 a été assemblée à partir du promoteur $P_{A/R}$ couplé au 5'UTR de T_{RBCS2} (pCM0-020), du gène *BSR* (pCM0-120) et du 3'UTR de T_{RBCS2} couplé au terminateur T_{RBCS2} (pCM0-115) dans le plasmide pICH47742 (voir Chapitre II.2.2). Les unités de transcription pCM1-034 (*mVenus*) et pCM1-029 (blasticidin résistance) ont été combinés dans le plasmide récepteur pAGM8031 pour obtenir le plasmide de niveau M pCMM-23.

Pour la construction du biosenseur d'activités caspases nous avons utilisé les séquences publiées dans Tebo and Gautier, 2019. Ainsi les briques ont été réencodées selon le biais de codon de *Chlamydomonas* (www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3055), domestiquées pour le kit MoClo de *Chlamydomonas* (Crozet et al., 2018), synthétisées (Twist Bioscience, San Francisco, USA) et clonées dans pAGM1311 pour obtenir les plasmides p0-215 (bFos), p0-216 (bJun-Myc), p0-217 (CFast11), p-218 (NFAST-3NLS), p0-219 (mCherry-NES) et p0-221 (DEVD). Les plasmides pCM0-010 (P_{PSAD}), p0-215, p0-217, p0-151 et pCM0-114 (T_{PSAD}) ont été assemblés dans pICH47732 pour donner p1-144. D'autre part, pCM0-015 ($P_{A/R}$), p0-216, p0-218, p0-221, p0-219 et pCM0-115 (T_{RBCS2}) ont été assemblés dans pICH47742 pour obtenir p1-146. Finalement, p1-144 et p1-146 ont été assemblés avec p1-20 (Hygro^R) et le linker pICH50892 dans pAGM8031 ce qui donne le plasmide final pM-109.

3.2 Gibson Assembly

Les plasmides pVLE4 et pVLE5 ont été construits avec la technique de la *Gibson assembly* (Gibson et al., 2009). *VLE* avec son propre 5'UTR a été amplifié avec la KAPA HiFi polymerase (Roche, Bâle, Suisse) avec les amorces vle-ga.1 (tgctactcacaacaagcccaCTTGACCTGACACAACCTT-AA) et vle-ga.2 (tggagctccaccgcggtggcTCCTCGGTTAGTCTCGTTGC). Le produit de PCR de 8237 pb a été purifié sur gel avec le kit « NucleoSpin Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Le plasmid pSL-Hyg a été digéré avec *NdeI* et *NotI* puis assemblé avec le produit de PCR avec le kit NEBuilder HiFi DNA Assembly donnant pVLE4. De même, pour

pVLE5, *VLE* avec son propre promoteur a été cloné avec les amorces vle-ga.3 (tgaacgcatgtcgagggagg-CGGCTGACGCATGGTTCGTGAG) et vle-ga.2 donnant un produit de 8648 pb qui a été assemblé avec pSL-Hyg digéré avec *NotI* et *StuI*. Dans ces deux cas, les constructions ont été vérifiées en PCR sur colonie avec des amorces spécifiques de *VLE* et en les digérant avec *PstI* ou *NotI*.

4 Transformation de *Chlamydomonas* et cribles

4.1 Création de la banque de mutants *saz*

Pour la création des banques de mutants *saz*, la transformation a été faite selon le protocole Lemaire précédemment publié (de Carpentier et al., 2020; Pollock et al., 2017). La cassette de résistance à la paromomycine chez *Chlamydomonas reinhardtii*, utilisée pour la création des banques de mutants *saz*, a été excisée du plasmide pSL72 (Pollock et al., 2004) avec *XhoI* et *EcoRI*, isolée sur gel d'agarose puis purifiée avec le kit « NucleoSpin Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) pour ainsi obtenir l'insert i72. Les cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* ont été cultivées en TAP jusqu'à une concentration de $1-2 \times 10^6$ cellule/mL et concentrés 100 fois dans du TAP-sucrose 60 mM. 250 μ L de suspension ont été incubés au moins 20 min à 4°C en présence de 40 ng de l'insert i72. Les cellules ont été électroporées à 2000 V.cm^{-1} , 25 μ F et sans résistance de shunt et incubées dans 10 mL de TAP-sucrose 60 mM pendant 16 à 20 h en faible lumière avant d'être étalées sur boîtes de TAP-agar supplémentés de paromomycine (20 mg/L). Les transformants ont été criblés après 5 à 7 jours de croissance sous lumière continue. Environ 13 000 transformants ont été criblés pour leur capacité à agréger spontanément en plaque 96 puits avec 200 μ L de TAP/puits et sous agitation (350 rpm) pendant 5 jours. Ce crible a permis d'obtenir 16 mutants appelés *saz*.

4.2 Autres transformations

Pour l'expression de transgènes dans la souche sauvage et les mutants, une autre méthode publiée a été adaptée Onishi and Pringle, 2016. L'insert a été excisé du plasmide de niveau M désiré avec *BsaI*, isolé sur gel d'agarose et purifié avec le kit « NucleoSpin Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). *Chlamydomonas reinhardtii* en croissance exponentielle a été concentré à 2×10^8 cellules/mL dans 240 μ L tampon CHES (10 mM CHES pH9.25 (C2885), 40 mM sucrose et 10 mM sorbitol) contenant 1,0 μ g de l'insert désiré. Le mélange a ensuite été incubé à 15°C sous agitation (700 rpm) pendant au moins 20 min et électroporé (1500 V.cm^{-1} , 25 μ F et pas de résistance de shunt). Les cellules ont été incubées 16 à 20 h dans 13 mL de TAP-sucrose pour récupérer, étalées sur boîtes de TAP-agar supplémentés de blasticidine S (50 mg/L) ou hygromycine B (20 mg/L) et laissées pousser pendant 5 à 7 jours en lumière continue.

Pour la souche Venus (CC4425-mVenus), les transformants ont été imagées avec le scanner laser Typhoon FLA 9500 (GE, Healthcare) à une excitation de 473 nm avec les filtres BPG1 pour la YFP et LPG pour la chlorophylle. 40 colonies fluorescentes ont été striées sur boîte et scannées une deuxième fois pour déterminer la souche la plus fluorescente.

5 Détection de l'insert

L'insert de résistance à la paromomycine a été localisé dans les mutants *saz* avec les techniques RESDA ou adaptateur-PCR (González-Ballester et al., 2005; Pollock et al., 2017). Pour l'adaptateur-PCR, la restriction et la ligation de l'adaptateur ont été effectuées en une seule étape comme décrit dans l'article (Pollock et al., 2017). Les PCR ont été effectuées avec la polymérase Quick-Load® Taq 2x Master Mix selon les recommandations du fabricant. Les PCR de vérification ont été effectuées avec les amorces suivantes : CBLP.5 (GACGTCATCCACTGCCTGTG), CBLP.3 (CGAC-GCATCCTCAACACACC), *ppi.1* (AGAACCTGTCGT-TTGAGGC), *ppi.2* (CCTTGTACCCGTCAATCTTG), *hik.1* (ATTTCCCTAATACCGTGGGGGC), *hik.2* (C-ACCAACGCAAAAACGGTGC), *cal.1* (CAACAGCGCCTGCGAGTCGC), *cal.2* (CTCGAAGATTGTCAG-AGCG), *gam.1* (CCACCATGCAGGAGTACTAC), *gam.2* (CGCGATAGCTCACGAACAAC), *vle.1* (CGT-GGATATACCAGTACGGC), *vle.2* (CGGAAGAGAAGGACACGTAG) et RB4 (TGGTTCGGGCCGGAG-TGTTTC).

6 RT-qPCR

L'ARN a été purifié avec du Trizol à partir de 2 mL cultures en phase exponentielles de croissance en conditions standard. Le traitement à la DNase et la transcription inverse ont été effectuées avec le kit « Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR » (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) selon les recommandations de fabricant. Les qPCR ont été effectuées avec les réactifs « iTaq Universal SYBR Green Supermix » et le thermocycleur CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Les amorces utilisées sont les suivantes : CBLP.5 (GACGTCATCCACTGCCTGTG), CBLP.3 (CGAC-GCATCCTCAACACACC), *ppi.3* (CAGTGGAGTTTG-AGGTGGAG), *ppi.2* (CCTTGTACCCGTCAATCTTG), *vle.1* (CGTGGATATACCAGTACGGC), *vle.2* (C-GGAAGAGAAGGACACGTAG), *vle.7* (CCTGGAAAGGAGCGACGCAG) et *vle.8* (TCTGCACCCGTGAT-GTGTAT). Le niveau d'ARN a été quantifié avec la méthode des delta-Ct avec le logiciel CFX Manager 3.1 (Bio-Rad Laboratories), et normalisé avec le contrôle *CBLP*.

Bibliographie

Ajjawi, I., Verruto, J., Aqui, M., Soriaga, L.B., Coppersmith, J., Kwok, K., Peach, L., Orchard, E., Kalb, R., Xu, W., et al. (2017). Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator. *Nature Biotechnology* *35*, 647–652.

Alexander, N.J., McCormick, S.P., and Ziegenhorn, S.L. (1999). Phytotoxicity of selected trichothecenes using *Chlamydomonas reinhardtii* as a model system. *Nat. Toxins* *7*, 265–269.

Ameri, M., Baron-Sola, A., Khavari-Nejad, R.A., Soltani, N., Najafi, F., Bagheri, A., Martinez, F., and Hernández, L.E. (2020). Aluminium triggers oxidative stress and antioxidant response in the microalgae *Scenedesmus* sp. *Journal of Plant Physiology* *246–247*, 153114.

Baier, T., Jacobebbinghaus, N., Einhaus, A., Lauersen, K.J., and Kruse, O. (2020). Introns mediate post-transcriptional enhancement of nuclear gene expression in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLOS Genetics* *16*, e1008944.

Barahimipour, R., Strenkert, D., Neupert, J., Schroda, M., Merchant, S.S., and Bock, R. (2015). Dissecting the contributions of GC content and codon usage to gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* *84*, 704–717.

Barahimipour, R., Neupert, J., and Bock, R. (2016). Efficient expression of nuclear transgenes in the green alga *Chlamydomonas*: synthesis of an HIV antigen and development of a new selectable marker. *Plant Mol Biol* *90*, 403–418.

Baulina, O., Gorelova, O., Solovchenko, A., Chivkunova, O., Semenova, L., Selyakh, I., Scherbakov, P., Burakova, O., and Lobakova, E. (2016). Diversity of the nitrogen starvation responses in subarctic *Desmodesmus* sp. (Chlorophyceae) strains isolated from symbioses with invertebrates. *FEMS Microbiol Ecol* *92*.

Becks, L., Ellner, S.P., Jones, L.E., and Jr, N.G.H. (2010). Reduction of adaptive genetic diversity radically alters eco-evolutionary community dynamics. *Ecology Letters* *13*, 989–997.

Berthold, P., Schmitt, R., and Mages, W. (2002). An Engineered *Streptomyces hygroscopicus aph 7'* Gene Mediates Dominant Resistance against Hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist* *153*, 401–412.

Bickerton, P., Sello, S., Brownlee, C., Pittman, J.K., and Wheeler, G.L. (2016). Spatial and temporal specificity of Ca₂₊ signalling in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to osmotic stress. *New Phytol* *212*, 920–933.

Bjærke, O., Jonsson, P.R., Alam, A., and Selander, E. (2015). Is chain length in phytoplankton regulated to evade predation? *Journal of Plankton Research* *37*, 1110–1119.

Blaby, I.K., Blaby-Haas, C.E., Tourasse, N., Hom, E.F.Y., Lopez, D., Aksoy, M., Grossman, A., Umen, J., Dutcher, S., Porter, M., et al. (2014). The *Chlamydomonas* genome project: a decade on. *Trends in Plant Science* *19*, 672–680.

- Boelee, N.C. (2013). Microalgal biofilms for wastewater treatment. phd. S.n.
- Boraas, M.E., Seale, D.B., and Boxhorn, J.E. (1998). Phagotrophy by a flagellate selects for colonial prey: A possible origin of multicellularity. *Evolutionary Ecology* *12*, 153–164.
- Boyd, M., Rosenzweig, F., and Herron, M.D. (2018). Analysis of motility in multicellular *Chlamydomonas reinhardtii* evolved under predation. *PLoS One* *13*.
- Brenner, K., You, L., and Arnold, F.H. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology* *26*, 483–489.
- Brückner, S., and Mösch, H.-U. (2012). Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* *36*, 25–58.
- Bruggeman, A.J., Kuehler, D., and Weeks, D.P. (2014). Evaluation of three herbicide resistance genes for use in genetic transformations and for potential crop protection in algae production. *Plant Biotechnology Journal* *12*, 894–902.
- Brunet, T., and King, N. (2017). The Origin of Animal Multicellularity and Cell Differentiation. *Developmental Cell* *43*, 124–140.
- Buck, J.M., Río Bártulos, C., Gruber, A., and Kroth, P.G. (2018). Blastocidin-S deaminase, a new selection marker for genetic transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *PeerJ* *6*.
- Burgess, S.J., Tamburic, B., Zemichael, F., Hellgardt, K., and Nixon, P.J. (2011). Chapter 3 - Solar-Driven Hydrogen Production in Green Algae. In *Advances in Applied Microbiology*, A.I. Laskin, S. Sariaslani, and G.M. Gadd, eds. (Academic Press), pp. 71–110.
- Burns, J.A., Zhang, H., Hill, E., Kim, E., and Kerney, R. (2017). Transcriptome analysis illuminates the nature of the intracellular interaction in a vertebrate-algal symbiosis. *ELife* *6*, e22054.
- Burns, J.A., Kerney, R., and Duhamel, S. (2020). Heterotrophic Carbon Fixation in a Salamander-Alga Symbiosis. *BioRxiv* 2020.02.14.948299.
- Calatrava, V., Hom, E.F.Y., Llamas, Á., Fernández, E., and Galván, A. (2018). OK, thanks! A new mutualism between *Chlamydomonas* and methylobacteria facilitates growth on amino acids and peptides. *FEMS Microbiol Lett* *365*.
- Calsbeek, R., and Cox, R.M. (2010). Experimentally assessing the relative importance of predation and competition as agents of selection. *Nature* *465*, 613–616.
- Campbell, V.W., and Jackson, D.A. (1980). The effect of divalent cations on the mode of action of DNase I. The initial reaction products produced from covalently closed circular DNA. *J. Biol. Chem.* *255*, 3726–3735.

de Carpentier, F., Le Peillet, J., Boisset, N.D., Crozet, P., Lemaire, S.D., and Danon, A. (2020). Blasticidin S Deaminase: A New Efficient Selectable Marker for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Front. Plant Sci.* *11*.

Casini, A., Storch, M., Baldwin, G.S., and Ellis, T. (2015). Bricks and blueprints: methods and standards for DNA assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 568–576.

Cavada, B.S., Osterne, V.J.S., Lossio, C.F., Pinto-Junior, V.R., Oliveira, M.V., Silva, M.T.L., Leal, R.B., and Nascimento, K.S. (2019). One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. *International Journal of Biological Macromolecules* *134*, 901–911.

Chankova, S.G., Dimova, E., Dimitrova, M., and Bryant, P.E. (2007). Induction of DNA double-strand breaks by zeocin in *Chlamydomonas reinhardtii* and the role of increased DNA double-strand breaks rejoining in the formation of an adaptive response. *Radiat Environ Biophys* *46*, 409–416.

Chen, H., and Fink, G.R. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev.* *20*, 1150–1161.

Chen, G., Zhu, N., Hu, Z., Liu, L., Wang, G.-Q., and Wang, G. (2020). Motility changes rather than EPS production shape aggregation of *Chlamydomonas microspheara* in aquatic environment. *Environmental Technology* *0*, 1–24.

Choi, C.J., and Berges, J.A. (2013). New types of metacaspases in phytoplankton reveal diverse origins of cell death proteases. *Cell Death Dis* *4*, e490.

Čížková, M., Slavková, M., Vítová, M., Zachleder, V., and Bišová, K. (2019). Response of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* to the DNA Damaging Agent Zeocin. *Cells* *8*, 735.

Connolly, C., and Fleiss, T. (1997). A study of efficiency and accuracy in the transformation from RGB to CIELAB color space. *IEEE Transactions on Image Processing* *6*, 1046–1048.

Cooper, M.B., and Smith, A.G. (2015). Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Current Opinion in Plant Biology* *26*, 147–153.

Cornish-Bowden, A.J., and Knowles, J.R. (1969). The pH-dependence of pepsin-catalysed reactions. *Biochemical Journal* *113*, 353–362.

Corpas, F.J., and Barroso, J.B. (2013). Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in higher plants. *New Phytologist* *199*, 633–635.

Costerton, J.W., Geesey, G.G., and Cheng, K.-J. (1978). How Bacteria Stick. *Scientific American* *238*, 86–95.

Cronmiller, E., Toor, D., Shao, N.C., Kariyawasam, T., Wang, M.H., and Lee, J.-H. (2019). Cell wall integrity signaling regulates cell wall-related gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Scientific Reports* *9*, 12204.

Crozet, P., Navarro, F.J., Willmund, F., Mehrshahi, P., Bakowski, K., Lauersen, K.J., Pérez-Pérez, M.-E., Auroy, P., Gorchs Rovira, A., Sauret-Gueto, S., et al. (2018). Birth of a Photosynthetic Chassis: A MoClo Toolkit Enabling Synthetic Biology in the Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS Synth. Biol.* *7*, 2074–2086.

Danon, A. (2012). Environmentally-Induced Oxidative Stress and Its Signaling. In *Photosynthesis*, J.J. Eaton-Rye, B.C. Tripathy, and T.D. Sharkey, eds. (Springer Netherlands), pp. 319–330.

Díaz-Santos, E., Vila, M., de la Vega, M., León, R., and Vigarà, J. (2015). Study of biofloculation induced by *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* and flocculating protein factors in microalgae. *Algal Research* *8*, 23–29.

Díaz-Santos, E., Vila, M., Vigarà, J., and León, R. (2016). A new approach to express transgenes in microalgae and its use to increase the flocculation ability of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Appl Phycol* *28*, 1611–1621.

Driscoll, W.W., and Travisano, M. (2017). Synergistic cooperation promotes multicellular performance and unicellular free-rider persistence. *Nature Communications* *8*, 15707.

Durand, P.M., Rashidi, A., and Michod, R.E. (2011). How an Organism Dies Affects the Fitness of Its Neighbors. *The American Naturalist* *177*, 224–232.

Dutz, J., Klein Breteler, W.C.M., and Kramer, G. (2005). Inhibition of copepod feeding by exudates and transparent exopolymer particles (TEP) derived from a *Phaeocystis globosa* dominated phytoplankton community. *Harmful Algae* *4*, 929–940.

Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H.D., and Lang, H. (1974). Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *European Journal of Biochemistry* *47*, 91–97.

Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R., and Marillonnet, S. (2009). Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type II Restriction Enzymes. *PLoS ONE* *4*, e5553.

Engler, C., Youles, M., Gruetzner, R., Ehnert, T.-M., Werner, S., Jones, J.D.G., Patron, N.J., and Marillonnet, S. (2014). A Golden Gate Modular Cloning Toolbox for Plants. *ACS Synth. Biol.* *3*, 839–843.

Escudero, A., Hunter, C., Roberts, J., Helwig, K., and Pahl, O. (2020). Pharmaceuticals removal and nutrient recovery from wastewaters by *Chlamydomonas acidophila*. *Biochemical Engineering Journal* *156*, 107517.

Fakhimi, N., Dubini, A., Tavakoli, O., and González-Ballester, D. (2019). Acetic acid is key for synergetic hydrogen production in *Chlamydomonas*-bacteria co-cultures. *Bioresource Technology* *289*, 121648.

Featherston, J., Arakaki, Y., Hanschen, E.R., Ferris, P.J., Michod, R.E., Olson, B.J.S.C., Nozaki, H., and Durand, P.M. (2018). The 4-Celled *Tetraebaena socialis* Nuclear Genome Reveals the Essential Components for Genetic Control of Cell Number at the Origin of Multicellularity in the Volvocine Lineage. *Molecular Biology and Evolution* *35*, 855–870.

Ferenczi, A., Pyott, D.E., Xipnitou, A., and Molnar, A. (2017). Efficient targeted DNA editing and replacement in *Chlamydomonas reinhardtii* using Cpf1 ribonucleoproteins and single-stranded DNA. *PNAS* *114*, 13567–13572.

Fesel, P.H., and Zuccaro, A. (2016). β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology* *90*, 53–60.

Fischer, B.B., Krieger-Liszkay, A., and Eggen, R.I.L. (2005). Oxidative stress induced by the photosensitizers neutral red (type I) or rose bengal (type II) in the light causes different molecular responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science* *168*, 747–759.

Fisher, R.M., Bell, T., and West, S.A. (2016). Multicellular group formation in response to predators in the alga *Chlorella vulgaris*. *J. Evol. Biol.* *29*, 551–559.

Flemming, H.-C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*.

Foroud, N.A., and Eudes, F. (2009). Trichothecenes in Cereal Grains. *International Journal of Molecular Sciences* *10*, 147–173.

Fu, L., Wang, P., and Xiong, Y. (2020). Target of Rapamycin Signaling in Plant Stress Responses. *Plant Physiol* *182*, 1613–1623.

Fukuda, H., and Kizaki, Y. (1999). A new transformation system of *Saccharomyces cerevisiae* with blasticidin S deaminase gene. *Biotechnology Letters* *21*, 969–971.

Gaff, D.F., and Okong'o-Ogola, O. (1971). The Use of Non-permeating Pigments for Testing the Survival of Cells. *J Exp Bot* *22*, 756–758.

Gallaher, S.D., Fitz-Gibbon, S.T., Glaesener, A.G., Pellegrini, M., and Merchant, S.S. (2015). *Chlamydomonas* Genome Resource for Laboratory Strains Reveals a Mosaic of Sequence Variation, Identifies True Strain Histories, and Enables Strain-Specific Studies. *The Plant Cell* *27*, 2335–2352.

Garcia-Echauri, S.A., and Cardineau, G.A. (2015). TETX: a novel nuclear selection marker for *Chlamydomonas reinhardtii* transformation. *Plant Methods* *11*, 27.

Gatignol, A., Durand, H., and Tiraby, G. (1988). Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Letters* *230*, 171–175.

Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., and Smith, H.O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* *6*, 343–345.

González-Ballester, D., de Montaigu, A., Galván, A., and Fernández, E. (2005). Restriction enzyme site-directed amplification PCR: A tool to identify regions flanking a marker DNA. *Analytical Biochemistry* *340*, 330–335.

Gorman, D.S., and Levine, R.P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *54*, 1665–1669.

Greiner, A., Kelterborn, S., Evers, H., Kreimer, G., Sizova, I., and Hegemann, P. (2017). Targeting of Photoreceptor Genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via Zinc-Finger Nucleases and CRISPR/Cas9. *The Plant Cell* *29*, 2498–2518.

Grosberg, R.K., and Strathmann, R.R. (2007). The Evolution of Multicellularity: A Minor Major Transition? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* *38*, 621–654.

Gulli, J.G., Herron, M.D., and Ratcliff, W.C. (2019). Evolution of altruistic cooperation among nascent multicellular organisms. *Evolution* *73*, 1012–1024.

Ha, K., Jang, M.-H., and Takamura, N. (2004). Colony Formation in Planktonic Algae Induced by Zooplankton Culture Media Filtrate. *Journal of Freshwater Ecology* *19*, 9–16.

Haire, T.C., Bell, C., Cutshaw, K., Swiger, B., Winkelmann, K., and Palmer, A.G. (2018). Robust Microplate-Based Methods for Culturing and in Vivo Phenotypic Screening of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Front. Plant Sci.* *9*.

Hallmann, A. (2006). The pherophorins: common, versatile building blocks in the evolution of extracellular matrix architecture in Volvocales. *The Plant Journal* *45*, 292–307.

Hanschen, E.R., Marriage, T.N., Ferris, P.J., Hamaji, T., Toyoda, A., Fujiyama, A., Neme, R., Noguchi, H., Minakuchi, Y., Suzuki, M., et al. (2016). The *Gonium pectorale* genome demonstrates co-option of cell cycle regulation during the evolution of multicellularity. *Nat Commun* *7*.

Harris, E.H. (1989). *The Chlamydomonas Sourcebook* (San Diego: Academic Press.).

Hart, T.W. (1985). Some observations concerning the S-nitroso and S-phenylsulphonyl derivatives of L-cysteine and glutathione. *Tetrahedron Letters* *26*, 2013–2016.

Hashimura, H., Morimoto, Y.V., Yasui, M., and Ueda, M. (2019). Collective cell migration of *Dictyostelium* without cAMP oscillations at multicellular stages. *Commun Biol* *2*.

Herron, M.D., Ratcliff, W.C., Boswell, J., and Rosenzweig, F. (2018). Genetics of a de novo origin of undifferentiated multicellularity. *R Soc Open Sci* *5*.

Herron, M.D., Borin, J.M., Boswell, J.C., Walker, J., Chen, I.-C.K., Knox, C.A., Boyd, M., Rosenzweig, F., and Ratcliff, W.C. (2019). *De novo* origins of multicellularity in response to predation. *Scientific Reports* *9*, 2328.

Hom, E.F.Y., and Murray, A.W. (2014). Niche engineering demonstrates a latent capacity for fungal-algal mutualism. *Science* *345*, 94–98.

Huber, O., and Sumper, M. (1994). Algal-CAMs: isoforms of a cell adhesion molecule in embryos of the alga *Volvox* with homology to *Drosophila* fasciclin I. *EMBO J.* *13*, 4212–4222.

Izumi, M., Miyazawa, H., Kamakura, T., Yamaguchi, I., Endo, T., and Hanaoka, F. (1991). Blasticidin S-resistance gene (*bsr*): A novel selectable marker for mammalian cells. *Experimental Cell Research* *197*, 229–233.

Jakobsen, H.H., and Tang, K.W. (2002). Effects of protozoan grazing on colony formation in *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) and the potential costs and benefits. *Aquatic Microbial Ecology* *27*, 261–273.

Joo, S., Nishimura, Y., Cronmiller, E., Hong, R.H., Kariyawasam, T., Wang, M.H., Shao, N.C., El Akkad, S.-E.-D., Suzuki, T., Higashiyama, T., et al. (2017). Gene Regulatory Networks for the Haploid-to-Diploid Transition of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* *175*, 314–332.

Kamakura, T., Yoneyama, K., and Yamaguchi, I. (1990). Expression of the blasticidin S deaminase gene (*bsr*) in tobacco: Fungicide tolerance and a new selective marker for transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* *223*, 332–334.

Kampe, H., König-Rinke, M., Petzoldt, T., and Benndorf, J. (2007). Direct effects of *Daphnia*-grazing, not infochemicals, mediate a shift towards large inedible colonies of the gelatinous green alga *Sphaerocystis Schroeteri*. *Limnologica* *37*, 137–145.

Kao, P.-H., and Ng, I.-S. (2017). CRISPRi mediated phosphoenolpyruvate carboxylase regulation to enhance the production of lipid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource Technology* *245*, 1527–1537.

Kapsetaki, S.E., and West, S.A. (2019). The costs and benefits of multicellular group formation in algae. *Evolution* *73*, 1296–1308.

Kapsetaki, S.K., Tep, A.T., and West, S.W. (2017). How do algae form multicellular groups? *Evolutionary Ecology Research* *18*.

Khatibi, P.A., Newmister, S.A., Rayment, I., McCormick, S.P., Alexander, N.J., and Schmale, D.G. (2011). Bioprospecting for Trichothecene 3-*O*-Acetyltransferases in the Fungal Genus *Fusarium* Yields Functional Enzymes with Different Abilities To Modify the Mycotoxin Deoxynivalenol. *Appl Environ Microbiol* *77*, 1162–1170.

Khona, D.K., Shirolkar, S.M., Gawde, K.K., Hom, E., Deodhar, M.A., and D'Souza, J.S. (2016). Characterization of salt stress-induced palmelloids in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research* *16*, 434–448.

Khong, N.M.H., Khaw, Y.S., Nazarudin, M.F., and Yusoff, F.M. (2019). *Microcystis aeruginosa* grown in different defined media leads to different cultivable heterotrophic bacteria composition that could influence cyanobacterial morphological characteristics and growth properties. *BioRxiv* 721175.

Kore, A.R., Shanmugasundaram, M., Charles, I., and Hoang, Q. (2010). Synthesis and biological evaluation of modified pentapeptides as potent proteinase K inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* *20*, 2750–2754.

Kublanovskaya, A., Baulina, O., Chekanov, K., and Lobakova, E. (2020). The microalga *Haematococcus lacustris* (Chlorophyceae) forms natural biofilms in supralittoral White Sea coastal rock ponds. *Planta* *252*, 37.

Kubo, T., Saito, T., Fukuzawa, H., and Matsuda, Y. (2001). Two tandemly-located matrix metalloprotease genes with different expression patterns in the *Chlamydomonas* sexual cell cycle. *Current Genetics* *40*, 136–143.

Kubo, T., Kaida, S., Abe, J., Saito, T., Fukuzawa, H., and Matsuda, Y. (2009). The *Chlamydomonas* Hatching Enzyme, Sporangin, is Expressed in Specific Phases of the Cell Cycle and is Localized to the Flagella of Daughter Cells Within the Sporangial Cell Wall. *Plant Cell Physiol* *50*, 572–583.

Kumar, M., Sharma, K., Yadav, A.K., Kanchan, K., Baghel, M., Kateriya, S., and Pandey, G.K. (2020). Genome-wide identification and biochemical characterization of calcineurin B-like calcium sensor proteins in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemical Journal* *477*, 1879–1892.

Laloi, C., Stachowiak, M., Pers-Kamczyc, E., Warzych, E., Murgia, I., and Apel, K. (2007). Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 672–677.

Lam, G.P. 't, Vermuë, M.H., Eppink, M.H.M., Wijffels, R.H., and Berg, C. van den (2018). Multi-Product Microalgae Biorefineries: From Concept Towards Reality. *Trends in Biotechnology* *36*, 216–227.

Lang, K., and Schmid, F.X. (1988). Protein-disulphide isomerase and prolyl isomerase act differently and independently as catalysts of protein folding. *Nature* *331*, 453–455.

Ledford, H.K., Chin, B.L., and Niyogi, K.K. (2007). Acclimation to Singlet Oxygen Stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* *6*, 919–930.

Lee, J.J. (2006). Algal symbiosis in larger foraminifera. *Symbiosis (Rehovot)* *42*, 63–75.

Lee, J., Cho, D.-H., Ramanan, R., Kim, B.-H., Oh, H.-M., and Kim, H.-S. (2013). Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* *131*, 195–201.

Lewis, K. (2001). Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *45*, 999–1007.

Li, C., Zheng, C., Fu, H., Zhai, S., Hu, F., Naveed, S., Zhang, C., and Ge, Y. (2021). Contrasting detoxification mechanisms of *Chlamydomonas reinhardtii* under Cd and Pb stress. *Chemosphere* 129771.

Li, X., Shin, S., Heinen, S., Dill-Macky, R., Berthiller, F., Nersesian, N., Clemente, T., McCormick, S., and Muehlbauer, G.J. (2015). Transgenic Wheat Expressing a Barley UDP-Glucosyltransferase Detoxifies Deoxynivalenol and Provides High Levels of Resistance to *Fusarium graminearum*. *MPMI* *28*, 1237–1246.

Li, X., Michlmayr, H., Schweiger, W., Malachova, A., Shin, S., Huang, Y., Dong, Y., Wiesenberger, G., McCormick, S., Lemmens, M., et al. (2017). A barley UDP-glucosyltransferase inactivates nivalenol and provides Fusarium Head Blight resistance in transgenic wheat. *J Exp Bot* *68*, 2187–2197.

Li, X., Patena, W., Fauser, F., Jinkerson, R.E., Saroussi, S., Meyer, M.T., Ivanova, N., Robertson, J.M., Yue, R., Zhang, R., et al. (2019). A genome-wide algal mutant library and functional screen identifies genes required for eukaryotic photosynthesis. *Nat Genet* *51*, 627–635.

Long, J.D., Smalley, G.W., Barsby, T., Anderson, J.T., and Hay, M.E. (2007). Chemical cues induce consumer-specific defenses in a bloom-forming marine phytoplankton. *PNAS* *104*, 10512–10517.

Lőrincz, Z., Preininger, É., Kósa, A., Pónyi, T., Nyitrai, P., Sarkadi, L., Kovács, G.M., Böddi, B., and Gyurján, I. (2010). Artificial tripartite symbiosis involving a green alga (*Chlamydomonas*), a bacterium (*Azotobacter*) and a fungus (*Alternaria*): Morphological and physiological characterization. *Folia Microbiol* *55*, 393–400.

Low, Y.J., and Lau, S.W. (2017). Effective flocculation of *Chlorella vulgaris* using chitosan with zeta potential measurement. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* *206*, 012073.

Lowder, L.G., and Herbert, S.K. (2015). Heterologous expression of a *Volvox* cell adhesion molecule causes flocculation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Appl Phycol* *27*, 721–731.

Luck, M., and Hegemann, P. (2017). The two parallel photocycles of the *Chlamydomonas* sensory photoreceptor histidine kinase rhodopsin 1. *Journal of Plant Physiology* *217*, 77–84.

Lürling, M. (2021). Grazing resistance in phytoplankton. *Hydrobiologia* *848*, 237–249.

Lürling, M., and Beekman, W. (2006). Palmelloids formation in *Chlamydomonas reinhardtii*: defence against rotifer predators? *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* *42*, 65–72.

Lürling, M., and Van Donk, E. (1996). Zooplankton-induced unicell-colony transformation in *Scenedesmus acutus* and its effect on growth of herbivore *Daphnia*. *Oecologia* *108*, 432–437.

Lürling, M., and Van Donk, E. (1997). Morphological changes in *Scenedesmus* induced by infochemicals released in situ from zooplankton grazers. *Limnology and Oceanography* *42*, 783–788.

Lürling, M., and Van Donk, E. (2000). Grazer-Induced Colony Formation in *Scenedesmus*. Are There Costs to Being Colonial? *Oikos* *88*, 111–118.

Lürling, M., Lange, H.J.D., and Donk, E.V. (1997). Changes in food quality of the green alga *Scenedesmus* induced by *Daphnia* infochemicals: biochemical composition and morphology. *Freshwater Biology* *38*, 619–628.

Luxmi, R., Blaby-Haas, C., Kumar, D., Rauniyar, N., King, S.M., Mains, R.E., and Eipper, B.A. (2018). Proteases Shape the *Chlamydomonas* Secretome: Comparison to Classical Neuropeptide Processing Machinery. *Proteomes* 6.

Manoharan, M., Dahleen, L.S., Hohn, T.M., Neate, S.M., Yu, X.-H., Alexander, N.J., McCormick, S.P., Bregitzer, P., Schwarz, P.B., and Horsley, R.D. (2006). Expression of 3-OH trichothecene acetyltransferase in barley (*Hordeum vulgare* L.) and effects on deoxynivalenol. *Plant Science* 171, 699–706.

Marino-Puertas, L., Goulas, T., and Gomis-Rüth, F.X. (2017). Matrix metalloproteinases outside vertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864, 2026–2035.

Matsuda, Y., Koseki, M., Shimada, T., and Saito, T. (1995). Purification and characterization of a vegetative lytic enzyme responsible for liberation of daughter cells during the proliferation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 36, 681–689.

Mehrshahi, P., Nguyen, G.T.D.T., Gorchs Rovira, A., Sayer, A., Llaveró-Pasquina, M., Lim Huei Sin, M., Medcalf, E.J., Mendoza-Ochoa, G.I., Scaife, M.A., and Smith, A.G. (2020). Development of Novel Riboswitches for Synthetic Biology in the Green Alga *Chlamydomonas*. *ACS Synth. Biol.* 9, 1406–1417.

Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Maréchal-Drouard, L., et al. (2007). The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science* 318, 245–250.

Meslet-Cladière, L., and Vallon, O. (2011). Novel Shuttle Markers for Nuclear Transformation of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* 10, 1670–1678.

Mia, M.D., Lemaire, S.D., Choquet, Y., and Wollman, F.-A. (2019). Nitric Oxide Remodels the Photosynthetic Apparatus upon S-Starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 179, 718–731.

Michelet, L., Zaffagnini, M., Morisse, S., Sparla, F., Pérez-Pérez, M.E., Francia, F., Danon, A., Marchand, C., Fermani, S., Trost, P., et al. (2013). Redox regulation of the Calvin–Benson cycle: something old, something new. *Front. Plant Sci.* 4.

Michlmayr, H., Malachová, A., Varga, E., Kleinová, J., Lemmens, M., Newmister, S., Rayment, I., Berthiller, F., and Adam, G. (2015). Biochemical Characterization of a Recombinant UDP-glucosyltransferase from Rice and Enzymatic Production of Deoxynivalenol-3-*O*- β -d-glucoside. *Toxins (Basel)* 7, 2685–2700.

Miller, M.S., Esparza, J.M., Lippa, A.M., Lux, F.G., Cole, D.G., and Dutcher, S.K. (2005). Mutant Kinesin-2 Motor Subunits Increase Chromosome Loss. *MBoC* 16, 3810–3820.

Moharikar, S., D'Souza, J.S., Kulkarni, A.B., and Rao, B.J. (2006). Apoptotic-like cell death pathway is induced in unicellular chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) cells following UV irradiation: Detection and functional analyses. *Journal of Phycology* 42, 423–433.

Molina-Márquez, A., Vila, M., Vigarra, J., Borrero, A., and León, R. (2019). The Bacterial Phytoene Desaturase-Encoding Gene (*CRTI*) is an Efficient Selectable Marker for the Genetic Transformation of Eukaryotic Microalgae. *Metabolites* *9*.

Morisse, S., Zaffagnini, M., Gao, X.-H., Lemaire, S.D., and Marchand, C.H. (2014). Insight into protein S-nitrosylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Antioxid. Redox Signal.* *21*, 1271–1284.

Moulton, T., and Bell, D.G. (2013). Selecting for multicellularity in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *8, 9*.

Muhitch, M.J., McCormick, S.P., Alexander, N.J., and Hohn, T.M. (2000). Transgenic expression of the *TRI101* or *PDR5* gene increases resistance of tobacco to the phytotoxic effects of the trichothecene 4,15-diacetoxyscirpenol. *Plant Science* *157*, 201–207.

Neupert, J., Gallaher, S.D., Lu, Y., Strenkert, D., Segal, N., Barahimipour, R., Fitz-Gibbon, S.T., Schroda, M., Merchant, S.S., and Bock, R. (2020). An epigenetic gene silencing pathway selectively acting on transgenic DNA in the green alga *Chlamydomonas*. *Nature Communications* *11*, 6269.

O'Donnell, S., Chau, F., and Fischer, G. (2020). Highly Contiguous Nanopore Genome Assembly of *Chlamydomonas reinhardtii* CC-1690. *Microbiol Resour Announc* *9*.

Olson, B.J. (2013). From brief encounters to lifelong unions. *ELife* *2*.

Onishi, M., and Pringle, J.R. (2016). Robust Transgene Expression from Bicistronic mRNA in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* *6*, 4115–4125.

Ortega-Escalante, J.A., Kwok, O., and Miller, S.M. (2018). New Selectable Markers for *Volvox carteri* Transformation. *Protist* *170*, 52–63.

Oud, B., Guadalupe-Medina, V., Nijkamp, J.F., Ridder, D. de, Pronk, J.T., Maris, A.J.A. van, and Daran, J.-M. (2013). Genome duplication and mutations in *ACE2* cause multicellular, fast-sedimenting phenotypes in evolved *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* *110*, E4223–E4231.

Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., and Popovic, R. (2012). Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* *78*, 80–85.

Park, J.B.K., Craggs, R.J., and Shilton, A.N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* *102*, 35–42.

Patron, N.J., Orzaez, D., Marillonnet, S., Warzecha, H., Matthewman, C., Youles, M., Raitskin, O., Leveau, A., Farré, G., Rogers, C., et al. (2015). Standards for plant synthetic biology: a common syntax for exchange of DNA parts. *New Phytologist* *208*, 13–19.

Pennisi, E. (2009). On the Origin of Cooperation. *Science* *325*, 1196–1199.

Pennisi, E. (2010). *Volvox* Genome Shows It Doesn't Take Much to Be Multicellular. *Science* *329*, 128–129.

Pentz, J.T., Limberg, T., Beermann, N., and Ratcliff, W.C. (2015). Predator Escape: An Ecologically Realistic Scenario for the Evolutionary Origins of Multicellularity. *Evolution: Education and Outreach* *8*, 13.

Pentz, J.T., Márquez-Zacarías, P., Bozdog, G.O., Burnetti, A., Yunker, P.J., Libby, E., and Ratcliff, W.C. (2020). Ecological Advantages and Evolutionary Limitations of Aggregative Multicellular Development. *Current Biology* *30*, 4155–4164.e6.

Pérez-Pérez, M.E., Lemaire, S.D., and Crespo, J.L. (2016). Control of Autophagy in *Chlamydomonas* Is Mediated through Redox-Dependent Inactivation of the ATG4 Protease. *Plant Physiol* *172*, 2219–2234.

Pérez-Pérez, M.E., Couso, I., and Crespo, J.L. (2017). The TOR Signaling Network in the Model Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biomolecules* *7*, 54.

Picard-Bennoun, M., and Bennoun, P. (1985). Change in cytoplasmic ribosome properties during gametogenesis in the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Genetics* *9*, 239–243.

Pinto, F.L., Thapper, A., Sontheim, W., and Lindblad, P. (2009). Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria. *BMC Molecular Biol* *10*, 79.

Pollock, S.V., Prout, D.L., Godfrey, A.C., Lemaire, S.D., and Moroney, J.V. (2004). The *Chlamydomonas reinhardtii* proteins Ccp1 and Ccp2 are required for long-term growth, but are not necessary for efficient photosynthesis, in a low-CO₂ environment. *Plant Mol Biol* *56*, 125–132.

Pollock, S.V., Mukherjee, B., Bajsa-Hirschel, J., Machingura, M.C., Mukherjee, A., Grossman, A.R., and Moroney, J.V. (2017). A robust protocol for efficient generation, and genomic characterization of insertional mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Methods* *13*, 22.

Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glössl, J., Luschnig, C., and Adam, G. (2003). Detoxification of the *Fusarium* Mycotoxin Deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* *278*, 47905–47914.

Postma, M., and Goedhart, J. (2019). PlotsOfData—A web app for visualizing data together with their summaries. *PLOS Biology* *17*, e3000202.

Preininger, E., Pónyi, T., Sarkadi, L., Nyitrai, P., and Gyurján, I. (2006). Long-living *Azotobacter-Chlamydomonas* association as a model system for plant-microbe interactions. *SYMBIOSIS* *42*, 45–50.

Prochnik, S.E., Umen, J., Nedelcu, A.M., Hallmann, A., Miller, S.M., Nishii, I., Ferris, P., Kuo, A., Mitros, T., Fritz-Laylin, L.K., et al. (2010). Genomic Analysis of Organismal Complexity in the Multicellular Green Alga *Volvox carteri*. *Science* *329*, 223–226.

Pucciariello, C., Banti, V., and Perata, P. (2012). ROS signaling as common element in low oxygen and heat stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* *59*, 3–10.

Rajamani, S., Bauer, W.D., Robinson, J.B., Farrow, J.M., Pesci, E.C., Teplitski, M., Gao, M., Sayre, R.T., and Phillips, D.A. (2008). The Vitamin Riboflavin and Its Derivative Lumichrome Activate the LasR Bacterial Quorum-Sensing Receptor. *MPMI* *21*, 1184–1192.

Ramos-Martinez, E.M., Fimognari, L., and Sakuragi, Y. (2017). High-yield secretion of recombinant proteins from the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnology Journal* *15*, 1214–1224.

Ratcliff, W.C., Denison, R.F., Borrello, M., and Travisano, M. (2012). Experimental evolution of multicellularity. *PNAS* *109*, 1595–1600.

Ratcliff, W.C., Herron, M.D., Howell, K., Pentz, J.T., Rosenzweig, F., and Travisano, M. (2013). Experimental evolution of an alternating uni- and multicellular life cycle in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature Communications* *4*.

Ratcliff, W.C., Fankhauser, J.D., Rogers, D.W., Greig, D., and Travisano, M. (2015). Origins of multicellular evolvability in snowflake yeast. *Nature Communications* *6*, 1–9.

Remias, D., Lütz-Meindl, U., and Lütz, C. (2005). Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. *European Journal of Phycology* *40*, 259–268.

Rocuzzo, S., Couto, N., Karunakaran, E., Kapoore, R.V., Butler, T.O., Mukherjee, J., Hansson, E.M., Beckerman, A.P., and Pandhal, J. (2020). Metabolic Insights Into Infochemicals Induced Colony Formation and Flocculation in *Scenedesmus subspicatus* Unraveled by Quantitative Proteomics. *Front. Microbiol.* *11*.

Roehner, N., Beal, J., Clancy, K., Bartley, B., Misirli, G., Grünberg, R., Oberortner, E., Pocock, M., Bissell, M., Madsen, C., et al. (2016). Sharing Structure and Function in Biological Design with SBOL 2.0. *ACS Synth. Biol.* *5*, 498–506.

Roth, M.S., Cokus, S.J., Gallaher, S.D., Walter, A., Lopez, D., Erickson, E., Endelman, B., Westcott, D., Larabell, C.A., Merchant, S.S., et al. (2017). Chromosome-level genome assembly and transcriptome of the green alga *Chromochloris zofingiensis* illuminates astaxanthin production. *PNAS* *114*, E4296–E4305.

Salim, S., Bosma, R., Vermuë, M.H., and Wijffels, R.H. (2011). Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *J Appl Phycol* *23*, 849–855.

Salomé, P.A., and Merchant, S.S. (2019). A Series of Fortunate Events: Introducing *Chlamydomonas* as a Reference Organism. *The Plant Cell* *31*, 1682–1707.

Sathe, S., and Durand, P.M. (2016). Cellular aggregation in *Chlamydomonas* (Chlorophyceae) is chimaeric and depends on traits like cell size and motility. *European Journal of Phycology* *51*, 129–138.

Saur, I.M.L., and Hückelhoven, R. (2021). Recognition and defence of plant-infecting fungal pathogens. *Journal of Plant Physiology* *256*, 153324.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *Nat Methods* *9*.

Schmitt, M.E., Brown, T.A., and Trumppower, B.L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* *18*, 3091–3092.

Schnell, R.A., and Lefebvre, P.A. (1993). Isolation of the Chlamydomonas Regulatory Gene *NIT2* by Transposon Tagging. *Genetics* *134*, 737–747.

Schroda, M. (2019). Good News for Nuclear Transgene Expression in *Chlamydomonas*. *Cells* *8*, 1534.

Schweiger, W., Boddu, J., Shin, S., Poppenberger, B., Berthiller, F., Lemmens, M., Muehlbauer, G.J., and Adam, G. (2010). Validation of a Candidate Deoxynivalenol-Inactivating UDP-Glucosyltransferase from Barley by Heterologous Expression in Yeast. *MPMI* *23*, 977–986.

Shao, J., Wang, Z., Liu, Y., Liu, H., Peng, L., Wei, X., Lei, M., and Li, R. (2012). Physiological responses of *Microcystis aeruginosa* NIES-843 (cyanobacterium) under the stress of chitosan modified kaolinite (CMK) loading. *Ecotoxicology* *21*, 698–704.

Sharabi, Y., and Gilboa-Garber, N. (1980). Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* Hemagglutinins with *Euglena gracilis*, *Chlamydomonas reinhardtii*, and *Tetrahymena pyriformis*. *The Journal of Protozoology* *27*, 80–83.

Shaw, P.E. (2007). Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases and transcription: is there a twist in the tail? *EMBO Reports* *8*, 40–45.

Shin, S., Torres-Acosta, J.A., Heinen, S.J., McCormick, S., Lemmens, M., Paris, M.P.K., Berthiller, F., Adam, G., and Muehlbauer, G.J. (2012). Transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing a barley UDP-glucosyltransferase exhibit resistance to the mycotoxin deoxynivalenol. *J Exp Bot* *63*, 4731–4740.

Sizova, I., Fuhrmann, M., and Hegemann, P. (2001). A *Streptomyces rimosus aphVIII* gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene* *277*, 221–229.

Sizova, I.A., Lapina, T.V., Frolova, O.N., Alexandrova, N.N., Akopiants, K.E., and Danilenko, V.N. (1996). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with a *Streptomyces rimosus* gene as the selective marker. *Gene* *181*, 13–18.

Smukalla, S., Caldara, M., Pochet, N., Beauvais, A., Guadagnini, S., Yan, C., Vinces, M.D., Jansen, A., Prevost, M.C., Latgé, J.-P., et al. (2008). *FLO1* Is a Variable Green Beard Gene that Drives Biofilm-like Cooperation in Budding Yeast. *Cell* *135*, 726–737.

Soriano-Jerez, Y., López-Rosales, L., Cerón-García, M.C., Sánchez-Mirón, A., Gallardo-Rodríguez, J.J., García-Camacho, F., and Molina-Grima, E. (2020). Long-term biofouling formation mediated by extracellular proteins in *Nannochloropsis gaditana* microalga cultures at different medium N/P ratios. *Biotechnol Bioeng.*

Stevens, D.R., Purton, S., and Rochaix, J.-D. (1996). The bacterial pleuromycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Molec. Gen. Genet.* *251*, 23–30.

Stratford, M., and Keenan, M.H.J. (1988). Yeast flocculation: Quantification. *Yeast* *4*, 107–115.

Sumper, M., Berg, E., Wenzl, S., and Godl, K. (1993). How a sex pheromone might act at a concentration below 10^{-16} M. *EMBO J* *12*, 831–836.

Suzuki, T., and Iwahashi, Y. (2015). Low Toxicity of Deoxynivalenol-3-Glucoside in Microbial Cells. *Toxins* *7*, 187–200.

Suzuki, L., Woessner, J.P., Uchida, H., Kuroiwa, H., Yuasa, Y., Waffenschmidt, S., Goodenough, U.W., and Kuroiwa, T. (2000). A Zygote-Specific Protein with Hydroxyproline-Rich Glycoprotein Domains and Lectin-Like Domains Involved in the Assembly of the Cell Wall of *Chlamydomonas reinhardtii* (chlorophyta). *Journal of Phycology* *36*, 571–583.

Tabatabaei, I., Dal Bosco, C., Bednarska, M., Ruf, S., Meurer, J., and Bock, R. (2019). A highly efficient sulfadiazine selection system for the generation of transgenic plants and algae. *Plant Biotechnol J* *17*, 638–649.

Tanford, C., and Hauenstein, J.D. (1956). Hydrogen Ion Equilibria of Ribonuclease. *J. Am. Chem. Soc.* *78*, 5287–5291.

Tardif, M., Atteia, A., Specht, M., Cogne, G., Rolland, N., Brugière, S., Hippler, M., Ferro, M., Bruley, C., Peltier, G., et al. (2012). PredAlgo: A New Subcellular Localization Prediction Tool Dedicated to Green Algae. *Molecular Biology and Evolution* *29*, 3625–3639.

Tebo, A.G., and Gautier, A. (2019). A split fluorescent reporter with rapid and reversible complementation. *Nat Commun* *10*.

Teplitski, M., Chen, H., Rajamani, S., Gao, M., Merighi, M., Sayre, R.T., Robinson, J.B., Rolfe, B.G., and Bauer, W.D. (2004). *Chlamydomonas reinhardtii* Secretes Compounds That Mimic Bacterial Signals and Interfere with Quorum Sensing Regulation in Bacteria. *Plant Physiology* *134*, 137–146.

Theuerkorn, M., Fischer, G., and Schiene-Fischer, C. (2011). Prolyl cis/trans isomerase signalling pathways in cancer. *Current Opinion in Pharmacology* *11*, 281–287.

Tran, D., Galletti, R., Neumann, E.D., Dubois, A., Sharif-Naeini, R., Geitmann, A., Frachisse, J.-M., Hamant, O., and Ingram, G.C. (2017). A mechanosensitive Ca^{2+} channel activity is dependent on the developmental regulator DEK1. *Nature Communications* *8*, 1009.

Tsiatsiani, L., Van Breusegem, F., Gallois, P., Zavialov, A., Lam, E., and Bozhkov, P.V. (2011). Metacaspases. *Cell Death Differ* *18*, 1279–1288.

Vijayaraghavareddy, P., Adhinarayanreddy, V., Vemanna, R.S., Sreeman, S., and Makarla, U. (2017). Quantification of Membrane Damage/Cell Death Using Evan's Blue Staining Technique. *Bio-Protocol* *7*, e2519–e2519.

Vilarrasa-Blasi, J., Fauser, F., Onishi, M., Ramundo, S., Patena, W., Millican, M., Osaki, J., Philp, C., Nemeth, M., Salomé, P.A., et al. (2020). Systematic characterization of gene function in a photosynthetic organism. *BioRxiv* 2020.12.11.420950.

Wakabayashi, K., Misawa, Y., Mochiji, S., and Kamiya, R. (2011). Reduction-oxidation poise regulates the sign of phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PNAS* *108*, 11280–11284.

Wakao, S., Chin, B.L., Ledford, H.K., Dent, R.M., Casero, D., Pellegrini, M., Merchant, S.S., and Niyogi, K.K. (2014). Phosphoprotein SAK1 is a regulator of acclimation to singlet oxygen in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Elife* *3*, e02286.

Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., and Marillonnet, S. (2011). A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. *PLoS ONE* *6*, e16765.

West, S.A., Cooper, G.A., Ghoul, M.B., and Griffin, A.S. (2021). Ten recent insights for our understanding of cooperation. *Nature Ecology & Evolution* 1–12.

Wetterhorn, K.M., Gabardi, K., Michlmayr, H., Malachova, A., Busman, M., McCormick, S.P., Berthiller, F., Adam, G., and Rayment, I. (2017). Determinants and Expansion of Specificity in a Trichothecene UDP-Glucosyltransferase from *Oryza sativa*. *Biochemistry* *56*, 6585–6596.

Whiteley, M., Diggle, S.P., and Greenberg, E.P. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* *551*, 313–320.

Wickham, H. (2011). ggplot2. *WIREs Computational Statistics* *3*, 180–185.

Winters, M., Arneborg, N., Appels, R., and Howell, K. (2019). Can community-based signalling behaviour in *Saccharomyces cerevisiae* be called quorum sensing? A critical review of the literature. *FEMS Yeast Research* *19*.

Wood, C.R., and Rosenbaum, J.L. (2015). Ciliary Ectosomes: transmissions from the cell's antenna. *Trends Cell Biol* *25*, 276–285.

Wood, C.R., Huang, K., Diener, D.R., and Rosenbaum, J.L. (2013). The Cilium Secretes Bioactive Ectosomes. *Current Biology* *23*, 906–911.

Wu, Y.-R., Lin, Y.-C., and Chuang, H. (2016). Laminarin modulates the chloroplast antioxidant system to enhance abiotic stress tolerance partially through the regulation of the defensin-like gene expression. *Plant Science* *247*, 83–92.

Yamashita, S., Arakaki, Y., Kawai-Toyooka, H., Noga, A., Hirono, M., and Nozaki, H. (2016). Alternative evolution of a spheroidal colony in volvocine algae: developmental analysis of embryogenesis in *Astrephomene* (Volvocales, Chlorophyta). *BMC Evolutionary Biology* *16*, 243.

Yang, F., Xiang, W., Fan, J., Wu, H., Li, T., and Long, L. (2016). High pH-induced flocculation of marine *Chlorella* sp. for biofuel production. *J Appl Phycol* *28*, 747–756.

Yang, X., Peng, J., and Pan, J. (2019). Nourseothricin N-acetyl transferase (NAT), a new selectable marker for nuclear gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant Methods* *15*, 140.

Yasuda, T., Takeshita, H., Iida, R., Ueki, M., Nakajima, T., Kaneko, Y., Mogi, K., Kominato, Y., and Kishi, K. (2004). A single amino acid substitution can shift the optimum pH of DNase I for enzyme activity: biochemical and molecular analysis of the piscine DNase I family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* *1672*, 174–183.

Zhang, B., Guo, Y., Lens, P.N.L., Zhang, Z., Shi, W., Cui, F., and Tay, J.H. (2019). Effect of light intensity on the characteristics of algal-bacterial granular sludge and the role of N-acetyl-homoserine lactone in the granulation. *Science of The Total Environment* *659*, 372–383.

Zhu, X., Wang, J., Lu, Y., Chen, Q., and Yang, Z. (2015). Grazer-induced morphological defense in *Scenedesmus obliquus* is affected by competition against *Microcystis aeruginosa*. *Scientific Reports* *5*, 12743.

Zschiedrich, C.P., Keidel, V., and Szurmant, H. (2016). Molecular mechanisms of two-component signal transduction. *J Mol Biol* *428*, 3752–3775.

Annexes

1 Analyse protéomique

Protéines sur- ou sous-représentées dans le milieu de 6 ou 5 mutants *saz* (se référer à 2.1.2).

2 Analyse RNA-Seq

Transcrits dérégulés chez 6 ou 5 mutants *saz* (se référer à 2.1.2).

3 Birth of a Photosynthetic Chassis: A MoClo Toolkit Enabling Synthetic Biology in the Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

Cre09.g401900.t1	Unknown protein
Cre12.g513350.t1	Unknown, Insulin-like growth factor binding protein, N-terminal, Secretory P
Cre16.g693300.t1	Unknown, Secretory
Cre12.g493750.t1	Unknown, Secretory Pathway
Cre02.g113626.t1	Unknown, Secretory Pathway

Birth of a Photosynthetic Chassis: A MoClo Toolkit Enabling Synthetic Biology in the Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

Pierre Crozet,^{†,¶,Ⓜ} Francisco J. Navarro,^{‡,¶,Ⓜ} Felix Willmund,^{§,¶,Ⓜ} Payam Mehrshahi,^{‡,¶,Ⓜ} Kamil Bakowski,^{||} Kyle J. Lauersen,[⊥] Maria-Esther Pérez-Pérez,[#] Pascaline Auroy,[∇] Aleix Gorchs Rovira,[‡] Susana Sauret-Gueto,[‡] Justus Niemeyer,[§] Benjamin Spaniol,[§] Jasmine Theis,[§] Raphael Trösch,[§] Lisa-Desiree Westrich,[§] Konstantinos Vavitsas,^{||,Ⓜ,Ⓜ} Thomas Baier,[⊥] Wolfgang Hübner,[⊥] Felix de Carpentier,[†] Mathieu Cassarini,[†] Antoine Danon,[†] Julien Henri,[†] Christophe H. Marchand,[†] Marcello de Mia,[†] Kevin Sarkissian,[†] David C. Baulcombe,[‡] Gilles Peltier,[∇] José-Luis Crespo,[#] Olaf Kruse,^{⊥,Ⓜ} Poul-Erik Jensen,^{||,Ⓜ} Michael Schroda,^{*,§} Alison G. Smith,^{*,‡,Ⓜ} and Stéphane D. Lemaire^{*,†}

[†]Institut de Biologie Physico-Chimique, UMR 8226, CNRS, Sorbonne Université, Paris, France

[‡]Department of Plant Sciences, University of Cambridge, Cambridge, CB2 3EA, U.K.

[§]Department of Biology, Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern, 67663, Germany

^{||}Copenhagen Plant Science Centre, Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

[⊥]Faculty of Biology, Center for Biotechnology (CeBiTec), Bielefeld University, Bielefeld, 33615, Germany

[#]Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC-Universidad de Sevilla, Sevilla, 41092, Spain

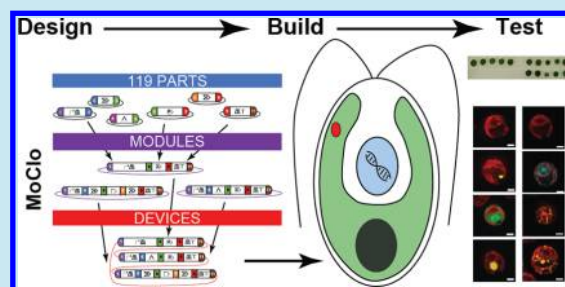
[∇]Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues Cadarache, Aix Marseille University, CEA, CNRS, BIAM, Saint Paul-Lez-Durance, France

[Ⓜ]Biomolecular Photonics, Department of Physics, Bielefeld University, Bielefeld, 33615, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: Microalgae are regarded as promising organisms to develop innovative concepts based on their photosynthetic capacity that offers more sustainable production than heterotrophic hosts. However, to realize their potential as green cell factories, a major challenge is to make microalgae easier to engineer. A promising approach for rapid and predictable genetic manipulation is to use standardized synthetic biology tools and workflows. To this end we have developed a Modular Cloning toolkit for the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. It is based on Golden Gate cloning with standard syntax, and comprises 119 openly distributed genetic parts, most of which have been functionally validated in several strains. It contains promoters, UTRs, terminators, tags, reporters, antibiotic resistance genes, and introns cloned in various positions to allow maximum modularity. The toolkit enables rapid building of engineered cells for both fundamental research and algal biotechnology. This work will make *Chlamydomonas* the next chassis for sustainable synthetic biology.

KEYWORDS: algal biotechnology, *Chlamydomonas reinhardtii*, modular cloning, synthetic biology



There is an urgent need to decarbonize the world economy due to depletion of fossil fuel reserves coupled with accumulation of greenhouse gases produced by their combustion. One alternative to the use of fossil fuels is to use photosynthetic microorganisms, such as microalgae, as green cell factories to produce fuels and chemicals from atmospheric CO₂ in a sustainable process driven by sunlight.^{1,2} The fixed carbon can be redirected toward compounds that can be used in the fuel, food, cosmetic, and pharmaceutical industries, such as proteins, alcohols, alkanes, lipids, sugars,

pigments or terpenes.^{3–5} By contrast with land plant-based photoproduction, microalgae do not compete with agriculture and can be grown at high yields even at large scale,^{4,6} including on waste streams, thus minimizing inputs.³ The green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (referred to hereafter as “*Chlamydomonas*”) has been extensively engineered for basic research and industrial biotechnology.^{4,6–8} Its nuclear and

Received: June 11, 2018

Published: August 30, 2018

organellar genomes are sequenced and annotated, molecular biology techniques and culture conditions are highly developed, and its physiology and metabolism are well understood.^{9–13} Moreover, the metabolic plasticity and cellular compartments of *Chlamydomonas* offer great potential for advanced metabolic engineering strategies.^{14,15} *Chlamydomonas* has already been engineered for production of the biodiesel precursor bisabolene,⁸ the terpene patchoulol,⁷ and recombinant proteins as well as enzymes such as an HIV antigen¹⁶ and xylanase.¹⁷ Despite these proofs of concept, however, the engineering of *Chlamydomonas* is still slow owing to a lack of standardized resources and tools.¹¹ Development of the field of algal synthetic biology offers the means to enable design and construction of microalgal cells with defined and predictable properties.¹⁸ Besides biotechnological applications, the transition from empirical to synthetic approaches also provides the opportunity to answer fundamental biological questions using new concepts and approaches based on understanding by construction rather than deconstruction.

Synthetic biology approaches, predicated on the Design–Build–Test–Learn cycle,¹⁹ make organisms easier to engineer through the use of standardized parts and their assembly to simplify the building of designed DNA molecules.¹⁹ Among available standards,²⁰ the Golden Gate Modular Cloning (MoClo) technology, based on Type IIS restriction enzymes, offers extensive standardization and allows the assembly of complex multigenic DNA from basic gene parts (e.g., promoters, CDS, terminators) in just two steps.^{21,22} The method accelerates and multiplies the possibilities to permute multiple genetic elements, and makes facile the building of multigene constructs for full metabolic pathways.²³ MoClo is efficient and versatile, but relies on the intensive upfront generation of a standardized library of basic building blocks, the gene parts, that have been domesticated to remove Type IIS sites, and codon optimized for the host as appropriate. MoClo toolkits have already been developed for a few model organisms^{24–29} although not yet for microalgae.

Here, we report the generation of a MoClo toolkit composed of more than 100 gene parts codon-optimized for the *Chlamydomonas* nuclear genome. These genetic parts were designed to provide maximum modularity to end-users, and to facilitate the development of engineered strains for fundamental and green biotechnological applications, through iterative design and testing. We provide functional validation and characterization of many gene parts in several *Chlamydomonas* strains. This kit is available to the community, to allow *Chlamydomonas* to become the next chassis for sustainable synthetic biology approaches.

RESULTS

Standard and Content of the *Chlamydomonas* MoClo Kit. Standardization is the key to efficient building. The *Chlamydomonas* MoClo kit adopts the syntax proposed by the plant synthetic biology community including the OpenPlant Consortium³⁰ (Figure 1). This syntax is defined for level 0 plasmids containing standard gene parts (promoters, coding sequences, untranslated regions, etc.) and assigns strict fusion sites for 10 cloning positions. In a single step, standardized parts can be assembled into modules (Transcriptional Unit, TU, level 1) and modules into devices (multigenic construct, level M or 2) according to the original MoClo syntax²² (Supplementary Figure 1). Our *Chlamydomonas* MoClo toolkit is composed of a set of 119 parts representing

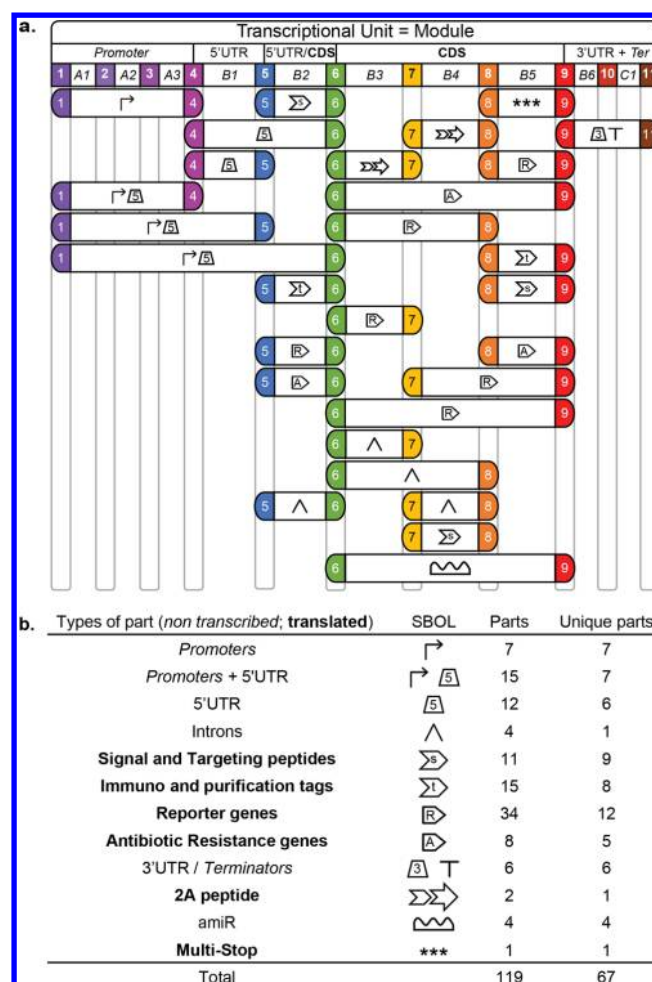


Figure 1. Overview of the *Chlamydomonas* MoClo toolkit. (a) Type and position of parts used following the Plant MoClo Syntax.³⁰ Symbols correspond to the SBOL2.0 visual⁶⁹ representation described in part b. Each of the 11 fusion sites defining a part position is represented with a color and a number. Positions presented are representative of the whole set of each part type. Parts in italicized letters are nontranscribed, parts in regular letters are transcribed, and parts in bold letters are transcribed and translated. (b) Table summarizing unique and total gene parts available. The SBOL2.0 symbols are indicated for each type. When the SBOL2.0 standard was not existing for a part type, the symbol proposed in a previous work²⁸ was used, or defined here.

67 unique genetic elements available at different positions within the standard, thereby providing maximum modularity to designers (Figure 1, Figure 2). The kit recapitulates most of the standard genetic elements previously developed for *Chlamydomonas* which we “domesticated” by removing *BpiI* and *BsaI* restriction sites (the two enzymes used by the MoClo strategy,²² Supplementary Figure 1) from their sequences by DNA synthesis or PCR-based mutagenesis. The available gene parts encompass seven promoters coupled or not to their original 5'UTR, the corresponding 5'UTR, and the *CrTHI4* riboswitch, eight immunological or purification tags in positions leading to N- or C-terminal translational fusions, nine signal and targeting peptides, 12 reporters, five antibiotic resistance genes, the foot and mouth virus (FMDV) 2A peptide which allows expression of two or more proteins from a single transcriptional unit,^{17,31,32} two micro RNA (miRNA) backbones and associated controls, and six 3'UTR-terminators

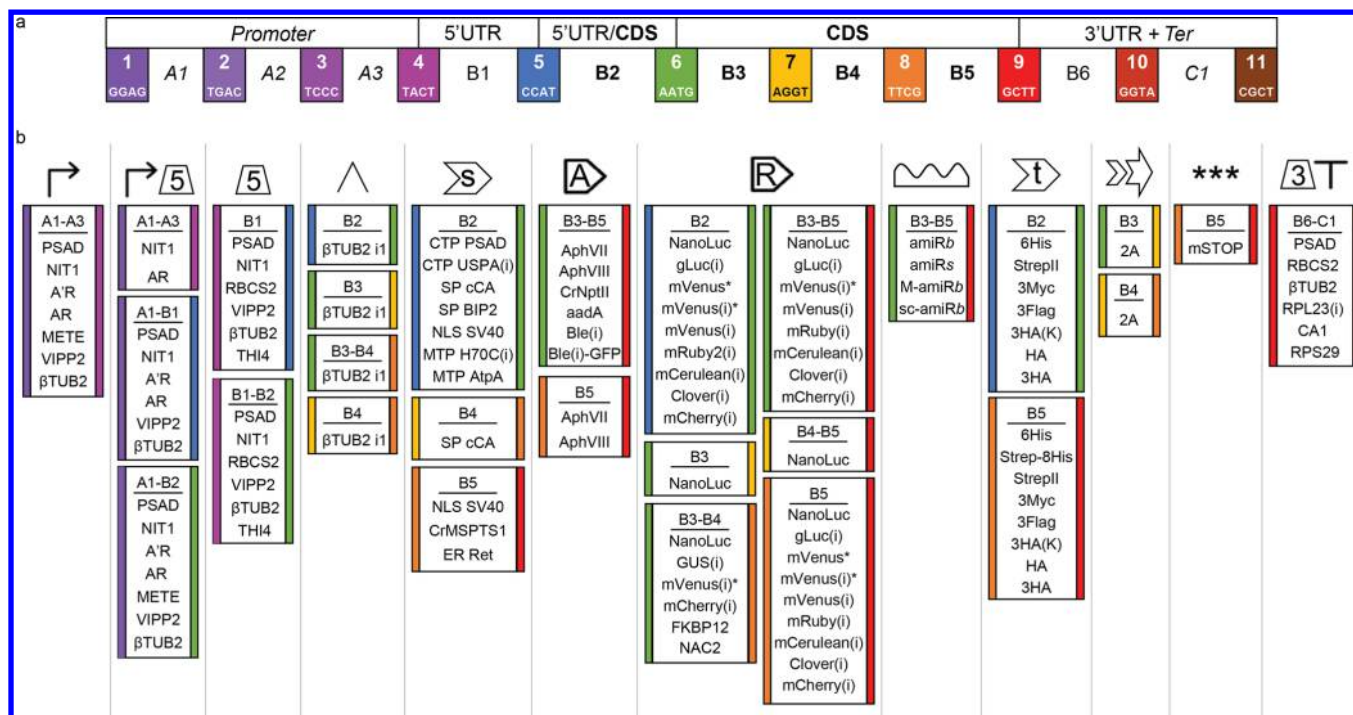


Figure 2. List of parts in function of their type and assembly position. (a) Plant MoClo syntax³⁰ indicating the color code for fusion sites used in this figure. (b) All parts in the Chlamydomonas MoClo kit are classified primarily by their function, indicated by SBOL2.0 visual code⁶⁹ as in Figure 1 (from left to right: promoters, promoter+5'UTR, 5'UTR, introns, antibiotic resistance genes, reporter genes, artificial microRNA, immunological and purification tags, 2A peptide, and 3'UTR+terminators). Colored stripes on the left and right sides of each box represent the fusion sites in 5' and 3' of the position, respectively, and follow the color code on top. AR and A'R stand for HSP70A/RBCS2 and HSP70A467/RBCS2, respectively.³⁶ A star (*) indicates that the part contains extra restriction sites as in pOpt vectors⁶⁸ while the same part unmarked does not. An (i) indicates the presence of an intron within the part (cf. Supplementary Table 2). For amiRNA (amiR) backbones, *b* and *s* mean that *BpiI* and *SpeI* site are within the backbone for amiR cloning, respectively, while *M* and *sc* mean that the target amiR sequence for MAA7 and the control scrambled sequence were introduced into the miR1157 backbone, respectively (cf. Figure 4). mSTOP stands for multi-STOP.

(Figure 1b, Figure 2, and Supplementary Table 1). All sequences and plasmids are available through the public Addgene repository (<http://www.addgene.org/>).

Constitutive Promoters and Reporter Genes. Five antibiotic resistance genes are used as selectable markers for Chlamydomonas but also can function as reporter genes.^{33,34} We assembled three modules that allow control of the expression of the *aadA* gene, conferring spectinomycin resistance, by three constitutive promoters: P_{PSAD} and $P_{\beta TUB2}$ with or without the first intron of $\beta TUB2$ (pCM1-1 to 3, Supplementary Table 3). The transformation efficiency of the three modules in UVM4³⁵ cells was estimated by counting spectinomycin resistant colonies and showed resistance frequencies within the same range (Figure 3a). The presence of the first $\beta TUB2$ intron significantly increased the transformation efficiency as previously observed with the presence of RBCS2 introns in the *ble* marker.^{33,36,37} Alternative reporters are bioluminescent proteins, which allow more sensitive and quantitative analysis of gene expression. The kit contains *Gaussia princeps* luciferase, the brightest luciferase established in Chlamydomonas,³⁸ as well as the redesigned NanoLuciferase (NanoLuc) which provides a stable and strong luminescence signal.³⁹ Chlamydomonas NanoLuc was specifically developed for our MoClo kit through recoding to match the codon bias of Chlamydomonas, and cloned at six different positions within the standard. This new part was first tested with the most widely used promoter/terminator combination (P_{AR} promoter/ T_{RBCS2} terminator) for strong constitutive expression in Chlamydomonas. The corresponding module (pCM1-04)

was assembled with another module conferring paromomycin resistance (Supplementary Figure 2) into a device (pCMM-1) that was introduced into the genome of the D66 strain (CC-4425, Figure 3b). Among paromomycin resistant colonies, $34.8\% \pm 8.3$ ($N = 48$, mean \pm SEM) were luminescent. The signal was variable between clones due to genomic position effects^{40,41} but was linear from 50 to 5×10^5 cells (Figure 3b and Supplementary Figure 2). By contrast, nonexpressing transformants (resistant to paromomycin only) or the D66 recipient strain displayed only a faint signal, 3 orders of magnitude lower, and saturating swiftly (Figure 3b, inset). The modularity of the MoClo strategy allows rapid assessment of combinations of multiple parts. For example, we assembled four modules for which NanoLuc expression is controlled by all possible combinations of the two most common constitutive promoters (P_{AR} and P_{PSAD}) and terminators (T_{RBCS2} and T_{PSAD}) (Figure 3b, pCM1-4 to 7, Supplementary Table 3). Each module was assembled with the paromomycin resistance module (pCMM-1 to 4, Supplementary Table 4) and introduced into the Chlamydomonas genome. Bioluminescence levels were averaged over hundreds of transformants to account for the genome position effect.^{40,41} The strengths of the two promoters were found to be comparable, while T_{PSAD} appeared to confer robust expression from both promoters, 10-fold higher than T_{RBCS2} (Figure 3c). In a distinct context (strain, reporter sequence, culture conditions, etc.), the same genetic element may perform differently.^{31,35} Such context sensitivity can be overcome by taking advantage of the modularity of the Chlamydomonas MoClo kit, which

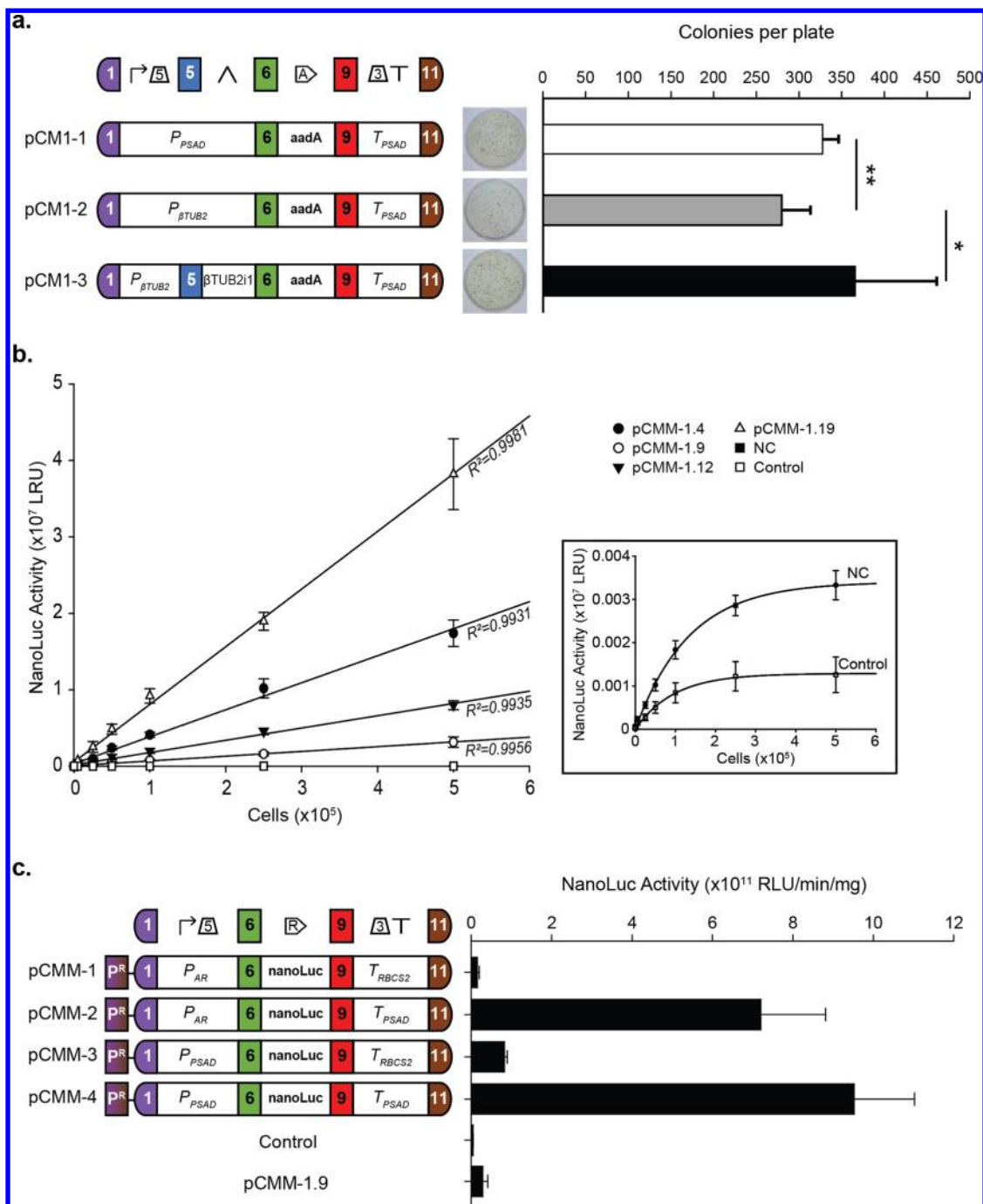


Figure 3. Constitutive promoters and reporter genes. (a) Average number of spectinomycin resistant colonies after transformation of UVM4 cells (mean \pm SD, $N = 11$) for the three modules (pCM1-3, where pCM stands for plasmid *Chlamydomonas* MoClo). Representative transformation plates are shown. (b) Linearity of NanoLuc activity as a function of cell number. NanoLuc activity for four independent clones transformed with the pCMM-1 device (pCMM-1.X), one nonexpressing clone (NC) and the recipient strain (CC-4425 noted as control) are presented ($N = 3$, mean \pm SEM). Linear regression and correlation coefficient (R^2) are shown. The NC and control are shown in the inset on a different scale. (c) Average NanoLuc activity of D66 (CC-4425) cells transformed with four devices (pCMM-1 to 4) harboring promoter/terminator combinations to drive NanoLuc expression coupled to a paromomycin resistance module (represented as P^R , left, Supplementary Figure 2). Luminescence levels are represented as mean \pm SEM (average of a total of more than 400 clones from three biological replicates). The negative and positive controls are the recipient strain and the pCMM-1.9 strain (shown in panel b), respectively. (a,c) $*p < 0.05$; $**p < 0.01$ assessed by Student's t test, SBOL2.0⁶⁹ visual of module designs are shown above the devices.

allows for the rapid characterization of all possible parts combinations. These results also confirmed the performance of the *Chlamydomonas* NanoLuc reporter and its employability for detailed understanding and characterization of genetic

circuits especially if coupled with automated cell-sorting microfluidic devices.⁴²

Control of Gene Expression. To build genetic circuits, the fine-tuning of gene expression is a prerequisite. Multiple parts enabling controlled gene expression have therefore been

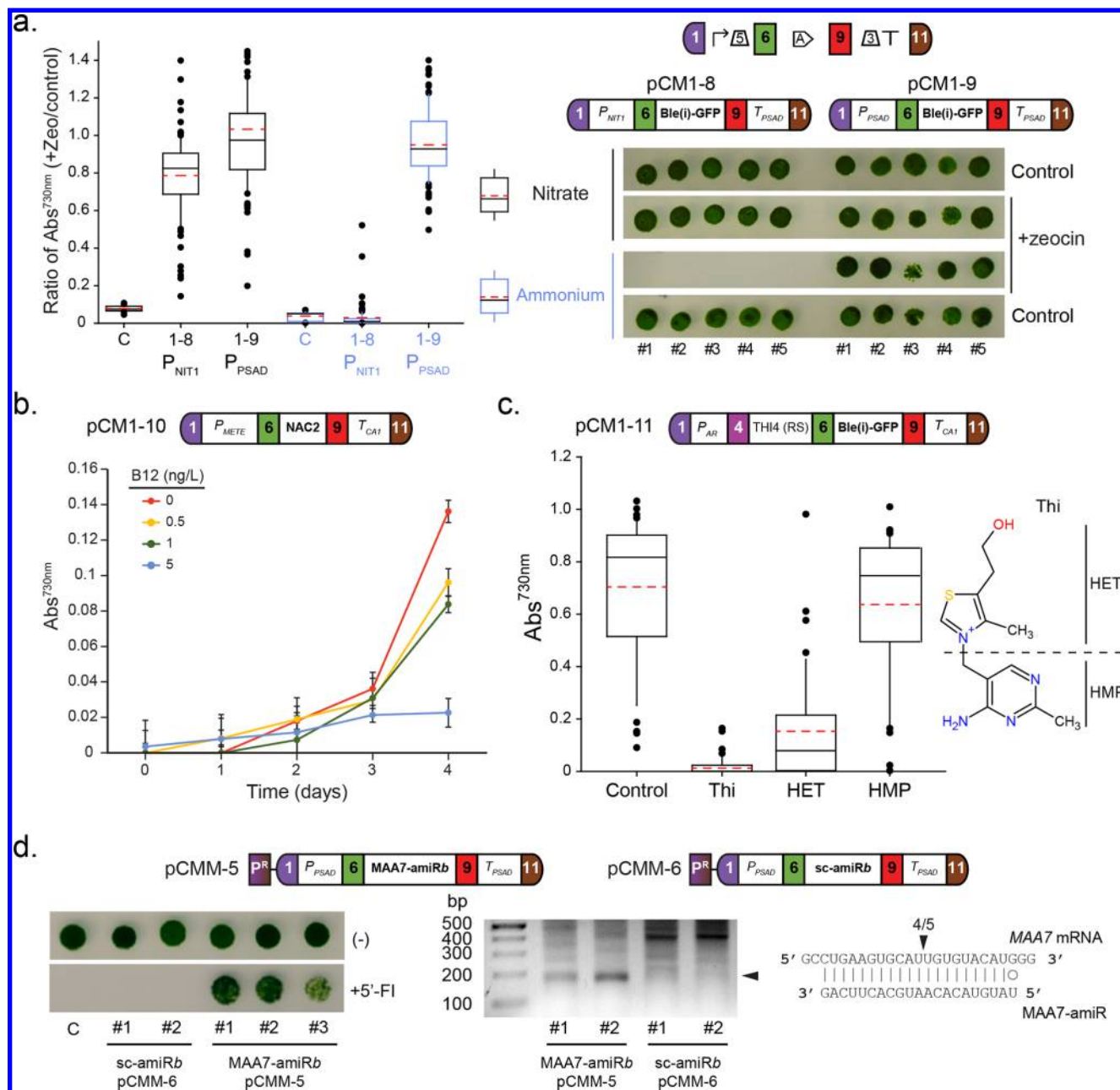


Figure 4. Control of gene expression. (a) Control of gene expression by the nitrogen source. Zeocin resistant colonies (conferred by *Ble(i)-GFP*) selected after transformation of CC-1690 cells with each of the two represented modules (“1-8” for pCM1-8 and “1-9” for pCM1-9) were grown in TAP-nitrogen \pm zeocin (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) supplemented with either 7.5 mM (NH_4Cl (ammonium, blue) or 4 mM KNO_3 (nitrate, black) and their growth was followed (absorbance at 730 nm). The plot shows the ratio between the growth in the presence and absence of zeocin (C is the nontransformed CC-1690 strain). The right panel shows cells grown in similar conditions but on solid media. Results presented ($N = 16$ for control CC-1690 and $N = 86$ for each other conditions) correspond to one out of three independent transformations (for the other two, see [Supplementary Figure 3](#)). (b) Control of gene expression by vitamin B₁₂. Conditional complementation of *nac2-26* cells with the pCM1-10 module expressing *NAC2* under P_{METE} control. Complemented strains were selected for photoautotrophic growth on solid minimal medium and the cells were grown in liquid minimal medium supplemented with the indicated amount of vitamin B₁₂. Data are mean \pm SD ($N = 3$). (c) Control of gene expression by vitamin B₁. Average growth (absorbance at 730 nm after 7 days of growth, $N = 40$) of UVM4 cells transformed with the pCM1-11 module designed to express constitutively *Ble(i)-GFP* transcripts containing the *THI4* riboswitch in the 5'UTR. After culture in TAP, the cells were transferred to TAP+zeocin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) supplemented with 10 μM thiamine (Thi), 10 μM 4-methyl-5-(2-hydroxyethyl) thiazole (HET), or 10 μM 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine (HMP) or not (control). The chemical structure of Thi is represented on the right and the HET and HMP moieties are indicated (see also [Supplementary Figure 3](#)). (d) Targeted gene knockdown with artificial miRNA. Paromomycin resistant cells selected after transformation of CC-1690 cells by each of the two represented devices (pCMM-5 and pCMM-6), carrying an amiRNA cloned with *BpiI* and directed against *MAA7* (*MAA7-amiRb*) or a random sequence (“scrambled”: *sc-amiRb*), were grown in the absence (denoted (-)) or presence of 5'-fluoroindole (+5'-FI) (left panel). Clones resistant to 5'-FI were analyzed by a modified 5'-RACE assay. A specific 173 bp PCR band (black arrowhead) was amplified only from the 5'-FI resistant transformants and not from ones expressing the amiRNA with scrambled sequence (middle panel and [Supplementary Figure 3](#)). Sequencing revealed that the most frequent cleavage occurred at positions opposed to positions 10 and 11 of the amiRNA (right panel, black arrowhead). P^R represents the paromomycin resistance module

Figure 4. continued

(pCM1-27, Supplementary Figure 2a). (a,c) The box and whisker plots show the 10th (lower whisker), 25th (base of box), 75th (top of box), and 90th (top whisker) percentiles. The line within the box is the median, the dashed red line is the mean. Outliers are plotted as individual data points.

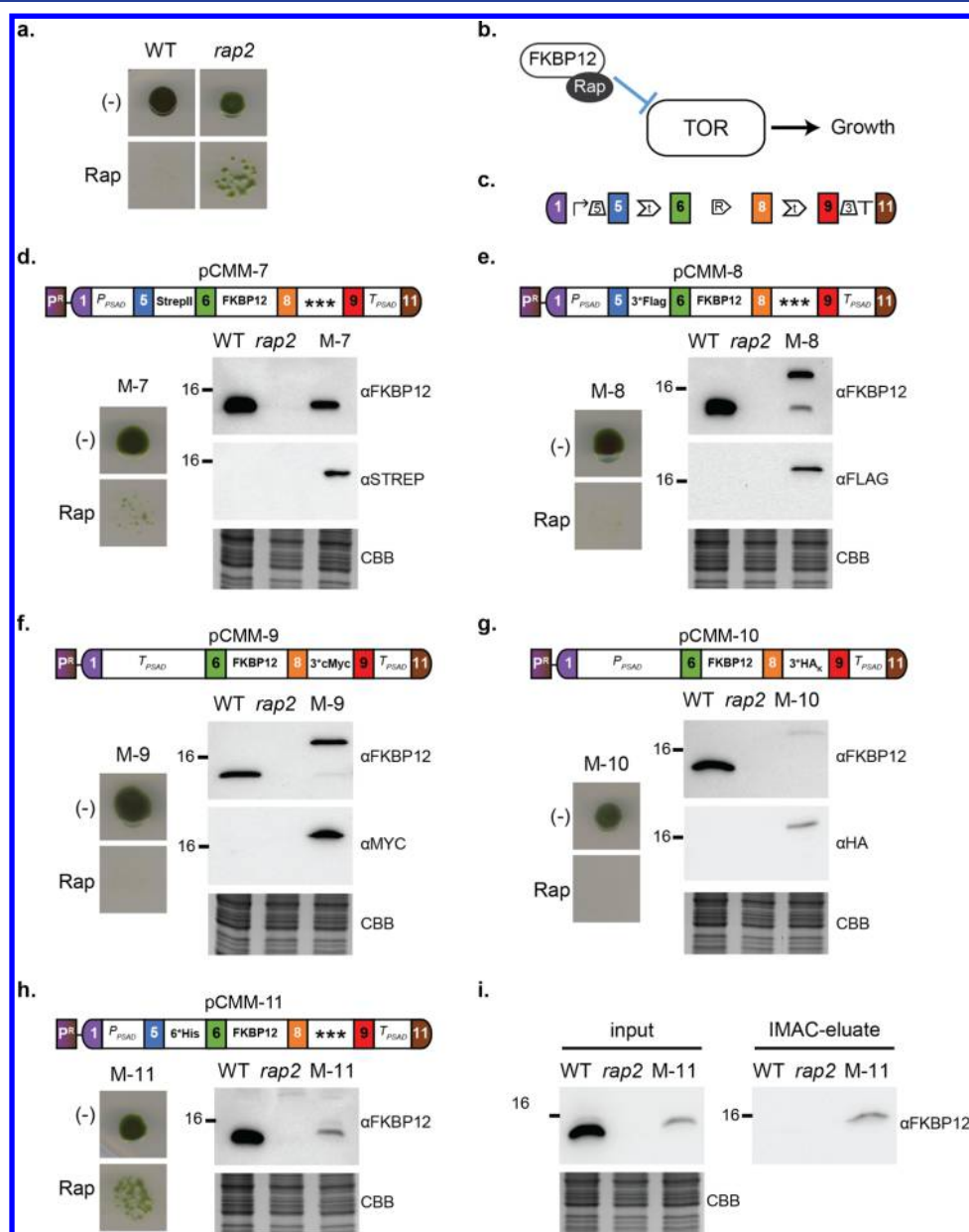


Figure 5. Design, build, and test of five fusion tags. (a) Phenotype of recipient (WT) and Δ FKBP12 (*rap2*) strains in the presence (Rap) or absence (-) of 1 μ M rapamycin. (b) Molecular mechanism underlying the *rap2* phenotype. Target Of Rapamycin (TOR) is inhibited by rapamycin only in the presence of FKBP12 (mutated in *rap2*). Upon formation of the tripartite TOR/FKBP12/rapamycin complex, TOR is inhibited and growth is arrested.⁵² (c) SBOL2.0 visual⁶⁹ of module designs for functional complementation of *rap2*. (d-h) Phenotype in the presence (Rap) or absence (-) of 1 μ M rapamycin and detection of tagged proteins in soluble extracts by immunoblotting with antibodies against either FKBP12 (α FKBP12) or the appropriate tag (indicated within each panel). Each device is indicated in the upper part of the panel. CBB: Coomassie Brilliant Blue staining of a duplicate gel loaded with the same samples and shown as loading control. (i) Purification through ion-metal affinity chromatography (IMAC) of 6His-FKBP12 expressed from the same device as in panel h. P^R represents the paromomycin resistance module (pCM1-27, Supplementary Figure 2a). *rap2* cells transformed with pCMM-X are indicated as M-X in each panel. Data are representative of three biological replicates.

implemented. The activity of the P_{NIT1} promoter can be controlled by switching the nitrogen source since it is strongly repressed by ammonium and highly induced on nitrate.^{34,43,44} A module where P_{NIT1} controls expression of the *Ble-GFP* gene (pCM1-8) conferred strong zeocin resistance in the CC-1690

strain but only when ammonium was replaced by nitrate as the nitrogen source. By contrast, the P_{PSAD} promoter (pCM1-9) conferred strong antibiotic resistance on both nitrogen sources (Figure 4a and Supplementary Figure 3a-c). The vitamin B₁₂-repressible promoter P_{METE} ⁴⁵ allowed conditional functional

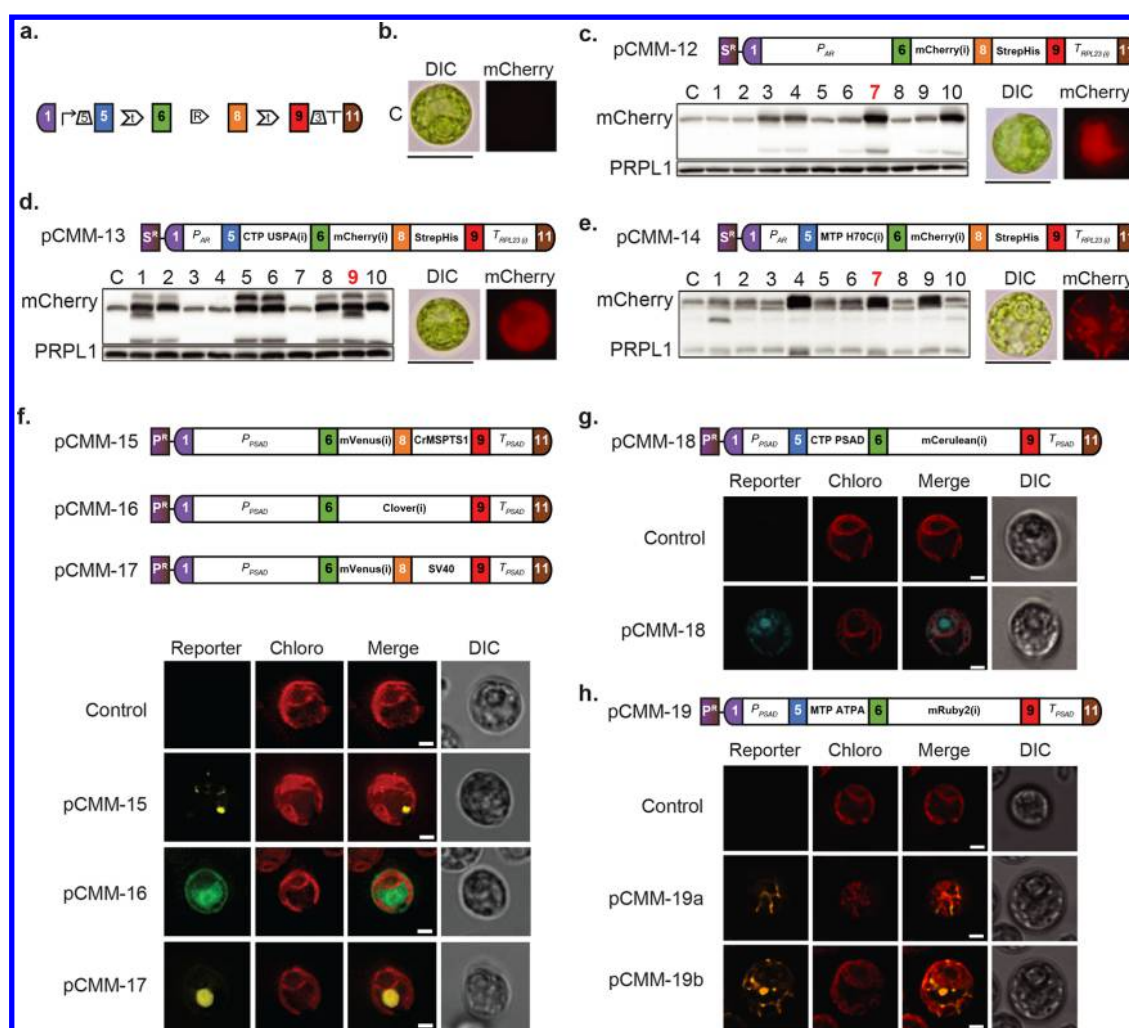


Figure 6. Targeting reporter genes to different subcellular compartments. (a) SBOL2.0⁶⁹ visual syntax for modules used. (b) Visible light (“DIC”) and fluorescence signal (“mCherry”) of the UVM4 recipient strain used as control (“C”) for panels c–e. (c–e) mCherry targeting to the (c) cytosol with no transit peptide, (d) chloroplast with CTP USPA (Chloroplast Transit Peptide of Universal Stress Protein A) or (e) mitochondria with MTP H70C (Mitochondrial Transit Peptide of HSP70C) in UVM4 cells transformed with the indicated devices (pCMM-12 to 14). In each panel, an anti-mCherry immunoblot analysis of transformants is shown. Note that the anti-mCherry antibody cross-reacts with a protein of similar size present in control cells (C). An anti-PRPL1 immunoblot is shown as loading control. The transformant strain number indicated in red corresponds to the images (bars are 10 μm) presented on the right. (f–h) Fluorescent marking of (f) microbodies with mVenus-CrMSPTS1 (Malate Synthase PTS1-like sequence), cytosol with Clover or the nucleus with mVenus-SV40 (Simian Virus 40 nuclear localization signal), (g) the chloroplast with CTP PSAD-mCerulean (Chloroplast Transit Peptide of PSAD), (h) mitochondria with MTP ATPA-mRuby2 (Mitochondrial Transit Peptide of ATPA) after transformation of UVM4 cells with the indicated devices (pCMM-15 to 19). Images of representative transformants are grouped with the corresponding control image (recipient strain) according to the filter used. pCMM-19a and pCMM-19b show two images taken on different z-axis on the same cell. “Chloro” refers to chlorophyll autofluorescence. The scale bars represent 2 μm . S^R and P^R represent, respectively, modules conferring resistance to spectinomycin (S^R = pCM1-1, Figure 3a and Supplementary Figure 2a) and paromomycin (P^R = pCM1-27, Supplementary Figure 2a).

complementation of the photosynthetic mutant *nac2-26* (CC-4421), which lacks photosystem II due to the absence of the TPR-like protein NAC2 required for stability of the *psbD* mRNA encoding the D2 reaction center protein.⁴⁶ *nac2-26* mutant cells engineered with a module harboring the NAC2 coding sequence under the control of the P_{METE} promoter (pCM1-10) could grow photoautotrophically in the absence of vitamin B₁₂, but growth was compromised by increasing its concentration by amounts as low as 5 ng/L (Figure 4b).

Regulation of gene expression can also be controlled by vitamin B₁ (thiamine) at the level of the transcript through riboswitches.^{47,48} Binding of thiamine pyrophosphate to the *THI4* riboswitch (RS) results in alternative splicing and retention of an 81 bp upstream open reading frame, ultimately

interfering with translation.^{47,48} The RS also responds when cells are grown in the presence of the thiamine biosynthetic intermediate 4-methyl-5-(2-hydroxyethyl) thiazole (HET), but not with 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine (HMP).⁴⁷ A module combining P_{AR} and *THI4* (RS) to drive expression of the *ble-GFP* gene (pCM1-11) conferred conditional zeocin sensitivity in the UVM4 strain.³⁵ Resistance was compromised by thiamine or HET but not HMP (Figure 4c and Supplementary Figure 3d), thereby demonstrating the efficient repression of the transgene through the *THI4* riboswitch.

Finally, to allow targeted repression of gene expression, a microRNA precursor sequence derived from the pre-miR1157 and used for the generation of artificial miRNAs (amiRNA)⁴⁹

was redesigned for compatibility with the Golden Gate cloning method. To demonstrate its effectiveness in driving gene repression, a specific amiRNA sequence directed against the *MAA7* gene, whose repression provides resistance to 5'-fluoroindole (5'-FI),⁵⁰ was inserted into the microRNA precursor. A control random sequence ("scrambled") amiRNA was inserted into the same backbone. These parts were placed under the control of P_{PSAD} and T_{PSAD} (pCM1-12 and 13) and assembled with a paromomycin resistance module (pCM1-27). The same amiRNA sequences were introduced into the previously established pChlamiRNA3 vector⁴⁹ as controls. After transformation of the CC-1690 strain, 36% of paromomycin-resistant cells displayed resistance to 5'-FI with the device targeting *MAA7* (pCMM-5) but not with the scrambled amiRNA (pCMM-6) (Figure 4d and Supplementary Figure 3f). A modified 5' rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) assay revealed that the *MAA7* transcript was most frequently cleaved at a site corresponding to positions 10 and 11 of the amiRNA, as expected for a specific action of the miRNA (Figure 4d). The properties of controllable parts can also be combined as shown for P_{NTT1} control of amiRNA-dependent gene repression.³⁴ An amiRNA strategy recently proved useful for concerted metabolic engineering of a biodiesel precursor in *Chlamydomonas*.⁸ The versatility of the MoClo kit opens new possibilities for sophisticated metabolic engineering strategies, for example, the specific downregulation of up to six target genes with one level M assembly.

Multiple Fusion Tags for Detection and Purification of Gene Products. Protein fusion tags are indispensable tools used to improve protein expression yields, enable protein purification, and accelerate the characterization of protein structure and function.⁵¹ Our MoClo kit includes multiple epitope and affinity tags known to be functional in *Chlamydomonas*. The modularity of the MoClo assembly allows rapid assessment of the best tagging strategy through a rapid design/build/test/learn cycle. We took advantage of the well characterized *rap2* mutant ($\Delta FKBP12$), which is insensitive to rapamycin,⁵² to test the functionality of five tags (Figure 5a,b). We designed and built 5 devices allowing strong constitutive expression of N- or C-terminal tagged FKBP12 coupled to a paromomycin module (pCMM-7 to 11, Figure 5c–h and Supplementary Table 4). The engineered strains were selected on paromomycin and the functionality of the fusion protein was tested by assessing sensitivity to rapamycin. Protein extracts were probed by immunoblotting using FKBP12-specific and tag-specific antibodies (Figure 5d–h). All tags allowed detection (Figure 5d–h) or purification (Figure 5i) of FKBP12 even though some were not functional for restoring rapamycin sensitivity. The test revealed that pCMM-9 outperforms other devices since it provides a WT-like phenotype and expression level coupled to a strong and specific Myc signal with no significant processing of the protein. These results demonstrate the importance of the modularity provided by the *Chlamydomonas* MoClo toolkit for designing optimal fusion proteins.

Visualization and Targeting of Proteins in Living Cells. Fluorescent protein tags allow the temporal and spatial monitoring of dynamic expression patterns at cellular and subcellular scales.⁵³ Natural and synthetic metabolic pathways can be optimized through spatial organization since cell compartments offer many advantages, such as isolation of metabolic reactions and generation of concentration gra-

dients.¹⁴ In a eukaryotic chassis like *Chlamydomonas*, organelles such as microbodies, mitochondria, and chloroplasts can be engineered to implement or improve metabolic pathways.¹⁵ The *Chlamydomonas* MoClo kit includes 11 targeting and signal peptides that allow the targeting of fusion proteins to mitochondria, chloroplast, nucleus, secretory pathway, ER, and peroxisome-like microbodies. The functionality of the targeting and signal peptides and of the five fluorescent proteins (mVenus, yellow; mCherry, red; mRuby2, red; Clover, green; mCerulean3, cyan) included in the toolkit was tested. Eight modules (pCM1-19 to 26, Supplementary Table 3) combining diverse fluorescent proteins and targeting sequences were assembled into devices with an antibiotic resistance module (pCMM-12 to 19). All devices were found to behave as expected and provided the expected fluorescent signal in the targeted compartment (Figure 6). The fluorescent and targeting parts of the *Chlamydomonas* MoClo toolkit, most of which have been validated here, enable engineering in the third dimension¹⁴ that is, isolation and organization in multiple cellular compartments, and offer new tools for biological design/build/test cycles.

DISCUSSION

The *Chlamydomonas* MoClo toolkit presented here provides more than 100 domesticated gene parts to allow advanced synthetic biology in microalgae. Numerous parts of multiple types have been characterized and validated in different genetic backgrounds¹⁰ and culture conditions, and can be readily used for biological design without further development. With the efficiency and modularity of the MoClo strategy, molecular cloning is no longer a limiting step for engineering *Chlamydomonas* cells. Indeed, from design to building, a complex device of up to six different genes/modules can be obtained within a week using the standardized parts provided in our kit. The modularity will also enable combinatorial assembly by shuffling part libraries⁵⁴ and determine *a posteriori* which combination is the most relevant. The development of gene-editing technologies in *Chlamydomonas*, including Zinc-finger nucleases^{55,56} and several CRISPR-Cas9 approaches,^{55,57–59} together with the development of high-throughput microfluidics⁴² are beginning to gather pace. Coupling these resources to our standardized MoClo toolkit will facilitate the use of *Chlamydomonas* as the photosynthetic chassis for innovative synthetic biology approaches aimed at fundamental and biotechnological applications. We expect that the creativity of designers, released from the time constraints associated with classical cloning strategies, will allow rapid expansion of the standard gene parts, modules, and devices through open distribution, notably using the Addgene repository. We invite the community to openly share their parts through Addgene and/or our consortium (contact M. Schroda). The development of the *Chlamydomonas* MoClo toolkit constitutes a complete step-change in the fields of microalgal biology and biotechnology. The parts developed for the MoClo toolkit may also be employed in other microalgal species since the orthogonality of several *Chlamydomonas* transcriptional units has been demonstrated in multiple hosts, including the industrially relevant species *Chlorella ellipsoidea*, *Nannochloropsis sp.* and *Dunaliella salina*.⁶⁰ Synthetic approaches will allow engineering of microalgae in a predictable and efficient manner and thereby offer great potential to couple environmental protection, energy transition, and bioeconomic growth.⁴

METHODS

All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich, unless otherwise specified.

Escherichia coli and *Chlamydomonas reinhardtii* Strains, Transformation, and Growth Conditions.

Bacterial growth was performed at 37 °C in LB broth supplemented with agar (20% m/V), spectinomycin (50 µg/mL), ampicillin or carbenicillin (50 or 100 µg/mL, respectively) and X-gal (40 µg/mL) when required. Chemically competent *E. coli* DH10β (New England Biolabs) were used for transformation (by heat shock following the manufacturer's instructions) and maintenance of plasmids. All plasmids of the kit were maintained and amplified in TOP10 *E. coli* strain prior to submission to Addgene.

C. reinhardtii strains,^{35,46,52,61,62} culture and transformation conditions are recapitulated in [Supplementary Table 5](#). They were grown in Tris-acetate-phosphate (TAP) medium⁶³ supplemented with agar (1.6% m/V), spectinomycin (100 µg/mL), paromomycin (15 µg/mL), zeocin (ThermoFisher Scientific, 10 to 15 µg/mL), 5-fluoroindole (20 µM) or rapamycin (LC Laboratories, 1 µM) when required. For *NIT1* promoter characterization ([Figure 4a](#)), a modified TAP medium lacking nitrogen source (TAP-N) was used instead, and was supplemented with 4 mM KNO₃ (nitrate) or 7.5 mM NH₄Cl (ammonium). For NAC2 autotrophy test ([Figure 4b](#)), cells were grown in minimal media (HSM) for selection of complemented strains. The responsiveness to B12 was assessed on plate and then in liquid. Cells were grown for 15 days in HSM until 1–5 × 10⁷ cells/mL concentration was reached prior to inoculation in a 96-well plate at a concentration of 10⁵ cells/mL in 200 µL of HSM. For response assays ([Figure 4c](#)) thiamine (Melford Laboratories Ltd.), 4-methyl-5-(2-hydroxyethyl) thiazole (HET) and 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine (HMP, Fluorochem UK) were added to TAP media at a final concentration of 10 µM.

For transformation by electroporation (see [Supplementary Table 5](#)), a TAP culture of (1–5) × 10⁶ cells/mL was concentrated 100 times in TAP complemented with 60 mM sucrose or the MAX Efficiency Transformation reagent for Algae (ThermoFisher scientific) and 25–250 µL were incubated with 80–300 ng of DNA for 10–30 min on ice in a 0.4 cm gapped cuvette (BioRad) prior to electroporation (BioRad Gene Pulser Xcell). The cells were then left to recover in TAP complemented with 40–60 mM sucrose for 16 h under appropriate light and shaking conditions (typically 50 µmol photon m⁻² s⁻¹ at 100 rpm) prior to plating on TAP-agar plates with adapted antibiotics. Transformation by glass-beads method followed previously published protocols.^{7,64} Briefly, after growth in TAP until 5 × 10⁶ cells/mL, cells were concentrated 30 times and 5 × 10⁷ cells were mixed with DNA using glass beads. After 2-fold dilution with TAP, 2.5 × 10⁷ cells were spread onto TAP agar plates containing 100 µg mL⁻¹ spectinomycin. Plates were incubated for 16 h in the dark prior to light exposition (30 µmol photon·m⁻²·s⁻¹). When colony counting was performed ([Figure 3a](#)), it was 8 days after the beginning of light. In both cases, the transformation protocol leads to insertion of a linear DNA in a random location within the nuclear genome.

Design. All *in silico* sequence designs and analysis were performed with Serial Cloner, Benchling, SnapGene, ApE or Genome Compiler. For exogenous parts, reverse translation was performed with Serial Cloner using *C. reinhardtii* nuclear

genome codon frequency (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3055>).

amiRNAs can be generated using DNA parts pCM0-068 and pCM0-069. Both are derived from the endogenous pre-miR1157,⁶⁵ but differ in the way in which the amiRNA specific sequence is introduced. pCM0-069/pCMM-20 is analogous to pChlamyRNA3,⁶⁵ and a dsDNA fragment containing the amiRNA/loop/amiRNA* sequence is introduced into a *SpeI* site inside the miRNA precursor sequence. pCM0-068 presents two divergently oriented *BpiI* sites, allowing the cloning of the dsDNA fragment by Golden Gate. In this last case, the dsDNA fragment is formed by the annealing of two oligos with the following sequence: (1) sense oligo (5' AGTA-(MIRNA*-SEQ)-TCTCGCTGATCGGCACCATGGGGGTGG-TGGTGATCAGCGCTA-(MIRNA SEQ)-T 3'), (2) antisense oligo (5' CAGT-A-(rev com MIRNA SEQ)-TAGCGCTGATCACCACCACCCCATGGTGCCGATCAGCGAGA-(rev com MIRNA*SEQ) 3'). There are online tools that help with the design of the amiRNA sequence (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>).

Parts Repository. All sequences listed in [Supplementary Table 2](#) were deposited in Addgene. Physical distribution of the DNA is performed through Addgene. We invite the community to share their future parts through Addgene and/or with our consortium (contact M. Schroda) which will make them available to the community.

Parts Cloning. All PCR reactions were performed using the Phusion DNA polymerase, KOD Xtreme Hot Start DNA polymerase (Merck), or Q5 DNA polymerase purchased from New England Biolabs (NEB) following the manufacturer's instructions adapted to GC-rich DNA, typically duration of hybridization and polymerization was doubled and/or GC enhancer solution was used. Molecular biology kits were purchased from Macherey-Nagel, peqLab, NEB or QIAGEN (gel extraction and miniprep kits). Primers were produced by Eurofins Genomics or Sigma-Aldrich, while synthesized parts were obtained from Genecust, DC Biosciences, IDTDNA or Sigma-Aldrich.

MoClo Assembly Conditions. All Restriction/ligation reactions were performed using *BbsI* or *BbsI*-HF (*BpiI* is an isoschizomer) or *BsaI*-HF (NEB or ThermoFisher) together with T4 ligase (NEB) in a medium containing the NEB CutSmart buffer and 1 mM ATP (with stock of 10 mM solubilized in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.9). Typical ratio between destination plasmid (100 fmol) and entry plasmid/parts was 1:2. To facilitate handling of the kit for end-users, we provide detailed protocols and reaction mix calculators for each type of assembly: level 0 for parts ([Supplementary Table 6](#)), level 1 for modules ([Supplementary Table 7](#)) and level M for devices ([Supplementary Table 8](#)).

Quality Control of Generated DNAs. All plasmids were controlled by differential restriction. In addition, all level 0 plasmids were sequenced with specific primers. Sequencing was performed by Eurofins Genomics, Source BioSciences UK, SeqLab, Macrogen, Microsynth, GATC Biotech or Core Facility (CeBiTec, Bielefeld University).

NanoLuc Activity Determination. Reagents were purchased from Promega (ref N1110) and activity was determined as previously described.³⁹ For screening, *C. reinhardtii* colonies were transferred into a 96-well plate containing 100 µL of TAP in each well. After gentle resuspension, 50 µL was transferred into a solid white 96-well plate to which 50 µL of Nano-Glo substrate diluted in the

provided buffer (2% V/V) was added and gently mixed by pipetting. Luminescence was measured at 460 nm with a CLARIOstar plate reader (BMG Labtech). For promoter/terminator combination assessment experiment (Figure 3c), all *C. reinhardtii* colonies from a transformation event were pooled and resuspended in TE buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 mM EDTA) complemented with antiprotease (1 tablet per 50 mL, Sigma-Aldrich: S8830). The cells were lysed by vortexing 10 s twice in the presence of glass beads (about 1:5 ratio beads/cells V/V) prior to two centrifugations (20000g for 10 min at 4 °C) to clarify the supernatant. The protein concentration was then determined using Bradford reagent with a Bovine Serum Albumin standard curve and the concentration was standardized to 0.5 g/L. The activity was determined in a 96-well plate in a final volume of 50 μ L (1:1 with nano-Glo resuspended in provided lysis buffer) per well. NanoLuc activity was determined on six different increasing protein quantities (0.1 to 2.5 μ g) for each assay, allowing to assess the linearity of the signal.

Absorbance Measurement of Cultures Growing in Microtiter Plates. Growth in microtiter plates was determined by measuring the optical density of each well at 730 nm. Microtiter plates containing 180–200 μ L culture were incubated under constant light (125 μ mol photon \cdot m $^{-2}$ \cdot s $^{-1}$) at 25 °C and 40 rpm orbital shaking. For density determination, cultures were resuspended by pipetting and 100 μ L of cell suspension was transferred to a new microtiter plate containing 50 μ L TAP 0.03% Tween-20. The optical density of each well was determined at 730 nm in a CLARIOstar plate reader (BMG Labtech). Plates were shaken for 6–10 s at 600 rpm before measurement.

RNA Extraction and miRNA-Mediated Cleavage Mapping. RNA isolation was carried out as previously described⁴⁹ (a detailed protocol can be found at <http://www.plantsci.cam.ac.uk/research/davidbaulcombe/methods/downloads/smallrna.pdf/view>), with the following modifications: Cells were centrifuged and resuspended in 0.25 mL of water and mixed with 0.25 mL of Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 50 mM EDTA, 2% SDS, 1 mg/mL proteinase K). Lysis buffer was incubated at 50 °C for 5 min prior to mixing with cells. Cell suspension was then incubated at 25 °C for 20 min. Finally, 2 mL of PureZol (Biorad) was added and samples were snap-frozen. RNA quality was assessed in gel and quantified in Nanodrop (ThermoFisher scientific).

miRNA cleavage site determination was performed as previously described.⁶⁶ Briefly, 10 μ g of total RNA was ligated with an RNA oligo (5' CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGAC UGAAGGAGUAGAAA 3') using T4 RNA ligase for 1 h at 37 °C. RNA was extracted with phenol/chloroform and precipitated with ethanol and sodium acetate. The precipitated RNA was retrotranscribed into cDNA by SuperScript IV reverse transcriptase (ThermoFisher scientific), using random hexamers and following manufacturer's recommendations. Two microliters of the cDNA was used as template of a PCR using primers FJN456 (5'-CGACTG-GAGCACGAGGACACTGA) and FJN495 (5'-TGGGGT-AGGGGTGGGGGCCAG). A 2 μ L portion of this PCR was used as template of a second PCR with primers FJN457 (5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA) and FJN496 (5'-TGACCCAGTCGCGGATGGCCT). PCR was resolved in a 2% agarose gel and the specific band was isolated from the gel and cloned into pGEM-T easy (Promega) for sequencing.

Immuno-blotting. Chlamydomonas cells expressing FKBP12 fusion proteins from liquid cultures were collected by centrifugation 4000g for 5 min at room temperature (RT), washed in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, and resuspended in a minimal volume of the same solution. Cells were lysed by two cycles of slow freezing to –80 °C followed by thawing at RT. The soluble cell extract was separated from the insoluble fraction by centrifugation (15000g for 20 min at 4 °C). Total protein extracts (15 μ g) were then subjected to 15% SDS-PAGE.

mCherry-expressing cells were harvested at 3500 rpm for 2 min (4 °C) and resuspended in 60 μ L of DTT-carbonate buffer (0.1 M DTT, 0.1 M Na₂CO₃). After freezing at –20 °C and thawing, 55 μ L of SDS-sucrose buffer were added (5% SDS, 30% sucrose). Samples were then boiled for 45 s at 95 °C, followed by 2 min incubation on ice and 13000g centrifugation for 2 min at RT. Protein extracts corresponding to 2 μ g of chlorophyll were then separated using 12% SDS-PAGE.

For immunoblot analyses, proteins were then transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, 162-0115 or Amersham Protran). After blocking with 3 to 5% low-fat milk in PBS for 1 h at RT, membranes were incubated with primary antibody in 5% low-fat milk in PBS for 16 h at 4 °C. After four washes in PBS–0.1% tween-20 (TPBS), the membranes were incubated with secondary antibody in 5% low-fat milk in PBS for 1 h at RT, and subsequently washed four times in TPBS prior to chemiluminescence revelation using ECL. Primary antibodies used were anti-FKBP12⁵² (1/5000 dilution; secondary was antirabbit 1/10000), anti-FLAG (Sigma-Aldrich F1804, 1/5000 dilution; secondary was antimouse 1/5000), anti-STREP (IBA, Catalog No. 2-1509-001, 1/5000 dilution; conjugated to HRP), anti-cMYC (Sigma-Aldrich M4439, 1/2500 dilution; secondary was antimouse 1/5000), anti-HA (Sigma-Aldrich H9658, 1/5000 dilution; secondary was antimouse 1/2500) and anti-PRPL1.⁶⁷ For mCherry serum, rabbits were immunized against purified full-length mCherry protein containing an N-terminal His₆-tag.

Microscopy. For mCherry experiments (Figure 6b–e), images were taken at 100 \times magnification with a BX53F microscope (Olympus). Fluorescence images for the detection of mCherry were taken using a TRITC filter. For other fluorescent proteins (Figure 6f–h), microscopy was performed as previously described.^{7,68}

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acssynbio.8b00251.

Additional figures as described in the text (PDF)

Supplemental tables as described in the text. All parts accession numbers and the corresponding references are listed in Supplementary Table 2 (XLSX)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Tel.: +33 (0)628345239. Fax: +33 (0)158415025. E-mail: stephane.lemaire@ibpc.fr (S.D.L.).

*Tel.: +44 1223 333952. Fax: +44-1223-333953. E-mail: as25@cam.ac.uk (A.G.S.).

*Tel.: +49(0)631 205 2697. Fax: +49(0)631 205 2999. E-mail: schroda@bio.uni-kl.de (M.S.).

ORCID

Pierre Crozet: 0000-0001-5113-2407


Konstantinos Vavitsas: 0000-0002-6828-1000

Olaf Kruse: 0000-0001-9874-382X

Poul-Erik Jensen: 0000-0001-6524-7723

Alison G. Smith: 0000-0001-6511-5704

Present Address

K.V.: Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology (AIBN), The University of Queensland, Australia.

Author Contributions

[†]P.C., F.J.N., F.W., and P.M. contributed equally to the work. S.D.L., A.G.S., M.S., P.E.J., O.K., J.L.C., and G.P. created the consortium that led this study. P.C., F.J.N., F.W., P.M., D.C.B., G.P., J.L.C., O.K., P.E.J., M.S., A.G.S., and S.D.L. designed the study and wrote the manuscript. P.C., F.J.N., F.W., P.M., K.B., K.J.L., M.E.P.P., P.A., A.G.R., S.S.G., J.N., B.S., J.T., R.T., L.D.W., K.V., T.B., W.H., F.d.C., M.C., A.D., J.H., C.H.M., M.d.M., and K.S. designed parts, modules and devices, performed the experiments, and/or analyzed data.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Karin Gries and Vincent Assoun for their technical help. This work was supported in part by Agence Nationale de la Recherche Grant ANR-17-CE05-0008 and LABEX DYNAMO ANR-LABX-011 (to P.C., A.D., F.d.C., J.H., C.H.M., M.d.M., K.S., M.C., and S.D.L.), by the DFG-funded TRR175 and FOR2092 (to F.W., B.S., J.N., J.T., L.W., R.T., and M.S.), by OpenPlant (BBSRC/EP SRC) (to F.J.N. and S.S.G.), by Ministerio de Economía y Competitividad Grants BFU2015-68216-P and BIO2015-74432-JIN (to J.L.C. and M.E.P.P.), by the VILLUM Foundation (Project no. 13363) (to P.E.J., K.B., K.V.), by the Technology Platforms at the Center for Biotechnology (CeBiTec) Bielefeld University (to K.L., T.B., and O.K.), by UK Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) (to P.M. and A.G.R.) and by ERA-SynBio project Sun2Chem (to P.A. and G.P.).

ABBREVIATION

MoClo, Modular Cloning; TU, Transcriptional Unit; RBCS2, Ribulose Biphosphate Carboxylase Oxygenase small subunit 2; HSP70, Heat Shock Protein 70; AR, HSP70A/RBCS2; TUB2, Tubulin 2; PSAD, Photosystem I reaction center subunit II; HET, 4-methyl-5-(2-hydroxyethyl) thiazole; HMP, 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine; amiRNA, artificial micro RNA; TAP, Tris Acetate Phosphate

REFERENCES

- (1) Zargar, A., Bailey, C. B., Haushalter, R. W., Eiben, C. B., Katz, L., and Keasling, J. D. (2017) Leveraging microbial biosynthetic pathways for the generation of 'drop-in' biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 45, 156–163.
- (2) Georgianna, D. R., and Mayfield, S. P. (2012) Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature* 488, 329–335.
- (3) Wijffels, R. H., Kruse, O., and Hellingwerf, K. J. (2013) Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 405–413.

- (4) Gimpel, J. A., Henríquez, V., and Mayfield, S. P. (2015) *Front. Microbiol.* 6, 1376.

- (5) Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Fields, F. J., and Mayfield, S. P. (2015) Chlamydomonas as a model for biofuels and bio-products production. *Plant J.* 82, 523–531.

- (6) Gangl, D., Zedler, J. A., Rajakumar, P. D., Martinez, E. M., Riseley, A., Włodarczyk, A., Purton, S., Sakuragi, Y., Howe, C. J., Jensen, P. E., and Robinson, C. (2015) Biotechnological exploitation of microalgae. *J. Exp. Bot.* 66, 6975–6990.

- (7) Lauersen, K. J., Baier, T., Wichmann, J., Wordenweber, R., Mussnug, J. H., Hubner, W., Huser, T., and Kruse, O. (2016) Efficient phototrophic production of a high-value sesquiterpenoid from the eukaryotic microalga Chlamydomonas reinhardtii. *Metab. Eng.* 38, 331–343.

- (8) Wichmann, J., Baier, T., Wentnagel, E., Lauersen, K. J., and Kruse, O. (2017) Tailored carbon partitioning for phototrophic production of (E)-alpha-bisabolene from the green microalga Chlamydomonas reinhardtii. *Metab. Eng.* 45, 211.

- (9) Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Marechal-Drouard, L., Marshall, W. F., Qu, L. H., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M. H., Kapitonov, V. V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S. M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C. L., Cognat, V., Croft, M. T., Dent, R., Dutcher, S., Fernandez, E., Fukuzawa, H., Gonzalez-Ballester, D., Gonzalez-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P. A., Lemaire, S. D., Lobanov, A. V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, L., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J. V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A. M., Niyogi, K., Novoselov, S. V., Paulsen, I. T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J. P., Riano-Pachon, D. M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schroda, M., Stern, D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S. L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C. J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M. R., Ledford, H., Long, J. C., Minagawa, J., Page, M. D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A. M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C. L., Gladyshev, V. N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R. T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Hornick, L., Huang, Y. W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martinez, D., Ngau, W. C., Otilar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szajkowski, L., Werner, G., Zhou, K., Grigoriev, I. V., Rokhsar, D. S., and Grossman, A. R. (2007) The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318, 245–250.

- (10) Gallaher, S. D., Fitz-Gibbon, S. T., Glaesener, A. G., Pellegrini, M., and Merchant, S. S. (2015) Chlamydomonas Genome Resource for Laboratory Strains Reveals a Mosaic of Sequence Variation, Identifies True Strain Histories, and Enables Strain-Specific Studies. *Plant Cell* 27, 2335–2352.

- (11) Scaife, M. A., Nguyen, G. T., Rico, J., Lambert, D., Helliwell, K. E., and Smith, A. G. (2015) Establishing Chlamydomonas reinhardtii as an industrial biotechnology host. *Plant J.* 82, 532–546.

- (12) Li, X., Zhang, R., Patena, W., Gang, S. S., Blum, S. R., Ivanova, N., Yue, R., Robertson, J. M., Lefebvre, P. A., Fitz-Gibbon, S. T., Grossman, A. R., and Jonikas, M. C. (2016) An Indexed, Mapped Mutant Library Enables Reverse Genetics Studies of Biological Processes in Chlamydomonas reinhardtii. *Plant Cell* 28, 367–387.

- (13) Jinkerson, R. E., and Jonikas, M. C. (2015) Molecular techniques to interrogate and edit the Chlamydomonas nuclear genome. *Plant J.* 82, 393–412.

- (14) Agapakis, C. M., Boyle, P. M., and Silver, P. A. (2012) Natural strategies for the spatial optimization of metabolism in synthetic biology. *Nat. Chem. Biol.* 8, 527–535.

- (15) Chen, A. H., and Silver, P. A. (2012) Designing biological compartmentalization. *Trends Cell Biol.* 22, 662–670.

- (16) Barahimipour, R., Neupert, J., and Bock, R. (2016) Efficient expression of nuclear transgenes in the green alga Chlamydomonas: synthesis of an HIV antigen and development of a new selectable marker. *Plant Mol. Biol.* 90, 403–418.

- (17) Rasala, B. A., Lee, P. A., Shen, Z., Briggs, S. P., Mendez, M., and Mayfield, S. P. (2012) Robust expression and secretion of Xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide. *PLoS One* 7, e43349.
- (18) Scaife, M. A., and Smith, A. G. (2016) Towards developing algal synthetic biology. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 716–722.
- (19) Endy, D. (2011) Building a new biology. *C. R. Chim.* 14, 424–428.
- (20) Casini, A., Storch, M., Baldwin, G. S., and Ellis, T. (2015) Bricks and blueprints: methods and standards for DNA assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 568–576.
- (21) Engler, C., Kandzia, R., and Marillonnet, S. (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* 3, e3647.
- (22) Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., and Marillonnet, S. (2011) A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One* 6, e16765.
- (23) Smanski, M. J., Bhatia, S., Zhao, D., Park, Y., Woodruff, B. A. L., Giannoukos, G., Ciulla, D., Busby, M., Calderon, J., Nicol, R., Gordon, D. B., Densmore, D., and Voigt, C. A. (2014) Functional optimization of gene clusters by combinatorial design and assembly. *Nat. Biotechnol.* 32, 1241–1249.
- (24) Celinska, E., Ledesma-Amaro, R., Larroude, M., Rossignol, T., Pathenier, C., and Nicaud, J. M. (2017) Golden Gate Assembly system dedicated to complex pathway manipulation in *Yarrowia lipolytica*. *Microb. Biotechnol.* 10, 450–455.
- (25) Engler, C., Youles, M., Gruetzner, R., Ehner, T. M., Werner, S., Jones, J. D., Patron, N. J., and Marillonnet, S. (2014) A golden gate modular cloning toolbox for plants. *ACS Synth. Biol.* 3, 839–843.
- (26) Iverson, S. V., Haddock, T. L., Beal, J., and Densmore, D. M. (2016) CIDAR MoClo: Improved MoClo Assembly Standard and New E. coli Part Library Enable Rapid Combinatorial Design for Synthetic and Traditional Biology. *ACS Synth. Biol.* 5, 99–103.
- (27) Lee, M. E., DeLoache, W. C., Cervantes, B., and Dueber, J. E. (2015) A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. *ACS Synth. Biol.* 4, 975–986.
- (28) Martella, A., Matjusaitis, M., Auxillos, J., Pollard, S. M., and Cai, Y. (2017) EMMA: An Extensible Mammalian Modular Assembly Toolkit for the Rapid Design and Production of Diverse Expression Vectors. *ACS Synth. Biol.* 6, 1380.
- (29) Moore, S. J., Lai, H. E., Kelwick, R. J., Chee, S. M., Bell, D. J., Polizzi, K. M., and Freemont, P. S. (2016) EcoFlex: A Multifunctional MoClo Kit for E. coli Synthetic Biology. *ACS Synth. Biol.* 5, 1059–1069.
- (30) Patron, N. J., Orzaez, D., Marillonnet, S., Warzecha, H., Matthewman, C., Youles, M., Raitskin, O., Leveau, A., Farre, G., Rogers, C., Smith, A., Hibberd, J., Webb, A. A., Locke, J., Schornack, S., Ajioka, J., Baulcombe, D. C., Zipfel, C., Kamoun, S., Jones, J. D., Kuhn, H., Robatzek, S., Van Esse, H. P., Sanders, D., Oldroyd, G., Martin, C., Field, R., O'Connor, S., Fox, S., Wulff, B., Miller, B., Breakspear, A., Radhakrishnan, G., Delaux, P. M., Loque, D., Granell, A., Tissier, A., Shih, P., Brutnell, T. P., Quick, W. P., Rischer, H., Fraser, P. D., Aharoni, A., Raines, C., South, P. F., Ane, J. M., Hamberger, B. R., Langdale, J., Stougaard, J., Bouwmeester, H., Udvardi, M., Murray, J. A., Ntoukakis, V., Schafer, P., Denby, K., Edwards, K. J., Osbourn, A., and Haseloff, J. (2015) Standards for plant synthetic biology: a common syntax for exchange of DNA parts. *New Phytol.* 208, 13–19.
- (31) Lopez-Paz, C., Liu, D., Geng, S., and Umen, J. G. (2017) Identification of *Chlamydomonas reinhardtii* endogenous genetic flanking sequences for improved transgene expression. *Plant J.* 92, 1232–1244.
- (32) Plucinak, T. M., Horken, K. M., Jiang, W., Fostvedt, J., Nguyen, S. T., and Weeks, D. P. (2015) Improved and versatile viral 2A platforms for dependable and inducible high-level expression of dicistronic nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 82, 717–729.
- (33) Lumberras, V., Stevens, D. R., and Purton, S. (1998) Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *Plant J.* 14, 441–447.
- (34) Strenkert, D., Schmollinger, S., and Schroda, M. (2013) Heat shock factor 1 counteracts epigenetic silencing of nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Res.* 41, 5273–5289.
- (35) Neupert, J., Karcher, D., and Bock, R. (2009) Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *Plant J.* 57, 1140–1150.
- (36) Schroda, M., Beck, C. F., and Vallon, O. (2002) Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 31, 445–455.
- (37) Eichler-Stahlberg, A., Weisheit, W., Ruecker, O., and Heitzer, M. (2009) Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 229, 873–883.
- (38) Shao, N., and Bock, R. (2008) A codon-optimized luciferase from *Gussia princeps* facilitates the in vivo monitoring of gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* 53, 381–388.
- (39) Hall, M. P., Unch, J., Binkowski, B. F., Valley, M. P., Butler, B. L., Wood, M. G., Otto, P., Zimmerman, K., Vidugiris, G., Machleidt, T., Robers, M. B., Benink, H. A., Eggers, C. T., Slater, M. R., Meisenheimer, P. L., Klaubert, D. H., Fan, F., Encell, L. P., and Wood, K. V. (2012) Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem. Biol.* 7, 1848–1857.
- (40) Lodha, M., Schulz-Raffelt, M., and Schroda, M. (2008) A new assay for promoter analysis in *Chlamydomonas* reveals roles for heat shock elements and the TATA box in HSP70A promoter-mediated activation of transgene expression. *Eukaryotic Cell* 7, 172–176.
- (41) Barahimipour, R., Strenkert, D., Neupert, J., Schroda, M., Merchant, S. S., and Bock, R. (2015) Dissecting the contributions of GC content and codon usage to gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 84, 704–717.
- (42) Best, R. J., Lyczakowski, J. J., Abalde-Cela, S., Yu, Z., Abell, C., and Smith, A. G. (2016) Label-Free Analysis and Sorting of Microalgae and Cyanobacteria in Microdroplets by Intrinsic Chlorophyll Fluorescence for the Identification of Fast Growing Strains. *Anal. Chem.* 88, 10445–10451.
- (43) Ohresser, M., Matagne, R. F., and Loppes, R. (1997) Expression of the arylsulphatase reporter gene under the control of the nit1 promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* 31, 264–271.
- (44) Schmollinger, S., Strenkert, D., and Schroda, M. (2010) An inducible artificial microRNA system for *Chlamydomonas reinhardtii* confirms a key role for heat shock factor 1 in regulating thermotolerance. *Curr. Genet.* 56, 383–389.
- (45) Helliwell, K. E., Scaife, M. A., Sasso, S., Araujo, A. P., Purton, S., and Smith, A. G. (2014) Unraveling vitamin B12-responsive gene regulation in algae. *Plant Physiol.* 165, 388–397.
- (46) Boudreau, E., Nickelsen, J., Lemaire, S. D., Ossenbuhl, F., and Rochaix, J. D. (2000) The Nac2 gene of *Chlamydomonas* encodes a chloroplast TPR-like protein involved in psbD mRNA stability. *EMBO J.* 19, 3366–3376.
- (47) Croft, M. T., Moulin, M., Webb, M. E., and Smith, A. G. (2007) Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20770–20775.
- (48) Moulin, M., Nguyen, G. T., Scaife, M. A., Smith, A. G., and Fitzpatrick, T. B. (2013) Analysis of *Chlamydomonas* thiamin metabolism in vivo reveals riboswitch plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 14622–14627.
- (49) Molnar, A., Schwach, F., Studholme, D. J., Thuenemann, E. C., and Baulcombe, D. C. (2007) miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 447, 1126–1129.
- (50) Palombella, A. L., and Dutcher, S. K. (1998) Identification of the gene encoding the tryptophan synthase beta-subunit from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 117, 455–464.
- (51) Young, C. L., Britton, Z. T., and Robinson, A. S. (2012) Recombinant protein expression and purification: a comprehensive

review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol. J.* 7, 620–634.

(52) Crespo, J. L., Diaz-Troya, S., and Florencio, F. J. (2005) Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 139, 1736–1749.

(53) Crivat, G., and Taraska, J. W. (2012) Imaging proteins inside cells with fluorescent tags. *Trends Biotechnol.* 30, 8–16.

(54) Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R., and Marillonnet, S. (2009) Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PLoS One* 4, e5553.

(55) Greiner, A., Kelterborn, S., Evers, H., Kreimer, G., Sizova, I., and Hegemann, P. (2017) Targeting of Photoreceptor Genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via Zinc-finger Nucleases and CRISPR/Cas9. *Plant Cell* 29, 2498.

(56) Sizova, I., Greiner, A., Awasthi, M., Kateriya, S., and Hegemann, P. (2013) Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases. *Plant J.* 73, 873–882.

(57) Shin, S. E., Lim, J. M., Koh, H. G., Kim, E. K., Kang, N. K., Jeon, S., Kwon, S., Shin, W. S., Lee, B., Hwangbo, K., Kim, J., Ye, S. H., Yun, J. Y., Seo, H., Oh, H. M., Kim, K. J., Kim, J. S., Jeong, W. J., Chang, Y. K., and Jeong, B. R. (2016) CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Rep.* 6, 27810.

(58) Baek, K., Kim, D. H., Jeong, J., Sim, S. J., Melis, A., Kim, J. S., Jin, E., and Bae, S. (2016) DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Sci. Rep.* 6, 30620.

(59) Ferenczi, A., Pyott, D. E., Xipnitou, A., and Molnar, A. (2017) Efficient targeted DNA editing and replacement in *Chlamydomonas reinhardtii* using Cpf1 ribonucleoproteins and single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 13567–13572.

(60) Doron, L., Segal, N., and Shapira, M. (2016) Transgene Expression in Microalgae-From Tools to Applications. *Front. Plant Sci.* 7, 505.

(61) Sager, R. (1955) Inheritance in the Green Alga *Chlamydomonas Reinhardi*. *Genetics* 40, 476–489.

(62) Kuchka, M. R., Goldschmidt-Clermont, M., van Dillewijn, J., and Rochaix, J. D. (1989) Mutation at the *Chlamydomonas* nuclear NAC2 locus specifically affects stability of the chloroplast psbD transcript encoding polypeptide D2 of PS II. *Cell* 58, 869–876.

(63) Gorman, D. S., and Levine, R. P. (1965) Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 54, 1665–1669.

(64) Kindle, K. L. (1990) High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1228–1232.

(65) Molnar, A., Bassett, A., Thuenemann, E., Schwach, F., Karkare, S., Ossowski, S., Weigel, D., and Baulcombe, D. (2009) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 58, 165–174.

(66) Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. (2002) Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* 297, 2053–2056.

(67) Ries, F., Carius, Y., Rohr, M., Gries, K., Keller, S., Lancaster, C. R. D., and Willmund, F. (2017) Structural and molecular comparison of bacterial and eukaryotic trigger factors. *Sci. Rep.* 7, 10680.

(68) Lauersen, K. J., Kruse, O., and Mussgnug, J. H. (2015) Targeted expression of nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii* with a versatile, modular vector toolkit. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 3491–3503.

(69) Roehner, N., Beal, J., Clancy, K., Bartley, B., Misirli, G., Grunberg, R., Oberortner, E., Pocock, M., Bissell, M., Madsen, C., Nguyen, T., Zhang, M., Zhang, Z., Zundel, Z., Densmore, D., Gennari, J. H., Wipat, A., Sauro, H. M., and Myers, C. J. (2016) Sharing Structure and Function in Biological Design with SBOL 2.0. *ACS Synth. Biol.* 5, 498–506.

Titre : Caractérisation des mécanismes contrôlant l'agrégation, un processus de défense contre le stress chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*

Mots clés : agrégation, multicellularité, *Chlamydomonas reinhardtii*, stress environnemental, socialisation

Résumé : L'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* est un des organismes photosynthétiques modèle les plus étudiés. Sa prévalence en recherche fondamentale et biotechnologique est due aux puissantes approches de génétique et de biologie moléculaire que l'on peut y développer. Nous utilisons *Chlamydomonas* pour comprendre quelles sont les stratégies utilisées par un organisme unicellulaire pour survivre dans un environnement hostile. Cette thèse décrit une nouvelle réponse collective au stress abiotique. En conditions toxiques, les cellules se regroupent en structures multicellulaires visibles à l'œil nu au sein duquel elles sont protégées. Dans ce contexte, les interactions cellulaires ont été étudiées avec de nouveaux outils moléculaires et d'analyse d'image. Nous avons montré que les agrégats sont formés par agglutination des cellules et non par divisions successives. De plus, une matrice extracellulaire riche

en sucre a été détectée entre les cellules. De façon remarquable, le milieu extracellulaire de cellules agrégées est suffisant pour provoquer l'agrégation de cellules planctonique. Pour découvrir les régulations de l'agrégation, une banque de 13 000 mutants d'insertion a été criblé. Nous avons isolé 16 mutants *socializer (saz)* agrégeant spontanément. Ces mutants ont une forte résistance au stress ce qui confirme le rôle protecteur des agrégats. Ils possèdent aussi une matrice extracellulaire et leur filtrat est suffisant pour induire l'agrégation. Grâce à l'analyse du transcriptome et du sécrétome des mutants *saz* nous avons identifié des familles de protéines potentiellement impliquées dans la mise en place des structures multicellulaires. Une approche de génétique inverse sur les gènes candidats nous a permis d'identifier premiers régulateurs positifs et négatifs de l'agrégation en réponse au stress.

Title : Characterization of mechanisms controlling aggregation, a defense process in response to stress in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Keywords : aggregation, multicellularity, *Chlamydomonas reinhardtii*, environmental stresses, socialization

Abstract : The unicellular model alga *Chlamydomonas reinhardtii* is one of the most studied photosynthetic organisms. Its prevalence in basic and biotechnological research is due to the powerful genetic and molecular biology approaches that can be developed in this organism. We use *Chlamydomonas* to understand the strategies used by a unicellular organism to survive in a hostile environment. This thesis describes a new collective abiotic stress response. In a toxic environment, cells aggregate forming multicellular structures visible to the naked eye in which they are protected. We analyzed this process using genetic, reverse genetics, imaging approaches and a multiomic analysis. Aggregates were found to be built by cell adhesion rather than a clonal mode. In addition, we detected a sugar-containing extracellular matrix embedding the cells. Interestingly, the extracellular medium of

aggregated cells is sufficient to induce aggregation of planktonic ones. To discover the regulators of aggregation, we screened a library of 13000 insertional mutants. 16 *socializer (saz)* mutants that aggregates spontaneously were isolated. These mutants exhibit a strong resistance to stress, thus confirming that aggregates are protective of the surrounding toxicity. They also contain an extracellular matrix, and their filtrate is sufficient to induce aggregation. Thanks to the analysis of the transcriptome and secretome of *saz* mutants we have identified families of proteins potentially involved in the establishment of multicellular structures. A reverse genetics approach on candidate genes allowed us to identify the first positive and negative regulators of aggregation in response to stress.