



HAL
open science

Contrôle nucléaire de la biogenèse du chloroplaste par des protéines de la machinerie de transcription plastidiale

Louise Chambon

► **To cite this version:**

Louise Chambon. Contrôle nucléaire de la biogenèse du chloroplaste par des protéines de la machinerie de transcription plastidiale. Biologie végétale. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT: 2022GRALV057 . tel-03859468

HAL Id: tel-03859468

<https://theses.hal.science/tel-03859468>

Submitted on 18 Nov 2022

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Biologie Végétale

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Louise CHAMBON

Thèse dirigée par **Robert BLANVILLAIN**

préparée au sein du **Laboratoire LPCV - Laboratoire de
Physiologie Cellulaire Végétale**
dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Contrôle nucléaire de la biogenèse du chloroplaste par des protéines de la machinerie de transcription plastidiale

Nuclear control of chloroplast biogenesis through proteins of the plastidial transcription machinery

Thèse soutenue publiquement le **21 mars 2022**,
devant le jury composé de :

Monsieur Ben FIELD

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Provence et Corse,
Rapporteur

Madame Emilie DEMARSY

MAITRE DE CONFERENCE, Université de Genève, Examinatrice

Monsieur Kamel HAMMANI

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS délégation Alsace, Rapporteur

Madame Corinne MERCIER

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes,
Examinatrice

Monsieur Jean-Gabriel VALAY

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes,
Président

Monsieur Norbert ROLLAND

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes, Examineur



A mon père, mon phare dans la tempête

Merci

TABLE DES MATIERES

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| TABLE DES MATIERES | 3 |
| ABREVIATIONS | 5 |
| NOTES SUR LES ILLUSTRATIONS | 6 |
| ABSTRACT & RESUME | 11 |
| RESUME | 12 |
| <i>ABSTRACT</i> | 13 |
| INTRODUCTION | 14 |
| CHAPITRE I..... | 15 |
| DEVELOPPEMENT DU CHLOROPLASTE | 15 |
| <i>I – 1) ORIGINE ET EVOLUTION DES ARCHAEPLASTIDA</i> | 15 |
| <i>I – 2) AUTOTROPHIE CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES</i> | 16 |
| A - L'ARCHITECTURE DU CHLOROPLASTE REFLETE SON METABOLISME | 16 |
| B - LES CHLOROPLASTES DANS LES TISSUS DU LIMBE ADULTE | 19 |
| <i>I – 3) DIVERSIFICATION DES PLASTES CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES</i> | 23 |
| A - LARGE PLASTIQUE PLASTIDIALE..... | 23 |
| B - DEVELOPPEMENT DES CHLOROPLASTES A LA LUMIERE | 24 |
| <i>I – 4) CONVERSION PHOTOSYNTHETIQUE DES ETIOPLASTES</i> | 27 |
| A - DEFINITION ET OCCURRENCE DES ETIOPLASTES | 27 |
| B - MORPHOLOGIE ET COMPOSITION MOLECULAIRE SONT LIEES..... | 28 |
| C - DIFFERENCIATION DE L'ETIOPLASTE EN CHLOROPLASTE A LA LUMIERE | 30 |
| <i>I – 5 CONVERSIONS PHOTOSYNTHETIQUES : CONCLUSIONS</i> | 33 |
| A - LES ETIOPLASTES SONT DE BONS OUTILS POUR ETUDIER LA BIOGENESE DU CHLOROPLASTE | 33 |
| B - CONCLUSION DU CHAPITRE..... | 34 |
| CHAPITRE II..... | 37 |
| L'EXPRESSION DU GENOME PLASTIDIAL CONTROLE LA BIOGENESE DU CHLOROPLASTE | 37 |
| <i>II – 1) LE CHLOROPLASTE EST UN COMPARTIMENT GENETIQUE SEMI AUTONOME</i> | 37 |
| A - ORGANISATION SEMI-PROCARYOTE DU GENOME PLASTIDIAL..... | 37 |
| C - PROTEINES DU NUCLEOÏDE ET SYNDROME DES PAPS | 40 |
| <i>II- 2) DES PROTEINES NUCLEAIRES DE LA MACHINERIE D'EXPRESSION DU PLASTE CONTROLENT SON IDENTITE</i> | 42 |
| A - DEFINITION DE L'ALBINO BLOC..... | 42 |
| B - L'ALBINO BLOC MENE A DES DEFAUTS PLEIOTROPIQUES..... | 43 |
| C - LA BIOGENESE DU CHLOROPLASTE EST A DISTINGUER DU DEVELOPPEMENT DES PLASTES | 44 |
| <i>II – 3) QUAND ET OU LE COMPLEXE PEP/PAP EST-IL ASSEMBLE ?</i> | 45 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| A - ACTIVITE DIFFERENCIELLE DES 3 RNAPS DU PLASTE..... | 45 |
| B - LA PEP EST GLOBALEMENT INACTIVE DANS LES ETIOPLASTES | 46 |
| C - LA PEP EST L'ENZYME LA PLUS ACTIVE A LA LUMIERE | 47 |
| D - LES PAPS DANS LE PLASTE NE SE LIMITENT PAS LA FORMATION DU COMPLEXE | 48 |
| E - BIEN D'AUTRES PROTEINES NUCLEAIRES DU TAC SONT ESSENTIELLES AU VERDISSEMENT DES PLASTES | 49 |
| F – CONCLUSION : LES PAPS ASSURENT L'ACTIVITE DE LA PEP, ET DONC L'IDENTITE DES PLASTES..... | 50 |
| II – 4) MODELE MOLECULAIRE DE LA BIOGENESE DU CHLOROPLASTE A LA LUMIERE | 52 |
| A - REGULATION DE L'EXPRESSION DES PAPS DANS LE NOYAU A LA LUMIERE | 53 |
| C - PERCEPTION DE LA LUMIERE ET ASSEMBLAGE DU COMPLEXE SE VEROUILLEN MUTUELLEMENT | 55 |
| D - LES PAPS ET PROTEINES DU NUCLEOÏDE SCELLENT ENSEMBLE VERDISSEMENT ET DEVELOPPEMENT | 56 |
| E - CARACTERISER PAP8 POUR CARACTERISER LE NŒUD DEVELOPEMENTAL DE LA TRANSITION PHOTOSYNTHETIQUE : HYPOTHESE ET AXES DE RECHERCHE | 58 |
| RESULTATS..... | 61 |
| PUBLICATION SCIENTIFIQUE 1 ^{ER} AUTEUR & CONTRIBUTIONS | 61 |
| CHAMBON ET AL., 2022, EN REVUE, IJMS..... | 61 |
| LIEBERS ET AL., 2020, EMBO JOURNAL | 61 |
| PAP8/PTAC6 IS PART OF A NUCLEAR PROTEIN COMPLEX AND DISPLAYS RNA RECOGNITION MOTIFS OF VIRAL ORIGIN | 62 |
| <i>Abstract</i> | 62 |
| 1. <i>Introduction</i> | 63 |
| <i>Methods</i> | 65 |
| <i>Results</i> | 67 |
| 1. PAP8 is found in a nuclear complex during photomorphogenesis | 67 |
| 2. PAP8 Functional fusions | 69 |
| 3. Uncoupling localization and function of PAP8..... | 71 |
| 4. PAP8 micro-homology to RDR6 reveals RNA binding motifs in PAP8..... | 74 |
| DISCUSSION | 75 |
| MATERIEL SUPPLEMENTAIRE..... | 62 |
| OUVERTURE : FONCTIONNALISATION DES PAPS | 87 |
| Divergence fonctionnelle d'au moins une PAP chez la mousse | 87 |
| vegetaux sans PAPS & integration du verdissement dans le developpement..... | 89 |
| des plantes sans PEP parviennent à verdier a la lumiere | 91 |
| MATERIEL ET METHODES | 95 |
| CLONAGES & BIOLOGIE MOLECULAIRE..... | 95 |
| BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE CHEZ LA PLANTE | 109 |
| AUTRES CONTRIBUTIONS PENDANT LE DOCTORAT | 116 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 122 |

ABBREVIATIONS



| | |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| [] | Phénotype |
| [A] | Phénotype Albinos |
| [wt] | Phénotype sauvage (<i>wild type</i>) |
| 70s | Ribosome procaryote |
| atp genes | Gènes codant pour les sous unités de l'ATP synthase des plastes |
| Col0 | <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotype Columbia-0 |
| cTP | <i>Chloroplast Transit Peptide</i> |
| CZ | <i>Central Zone</i> |
| GLK | <i>Golden-Like</i> |
| GUN | <i>Genome Uncoupled</i> |
| HY5 | <i>Elongated hypocotyl 5</i> |
| LHC | <i>Light Harvesting Complex</i> |
| LP | <i>Leaf Primordia</i> |
| LPOR | <i>Light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase</i> |
| NCP | <i>Nuclear control of PEP-activity</i> |
| NEP | <i>Nuclear-encoded RNA polymerase</i> |
| NLS | <i>Nuclear Localization Signal</i> |
| OEC | <i>Oxygen evolving complex</i> |
| PAP | <i>PEP-Associated Proteins</i> |
| PAP1 | pTAC3 |
| PAP2 | pTAC2 |
| PAP3 | pTAC10 |
| PAP4 | FSD3 |
| PAP5/HMR | pTAC12 |
| PAP6 | FLN1 |
| PAP7 | pTAC14 |
| PAP8 | pTAC6 |
| PAP8^{dcTP} | PAP8 dont le cTP en N-terminal est supprimé. |
| PAP8^{NLSm5} | PAP8 muté en 5 positions sur son NLS |
| PAP9 | FSD2 |
| PAP10 | TrxZ |
| PAP11 | MurE-like |
| PAP12 | pTAC7 |
| PBG | p35s::PhyB-GFP |
| PEND | <i>Plastid envelope DNA-binding protein</i> |
| PEP | <i>Plastid Encoded RNA Polymerase</i> |
| pet genes | Gènes codant pour les sous unités du Cytochrome b6-f |
| PhANGs | <i>Photosynthesis-associated Nuclear Genes</i> |
| PhAPGs | <i>Photosynthesis-associated Plastid genes</i> |
| PhyB | <i>Phytochrome B</i> |
| PIF | <i>Phytochrome interacting factors</i> |
| PS | Photosystème |

| | |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| psa genes | Gènes codant pour les sous unités du PSI |
| psb genes | Gènes codant pour les sous unités du PSII (&OEC) |
| pTAC | <i>proteins of the Transcriptionally active chromosome</i> |
| PZ | <i>Peripheral zone</i> |
| RCB | <i>Regulator of chloroplast biogenesis</i> |
| RNAP | ARN Polymérase |
| rpn genes | Gènes codant pour des sous-unités de la machinerie traductionnelle du plaste |
| Rpo | Gènes codant pour les sous-unités de la PEP |
| rrn genes | Gènes codant pour les ARN ribosomiques de la machinerie traductionnelle du plaste |
| RZ | <i>Rib zone</i> |
| SAM | <i>Shoot apical meristem</i> |
| s.u. | Sous-unité |
| TAC | <i>Transcriptionally active chromosome</i> |
| TAD | <i>Transcriptional activation domain</i> |
| TOC/TIC | <i>Translocon at the outer and inner membrane</i> : machinerie d'import du plaste |
| tRNA | ARN de transfert |
| trn genes | Gènes codant pour les tRNAs du plaste (tout acide aminé mais pas tous les codons) |
| Why1 | <i>Whirly1</i> |

NOTES SUR LES ILLUSTRATIONS

Les figures de l'introduction sont réalisées à la main, au criterium, encre, ou aquarelle. Elles sont faites de sorte à illustrer le corps de texte où sont insérées les références utilisées pour les concevoir. Vous trouverez ici quelques notes les concernant ainsi que le détail des publications utilisées.

Figure 2 : Schéma de la phase claire de la photosynthèse ayant lieu sur les membranes des thylakoïdes : Utilisation de mes cours de licence de l'Université Grenoble Alpes.

Figure 3 : Illustration d'une coupe transversale histologique typiquement obtenue dans un tissu foliaire mature : Réinvestissement des corrections dessinées pour mes étudiants en 1ere années de licence lors des travaux pratiques de physiologie végétale, unité d'enseignement de l'Université Grenoble Alpes sous la responsabilité de Rolland Douzet.

Figure 4 : Le développement de la plantule et la conversion des plastes est dépendante de la lumière : Résumé de toutes les figures dessinées dans l'introduction, donc faite de tête. Néanmoins les proplastes sont dessinés avec plastoglobules car représentés avec membranes internes en cours de construction (Liang *et al.*, 2018), de même qu'une vacuole car certaines équipes observent des proplastes particulièrement vacuolés (Pogson, Ganguly and Albrecht-borth, 2015). Les membranes internes des proplastes en cours de différenciation ne sont pas toujours observées en lien avec la membrane à cause des plans de coupes. L'étioplaste est représenté avec un grain d'amidon, bien que ceux-ci ne soient pas tout le temps observables (Solymosi and Keresztes, 2012; Solymosi and Aronsson, 2013). La coupe transversale dessinée pour représenter les tissus plus âgés provient de (Barton, Schattat and Jakob, 2016).

Figure 5 : Une phase photosynthétique transitoire a lieu lors de l'embryogenèse avant dessiccation de la graine : L'autofluorescence de l'embryon est peinte depuis la publication de (Tejos, Mercado and Meisel, 2010), et la légende qui permet d'explicitier certains points du chapitre 2 de l'introduction depuis la publication de (Allorent *et al.*, 2013), et l'évolution de la taille de la graine depuis (Liebers *et al.*, 2020).

Figure 6 : Illustration de la différenciation des proplastes dans le SAM et les cotylédons d'une graine germant à la lumière : Le dessin des plastes et du méristème provient des publications de (Charuvi *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2018) lorsqu'encore plat (pas encore bombé), et celui du développement de la plante de (Pogson, Ganguly and Albrecht-borth, 2015; Yadav *et al.*, 2019).

Figure 7 : Caractéristiques morphologiques de l'étiollement à l'échelle de la plantule, cellulaire, et moléculaire, typiquement observé dès 3 jours de croissance à l'obscurité : La structure du PLB provient de (Floris and Kühlbrandt, 2021), ses constituants de (Blomqvist and Ryberg, 2008), le tout vérifié avec

(Kowalewska, Bykowski and Mostowska, 2019). A trois jours, le PLB des étioplastes peut encore grossir mais il a déjà atteint sa périodicité optimale, indiquant des étioplastes matures (Bykowski *et al.*, 2020).

Figure 8 : Illustration des processus associés aux deux phases majeures de la conversion photosynthétique des étioplastes stockés dans le noir à l'échelle de la plantule, cellulaire, et moléculaire : L'évolution de la taille des cellules est une comparaison de ce qui est observé chez (Bykowski *et al.*, 2020; Pipitone *et al.*, 2021), où les graines germent sur un milieu MS non sucré (sinon les organes de réserve issus de la graine ne sont plus visibles après 3 jours de croissance). L'évolution des plastes à droite provient d'un assemblage d'observations réalisées chez *Arabidopsis thaliana* (Pipitone *et al.*, 2021), recoupé à ce qui observé de manière générale chez les plantes épigéiques (Rudowska *et al.*, 2012; Kowalewska *et al.*, 2016). L'ensemble riche d'une variété de données moléculaires est également vérifié dans d'autres publications (Solymosi and Aronsson, 2013; Fujii *et al.*, 2019).

Figure 9 : Vue imagée de la partie active transcriptionnellement du nucléoïde (TAC), en lien direct avec le métabolisme photosynthétique du plaste : L'organisation du supercomplexe PSII-LHCII provient de (Minagawa and Takahashi, 2004). Attention toutefois l'ensemble n'est pas exhaustif et seulement 28 des approximativement 50 sous-unités sont représentées, et ne permet pas non plus de rendre compte de leur dynamisme. L'ébauche est librement inspirée d'une partie des explications issues de (Pfannschmidt *et al.*, 2020), et permet de faire le lien entre les deux chapitres de l'introduction : mise en place du métabolisme photosynthétique (chapitre 1) et génétique (chapitre 2). Les thylakoïdes en cours d'empilement est inspiré des données de (Pribil, Labs and Leister, 2014).

Figure 10 : Schématisation de l'organisation du nucléoïde des plastes : Est une version simplifiée de (Pfalz and Pfannschmidt, 2013). L'ADN des plastes est largement schématisé, et ressemble sans doute plus à un vaste amas informe comme dans la figure 8.

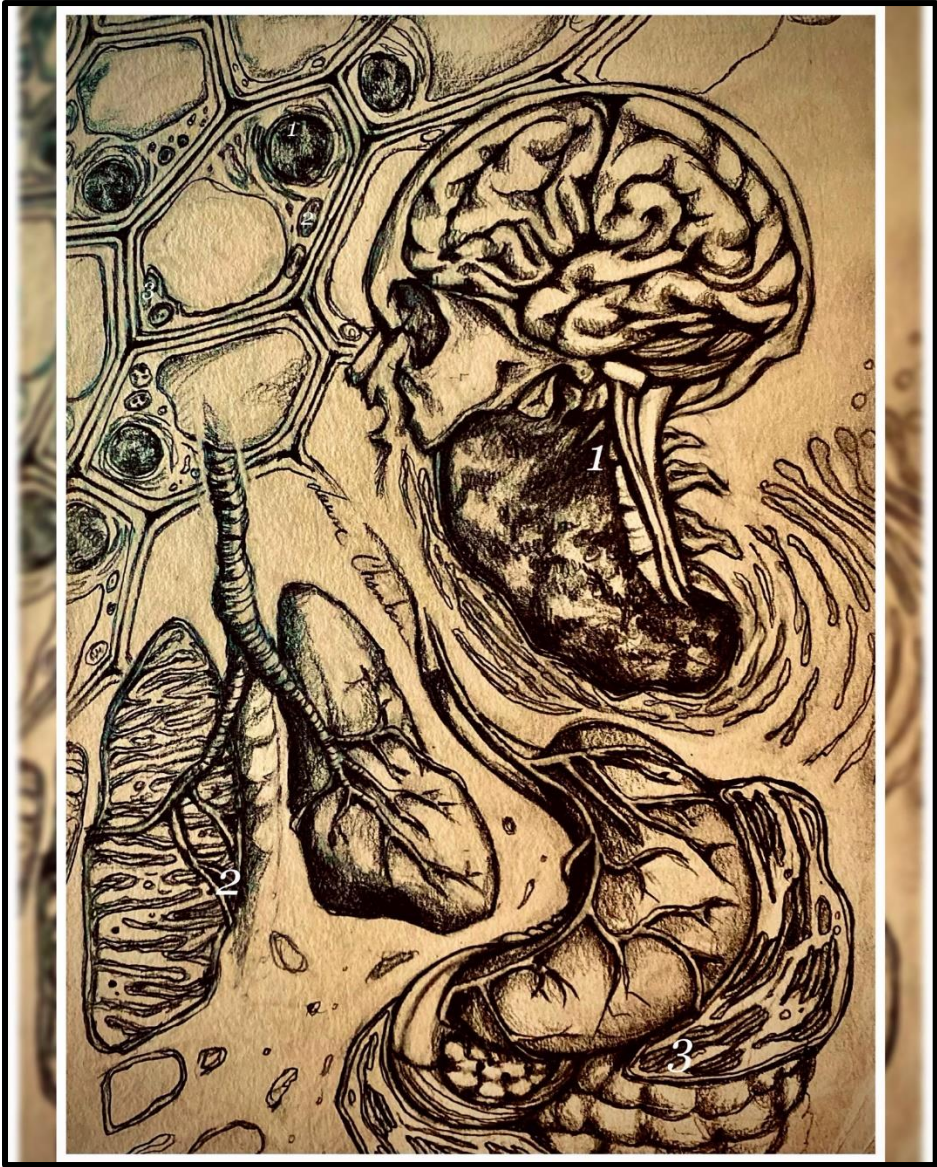
Figure 11 : La PEP se retrouve principalement sous deux formes : le cœur enzymatique de la PEP est représenté tel qu'assemblé chez *Sinapis*, et l'assemblage de ses unités reprises depuis (Börner *et al.*, 2015), et le dessin de son assemblage largement théorique, d'autant plus si représenté sous sa forme complexée avec les PAPs, tel que repris de (Kindgren and Strand, 2015). Les données d'interactions physiques entre PAPs proviennent de (Pfannschmidt *et al.*, 2015).

Figure 12 : Illustration des différents défauts phénotypiques associés aux KOs de la machinerie d'expression des plastes : Les mutants de NEPs sont représentés tels qu'observés chez (Baba *et al.*, 2004; Hricova, Quesada and Micol, 2006; Courtois *et al.*, 2007). Notez qu'en ce qui concerne RpoTp, c'est l'allèle mutant *sca3-2* qui est illustré.

Figure 13 : Résumé graphique de l'imbrication du verdissement et des phénomènes développementaux précoces liés à la perception de la lumière dans le mésophylle des cotylédons étiolés : Résumé pictural des différents points mentionnés dans l'introduction.

Illustrations botaniques : *Arabidopsis*, *Monotropa*, et les hellébore sont dessinés d'après observations personnelles. Le *Rhododendron pulchrum* depuis une annonce de pépiniériste, et *Cuscuta epithimum* depuis un regroupement d'images de l'espèce, de meme que le plan de pommes de terre et de maïs.

ABSTRACT & RESUME



RESUME

Le chloroplaste est un organite central dans le règne végétal puisqu'il est à l'origine du mode de vie autotrophe de la lignée verte. Chaque angiosperme décline cet organite semi-autonome en une variété de plastes finement adaptés au métabolisme des tissus qui les contient, alors même que leur génome, extrêmement réduit, code en grande part pour la machinerie qui l'exprime. Il s'agit notamment de la PEP (Plastid-Encoded RNA Polymerase), dont les études récentes montrent qu'elle requiert 12 protéines codées par le génome nucléaire (PAP1-PAP12 : PEP-Associated Proteins) pour être pleinement active sur les gènes dédiés à l'identité photosynthétique du plaste (PhAPGs).

Cette association de la PEP avec chacune des PAPs est tellement importante pour la biogenèse du chloroplaste, qu'en son absence la plante développe un syndrome albinos. Ainsi condamnée à l'hétérotrophie, elle n'est plus capable de faire de graines. Cependant, le contrôle du développement et du fonctionnement des chloroplastes par le noyau ne se limite pas aux PAPs, puisque l'expression des gènes photosynthétiques codés par le noyau (PhANGs) sont également nécessaires au verdissement des plastes, de même qu'un vaste ensemble de protéines nucléaires en lien avec leur métabolisme génétique. Aussi chez les Angiospermes, la biogenèse du chloroplaste est sous le contrôle direct de la lumière, puisque sa perception par les photorécepteurs déclenche dans le noyau une vaste cascade de signalisation permettant la conversion photosynthétique de plastes précurseurs dans les tissus destinés à effectuer la photosynthèse.

Un des évènements les plus précoces de cette signalisation est la formation de photocorps dans le noyau, à l'origine entre autres de l'expression des PAPs, des PhAPGs, et plus largement de la quasi-totalité du protéome du plaste en cours de verdissement. Or un certain nombre de PAPs – dont PAP8, sujet de cette étude – sont également détectés dans le noyau et participent activement à la formation des photocorps. Elles y sont détectées sous forme mature, laissant envisager qu'elles auraient préalablement subi l'import chloroplastique. Le mouvement de ces protéines bi-localisées constitue de fait un lien très énigmatique entre la biogenèse du chloroplaste et le développement à la lumière. Et PAP8 notamment pourrait ainsi coordonner verdissement et développement.

J'ai donc ici développé une stratégie génétique de manipulation des deux séquences d'adressages qu'elle contient pour découpler ses fonctions subcellulaires. Si l'altération de l'adressage aux plastes oblitère la conversion chloroplastique en interdisant la formation du complexe PEP-PAPs, l'y restreindre en introduisant 5 mutations sur sa séquence d'adressage nucléaire (NLS) ralentit fortement le verdissement de la plante ainsi que son développement. Or cette présente étude démontre qu'altérer la localisation de PAP8 altère une fonction dans les plastes, sans doute liée au métabolisme des ARNs. En outre, les résultats indiquent que ce domaine fonctionnel est également important dans le noyau où PAP8 forme un sous-complexe avec d'autres PAPs. Néanmoins, la fonction nucléaire de PAP8 reste à élucider.

ABSTRACT

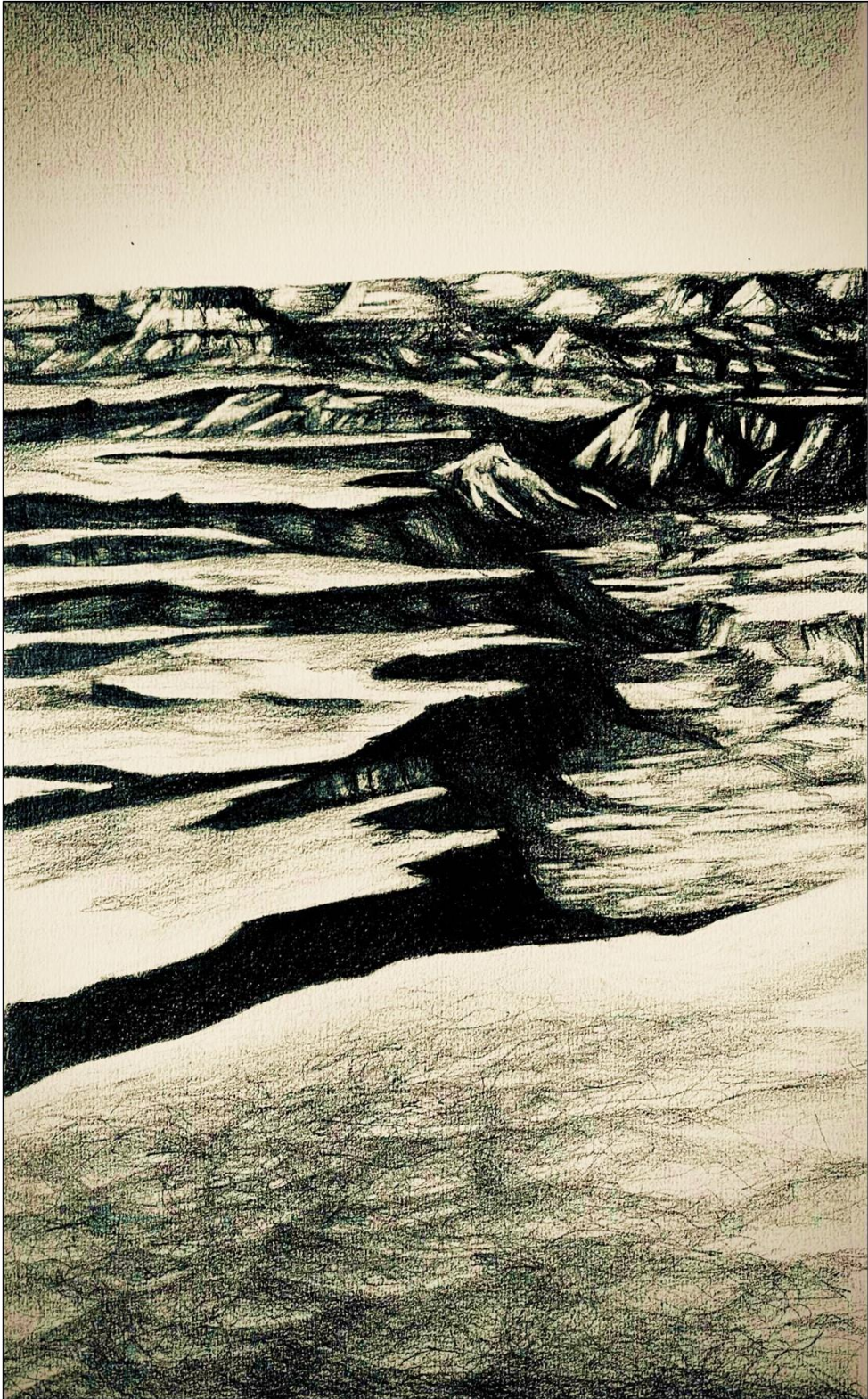
The chloroplast is a central organelle of the plant kingdom, since it is at the origin of the autotrophic lifestyle of the green lineage. Each higher plant declines this semi-autonomous organelle into a variety of plastids finely adapted to the metabolism of the tissues that contain them, even though their genome, extremely small, devotes a significant fraction to encode a part of the machinery that expresses it. These include the PEP (Plastid-Encoded RNA Polymerase), for which recent studies show that it requires 12 nuclear-encoded proteins, PAP1-PAP12, to fully transcribe photosynthetic-associated plastid genes (PhAPGs).

This association of PEP with each of the PAPs is so important for chloroplast biogenesis that in their absence, the plant develops an albino syndrome. Thus, condemned to heterotrophy, such mutants do not make seeds. The control of the development and functioning of chloroplasts by the nucleus is not limited to PAPs though, since the expression of photosynthetic-associated nuclear genes (PhANGs) are also necessary for the greening of plastids. In Angiosperms, chloroplast biogenesis is under the direct control of light, since its perception by photoreceptors triggers in the nucleus a vast signaling cascade allowing chloroplast conversion in tissues intended to perform photosynthesis.

One of the earliest events of this signaling is the formation of photobodies in the nucleus. They are at the origin of the expression of PAPs, PhAPGs, and more broadly of almost the entire proteome of the greening plastid. However, a number of PAPs including PAP8, which is the subject of this study, are also detected in the nucleus and actively participate in the formation of photobodies. They are detected in their processed form, without cTP, suggesting that they would have previously undergone chloroplast import. The movement of these bi-localized proteins is a very enigmatic link between chloroplast biogenesis and light development.

PAP8, in particular, could thus coordinate greening and development. Here I developed a strategy to manipulate the two signaling sequences of PAP8 to decouple its subcellular functions. The alteration of the chloroplast transit peptide obliterates the chloroplast conversion by prohibiting the formation of the PEP-PAP complex, whereas the mutation of its nuclear localization signal (NLS) greatly slows down the greening of the plant as well as its development. Using a genetic strategy, the present study demonstrates that altering the localization of PAP8 alters a function in the plastids, probably related to the metabolism of RNAs. In addition, the results suggest that this functional domain is also important in the nucleus where PAP8 forms a sub-complex with other PAPs. Nevertheless, the nuclear function of PAP8 remains to be determined.

INTRODUCTION



CHAPITRE I

DEVELOPPEMENT DU CHLOROPLASTE

I – 1) ORIGINE ET EVOLUTION DES ARCHAEPLASTIDA

Les cyanobactéries appartiennent à un clade ancien d'organismes procaryotiques liés à l'émergence de la réaction de photosynthèse oxygénique. Et c'est leur apparition précoce qui a conduit à la crise de l'oxygène "*Great Oxydation Event*" il y a 2.4 milliard d'années, modifiant durablement la chimie oxydo-réductrice de la Terre, bouleversant profondément la biologie des organismes qui s'y développaient alors (Demoulin *et al.*, 2019).

Plus tard, il y a au moins 1 milliard d'années, un protiste eucaryote phagotrophe a fait l'acquisition de cette capacité photosynthétique en phagocytant une cyanobactérie, préemptant ainsi son métabolisme autotrophe lors d'un processus que l'on nomme endosymbiose (de Vries and Archibald, 2017). L'émergence monophylétique de cette lignée dite « photosynthétique » est caractérisée par la présence de chloroplastes semi-autonomes parmi les organites de la cellule, reliquats de l'endosymbionte aux multiples signatures d'origine procaryotique. Cette association à bénéfice réciproque s'est ensuite complexifiée et diversifiée par une succession d'endosymbioses secondaires puis tertiaires (McGrath, 2021). En outre, c'est bien l'acquisition initiale de ce compartiment intracellulaire que l'on nomme le chloroplaste dans sa forme moderne, ayant doté son hôte d'un métabolisme photo-autotrophe. Cette acquisition unique lors de l'évolution du vivant est visiblement un succès, puisque le royaume végétal n'occupe pas moins de 80% de la biomasse actuelle (Bar-On, Phillips and Milo, 2018), et que tous les organismes vivants en dépendent.

Parmi les lignées ayant retenu un plaste primaire, les Archaeplastida, on compte les Viridiplantae (algues vertes et plantes terrestres), les Rhodophyta (algues rouges), et les Glaucophyta (Ponce-Toledo, López-García and Moreira, 2019). La terrestrialisation plus tardive des Viridiplantae, il y a seulement 450 millions d'années, permet l'émergence des plantes non vascularisées comme *Physcomitrium patens* dont le métabolisme reste assez éloigné des plantes de radiation plus récente. En effet, la vascularisation permettra de diversifier et de spécialiser des organes racinaires et aériens, de même que les organites que les cellules de ces tissus renferment. Apparaîtront ensuite les spermatophytes, avec d'abord les gymnospermes puis les plantes à graines : les angiospermes (de Vries *et al.*, 2016). Caractérisés par leurs fleurs, ces derniers se subdivisent en deux grandes catégories, monocotylédones et dicotylédones, dont le développement présente de nombreuses subtilités.

Si ces clades ont largement divergés au grès de l'évolution, tous retiennent le même chloroplaste dont la principale fonction est d'assurer la photosynthèse dans les tissus aériens de la plante exposés à la lumière.

1 – 2) AUTOTROPHIE CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES

A - L'ARCHITECTURE DU CHLOROPLASTE REFLETE SON METABOLISME

CONSTITUANTS MEMBRANAIRES DES THYLAKOÏDES

L'architecture de la plante est finement adaptée à son mode de vie autotrophe, et c'est aussi le cas à l'échelle de l'organe lui-même. En effet, les membranes des thylakoïdes sont le siège de la photosynthèse et sont étroitement empilées les uns sur les autres en granum, augmentant ainsi la surface disponible pour mener à bien cette réaction métabolique (Figure 1).

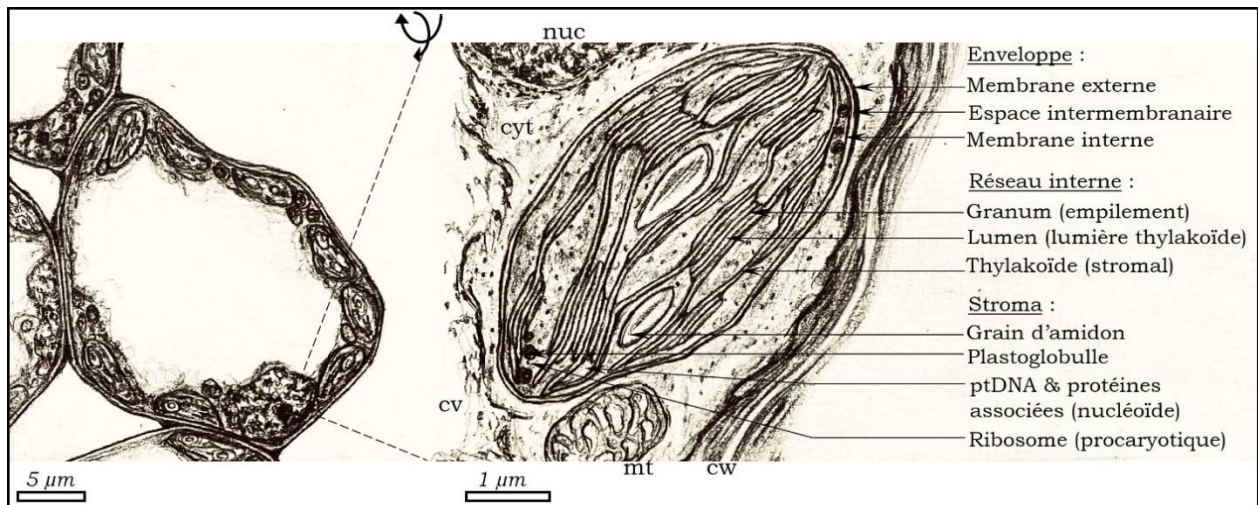


Figure 1 : Architecture canon du chloroplaste et place dans la cellule.

Après émergence de la plantule à la lumière, les cellules possèdent une grosse vacuole centrale (cv) qui repousse le cytosol (cyt) et les organites à la périphérie de la cellule, proche de la paroi cellulaire (cw), tel que dessiné à droite après un zoom de la zone indiquée. Les trois sous-compartiments du chloroplaste et ses constituants y sont indiqués, et une mitochondrie (mt) est également représentée pour rendre compte des échelles. Il faut avoir plus de chance pour observer le noyau (nuc), lui aussi repoussé contre la paroi de la cellule.

La plupart des lipides qui constituent les membranes des plastes sont des galactolipides (MGDG et DGDG) (Mechela, Schwenkert and Soll, 2019), et contribuent à leur architecture et aux réactions de photosynthèse qui s'y déroulent (Pipitone *et al.*, 2021). De nombreuses protéines viennent s'y insérer, la plupart impliquées dans le métabolisme photosynthétique, de même que des pigments avec chlorophylles et caroténoïdes, que l'on peut retrouver incorporés à des complexes de protéines ou libres

dans la bicouche lipidique. Leur présence joue un rôle direct sur le métabolisme photosynthétique (chlorophylle, caroténoïdes, plastoquinone), ou indirect via l'optimisation de l'utilisation de la lumière, et/ou en protège les constituants qui sont impliqués dans le processus (Pipitone *et al.*, 2021). Sont aussi présents des grains d'amidons – polymère stable dérivé du glucose –, et en ce sens souvent situés à proximité des membranes des thylakoïdes. On retrouve également proche des membranes des plastoglobules stockant lipides, caroténoïdes, et plastoquinone dans les plastes photosynthétiques (Sakamoto, Miyagishima and Jarvis, 2008).

Cela dit, les chloroplastes ne sont pas seulement le siège de la photosynthèse, et la présence de structures internes non thylakoïdiennes très dynamiques en atteste sûrement (Sakamoto, Miyagishima and Jarvis, 2008). Les chloroplastes sont en effet le siège de la synthèse de lipides, hormones, et autres métabolites nécessaires au métabolisme cellulaire, et en font *in fine* le siège de régulations extrêmement importantes pour la cellule, et plus largement pour l'organisme tout entier.

LES COMPLEXES PROTEIQUES DES THYLAKOÏDES SONT RESPONSABLES DE SON ARCHITECTURE

C'est l'ensemble des constituants des thylakoïdes, notamment les complexes photosynthétiques, qui permettent un empilement très organisé de ses membranes (Pribil, Labs and Leister, 2014). Leurs répartition précise dans l'espace permet non seulement de cloisonner le réseau de membranes internes du plaste en un lumen continu, mais aussi de coordonner les différentes réactions de la photosynthèse, optimisant ainsi le métabolisme du plaste.

On retrouve principalement les PSII (Photosysteme II) et LHC2 (Light-Harvesting Complex II) sur les thylakoïdes des grana car ils ont tendance à s'oligomériser, alors que le Cyt b6f (Cytochrome b6f complex) et l'ATP synthase du plaste (cpATPase), et le PSI-LHC1, sont plus encombrants et plutôt sur les thylakoïdes stromaux (Pribil, Labs and Leister, 2014). LHC2 doit notamment s'associer en trimères de telle sorte que les granas puissent se former, comme le démontre l'analyse des mutants *angulata 10 (anu10)* au phénotype vert-pale, et *grana deficient chloroplast 1 (gdc1)* aux conséquences léthales (Pogson, Ganguly and Albrecht-Borth, 2015). De la même manière, le DGDG est le galactolipide majeur des thylakoïdes stromaux, alors que celui des grana est le MGDG, dont les propriétés permettent de relaxer la tension exercée sur ces membranes (Pipitone *et al.*, 2021). Bien qu'observables comme des empilements de thylakoïdes lamellaires et plats en 2D, le réseau intramembranaire thylakoïdien est en fait un compartiment continu en 3D. Il délimite donc un lumen, un des 3 compartiments du chloroplaste, l'espace intermembranaire entre les deux membranes de l'enveloppe, et le stroma.

Plus ou moins dense, ce dernier contient des nucléoïdes constitués entre autres de protéines et de molécules d'ADN circulaires, rémanences du chromosome bactérien, et dont une partie code pour la machinerie de type procaryotique qui l'exprime (polymérase, ARN de transfert et ARNs et protéines

ribosomiques). Néanmoins, la plupart des protéines du chloroplaste – qu’elles soient en lien avec le métabolisme photosynthétique ou génétique –, sont encodées dans le noyau, et doivent donc être exprimées, traduites, puis importées depuis le cytosol.

L’organite est donc loin de s’autoréguler lui-même, et la plupart de ses réactions sont avant tout dictées en amont par le noyau.

METABOLISME DE LA PHOTOSYNTHESE, EN BREF

L’accès à la lumière est capital pour l’autotrophie de la plante, puisqu’elle déclenche directement la réaction de photosynthèse en alimentant la chaîne de transport d’électrons sur les membranes des thylakoïdes (Figure 2).

Deux types de composés majeurs sont essentiels à ce phénomène : les photosystème I et II (PSI et PSII), et les antennes collectrices de lumières (LHC) qui y sont associées. Les PSs se lient à la chlorophylle, qui passeront à un état excité après l’absorption d’un photon. Ce phénomène prend d’abord place dans les LHCs, puis est transmis de proche en proche jusqu’à une chlorophylle particulière contenue dans le centre réactionnel (RC) du photosystème. C’est grâce à cette transmission d’énergie que le PSII parvient à convertir deux molécules d’eau en une molécule de dioxygène, libérant ainsi des protons H⁺, et des électrons.

Ceux-ci sont captés par un transporteur d’électrons, la plastoquinone (PQ), mobile dans la bicouche lipidique, et envoyés au complexe Cyt b6f qui importe alors des protons H⁺ dans le lumen, puis à la plastocyanine, un autre transporteur mobile. L’électron est ensuite transmis au PSI puis à la ferrédoxine-NADPH oxydoréductase (FNR). C’est ici que le potentiel énergétique de l’électron est converti en un donneur d’électron stable, le NADPH. L’ensemble a lieu au niveau de la membrane du thylakoïde et conduit à l’acidification du lumen, créant un gradient de protons qui alimente la pompe ATPase pour convertir un ADP et un phosphate en ATP. C’est ce qu’on appelle la réaction de la phase claire. Notez que le flux de protons et d’électrons qui l’alimente peut facilement entraîner un stress oxydant en créant des radicaux libres, délétères aux acides nucléiques et protéines. Ceux-ci sont donc certes constamment pris en charge par la chaîne de transport d’électrons, mais ils sont également réinvestis par le plaste et la cellule pour traduire et réguler l’activité métabolique de l’organelle.

Lors du cycle de Calvin (ou phase sombre, non représentée), le NADPH et l’ATP ainsi produits sont utilisés pour fixer 3 molécules de CO₂ en une molécule de glucose C₆H₁₂O₆ dans le stroma par la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco).

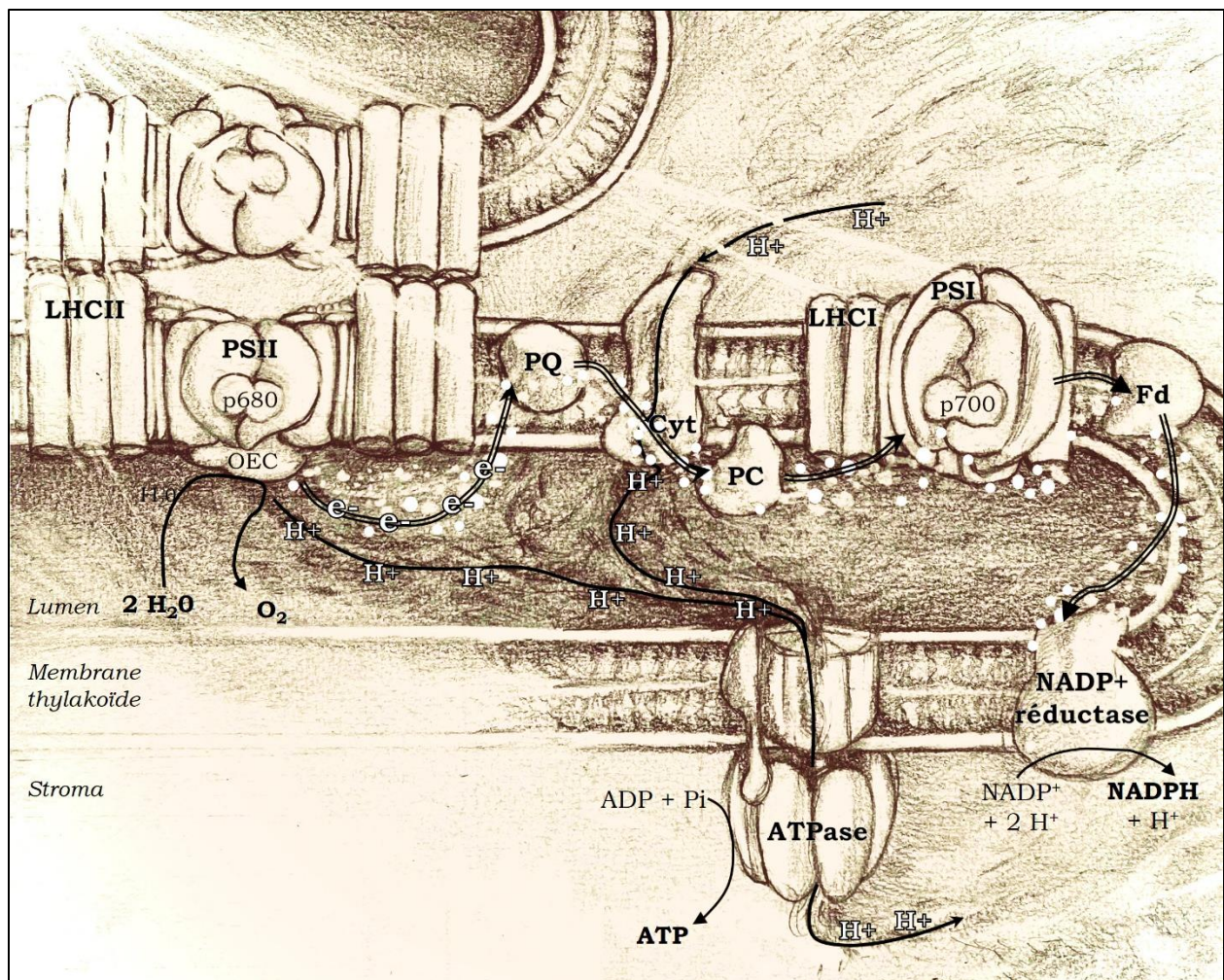


Figure 2 : Schéma simplifié de la phase claire de la photosynthèse sur les membranes des thylakoïdes.
 Les Photosystèmes II (PSII) et le PSIs associés aux antennes collectrices de lumière (LHCs) sont riches en chlorophylle, et assurent avec d'autres composés la réaction de la phase claire sur la membrane des thylakoïdes. L'ATP et le NADPH synthétisés serviront à fixer le CO₂ en glucose dans le stroma. Les complexes sont certes représentés avec quelques-unes de leurs sous-unités, mais en réalité bien plus sont en jeu et sont à la fois encodées dans le plaste et dans le noyau. Le trajet des protons est noirci pour montrer le gradient de proton entre lumen et stroma, et montré par une ligne simple épaisse, de même que la photolyse de l'eau dont certains sont issus ; celui des électrons par de petites étincelles blanches soulignées par une ligne double. OEC : Oxygen evolving complex. P680 et p700 : chlorophylles contenues dans les centres réactionnels des PSII et PSI respectivement.

B - LES CHLOROPLASTES DANS LES TISSUS DU LIMBE ADULTE

MORPHOLOGIE DU LIMBE FOLIAIRE

La réaction de photosynthèse implique deux phases, et nécessite apport d'eau et échanges gazeux pour importer le dioxyde de carbone et rejeter le dioxygène. Les plantes supérieures présentent des tissus aériens exposés à la lumière parfaitement optimisés pour effectuer cette réaction (Figure 3).

D'abord parce que les feuilles, principaux organes photosynthétiques de la plante, sont arrangées en de larges surfaces planes, optimisant les surfaces de contact avec la lumière. Ensuite parce que le mésophylle est principalement composé de parenchyme palissadique et lacuneux, deux tissus spécialisés dans la photosynthèse et donc riches en chloroplastes. Si le tissu palissadique est jointif, le parenchyme lacuneux est plus lâche et parsemé de lacunes pour optimiser les échanges gazeux nécessaires à la photosynthèse, et les stomates, cellules spécialisées de l'épiderme, contrôlent les flux avec l'extérieur.

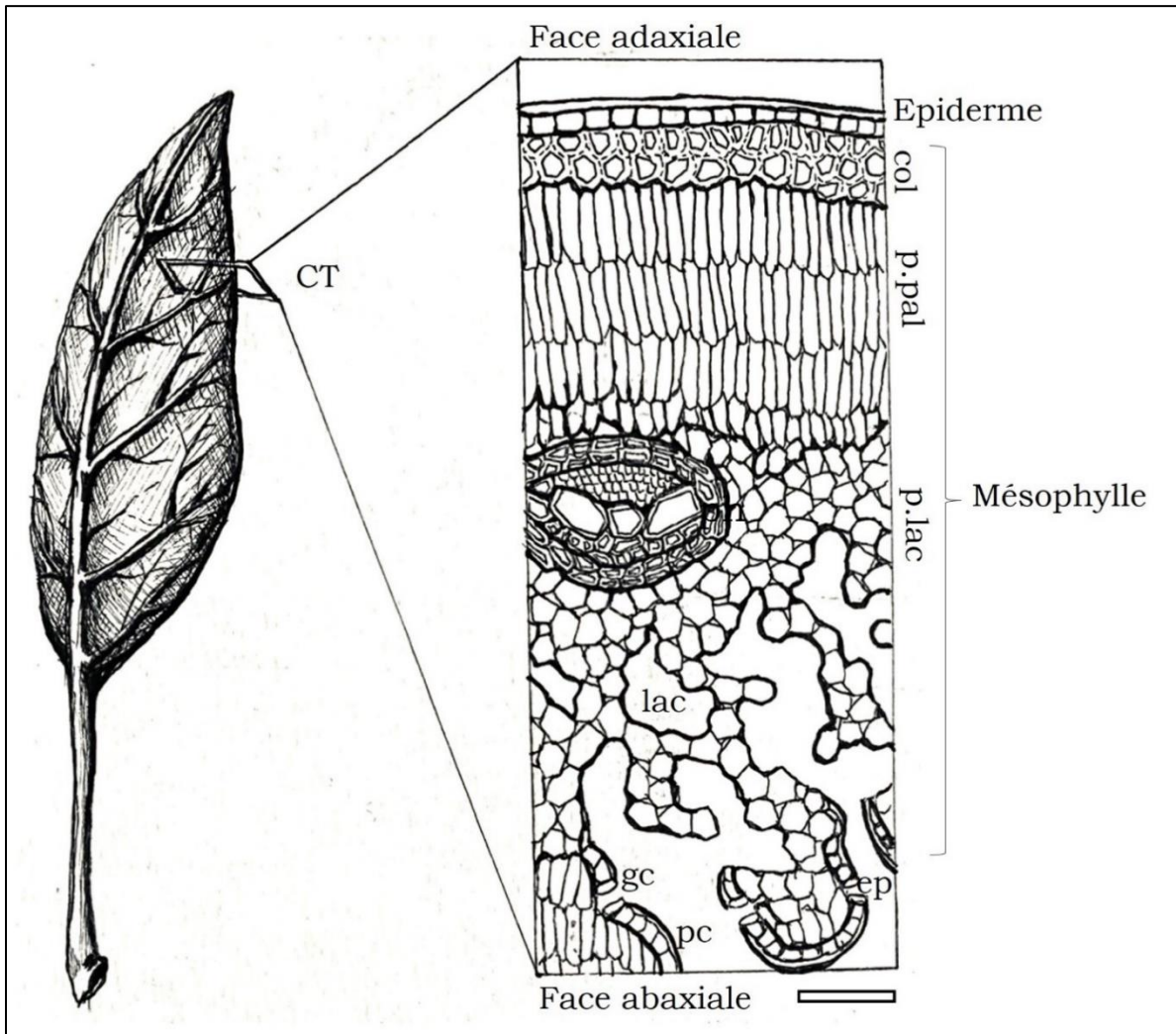


Figure 3 : Illustration d'une coupe transversale histologique typiquement obtenue dans un tissu foliaire mature. Un épiderme (ep) composé d'une seule couche cellulaire est présent sur les deux faces de la feuille. Recouvert d'une cuticule, ce tissu une fois mature ne contient que peu de chloroplastes dans les cellules du pavement (pc) et les cellules de garde (gc) qu'il contient, plus nombreuses sur la face abaxiale qu'adaxiale. Un tissu collenchymateux (col) peut venir sous-tendre un tissu palissadique jointif (p.pal) et lacuneux (p.lac), très riche en chloroplastes dont le taux est maintenu par fission de chloroplastes préexistants. Est également représenté une nervure secondaire, avec les éléments de xylème (sève brute) et phloème (sève élaborée), généralement cerclé de quelques fibres (sclérenchyme). La barre d'échelle représente 100 μm .

La circulation des fluides – sève brute contenant l'eau requise pour débiter la réaction de photosynthèse, et sève élaborée qui en contient le produit – traversent la plante des racines jusqu'aux feuilles et des feuilles jusqu'aux racines respectivement, optimisant là encore le métabolisme autotrophe de la plante.

DEVELOPPEMENT DE LA FEUILLE ET DEVENIR DES PLASTES

Une fois mature, le mésophylle équilibre son taux d'organites principalement par fission des chloroplastes préexistants. Ce processus de division, proche de la fission binaire procaryote, est médié par des protéines tubuline-like (FtsZ) et dynamin-like qui forment un anneau concentrique autour de l'organelle (Pogson, Ganguly and Albrecht-Borth, 2015). Le parenchyme mature peut ainsi contenir entre 80 et 120 chloroplastes par cellule, soutenant une forte activité métabolique et constituant un verrou de sécurité contre la forte charge mutagène qui en résulte à terme (Sakamoto, Miyagishima and Jarvis, 2008).

L'épiderme mature (Figure 4) est composé de cellules de pavement et des cellules de garde qui entourent les ostioles (ouvertures) des stomates. Le tissu contient des plastes avec des membranes internes chlorophylliennes, et sont donc en ce sens attribuables à des chloroplastes (Barton, Schattat and Jakob, 2016), bien que cela soit controversé (Charuvi *et al.*, 2012; Pogson, Ganguly and Albrecht-Borth, 2015). Cela dit, une fois le tissu mature, l'épiderme contient de nombreux leucoplastes (Charuvi *et al.*, 2012), et les chloroplastes qu'il contient sont plus petits et dix fois moins nombreux que dans une cellule du mésophylle (Bramham and Pyke, 2017). Ces plastes ont aussi moins de thylakoïdes qu'un chloroplaste palissadique, et leurs autofluorescence observée sous microscope est plus faible, et ont également tendance à se coller au fond de la cellule de l'épiderme, proches des cellules du tissu photosynthétique spécialisé en contrebas. Il est par conséquent difficile de ne pas les attribuer à ce tissu sans faire de coupe longitudinale (Barton, Schattat and Jakob, 2016).

Sachant que l'épiderme se prépare subtilement à la production de plastes en amont du mésophylle (cf chapitre II introduction), on peut s'autoriser à penser que la morphologie et la localisation particulière des épidermoplastes soient le reflet d'une signalisation liée au métabolisme autotrophe de la plante transmise efficacement au mésophylle et aux plastes qu'il contient.

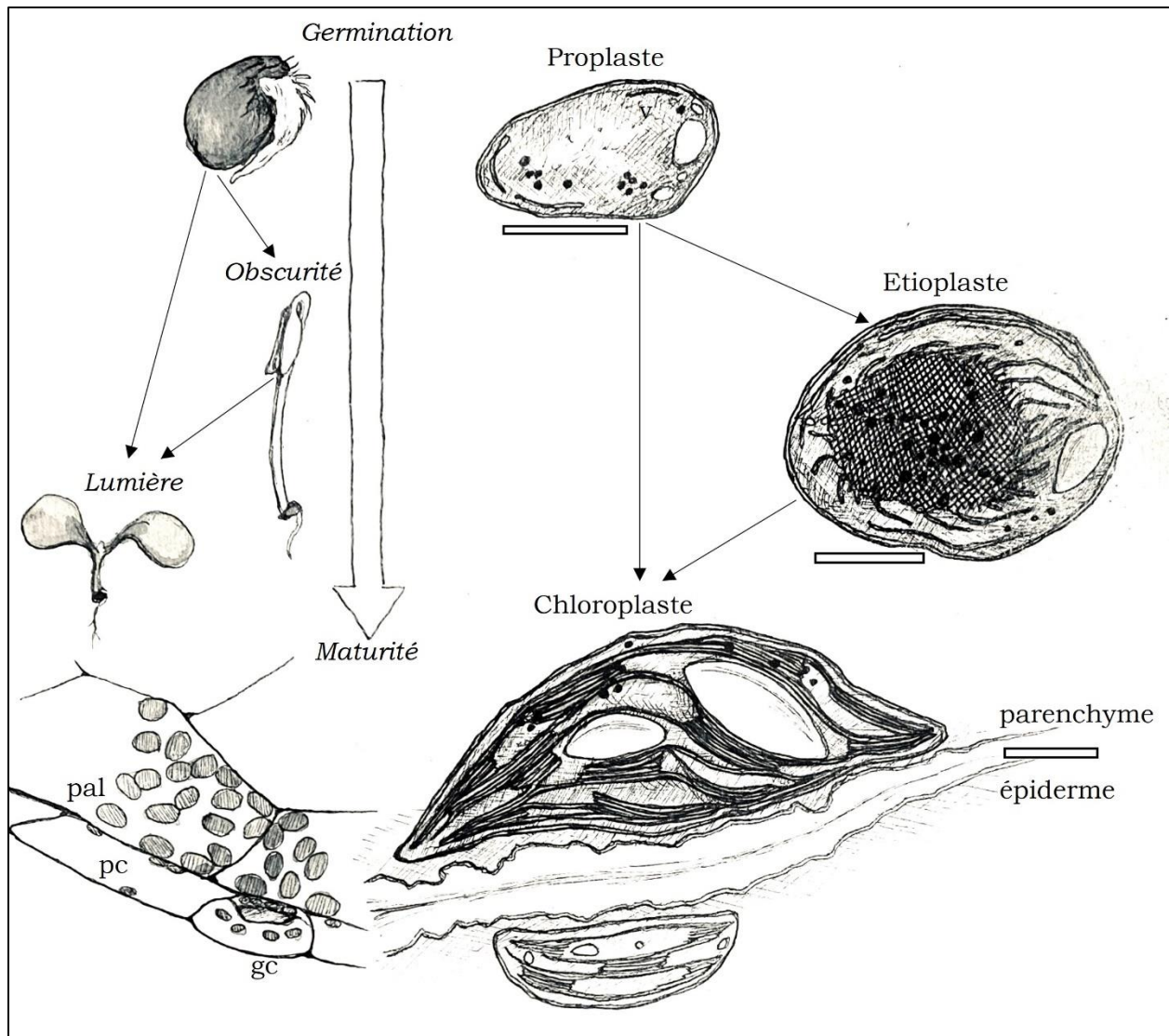


Figure 4 : Le développement de la plantule et la conversion des plastes sont dépendants de la lumière.

Si la graine germe à l'obscurité, elle rentre dans un programme développemental dit de skotomorphogénèse, où la plantule garde son crochet apical, les cotylédons restent petits et fermés, et s'y s'accumulent des étioplastes, précurseurs directs des chloroplastes. Si une telle plantule est illuminée, le programme génétique de la photomorphogénèse se lance et mène à l'inhibition de l'élongation de l'hypocotyle, l'ouverture et l'expansion des cotylédons, ainsi que la conversion photosynthétique rapide des plastes, phénomène nous le verrons hautement régulé par l'expression et l'adressage de gènes nucléaires aux plastes. Si la plante germe directement à la lumière, la plantule entrera directement en photomorphogénèse et l'hypocotyle ne s'allonge donc pas, tel que dessiné ici. Plus tard dans le développement le tissu de l'épiderme, notamment constitué de cellules de pavement (pc) et de cellules de garde (gc), se distingue par des chloroplastes plus petits et moins nombreux que dans le mésophylle (tissu palissadique, pal). La barre d'échelle représente approximativement 1µm.

I – 3) DIVERSIFICATION DES PLASTES CHEZ LES PLANTES SUPERIEURES

A - LARGE PLASTIQUE PLASTIDIALE

DEFINITION DU PLASTE

Le mode de vie autotrophe du règne végétal place évidemment le chloroplaste au cœur de son métabolisme. Mais ce plaste s'est largement diversifié depuis son acquisition par la lignée verte lors de l'apparition de la tissularisation, de même que le noyau qui aura subi de profonds réarrangements (Solymosi and Aronsson, 2013). En fait le chloroplaste a servi de base pour spécialiser différents types de plastes aux morphologies et fonctions variées, parfaitement adaptés aux contraintes subies par chacun des tissus de la plante (Lopez-Juez and Pyke, 2005).

En fonction du développement, du tissu ou organe considéré, et des conditions externes, le plaste peut se convertir réversiblement en un autre type (Liebers *et al.*, 2017) mais retiendra toujours ces caractéristiques : il est délimité par sa double membrane externe, et développe parfois des protrusions tubulaires (stromules). Le protéome et la composition en pigments ne sont pas les mêmes en fonction du plaste considéré et représentent leurs signatures. On distingue d'ailleurs deux catégories de plastes : pigmentés (chloroplastes, chromoplastes, etioplastes) et incolores (les leucoplastes dont les proplastes). Enfin, l'architecture des membranes internes (si elles existent) reflète l'identité du plaste et peuvent par exemple s'associer en cisternae (thylakoïdes stromaux chez le chloroplaste), ou en structures plus ou moins tubulaires dans le stroma.

CONVERSION CYCLIQUE DU PLASTE DE GENERATIONS EN GENERATIONS

En tant qu'organite semi-autonome, le chloroplaste ne se fabrique pas *de novo* à la descendance (Sakamoto, Miyagishima and Jarvis, 2008), mais est transmis sur le mode de l'hérédité cytoplasmique par voie maternelle (Maréchal *et al.*, 2009). Il subit ensuite une série de transformations profondes de la fécondation de la cellule œuf au stade de dessiccation de l'embryon mature (Liebers *et al.*, 2017).

Plus précisément, l'embryon à peine formé ne contient que des proplastes indifférenciés, bien que des traces de sous-unités photosynthétiques γ soient déjà détectées (Allorent *et al.*, 2013). De la chlorophylle s'accumule ensuite doucement dans le protoderme au stade globulaire (Figure 5), puis l'embryon prend la forme d'un cœur et accumule des plastes photosynthétiques à la structure proche de celle des chloroplastes (Tejos, Mercado and Meisel, 2010). Au stade « torpille », l'embryon accumule des taux élevés de chlorophylle, et tout l'embryon possède des chloroplastes, sauf les cellules de l'apex méristématique (SAM) et une partie du cortex initial (Tejos, Mercado and Meisel, 2010; Yadav *et al.*,

2019). L'expression des gènes photosynthétiques atteint d'ailleurs un pic lorsque l'embryon atteint le stade « cotylédons recourbés » (Allorent *et al.*, 2013). Néanmoins, les chloroplastes ainsi formés sont ensuite convertis en éoplaste avec la dessiccation de la graine (Liebers *et al.*, 2017). Parmi la quantité de sous-unités photosynthétiques générées, elle n'en gardera que quelques-unes, mais conservera par contre la machinerie qui l'exprime (Allorent *et al.*, 2013).

Bien que ce verdissement transitoire soit encore mal compris, on le suppose être un moyen efficace d'enclencher le métabolisme génétique plastidial rapidement dès la germination (Liebers *et al.*, 2017).

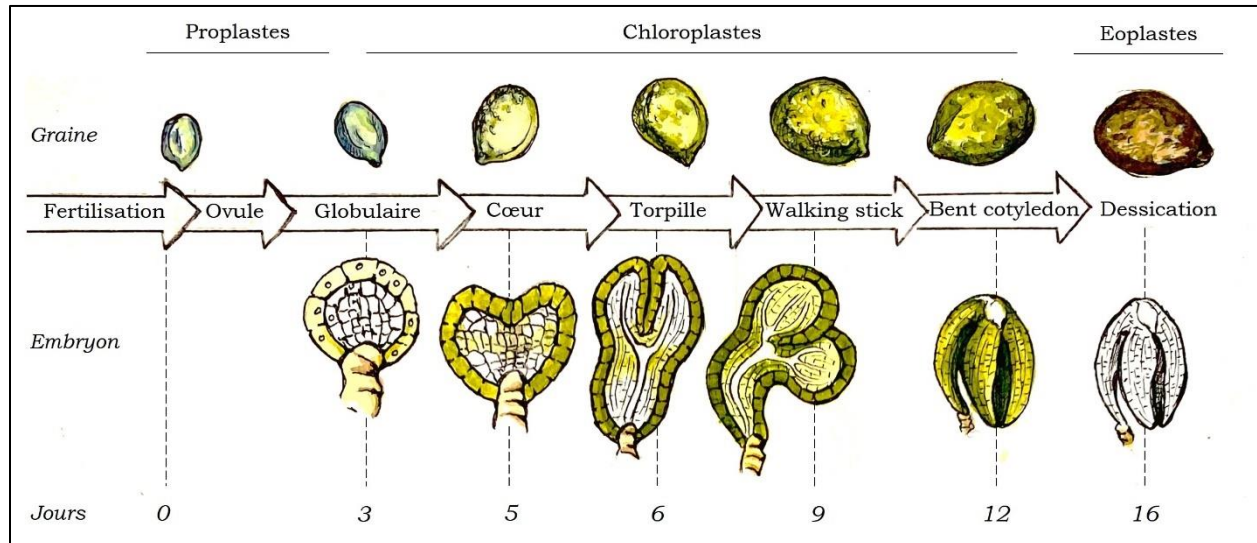


Figure 5 : Phase photosynthétique transitoire pendant l'embryogenèse, avant dessiccation de la graine.

Tout au long du processus de développement de l'embryon s'accumulent de nombreuses protéines photosynthétiques, mais celles-ci disparaissent quasiment toutes avec la phase de dessiccation qui suit, quand par ailleurs les NEPs s'accumulent dans les plastes. Avec la PEP qui s'est également accumulé tout au long du processus, les trois RNAPs sont conservées même après dessèchement, où seulement des Eoplastes sont conservés (RNAPs : voir chapitre II de l'introduction). L'évolution de la taille de la graine est représentée à l'échelle, mais pas la maturation de l'embryon. La période de dessiccation de la graine commence seulement aux alentours de 16 jours post-fertilisation, mais se poursuit sur plusieurs semaines. Notez que lors du stade bent cotyledon et plus tard après dessèchement, le méristème de la plantule est dessiné en surface pour visualisation, comme dans la figure 6.

B - DEVELOPPEMENT DES CHLOROPLASTES A LA LUMIERE

DANS LES COTYLEDONS A LA LUMIERE

Pour synchroniser le développement des plantules, les graines sont portées à 4°C dans le noir pendant plusieurs jours en condition humide. A la fin de cette période dite de stratification, les tissus de l'embryon présentent une plus forte intensité d'autofluorescence de la chlorophylle, donc indiquant des « chloroplastes quelques peu développés » (Yadav *et al.*, 2019) (Figure 6).

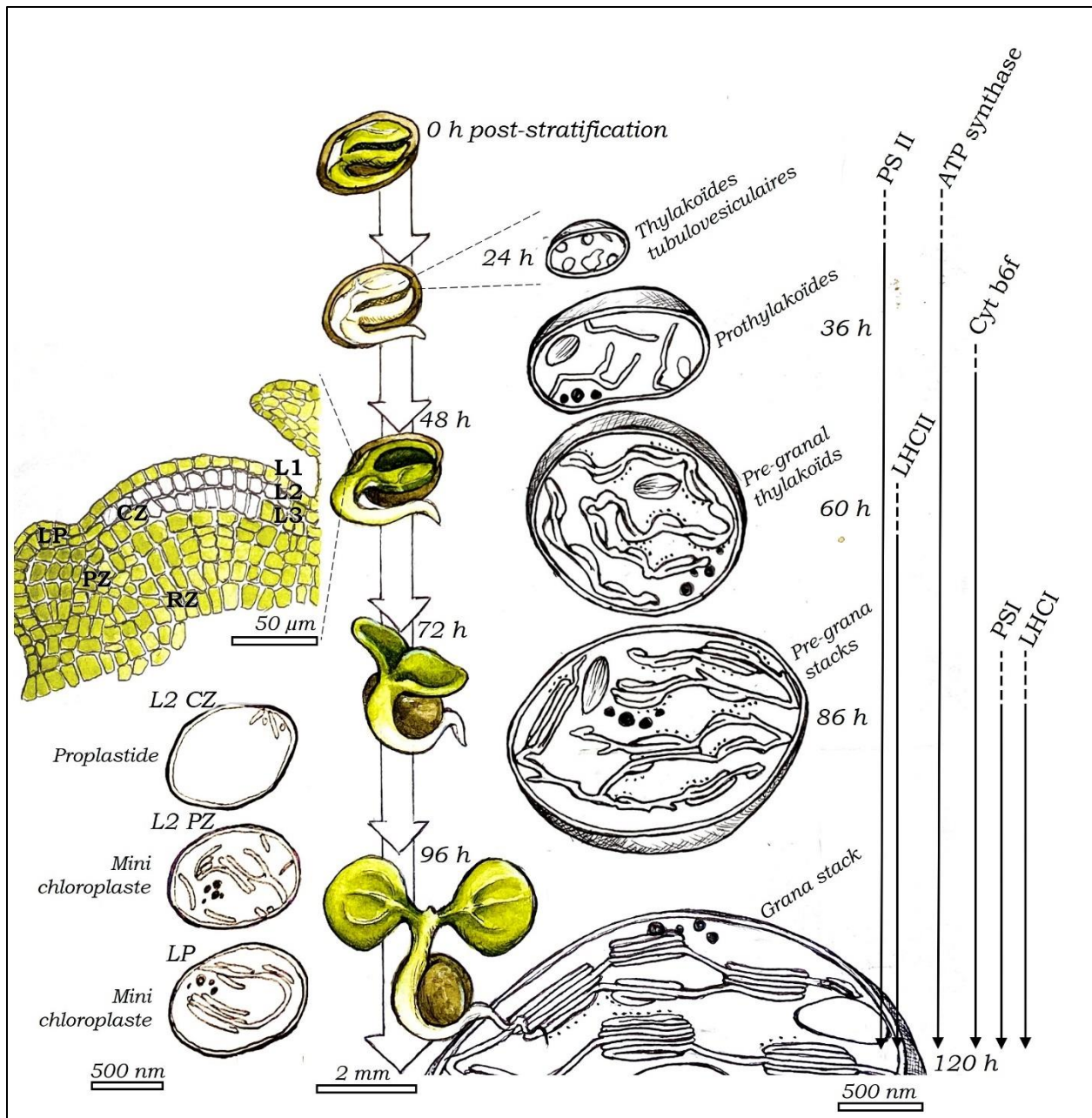


Figure 6 : Illustration de la différenciation des proplastes dans le SAM (à gauche) et les cotylédons (à droite) d'une graine germant à la lumière (au centre).

Pendant l'imbibition de la graine à 4°C, un certain nombre de plastes photosynthétiques s'accumulent à l'échelle de tout l'embryon, sauf dans l'ensemble du SAM, ici dessiné en surface de sorte à pouvoir le visualiser. Après 24h d'exposition à la lumière à température ambiante, ceux-ci laissent place à de petits proplastes sans structure interne. La racicelle de l'embryon pointe ensuite rapidement, et la conversion photosynthétique se met progressivement en place. L'apparition de thylakoïdes stromaux coïncide avec l'expression des produits de gènes photosynthétiques codant pour le PSI, quand les sous unités du PSII et LHCII s'accumulent progressivement déjà en amont. Après 48 heures le schéma de verdissement se met en place dans le SAM, et reste inchangé pendant tout le développement de la plante. La représentation des plastes du SAM et des cotylédons est à l'échelle. CZ : Central Zone. PZ : Peripheral Zone. LP : Leaf Primordia. RZ : Rib Zone. SAM : Shoot Apical Meristem.

Cette phase n'est pas requise à proprement parler pour déclencher la germination chez *Arabidopsis*, par contre elle est essentielle pour d'autres espèces, tel qu'extensivement étudié chez le pommier *Malus domestica* (Lewak, 2011; Krasuska *et al.*, 2015).

Cela dit, et en tous cas chez *Arabidopsis*, l'autofluorescence de l'embryon diminue 24 heures plus tard peu importe les conditions lumineuses (Yadav *et al.*, 2019). Les plastides des cotylédons perdent ici la quasi-totalité de leurs chlorophylles et sous unités photosynthétiques. Leur nombre semble également diminuer (Bai *et al.*, 2017). La membrane interne de l'enveloppe de ces plastides s'y invagine pour former des thylakoïdes tubulovésiculaires, et comme seules quelques traces de complexes photosynthétiques sont détectées, elles ne sont pas encore aplaties mais plutôt tubulaires. Ceux-ci grossissent rapidement en même temps qu'elles s'aplatissent, événement concordant avec l'association de polysomes à leur surface. Quelques traces de sous unités de PSII apparaissent d'ailleurs et s'accumulent graduellement tout au long du développement de l'embryon à la lumière.

Ce n'est qu'entre deux et trois jours post-stratification que s'assemblent de petits pré-grana. Leur formation débute avec l'apparition de petites protrusions entourées de polysomes sur les thylakoïdes, qui insèrent localement des protéines de complexes photosynthétiques. C'est cet événement qui sert de point de nucléation pour l'empilement subséquent des grana juvéniles puis matures 24 heures plus tard, quand apparaissent par ailleurs les sous unités du PSI et LHC1. D'ailleurs l'apparition de ces micro-domaines protéiques coïncide avec la délimitation plus nette des thylakoïdes stromaux. En ce sens, les chloroplastes commencent à ressembler à des chloroplastes matures, mais les granas gardent une morphologie relativement juvénile car ils conservent une large surface en contact avec le stroma. Finalement, 5 jours post-germination les thylakoïdes forment un réseau bien plus vaste, et l'ensemble possède toutes les caractéristiques d'un chloroplaste mature, où l'on continue à retrouver quelques points de contact avec l'enveloppe du plaste (Liang *et al.*, 2018).

LES PROPLASTES DU SAM LORS DU DEVELOPPEMENT A LA LUMIERE

Le méristème est une zone de division active qui peut se découper en plusieurs domaines. La zone centrale (CZ) sera à l'origine de tous les tissus aériens de la plante. Les deux zones latérales (PZ) flanquant la CZ seront responsables des feuilles, et la rib zone (RZ) des tissus internes. On peut aussi découper le SAM en trois couches successives : La couche L1 se différenciera en épiderme, la couche L2 en tissus externes du mésophylle (parenchyme palissadique), et la couche L3 en mésophylle interne (dont parenchyme lacuneux et vaisseaux). Le SAM, de l'embryogenèse jusqu'à 24 heures post-imbibition, est intégralement dépourvu de chlorophylle, peu importe l'intensité lumineuse perçue (Tejos, Mercado and Meisel, 2010; Yadav *et al.*, 2019).

Ce n'est que 48h plus tard que le SAM possède des chloroplastes dans toutes ces zones, sauf en L2-CZ ainsi que quelques cellules en contrebas de la couche L3 (Charuvi *et al.*, 2012; Dalal *et al.*, 2018; Yadav *et al.*, 2019). Les plastes de cette zone ne possèdent que quelques vésicules, et aucune structure thylakoidienne n'est observée si ce n'est quelques tubules non photosynthétiques souvent proches de la membrane, et sont donc en ce sens de vrais proplastés (Charuvi *et al.*, 2012).

Juste à côté, en L2-PZ par exemple, des systèmes membranaires internes empilés sont déjà visibles dans les plastes photosynthétiques, comme des versions miniatures des réseaux matures pour les petites cellules du méristème (Charuvi *et al.*, 2012; Dalal *et al.*, 2018). Dans tout le reste des 3 couches et dans le LP, les plastes sont identiques (Charuvi *et al.*, 2012). Cette évolution drastique de la morphologie des plastes de couche à couche dans le SAM y est notamment permise par une haute activité transcriptionnelle, menant à la production massive de protéines photosynthétiques (Dalal *et al.*, 2018). Le découpage de la localisation des chloroplastes dans le SAM restera inchangé tout au long du cycle de développement de la plante (Charuvi *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2019).

Sans rentrer dans le détail, il est intéressant de noter que la localisation des différents types de plastes dans le SAM n'est pas superposable aux marqueurs d'expressions connus de gènes développementaux dans ces zones (Dalal *et al.*, 2018). Développement intrinsèque et verdissement y sont donc subtilement décorrélés.

I – 4) CONVERSION PHOTOSYNTHETIQUE DES ETIOPLASTES

A - DEFINITION ET OCCURRENCE DES ETIOPLASTES

DEFINITION ETIOPLASTE

On constate donc facilement que la conversion photosynthétique des plastes de l'embryon est dépendante de la lumière. Mais si la plantule germe à l'obscurité, alors à la place des chloroplastes sont produits des étioplastés, caractéristiques des tissus étiolés (Figure 7). Ces plastes sont les précurseurs directs des chloroplastes, car capables de se convertir en quelques heures seulement après illumination.

D'une taille de 1 à 3 μm , ils contiennent parfois de l'amidon, des plastoglobules, et un imposant corps prolamellaire (PLB) duquel sont connectés des proto-thylakoïdes (PT) (Kowalewska, Bykowski and Mostowska, 2019). Ils ne possèdent pas de membranes internes empilées, et sont surtout dépourvus de chlorophylle. C'est d'ailleurs pourquoi les caroténoïdes sont bien visibles, conférant une couleur jaune aux cotylédons des plantes étiolées dans lesquels les étioplastés sont présents en masse (Solymosi and Aronsson, 2013).

Le corps prolamellaire en est la principale structure interne. D'une taille de 0.5 à 2 μm , sa composition en lipides-protéines-pigments est unique et à l'origine du repliement complexe de ses membranes tubulaires, arrangées en structures hexagonales répétées dans trois directions. Principalement constitués de lipides en phase cubique et d'un étroit arrangement de complexes protéiques, l'ensemble crée et maintient la structure paracrystalline du corps pro-lamellaire (Floris and Kühlbrandt, 2021). L'extrême repliement qui en résulte en fait la membrane la plus complexe du vivant connue à ce jour (Kowalewska, Bykowski and Mostowska, 2019).

De cette structure centrale s'étendent quelques structures lamellaires et perforées, les proto-thylakoïdes. Comme ils sont reliés au PLB, un lumen continu existe entre ces deux structures (Floris and Kühlbrandt, 2021).

FORMATION DES ETIOPLASTES CHEZ LES JEUNES TISSUS EXPOSES AU NOIR

On ne retrouve les étioplastés que dans les tissus n'ayant pas perçu la lumière. C'est par exemple le cas des feuilles contenues dans certains bourgeons foliaires d'espèces ligneuses (châtaignier), ou des feuillettes interne de feuilles du chou blanc (Solymosi *et al.*, 2004; Solymosi and Schoefs, 2010). Mais c'est chez les plantules étioilées que leur occurrence est la plus détaillée (Solymosi and Aronsson, 2013).

Lors de sa maturation, la graine a accumulé des protéines photosynthétiques qu'elle conserve en partie une fois la germination enclenchée (Tejos, Mercado and Meisel, 2010; Allorent *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2018; Yadav *et al.*, 2019). Mais 48 heures plus tard, la conversion photosynthétique dans les cotylédons est déjà bien entamée, sauf si elle est illuminée moins de 5 heures pendant ce laps de temps (Yadav *et al.*, 2019). Dans ce cas, 3 jours post-imbibition les cotylédons ne contiennent que des étioplastés, dans lesquels les PLBs ont déjà une périodicité optimale (Bykowski *et al.*, 2020).

Dans les parties plus basales de la plantule en revanche, on ne retrouve pas de PLB dans les plastés mais de nombreux plastoglobulles et quelques proto-thylakoïdes, révélant sans doute la présence de proplastés (Bykowski *et al.*, 2020).

B - MORPHOLOGIE ET COMPOSITION MOLECULAIRE SONT LIEES

COMPOSITION PROTEIQUE ET PIGMENTAIRE REQUISE POUR CRISTALLISATION DU PLB

A l'obscurité, la LPOR (light-dependant protochlorophyllide-oxydoréductase) s'accumule jusqu'à représenter 90 à 95% du protéome pro lamellaire (Solymosi and Aronsson, 2013), et est liée en un complexe tertiaire à du NADPH et à de la protochlorophyllide (PCphyde).

Sur le PLB, les complexes LPOR-NADPH-PCphyde s'associent en dimères, ce qui induit une courbure positive de la membrane dans laquelle ils s'insèrent. Comme ils sont adjacents les uns aux autres, ils forment une hélice qui vient décorer les membranes tubulaires branchées sur la face stromale du PLB, et ainsi former/stabiliser sa structure complexe (Floris and Kühlbrandt, 2021). Des ribosomes plastidiaux et fonctionnels se logent au centre des unités hexagonales que forme le paracristal, sans pour autant avoir de rôle dans sa formation (Solymosi and Aronsson, 2013; Floris and Kühlbrandt, 2021).

LPOR et PCPhyde sont absolument nécessaires à la structuration du PLB, sans quoi il ne parvient pas à se cristalliser, et le verdissement est retardé par manque de matériel précurseur pour la biogenèse rapide de thylakoïdes (Mechela, Schwenkert and Soll, 2019). En ce sens, la supplémentation en sucre induit indirectement une accumulation de PCphyde photo-active, augmentant la compaction et la taille du PLB (Bykowski *et al.*, 2020).

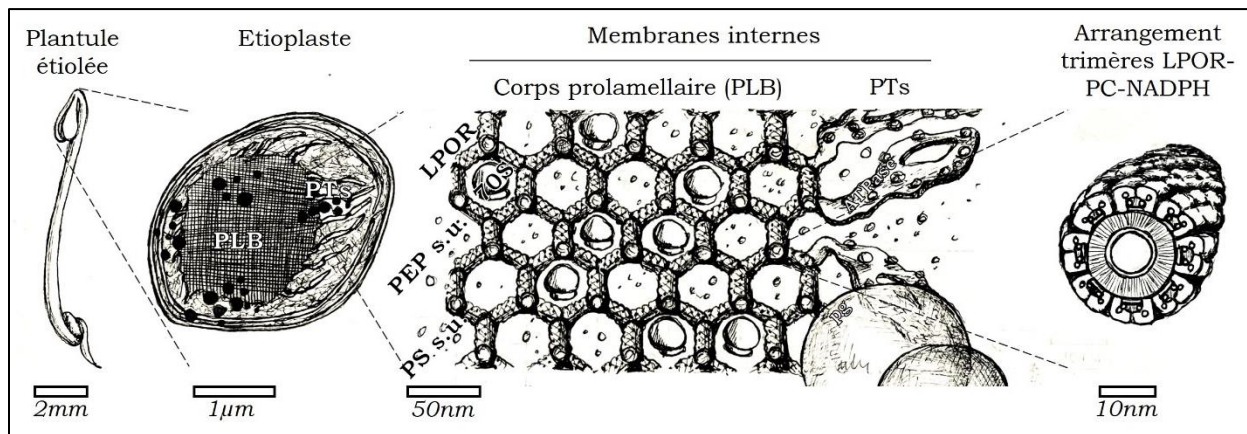


Figure 7 : Caractéristiques morphologiques de l'étiollement à l'échelle de la plantule, cellulaire, et moléculaire, typiquement observé dès 3 jours de croissance à l'obscurité.

Les etioplastes s'accumulent dans les cotylédons jusqu'aux deux premiers mm de l'hypocotyle et contiennent un PLB en occupant une vaste part. Ce dernier est recouvert de complexes de LPOR-PC-NADPH organisés en dimères, qui s'y insèrent en spirales paracristallines. Des ribosomes assemblés ainsi que d'autres protéines y sont également retrouvées, notamment des sous unités du PEP-core. De nombreux plastoglobules sont présents, mais la nature de leur contenu reste à déterminer. Des prothylakoïdes plats et perforés sont reliés au PLB, et sont tapissés de l'ATP synthase des plastes. PLB: ProLamellar Body. LPOR: Light-dependent Protochlorophyllide Oxidoreductase. PC: Protochlorophyllide. Pg: Plastoglobulle. PEP: Plastid Encoded RNA polymerase. PS: Photosystème. S.u.: Sous-unité.

D'AUTRES COMPOSES TYPIQUES DES THYLAKOÏDES SONT DÉJÀ PRÉSENTS DANS LE PLB

D'autres pigments sont également présents, ce sont les caroténoïdes (majoritairement lutéine, neoxanthin, et un peu de violaxanthin). Leurs rôles restent vagues quant à la formation des PLBs, car ils sont à peu de chose près, identiques en quantité et proportion que dans les PTs, qui n'ont pourtant pas du tout la même structure (Bykowski *et al.*, 2020). Principalement localisés dans les bicouches lipidiques, ils sont

en ce sens présumés agir sur les propriétés mécaniques des membranes de l'étioplaste (fluidité/ stabilité), plutôt que sur leurs structure/repliement tri-directionnel (Solymosi and Aronsson, 2013).

Enfin, bien que majoritairement composé de LPOR, le PLB possède déjà au moins quelques protéines de complexes photosynthétiques. La chlorophylle synthase y est notamment présente, de même que des chaperonnes et des enzymes du cycle de Calvin. Surtout, certaines sous unités du PSII ainsi que du cytochrome b6f (PsbS, PsbE, PetB, PetA) sont déjà présents, et il en va de même avec la plastocyanine et la ferrédoxine-NADPH oxydoréductase (Blomqvist and Ryberg, 2008).

A noter que 80% des 64 protéines du PLB ici identifiées par MS sont d'origine nucléaire, et doivent en conséquence être importées (Blomqvist and Ryberg, 2008). La présence de ces nombreuses sous-unités non arrangées en complexes photosynthétique dans l'étioplaste souligne que c'est un précurseur direct des chloroplastes.

C - DIFFERENCIATION DE L'ETIOPLASTE EN CHLOROPLASTE A LA LUMIERE

PHASE 1 : REARRANGEMENT

La riche composition du PLB permet une réorganisation extrêmement rapide de ses membranes dès perception de la lumière. D'abord parce que la LPOR, en plus de jouer un rôle structurel, est une enzyme clef dans la synthèse de chlorophylle. La lumière active directement l'enzyme, qui catalyse rapidement la conversion de la PCphyde associée en Chlorophyllide (Cphyde) et en consommant du NADPH (Rudowska *et al.*, 2012). Les dimères de LPOR se dissocient alors, libérant la Cphyde qui pénètre la membrane du PLB en train de se disloquer, et y est estérifié quasi-instantanément en chlorophylle a par la chlorophylle synthase (Floris and Kühlbrandt, 2021). L'enchaînement de ces réactions est extrêmement efficace, puisqu'en 15 à 30 secondes, 15% de la PChphyde est convertie en chlorophylle, dont au moins une partie est « sécurisée » en étant incorporée aux apoprotéines préexistantes sur les membranes internes du plaste (Solymosi and Aronsson, 2013).

La quantité de LPOR diminuera ainsi jusqu'à 4h (stade prégranal), pour disparaître à 8h (stade de formation des empilements) (Pipitone *et al.*, 2021). La dégradation rapide du PLB qui en résulte induit la formation progressive de thylakoïdes primaires le long des proto-thylakoïdes qui y sont rattachés (Figure 7). En conséquence, l'organisation cristalline du PLB est perdue en 1 heure, et au bout de deux heures il n'en reste plus que les rémanents (Kowalewska *et al.*, 2016).

Tandis que le PLB se disloque, les PTs auquel il donne naissance prennent en masse et s'allongent le long de l'axe du plaste. Au bout de 4 heures, le PLB a intégralement disparu au profit de longs proto-thylakoïdes

chlorophylliens dont l'aspect ressemble aux thylakoïdes pré-granals de plantules germant à la lumière (figure 6, stade thylakoïde pré-granal) (Liang *et al.*, 2022).

Pourtant encore une fois, relativement peu de changements moléculaires sont observés face à la réorganisation extrême observée à ce stade. En fait, un changement dans le protéome plastidial, même fin, induit une profonde modification du paysage plastidial.

PHASE 2 : ENRICHISSEMENT PROTEIQUE

Les thylakoïdes commencent à s'empiler en plusieurs couches à partir de 8 heures d'illumination, et restent poreux là où les membranes ne sont pas encore empilées (Figure 8). Pourtant, ils présentent déjà un spectre d'émission proche d'un chloroplaste mature (Kowalewska *et al.*, 2016).

La synthèse *de novo* de chlorophylle entamée au stade prégranal atteint ici une forte hausse, convertissant en masse les apoprotéines en enzymes photoactives (Solymosi and Aronsson, 2013). Apparaissent notamment des sous unités du PSI (Rudowska *et al.*, 2012) (Pipitone *et al.*, 2021) tandis que les sous unités du cyt b6f et de l'ATP synthase continuent à s'accumuler (Pipitone *et al.*, 2021), typiques des thylakoïdes stromaux (Pribil, Labs and Leister, 2014), qui par ailleurs commencent à se dessiner.

Les sous unités du PSII continuent à s'accumuler (Kowalewska *et al.*, 2016), dont les sous unités photosynthétiques actives et/ou impliquées dans la photoprotection. (Pipitone *et al.*, 2021). Quelques heures plus tard, l'activité photosynthétique devient stable, indiquant l'assemblage d'une machinerie photosynthétique pleinement fonctionnelle (Rudowska *et al.*, 2012; Pipitone *et al.*, 2021).

Bien que déjà mature métaboliquement, ce n'est que plus tard qu'on observe un profond changement dans le protéome du plaste (Kowalewska *et al.*, 2016; Pipitone *et al.*, 2021). Or comme la composition protéique influe largement sur l'architecture des membranes internes, l'ensemble subi de profondes modifications et les thylakoïdes commencent à s'empiler en grana aux lamelles fines (Pipitone *et al.*, 2021) et les thylakoïdes stromaux ne sont plus poreux (Kowalewska *et al.*, 2016).

Entre 24 et 96h, le taux de protéines photosynthétique double et les thylakoïdes sont composés de 70 à 80% de protéines nucléaires comme chez les chloroplastes matures.

Leurs taille double entre 48 et 96h (Kowalewska *et al.*, 2016; Pipitone *et al.*, 2021), et la seule différence observable entre ces deux stades est la taille et le nombre de grains d'amidons, témoins de la fixation active du CO₂ dans le stroma (Pipitone *et al.*, 2021).

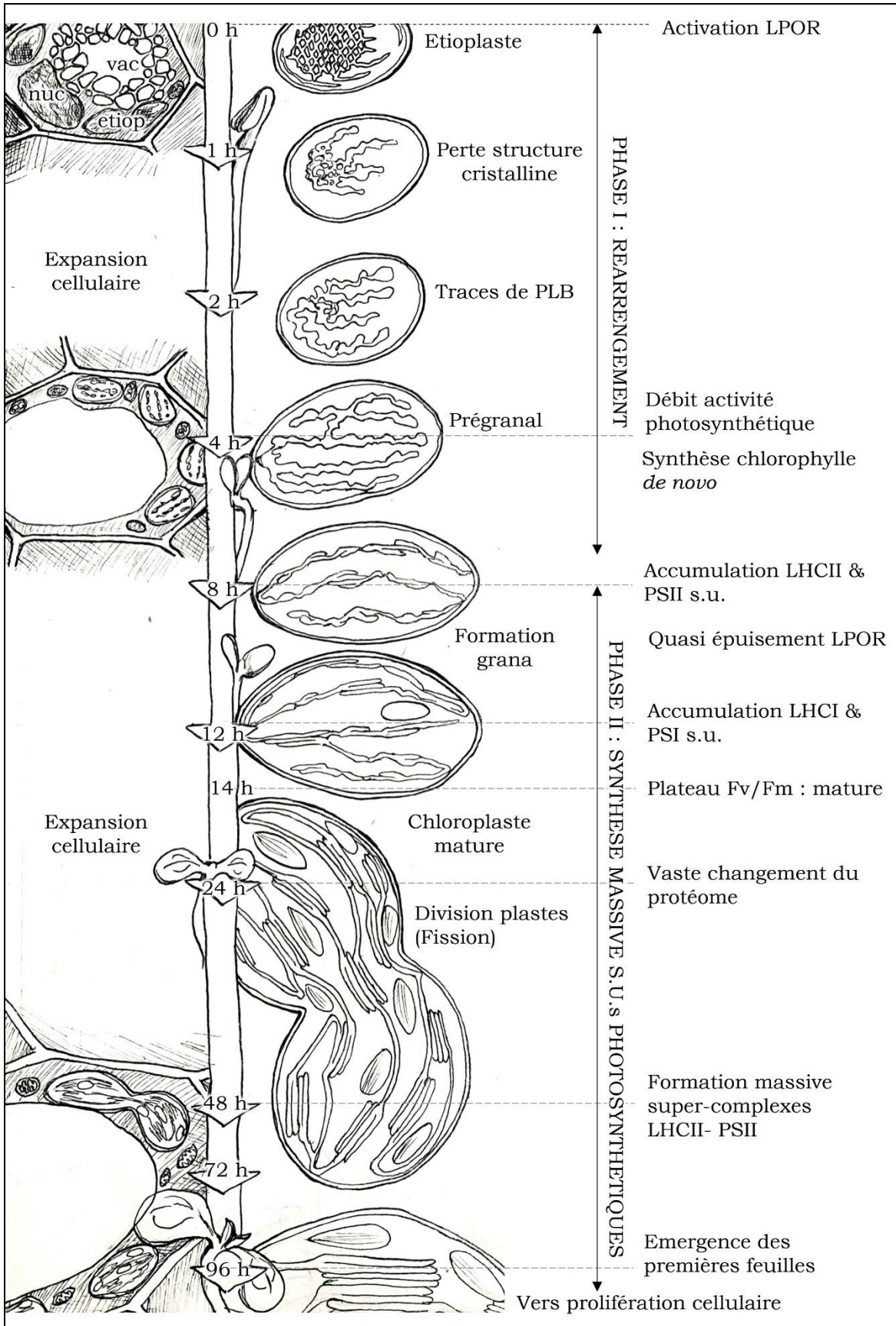


Figure 8 : Illustration des processus associés aux deux phases majeures de la conversion photosynthétique des étioplastes.

A gauche est dessiné une cellule type dont l'évolution est représentée à l'échelle. La vacuole grossit rapidement et pousse les organites contre la bordure cellulaire. Les plastes sont représentés à l'échelle à droite, et les deux phases de différenciation ainsi que les étapes qui y sont associées sont indiqués. A partir de 24 heures s'observe un profond changement dans leur protéome, avec l'import de près d'un demi-millier de protéines d'origine nucléaire (Pipitone et al., 2021). En même temps s'amorce la division des chloroplastes, qui précède la prolifération des cellules du mésophylle, laps de temps pendant lequel les thylakoïdes varient subtilement (surface d'empilement, nombre et taille des lamellae/stack, taille du plaste), indiquant que les chloroplastes se divisent alors que leurs membranes internes ne sont pas encore tout à fait assemblées.

I – 5 CONVERSIONS PHOTOSYNTHETIQUES : CONCLUSIONS

A - LES ETIOPLASTES SONT DE BONS OUTILS POUR ETUDIER LA BIOGENESE DU CHLOROPLASTE

Comme les étioplastes s'accumulent dans tous les tissus voués à être photosynthétiques, ils permettent de mettre en place un contexte expérimental on-off pour comprendre les étapes successives menant à la biogenèse du chloroplaste, bien plus accessibles et nombreux que les proplastides des micro-zones des méristèmes.

Aussi, travailler aux stades précoces de germination est difficile, tant elle peut être variable en fonction de paramètres difficilement maîtrisables (âge de la graine, conditions de conservation, de stratification, nombre de lignées successives...). Et si à la lumière, les proplastides des cotylédons de l'embryon se différencient plus linéairement en chloroplastes, cette transition n'est représentative que des stades précoces du développement de la plante (Liang et al., 2018).

Enfin, les micro-zones du SAM à l'origine des tissus foliaires n'offrent que peu de matériel à étudier (Charuvi et al., 2012; Yadav et al., 2019).

Au contraire, les étioplastes s'accumulent dans le noir et arrêtent de se diviser une fois matures (chez les dicotylédones), et offrent en conséquence suffisamment de matériel synchrone à étudier. Et comme leur conversion photosynthétique à la lumière se fait par paliers successifs, ils permettent d'en étudier quand et quels en sont les processus essentiels.

B - CONCLUSION DU CHAPITRE

Le chloroplaste est le plaste central de la plante, car son métabolisme autotrophe assure développement, croissance et survie à la plante. Si la photosynthèse qui y est associée apporte évidemment carbohydrates et énergie, ils sont aussi le centre de production de lipides et de métabolites essentiels aux différents processus cellulaires mis en jeu. Comme ils ont une origine endosymbiotique et qu'ils se sont diversifiés chez les angiospermes, ils doivent provenir de précurseurs transmis dans l'embryon, et leur transitions photosynthétique doit être y rapidement et finement régulée.

A partir de l'étude du triangle de différenciation proplaste-étioplaste-chloroplaste ont pu être déterminées quelles étaient les grandes étapes de la biogenèse du chloroplaste. Le processus étant rapide et complexe, on distinguera les chloroplaste dont les thylakoïdes possèdent de la chlorophylle incorporée dans des membranes internes (même si minime), des proplastides qui en sont eux intégralement dépourvu (Semenova *et al.*, 2019). Les étioplastes sont quant à eux définis comme ne possédant pas de membrane interne photosynthétique mais possèdent un imposant corps pro lamellaire rapidement convertible en membranes photosynthétiques dès illumination.

Le contrôle de la biogenèse du chloroplaste par la lumière implique une régulation complexe du génome nucléaire, puisque c'est le principal centre intégrateur du rôle de senseur des plastides. La plupart des protéines d'origine nucléaire qui en sont issues sont d'ailleurs essentielles au verdissement, et en fonction, donneront l'identité requise aux plastides en question. Un équilibrage raffiné de ces deux compartiments génétiques est donc requis pour contrôler l'import, la quantité, la nature, et le turnover des protéines importées et synthétisées, sans quoi les plastides précurseurs ne parviennent pas à se différencier en chloroplaste.

Le noyau et la régulation de l'expression de son génome sont donc les garants de l'identité du plaste, dont la nature du tissu, le stade développemental, et l'environnement auquel il est exposé, intégrera et transmettra les signaux.

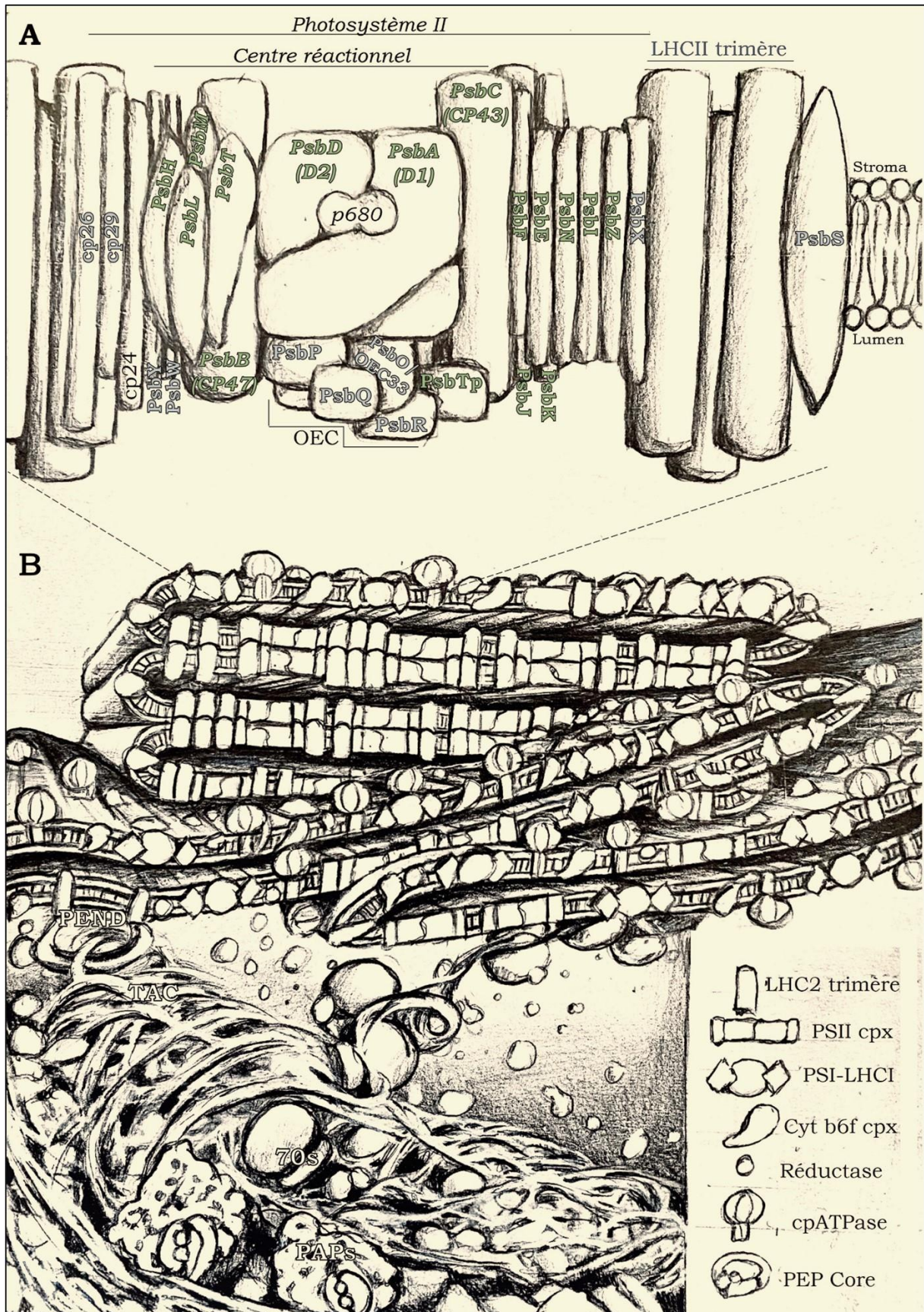
Chez le plaste, cette communication est extensivement régulée au niveau de son métabolisme génétique, c'est-à-dire de son activité transcriptionnelle et post-transcriptionnelle.

Or, cet organite a en effet conservé une partie de son génome ainsi que la machinerie qui l'exprime. Mais cette dernière dépend de nombreuses protéines d'origine nucléaire, sans lesquelles l'enzyme ne parvient pas à exprimer suffisamment les gènes photosynthétiques du plaste.

Et de tels défauts sont léthaux.

Figure 9 : Vue imagée de la partie active transcriptionnellement du nucléoïde (TAC), en lien direct avec le métabolisme photosynthétique du plaste.

En **A** sont indiquées les sous unités du supercomplexe PSII-LHCII, majoritairement assemblés dans les membranes de thylakoïdes adjacents. Bleu : encodé dans le noyau et importé depuis le cytosol, vert encodé dans le plaste. L'ébauche en **B** permet de visualiser le lien entre métabolisme photosynthétique et métabolisme génétique du plaste. Les aspects de ce dernier sont discutés dans le prochain chapitre. PEP : Plastid-encoded RNA polymerase. LHC : Light-harvesting complexes. OEC : Oxygen evolving complex. PS : PhotoSysteme



CHAPITRE II

L'EXPRESSION DU GENOME PLASTIDIAL CONTROLE LA BIOGENESE DU CHLOROPLASTE

II – 1) LE CHLOROPLASTE EST UN COMPARTIMENT GENETIQUE SEMI AUTONOME

A - ORGANISATION SEMI-PROCARYOTE DU GENOME PLASTIDIAL

Le chloroplaste est une rémanence bactérienne et en a à cet égard gardé de nombreux aspects, tant dans les gènes qu'il a retenu que dans la machinerie qui l'exprime. Cependant, entre l'acquisition de l'endosymbionte et de son intégration comme organelle un transfert massif de gène horizontal a eu lieu, et la plupart des gènes anciennement procaryotiques ont été perdus ou intégrés dans le génome nucléaire. Bien conservé dans la lignée verte, l'ADN plastidial (ou plastome) ne code chez les plantes supérieures qu'une infime partie du protéome du plaste. Le reste est en grande partie composé de protéines d'origine nucléaire, attestant de la prise de contrôle de l'organelle au cours de l'évolution (Ponce-Toledo, López-García and Moreira, 2019). On parle alors de compartiment génétique semi-autonome.

En outre, le génome des plastes qu'on retrouve dans le stroma sous forme circulaire est de petite taille et hautement compact. D'une taille d'environ 150 kb, les quelques 120 gènes qui y sont retenus sont parfois organisés en opérons, autre réminiscence de leur origine procaryotique. Cela dit, certains éléments indiquent une certaine « eucaryotisation » du génome puisque certains des transcrits du plaste doivent être épissés ou édités (Schmitz-Linneweber and Small, 2008).

Malgré le peu de gènes codés par le plastome, l'organelle est pourtant capable de se différencier en une variété de plastes aux morphologies et fonctions variées (dont certains sont mentionnés [chapitre 1](#) de l'introduction). L'identité du plaste passe en fait par son protéome, extensivement régulée par de nombreux processus, et dont la première strate de contrôle concerne la régulation de l'expression du plastome.

B - LES GENES DU PLASTES ONT CONSERVE UNE PARTIE DE LA MACHINERIE QUI LES EXPRIME

LE PLASTOME CODE POUR UNE DE SES PROPRES RNAP

Parmi les gènes encodés dans le plaste, 87 codent pour des protéines, dont seulement 54 impliqués dans la photosynthèse directement et donc nommés PhAPGs, pour « *Photosynthesis-Associated Plastid-encoded Genes* ». Mais le plastome code également pour sa propre machinerie d'expression, avec notamment 45 rRNAs et tRNAs, et 31 autres protéines de la machinerie d'expression et de traduction du plastome (Kanamaru *et al.*, 2001). Surtout, quatre de ces gènes codent pour les sous-unités constituant le cœur enzymatique d'une des RNA Polymerase (RNAP) du plaste, la PEP (Plastid-encoded RNAP) (Sato *et al.*, 1999).

D'aspect procaryotique, la PEP est basiquement dédiée à l'expression des PhAPGs lors de la conversion photosynthétique des plastes. L'enzyme est composé d'un cœur procaryotique Rpo proche de la RNAP procaryote d'E-Coli (Pfannschmidt *et al.*, 2000). Chez les angiospermes, les gènes codant pour les sous unités de l'enzyme rpoB, rpoC1, et rpoC2 sont organisés en opéron, et correspondent respectivement aux sous unités β (domaine catalytique), β' , et β'' (DNA-binding). Deux autres sous unités α issues du gène rpoA s'y associent pour générer le *core-enzyme* (Pfannschmidt *et al.*, 2015). Comme les RNAPs procaryotiques, des facteurs sigmas sont nécessaires pour garantir la reconnaissance des promoteurs lus par la PEP. Ils forment, en s'associant transitoirement avec le cœur enzymatique de la PEP, « *l'hollow-enzyme* » et garantissent déjà une activité transcriptionnelle à l'ensemble *in vitro* (Privat *et al.*, 2003). La redondance partielle de ces sigma facteurs, exprimés différemment depuis le noyau où ils sont encodés, assure spécificité et contrôle de l'expression des gènes du plastome par le noyau.

Mais les facteurs sigmas ne sauraient être suffisants pour induire la hausse de l'activité enzymatique de la PEP requise pour le verdissement. Celle-ci augmente drastiquement lorsqu'elle est complexée de 12 protéines d'origine nucléaire, les PAPs (PEP-Associated Proteins) qui permettent en fait d'augmenter largement l'activité de la PEP par rapport aux deux autres RNAPs du plastome, mécanisme assurant la transition photosynthétique des plastes précurseurs à la lumière (Pfannschmidt *et al.*, 2015).

LE PLASTOME D'ARABIDOPSIS THALIANA EST LU PAR 3 RNAPS

On trouve en effet un second type de RNAPs dans les plastes, les NEPs (Nuclear-Encoded Phage-like RNAP), codés par le génome nucléaire (gènes Rpo-T2 et Rpo-T3). Chez *Arabidopsis*, deux NEPs sont adressées aux plastes, où RpoTp (Rpo-T3) y est restreinte tandis que RpoTmp (Rpo-T2) est aussi retrouvée dans les mitochondries (Liere and Weihe, 2011). Comme ces NEPs reconnaissent les motifs YRTA et que la PEP reconnaît les éléments -35 et -10 dans les promoteurs du plastome, les deux types d'enzymes sont en partie dédiées à des sets de gènes qui leurs sont propre (Yagi and Shiina, 2014; Liebers *et al.*, 2017).

Les gènes dont l'expression est exclusivement dépendante de la PEP sont dits de Classe I, et correspondent pour la plupart à des PhAPGs. Les gènes de Classe III sont uniquement transcrits par les NEPs, dont les gènes codant pour les sous-unités de la PEP. La majorité des gènes du plastome est cependant de Classe II, c'est-à-dire pouvant être transcrits par les deux types d'enzymes, et correspondent globalement à des gènes non photosynthétiques dits « de ménage », car ils assurent le fonctionnement général et la pérennité de l'organite.

Mais beaucoup de PhAPGs peuvent également être lus par les NEPs (Börner *et al.*, 2015; Liebers *et al.*, 2017), complexifiant de fait la régulation de l'expression du plastome. Or d'une part, l'activité relative des trois RNAPs constitue un verrou majeur de l'identité du plaste. D'autre part, l'expression des gènes des plastes et du noyau sont couplés, où la réponse de l'un dépend de la réponse de l'autre. Et c'est bien l'ensemble de ces phénomènes complexes qui permet de modifier et de réguler finement et rapidement la composition du plaste, et donc son identité.

La biogenèse du chloroplaste est d'ailleurs particulièrement dépendante de l'expression massive des gènes nucléaires PAPs et de leur complexation sur la PEP, sans quoi le verdissement n'a jamais lieu. En fait, de nombreuses autres protéines codées dans le noyau sont plus largement essentielles à ce processus, et toutes appartiennent au large complexe d'acides nucléiques et de protéines du nucléoïde.

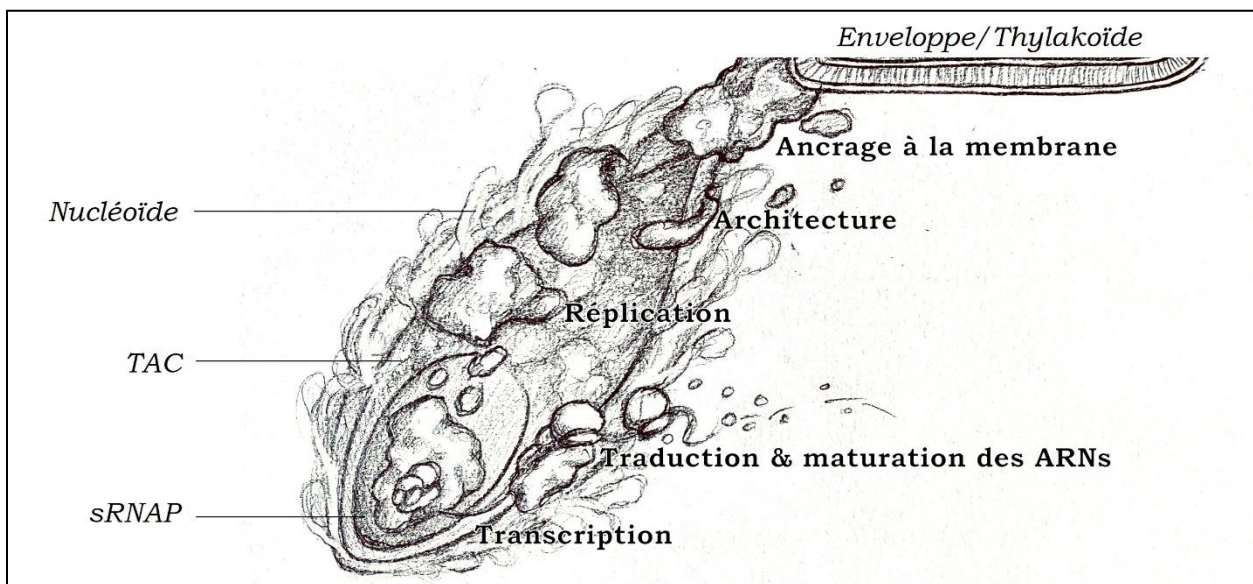


Figure 10 : Schématisation de l'organisation du nucléoïde des plastes.

Chez les plastes, un nucléoïde est composé de multiples copies d'ADN plastidial circulaire, d'ARN, et de protéines dont la vaste majorité est encodée dans le noyau. Dans la fraction active transcriptionnellement (TAC), celles-ci viennent en quelques sortes dessiner des domaines protéiques aux fonctions distinctes, assurant maintien, réplication, et expression du petit (mais non moins essentiel) génome des plastes. La fraction sRNAP (soluble RNAP fraction) représente le domaine minimal requis pour une activité enzymatique du complexe transcriptionnel isolé. L'ensemble beigne en de multiples endroits dans le stroma et est rattaché à une membrane interne du plaste (plutôt à la membrane interne de l'enveloppe par MFP1 chez les proplastides, plutôt à la membrane des thylacoïdes par PEND chez les chloroplastes matures). Une version plus détaillée est disponible dans (Pfalz & Pfannschmidt, 2013)

C - PROTEINES DU NUCLEOÏDE ET SYNDROME DES PAPS

PURIFICATION DES PROTEINES DU NUCLEOÏDE

Signature de son origine procaryote, l'ADN plastidial est arrangé en nucléoïde, c'est-à-dire en un étroit arrangement de protéines associées à de multiples copies d'ADN plastidial (ptDNA) et d'ARN (Majeran *et al.*, 2012; Pfalz and Pfannschmidt, 2013) (Figure 10).

Cela dit, les plastes des plantes terrestres ont perdu l'intégralité des protéines du nucléoïde à l'origine bactériennes au profit de protéines d'origine nucléaire (Yagi and Shiina, 2014). Celles-ci interagissent tout particulièrement avec la machinerie d'expression génétique, et régulent notamment son expression tant sur le plan transcriptionnel que traductionnel. Elles sont également essentielles pour la réplication, l'architecture, et l'ancrage du nucléoïde aux membranes du plaste (Sato *et al.*, 1999; Terasawa and Sato, 2005). La quantité de ces protéines est d'ailleurs telle qu'il a longtemps été difficile de déterminer quelle était la part exacte du protéome en réelle association avec les RNAPs du plaste.

Deux préparations de ce même complexe peuvent être obtenues expérimentalement : le TAC (« *Transcriptionally Active Chromosome* »), portion insoluble attachée aux membranes du plaste, active transcriptionnellement sans ajout d'ADN auquel elle est intrinsèquement liée. Sa composition reflète donc un grand nombre de composants, car prit dans l'amas de protéines du nucléoïde et/ou accroché directement ou indirectement au ptDNA. Une seconde préparation, le sRNAP (« *soluble RNA Polymerase fraction* »), peut être obtenue après utilisation de détergeant, et requiert donc d'y incorporer de l'ADN pour être active transcriptionnellement (Steiner *et al.*, 2011). Sa composition reflète le complexe minimal requis pour une activité normale du système, mais requiert en contrepartie beaucoup d'étapes de purification.

Les nucléoïdes dans le plaste sont donc organisés comme un assemblage de domaines aux propriétés différentes et dynamiques, dont le sRNAP représente le domaine minimum actif transcriptionnellement (Pfalz and Pfannschmidt, 2013). Certaines enzymes qu'on sait dans le TAC ne se retrouvent cependant jamais dans ces deux préparations et c'est notamment le cas des NEPs, peut-être en raison de leurs faibles abondances (Tadini *et al.*, 2020).

DECOUVERTE DES PAPS DANS LES FRACTIONS SRNAP

On peut retrouver la PEP sous deux formes

Historiquement, en 1994 Pfannschmidt et Link ont utilisé des graines de *Sinapis alba* pour isoler le sRNAP, car elles présentent l'avantage de développer de bien plus gros cotylédons qu'*Arabidopsis* tout en appartenant à la même famille des Brassicacées.

Et si on savait déjà que les etioplastes transcrivent un set de gènes différent des chloroplastes, ils avaient ici déterminé que la fraction soluble du nucléoïde formait majoritairement un complexe de 400 kDa (« *Peak-B* ») à l'obscurité, et de 1000 kDa (« *Peak-A* ») à la lumière ; et que le ratio A/B augmentait lors de la transition photosynthétique (Pfannschmidt and Link, 1994). Plus tard, on comprend que la forme B est sensible à la rifampicine, laissant penser à une architecture procaryotique du complexe, mais pas la forme A qui y est insensible (Pfannschmidt and Link, 1997). On a ensuite pu déterminer après analyse des deux pics qu'ils étaient en fait composés des mêmes constituants, où la forme A est associée en un complexe bien plus gros que la forme B. Cette dernière correspond en fait à « l'*hollow-enzyme* » (PEP *core-enzyme* et facteur sigma). En effet très semblable à la RNAP procaryote d'*E-coli* (Pfannschmidt *et al.*, 2000), le complexe présente déjà un certain degrés d'activité enzymatique (Pfannschmidt and Link, 1997; Privat *et al.*, 2003). Quant au Pic A, il correspond à un complexe bien plus gros en raison des protéines qui y sont en étroite association. Chez *Arabidopsis*, l'ensemble forme un complexe de 1000 kDa et de 700 kDa chez la moutarde (Pfalz *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2019; Yoo *et al.*, 2019; Yoo, Han and Chen, 2020).

Surtout, l'assemblage de ce complexe n'est observé que lorsque la plantule croît à la lumière, et concorde toujours avec une forte hausse de l'activité transcriptionnelle de l'enzyme.

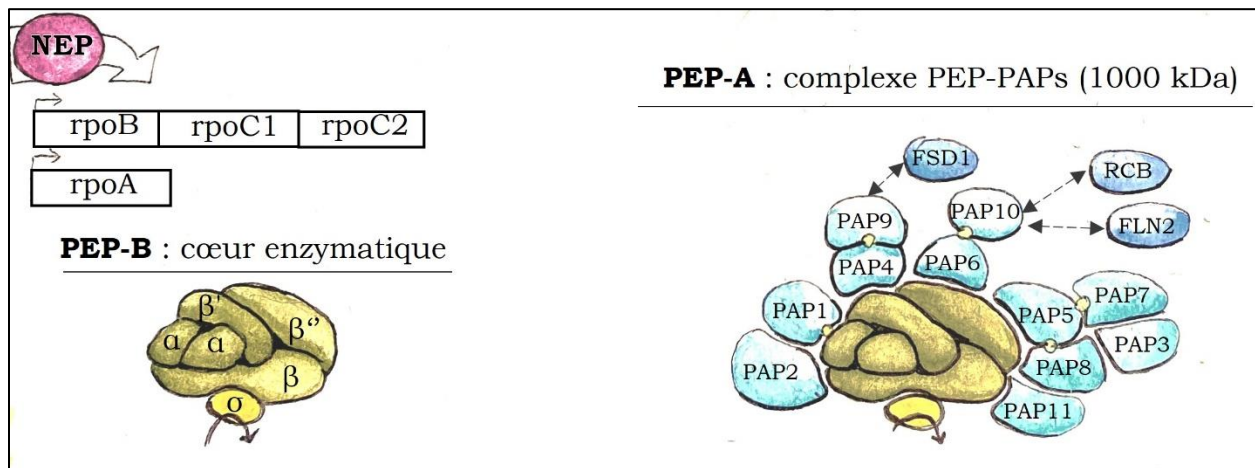


Figure 11 : La PEP se retrouve principalement sous deux formes.

Les 4 sous unités qui constituent le cœur enzymatique de la PEP sont encodées par les gènes *rpo* dans le plaste et sous contrôle exclusif des NEPs. Chez *Sinapis alba*, cette forme est présente dans le noir, et peu déjà présenter un certain degré d'activité enzymatique (in vitro) si un facteur sigma s'y associe transitoirement. Chez *Arabidopsis*, elle est présumée désassemblée dans le noir. Après perception de la lumière, la formation du complexe PEP-PAPs est nécessaire au pic d'activité de la PEP, verrou de la biogenèse du chloroplaste. D'autres protéines s'associent transitoirement ou moins étroitement que les PAPs au complexe, et certains auteurs (Tadini *et al.*, 2020) n'excluent d'ailleurs pas la possibilité que plusieurs sous-complexes PEP-PAPs puissent co-exister dans un même plaste. La disposition des sous unités de la PEP ainsi que des PAPs sur la PEP sont largement hypothétiques et reprises depuis Börner *et al.*, 2015 et Kindgren & Strand 2015 respectivement.

Le Pic-A correspond à la forme active du complexe

D'abord identifiés chez *Sinapis*, les 10 autres constituants du pic A furent donc par la suite nommés PAPs, pour « *PEP-Associated Proteins* » (Steiner *et al.*, 2011).

Quatre étaient déjà recensées (FSD2/PAP9, FSD3/PAP4, FLN1/PAP6, Trxz/PAP10), et 6 autres ne l'étaient pas (*pTAC3/PAP1*, *pTAC2/PAP2*, *pTAC10/PAP3*, *pTAC14/PAP7*, *pTAC12/PAP5*, et *pTAC6/PAP8*). Ils ont ensuite constaté que les mutations *knock-out* (KO) de trois d'entre eux (*pTAC2*, *pTAC6*, et *pTAC12*) mènent à des phénotypes albinos, avec lequel les plantules meurent rapidement sans source de carbone ajouté. Bien que la croissance des albinos puisse être maintenue sous cloche sur source de carbone et sous faible lumière, les plantes parvenues à maturité ne parviennent dans ces conditions qu'à produire des fleurs mais pas de graines. Seules des graines d'un parent hétérozygote de phénotype sauvage n'ayant pas poussé de la sorte peuvent être obtenues (Pfalz *et al.*, 2006).

Plus tard, la même équipe isole de nouveau le sRNAP de *Sinapis*, identifient les 10 mêmes protéines, et les autres KOs étudiés (*pTAC10*, *pTAC14* et *FLN1*) présentent à nouveau le même phénotype albinos (Steiner *et al.*, 2011). Basé sur la récurrence de leur albinisme, qui phénocopie tous les défauts observés dans un mutant PEP (*rpo*), ainsi que leur présence systématique sur la fraction sRNAP, on attribue ces 10 protéines du nucléoïde au groupe des PAPs, pour *PEP-Associated Proteins*. Plus tard, on attribue chez *Arabidopsis* pour ces mêmes raisons deux nouvelles protéines au complexe: *AtMurE/PAP11* (Garcia *et al.*, 2008) et *pTAC7/PAP12* (Pfalz and Pfannschmidt, 2013).

II- 2) DES PROTEINES NUCLEAIRES DE LA MACHINERIE D'EXPRESSION DU PLASTE CONTROLENT SON IDENTITE

A - DEFINITION DE L'ALBINO BLOC

CARACTERISTIQUES DE L'ALBINO BLOC

Pour résumer, l'ablation génétique individuelle des 12 protéines PAPs d'origine nucléaire mène quasi-invariablement au même phénotype albinos. En outre, le complexe PEP-PAP n'est observé que lorsque les chloroplastes se forment à la lumière, dont une grande partie de la signalisation est intégrée par le noyau. Un des verrous majeurs de la biogenèse du chloroplaste est donc l'expression des PAPs dans le noyau, leur adressage aux plastes, et leur complexation avec la PEP.

Chez ces mutants *pap*, la différenciation des chloroplastes a avorté en plastes albinos, plastes à la forme irrégulière avec de nombreux plastoglobules et sans aucun granum, où se forment à la place de nombreuses vésicules (parfois appelées vacuoles dans la littérature). On peut parfois n'observer aucune structure interne, surtout si la lumière appliquée est trop forte, indiquant que la lumière est à l'origine d'un trop grand stress oxydatif sur les quelques membranes lamellaires qui peuvent subsister dispersées dans le stroma dans certains plastes albinos (Gao *et al.*, 2011).

A l'échelle moléculaire, on assiste à une chute importante de l'expression des gènes de classe I, et généralement une absence totale des protéines photosynthétiques correspondantes. Les gènes de classe II non photosynthétiques et de classe III, que les NEPs reconnaissent, sont en revanche inchangés voir amplifiés ; phénomène décrit sous le terme de compensation transcriptionnelle.

Enfin, par couplage des génomes comme l'absence d'expression des gènes photosynthétiques du plastome est couplée avec l'absence d'expression des gènes photosynthétiques codés par le noyau, aucun gène de verdissement n'est exprimé par les deux génomes, d'où l'albinisme total des plantes.

MECANISME SOUS-JACENT A L'ALBINO BLOC

Si l'inactivation individuelle des PAPs provoque à chaque fois les mêmes conséquences, c'est que ce n'est pas leurs rôles individuels en tant que tels, mais bien leur présence sur le cœur catalytique de la PEP qui est essentielle à la biogenèse du chloroplaste (Pfalz and Pfannschmidt, 2013).

Dans ce modèle, les PAPs sont alors requises soit pour l'activité enzymatique de la PEP en tant que tel, soit critiques pour l'assemblage et/ou l'intégrité du complexe, soit pour le recrutement d'autres acteurs, également importants pour le métabolisme génétique du plaste, ou bien ces 3 possibilités à la fois (Steiner *et al.*, 2011), voir pourquoi pas, un tout autre modèle (voir Chapitre II de l'Ouverture).

Quoi qu'il en soit, c'est l'apparition rapide, mais aussi massive du complexe PEP-PAP qui constitue un verrou majeur du verdissement, puisque les mutants hypomorphes du maïs pTAC12, pTAC2, pTAC10 (exprimant encore un faible taux du gène muté) ne parviennent pas non plus ni à assembler le complexe à 1000 kDa à la lumière (Pfalz *et al.*, 2015), ni à verdir normalement (Williams-Carrier *et al.*, 2014), soulignant l'importance de la notion de dose protéique du complexe dans l'organelle.

B - L'ALBINO BLOC MENE A DES DEFAUTS PLEIOTROPIQUES

Une telle inhibition de la machinerie de transcription du chloroplaste cause des défauts à plus grand échelle que la seule perte d'expression des PhAPGs dans le plaste, puisque la transcription de certains gènes de classe II est également impactée dans les KOs albinos. De fait, en limitant les ressources

nécessaires à la traduction dans le plaste, l'absence du complexe PEP-PAP est la cause d'effets pléiotropiques à l'échelle de la plante.

Par exemple dans les mutants hypomorphes PAP11/Zm-MurE, PAP2/Zm-pTAC2, PAP5/Zm-pTAC12, PAP3/Zm-pTAC10, une multitude de tRNAs sont largement affectés, menant à une réduction globale des ARNs de transfert (tRNAs). D'après les auteurs, cela a pour effet de réduire à la fois l'expression des rRNAs 16S et 23S, de même que les gènes codant des sous unités du ribosome du plaste, et donc à terme à une défaillance de la biogenèse du complexe traductionnel dans son ensemble (Williams-Carrier *et al.*, 2014).

Par ailleurs, l'utilisation de KOs des facteurs sigmas permet de cibler quels sont les gènes spécifiquement impactés par l'absence de la PEP, car ils permettent à l'enzyme de reconnaître des promoteurs qui leurs sont (partiellement) spécifiques (Pfannschmidt *et al.*, 2015). Par exemple d'après le KO de SIG2, la PEP est requise pour l'expression des ARNs de transfert (tRNAs) d'au moins trnV et trnM (Kanamaru *et al.*, 2001), et est importante pour l'accumulation de nombreux autres dont trnE (Kanamaru *et al.*, 2001; Hanaoka *et al.*, 2005).

Et si réduire le taux et la variété des tRNAs disponibles dans le plaste impacte forcément la machinerie de traduction, la diminution de tRNE (codant pour tRNA^{GLU}) provoque une plus large variété de défauts encore. C'est en effet le seul ARN de transfert à la fois nécessaire pour la traduction et pour la voie de biosynthèse des tétrapyrroles (et donc de chlorophylles) et de la phytychromobiline (chromophores des photorécepteurs de type phytochrome) (Woodson *et al.*, 2014), reliant d'une certaine manière – nous y reviendrons –, perception de la lumière et verdissement.

C - LA BIOGENESE DU CHLOROPLASTE EST A DISTINGUER DU DEVELOPPEMENT DES PLASTES

Bien que l'absence de complexe PEP-PAP dans les plastes à la lumière soit la cause de nombreux défauts, la biogenèse du chloroplaste est à distinguer du développement des plastes et de la plante de manière générale. Aussi, bien que les défauts liés à l'absence de chloroplaste soient létaux, l'albino bloc doit plus être perçu comme un arrêt développemental que comme menant à la mort ou à l'inactivité des plastes dans les tissus qui devraient être photosynthétiques.

D'ailleurs, le terme ivoire convient mieux chez les adultes albinos, et indique que la synthèse des caroténoïdes a bien lieu. Enfin, bien qu'ils ne possèdent pas de thylakoïdes chlorophylliens, de l'amidon s'accumule quand même dans les plastes des feuilles des mutants PAP5 et PAP8 (Pfalz *et al.*, 2006), feuilles qui parviennent d'ailleurs à se former dans tous les KO PAPs (sauf dans le double mutant PAP6/FLN1-FLN2 (Gilkerson *et al.*, 2012)). L'ensemble indique que les plastes albinos sont malgré tout actifs et capables de se diviser et de s'accumuler, et que seule la PEP est inactive (Steiner *et al.*, 2011).

Etant donné leur importance, les PAPs doivent donc fatalement être coexprimées avec les sous-unités rpo de la PEP (Pfannschmidt *et al.*, 2015; Liebers *et al.*, 2018), et qui plus est très tôt lors du développement, car l'induction au dexaméthasone de FLN1/PAP6, (et donc du complexe PEP/PAP en entier), ne supprime le phénotype albinos que si elle a lieu lors de l'imbibition de la graine (Gilkerson *et al.*, 2012).

II – 3) QUAND ET OU LE COMPLEXE PEP/PAP EST-IL ASSEMBLE ?

A - ACTIVITE DIFFERENCIELLE DES 3 RNAPS DU PLASTE

Cela dit, les 3 RNAPs sont toujours présentes et plus ou moins actives dans le plaste (Demarsy *et al.*, 2006; Börner *et al.*, 2015). De plus, les NEPs participent également au verdissement et ne sont donc sans doute pas à négliger lors de ce(s) processus (figure 12).

Au stade plantule, le mutant RpoTp (Rpo-T3, *sca3-2*) est albinos (et hautement stressé), défaut partiellement restauré avec la croissance de la plante (Azevedo, Courtois and Lerbs-Mache, 2006; Hricova, Quesada and Micol, 2006). Ces défauts précoces sont attribués au fait que RpoTp permet non seulement l'expression de certaines sous unités ribosomales du plaste, mais aussi celle de l'opéron *rpoB-C1-C2*, et donc du cœur enzymatique de la PEP (Tadini *et al.*, 2020). En ce qui concerne la mutation KO de RpoTmp, la plantule reste plus ou moins verte tout au long de son développement mais germe comme le mutant RpoTp avec du retard ce qui montre que l'enzyme est également importante lors des stades précoces de développement (Hricova, Quesada and Micol, 2006). RpoTmp est d'ailleurs requise pour la transcription de rRNAs (Courtois *et al.*, 2007), de même que la plupart des PhAPGs lors de la stratification de la graine. Quoi qu'il en soit, si les deux NEPs sont en effet importantes de manière générale pour la plante et la biogenèse du chloroplaste, surtout lors des stades précoces, elles n'en sont visiblement pas le verrou contrairement à la formation du complexe PEP-PAP. Notons aussi que bien que les enzymes continuent à être détectées plus tard lors du développement, elles s'accumulent bien moins que la PEP dans les tissus photosynthétiques plus âgés (Pfannschmidt *et al.*, 2015).

En ce qui concerne la PEP, on la sait être spécifiquement dédiée à RbCL (Rubisco) (Demarsy *et al.*, 2012), et à certains tRNAs pendant les stades précoces de germination (Kanamaru *et al.*, 2001; Hanaoka *et al.*, 2005), mais on ne sait pas si les PAPs y sont déjà complexées ou pas. Cela dit, si on connaît mal l'expression des PAPs dans les stades précoces de germination, on connaît bien mieux les processus dans lesquels elles sont en jeu lors de la transition étio-chloroplaste, déclenchée après perception de la lumière de plantes étiolées.






















| | Col0 [wt] | KO NEPs | | | KO PAP/rpo |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| | | RpoTp | RpoTmp | Double | |
| Germination |  |  |  |  |  |
| Plantule |  |  |  | |  |
| Graines |  |  |  | |  |
| Floraison |  |  |  | |  |
| Rosette |  |  |  | |  |

Figure 12 : Illustration des différents défauts phénotypiques associés aux KOs de la machinerie d'expression des plastes.

Les NEPs sont essentielles au fonctionnement des plastes et de la plante en général, surtout en début de croissance comme en atteste le blocage total de germination du double mutant. *RpoTp* et *RpoTmp* sont d'ailleurs partiellement redondantes sur les gènes de classe II et III. En plus d'être importante pour le verdissement des plantules, *RpoTp* est aussi requise pour la prolifération des cellules du mésophylle, en aval de la complexation des PAPs avec les PEPs lors du dé-étiolement des plantules (cf fig 8). Quoi qu'il en soit, seuls les KOs PAPs et *rpo* (PEP-core s.u.) restent hétérotrophes tout au long du cycle de développement. La formation du complexe PEP-PAP constitue donc un verrou majeur de la biogenèse du chloroplaste. Les flèches en pointillé symbolisent un retard de croissance.

B - LA PEP EST GLOBALEMENT INACTIVE DANS LES ETIOPLASTES

En effet, le consensus est que dans le cas des chloroplastes, c'est la complexation massive des PAPs avec la PEP qui permet d'augmenter l'activité de la PEP par rapport à celle des NEPs, et donc de lancer le verdissement (Liebers *et al.*, 2017). Or comme les PAPs sont encodées dans le noyau, cette

transition passe directement par la régulation de leur expression dans le noyau, de leur traduction dans le cytosol, et de leur adressage aux plastes.

Sur coupe histologique de plantules étiolées de 3 jours, on voit que les gènes PAPs sont certes exprimés, mais ne le sont que dans l'épiderme des cotylédons. Dans le mésophylle cependant, aucun signal des fusions transcriptionnelles pPAP::GUS testées n'est détecté (Liebers *et al.*, 2018). Or d'une part, les PAPs sont coexprimées, et le schéma d'expression tissulaire observé ici est très probablement le même pour les autres PAPs. D'autre part, un adressage *de novo* aux plastes requiert forcément une expression *de novo* du gène, puisque le mécanisme d'import aux plastes par voie canonique est un phénomène co-traductionnel (Thomson, Pulido and Jarvis, 2020). De fait, après 3 jours dans le noir, les PAPs ne sont pas adressées *de novo* aux étioplastés des cellules du mésophylle. En revanche, étant donné la forte expression des PAPs dans l'épiderme de plantules étiolées, les étioplastés de ce tissu pourraient vraisemblablement pouvoir construire le complexe PEP-PAP 1000 kDa à l'obscurité. En ce sens, il n'est pas aberrant de le détecter dans certaines études par western blot – à l'échelle de la plantule donc (Ji *et al.*, 2021). D'ailleurs, si les plantes sont suivies journalièrement entre 2 et 4 jours de croissance à l'obscurité, c'est précisément à 3 jours que le complexe est détecté (Yoo *et al.*, 2019). Cette fugacité explique notamment pourquoi la PEP est observée principalement sans PAPs dans le noir chez *Sinapis alba*, voir désassemblée chez *Arabidopsis thaliana* (Yoo, Han and Chen, 2020). Enfin, le fait que l'épiderme des cotylédons contienne bien moins de plastes que le mésophylle (Cf chapitre I de l'introduction) explique vraisemblablement la variabilité de la détection du complexe PEP/PAP à l'obscurité par effet de dilution.

C - LA PEP EST L'ENZYME LA PLUS ACTIVE A LA LUMIERE

A l'échelle de la plantule, un remarquable pic d'expression des PAPs est observé dès 15 minutes d'illumination (Liebers *et al.*, 2018), temps pour lequel un pic d'accumulation protéique de PAP8 et de PAP5 apparaît puis se stabilise plus ou moins jusqu'à environ 8 heures d'illumination, comme pour la large sous unité de la Rubisco, gène par ailleurs sous contrôle exclusif de la PEP (Liebers *et al.*, 2020). De plus, l'expression des fusions transcriptionnelles dans le mésophylle est bien visible après 24h, mais y reste plutôt inchangée après 4h d'exposition. En conséquence, l'accumulation précoce des PAPs à l'échelle protéique doit donc sans doute correspondre à un assemblage rapide du complexe PEP-PAP dans l'épiderme.

Dans le mésophylle, le complexe se forme ensuite vraisemblablement entre 6 et 12 heures d'illumination, car c'est là qu'on observe un nouveau pic d'accumulation de PAP8 et de RbcL à l'échelle de la plante (Liebers *et al.*, 2020) quand par ailleurs s'accumulent nettement les sous unités de PSI et PSII, dont certaines sous-unités sont spécifiques de la PEP (PsaA et PsbB par exemple) (Rudowska *et al.*, 2012; Kowalewska *et al.*, 2016; Pipitone *et al.*, 2021). C'est d'ailleurs entre 6 et 8 heures que commence la

deuxième phase de conversion photosynthétique des étiooplastes, notamment avec une synthèse massive de composés photosynthétiques en partie codés dans le plaste. La formation du complexe PEP-PAP y permettrait alors d'induire la formation de thylakoïdes pouvant soutenir un début d'activité photosynthétique, optimal après une demi-journée d'illumination (Pipitone *et al.*, 2021) (Cf chapitre I de l'introduction). D'où le fait qu'une nette accumulation du complexe PEP-PAPs soit observable à partir de 12 heures dans les WB natifs de (Yoo *et al.*, 2019), lorsque des traces seulement sont détectées antérieurement dans leurs cinétique de de-étiolement et qui correspondent sans doute à l'assemblage rapide du complexe dans l'épiderme à la lumière.

D - LES PAPS DANS LE PLASTE NE SE LIMITENT PAS LA FORMATION DU COMPLEXE

Cela dit, les PAPS ne se limitent pas à leur rôle d'activation de la PEP, en atteste la variété de domaines fonctionnels ou d'homologies de séquences qui les caractérisent individuellement. On peut d'ailleurs les classer en trois grandes catégories, à savoir métabolisme des acides nucléiques, signalisation rédox, et photoprotection (Kindgren and Strand, 2015). Ces deux dernières catégories jointes permettent d'ailleurs de faire des PAPS le lien entre métabolisme photosynthétique et régulation de l'expression des PhAPGs, surtout en admettant que la photosynthèse est rapidement optimale après la formation massive du complexe.

Parmi les PAPS en lien avec les acides nucléiques, on retrouve PAP1/pTAC3, PAP2/pTAC2, PAP3/pTAC10, PAP5/pTAC12/HMR, PAP7/pTAC114, et PAP12/pTAC7. PAP1 et PAP2 sont des PPRs (Pentatricopeptid-Repeat), des protéines capables de se lier aux acides nucléiques pour recruter de nombreux autres co-facteurs. Les autres PAPS de cette catégorie peuvent également s'associer aux acides nucléiques, comme PAP3 avec les ARNs du plaste depuis son domaine STF (*S1 domain-containing Transcription-Stimulating Factor*), entre autre retrouvé chez des facteurs initiateurs de transcription et de traduction (Jeon *et al.*, 2012). PAP5/pTAC12/HMR, possède un domaine PEST qui est la signature de protéines à courte durée de vie. Comme la quasi-totalité des PAPS, on la retrouve en étroite association avec le TAC en fusion GFP, où la protéine se lie aux ARNs et ADN simple brins de gènes spécifiques de la PEP, peut être indirectement grâce au complexe PEP-PAP (Pfalz *et al.*, 2015).

Cela dit, parmi les douze PAPS, certaines restent énigmatiques, et c'est par exemple le cas de PAP11/AtMurE, homologue d'une enzyme impliquée dans la voie de synthèse des peptidoglycanes chez les procaryotes. Comme les plastes des plantes n'utilisent pas cette voie métabolique, la présence d'une telle protéine dans le complexe PEP-PAP est intrigante et reste pour le moment inexpliquée (Garcia *et al.*, 2008; Pfannschmidt *et al.*, 2015). La huitième PAP est également énigmatique, car elle ne présente a priori pas d'homologie de séquence (Pfannschmidt *et al.*, 2015), et ses fonctions restent encore indéterminées à ce jour.

E - BIEN D'AUTRES PROTEINES NUCLEAIRES DU TAC SONT ESSENTIELLES AU VERDISSEMENT DES PLASTES

Enfin, si les PAPs sont effectivement définies comme étant les composants de la fraction soluble du nucléoïde (sRNAP), et donc constituant le complexe minimal requis pour l'activité enzymatique du complexe transcriptionnel ; de nombreuses autres protéines du TAC sont également essentielles au verdissement de la plante et participent activement à la formation et à la régulation du complexe PEP-PAPs.

Sur le TAC de la moutarde ont pu être identifiées 35 protéines, dont 18 n'avaient pas encore été décrites, et donc nommées pTACs 1 à 18. Le TAC d'*Arabidopsis* varie subtilement, comprenant 26 protéines en commun avec *Sinapis* (Pfalz *et al.*, 2006).

Chez le Maïs, pTAC1/Zm-Why1 (Whirly1) fait partie des protéines les plus enrichies du TAC, où l'on retrouve également abondamment PAP1/pTAC3 et SIG2 (Majeran *et al.*, 2012). En l'occurrence les membres de la famille Whirly sont des protéines multifonctionnelles capables de s'accrocher aux acides nucléiques, et chez *Arabidopsis*, deux isoformes sont adressés par voie canonique aux plastes (At-Why1 et At-Why3) (Krause *et al.*, 2005). Et si la perte de fonction individuelle des deux isoformes ne cause aucun phénotype particulier, le double mutant est plus pâle et fortement impacté dans sa croissance (Maréchal *et al.*, 2009). Chez le maïs ou l'avoine, on ne retrouve qu'une isoforme dans les plastes (Zm-Why1 ou Hv-Why1), essentiellement en association avec des introns contenus dans les transcrits du plastome (Melonek *et al.*, 2010), où Why1 est aussi un organisateur majeur du nucléoïde nécessaire à sa compaction (Krupinska *et al.*, 2014). Surtout, on sait la protéine être requise lors de la mise en place de l'appareil traductionnel du plaste, en est en ce sens nécessaire elle aussi à la biogenèse du chloroplaste. Le phénotype du KO est d'ailleurs totalement albinos, et présente une forte répression des gènes typiquement transcrits par la PEP à la lumière (Prikryl *et al.*, 2008). Mais il faut faire la distinction entre phénotype albinos et phénotype delta rpo, typique des mutants PAP. Car d'une part, Why1 n'appartiennent pas à la fraction sRNAP mais à la fraction du TAC. Et d'autre part, on peut détecter dans le mutant hypomorphe de why1 le complexe PEP-PAP, ce qui n'est pas le cas du mutant PAP5, même à l'état hypomorphe (Pfalz *et al.*, 2015). En fait l'absence de nombreuses autres protéines du TAC mène souvent à un phénotype albinos (Pfalz and Pfannschmidt, 2013), car c'est l'ensemble de leurs interactions sur le nucléoïde qui régulent et pérennisent la machinerie d'expression génétique du plaste.

D'un autre côté, il existe aussi des protéines qui ne sont pas détectées dans le TAC, mais qui sont pourtant comme les PAPs nécessaires à l'apparition du complexe PEP-PAP. C'est par exemple le cas de RCB/SVR4/AtECB1, qui pourrait également participer directement à sa régulation redox. De plus, comme d'autres protéines et son paralogue NCP, RCB est été montrée comme interagissant avec certains

membres du complexe PEP-PAPs (Qiao *et al.*, 2011). Cela dit ces interactions avec la PEP seraient plus transitoires ou moins étroites qu'avec les PAPs (Figure 11).

F – CONCLUSION : LES PAPS ASSURENT L'ACTIVITE DE LA PEP, ET DONC L'IDENTITE DES PLASTES

Une grande diversité de plastes existe, pourtant tous possèdent le même petit génome compact avec la même machinerie d'expression. Sa régulation est complexe et dépend du contexte tissulaire, développemental, et lumineux. On l'a vu, un de ces verrous majeurs est le rapport d'activité des trois RNAPs entre elles, et dans le cas des chloroplastes, l'arrivée massive et rapide des PAPs permet d'augmenter largement la production de transcrits par la PEP.

On les sait d'ailleurs bien exprimées dans les plantules étiolées mais seulement dans l'épiderme, avec une faible accumulation de la protéine dans la fraction des étioplastes à l'échelle de la plante (Liebers *et al.*, 2020). On y suppose d'ailleurs le complexe PEP-PAP apparaitre transitoirement après trois jours de croissance, mais les raisons en restent encore obscures. Le mésophylle en revanche n'exprime pas les PAPs à l'obscurité, et celles-ci ne peuvent donc pas être adressées *de novo* aux plastes dans ces conditions.

Néanmoins, les cycles de conversions identitaires du plaste sont complexes, surtout entre la formation de l'embryon à l'établissement de la graine. Car c'est en effet ici que s'enchaînent des phases de conversions proplaste – chloroplaste entre le début de l'embryogénèse et la germination des graines (voir chapitre I de l'introduction).

Il est donc concevable que les PAPs soient exprimées lors de ces phases précoces et adressées aux plastes, lesquels pourraient les conserver à l'état de protéines plus tard dans les étioplastes du mésophylle.

Mais tel était le cas, leur(s) rôle(s) dans les étioplastes du mésophylle restera(en)t entièrement à déterminer, puisque la PEP y est considérée désassemblée dans ces conditions.

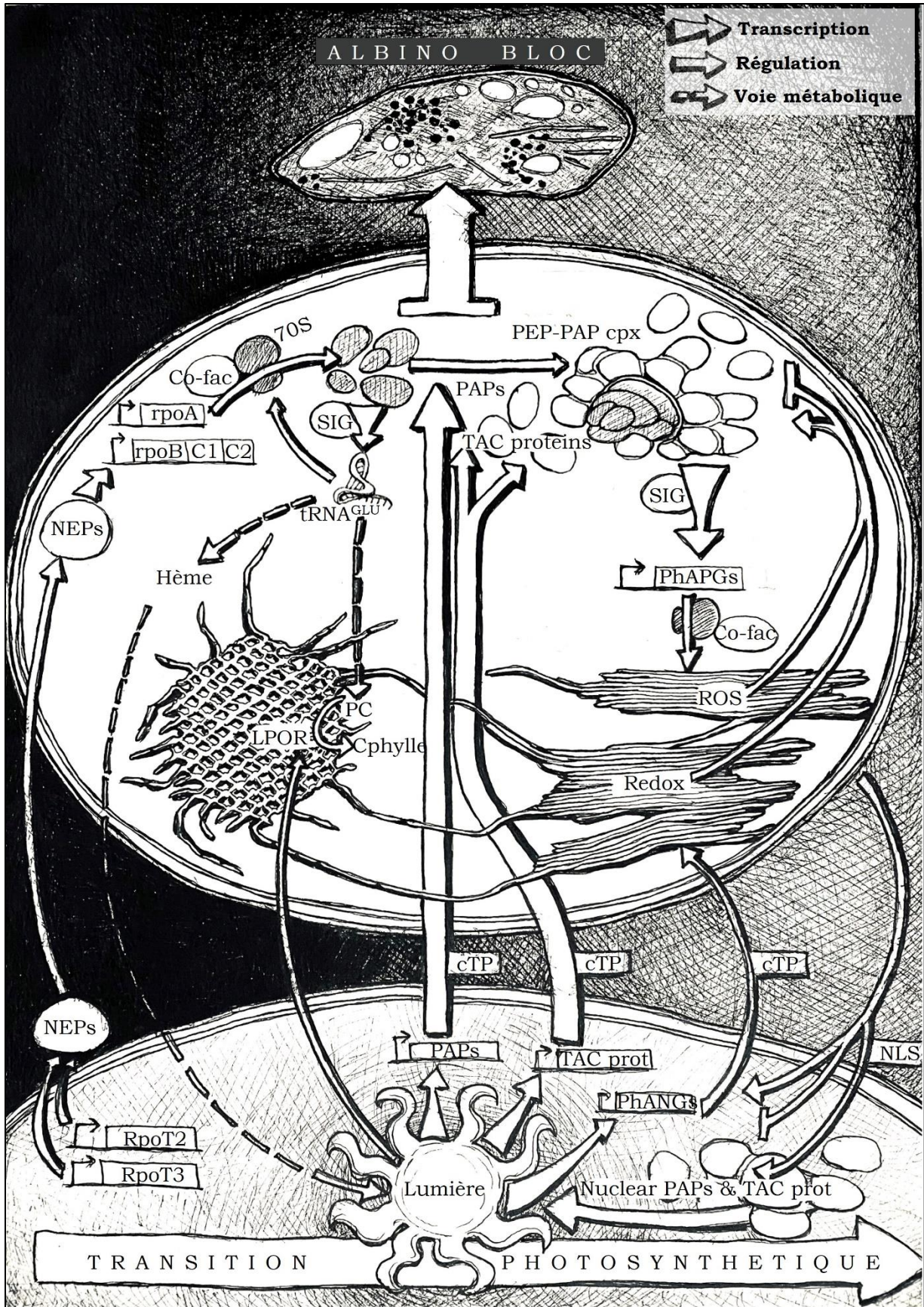


Figure 13 : Résumé graphique de l'imbrication du verdissement et des phénomènes développementaux précoces liés à la perception de la lumière dans le mésophylle des cotylédons étiolés chez Arabidopsis.

Les 3 RNAPs sont déjà présentes dans la graine sèche et s'accumulent lors de la germination, et les tRNAs sont exprimés quelques heures post-imbibition. Parmi eux tRNE, codant pour le tRNA^{GLU}, précurseur de la voie de l'hème (phytychromobiline et phytychromes) et de la voie du magnésium (tétrapyrroles et chlorophylles). Les NEPs encodés dans le noyau par les gènes RpoT2 et T3 sont adressés aux plastes et participent activement à l'accumulation de la PEP, en concert avec la machinerie de traduction semi-procaryotique du plaste qu'elles mettent également en place (et pour laquelle de nombreuses protéines nucléaires sont requises et simplifiées ici sous le terme de cofacteurs, co-fac). Si on ne connaît pas comment les PAPs se comportent dans les plastes ou dans le noyau pendant ces stades précoces, on les suppose absentes du mésophylle des cotylédons après 3 jours de croissance à l'obscurité, car le cœur enzymatique de la PEP y est supposé dissocié.

D'une part, dans les plastes la perception de la lumière entraîne directement la conversion de la protochlorophyllide en chlorophyllide par la LPOR en consommant du NADPH (enzyme et substrats présents en extrême quantité dans les étioplastés accumulés à l'obscurité dans le mésophylle), ensuite rapidement estérifié par la chlorophylle synthase et incorporée dans les quelques apo-protéines préexistantes, ayant pour effet de modifier drastiquement et rapidement l'architecture interne du plaste. D'autre part, la lumière et la toile de signalisation qu'elle entraîne dans le noyau mène au verdissement des plastes, notamment grâce à l'expression des gènes des PAPs ainsi que de nombreuses autres protéines du TAC et du nucléoïde en général. Leur adressage subséquent aux plastes aboutit à la formation massive du complexe PEP-PAPs, et les PhAPGs y sont alors massivement exprimés. En outre, comme les génomes sont couplés, l'expression des PhAPGs est synonyme de l'expression des PhANGs dans le noyau.

Ces événements clefs permettent de rapidement former un réseau de thylakoïdes photosynthétiquement actifs et dont le métabolisme participe en partie à la régulation de l'activité de la PEP, sans doute en lien avec certaines PAPs aux propriétés redox du complexe. L'import des PAPs dans les plastes est supposé se faire par voie canonique, processus co-traductionnel où le peptide de transit (cTP) positionné au N-termini des protéines est clivé après import par la machinerie TOC-TIC du plaste.

L'arrivage massif des PAPs sur la PEP constitue un des verrous majeurs de la biogenèse du chloroplaste, sans quoi la transition photosynthétique avorte et mène à la formation de plastés albinos. De forme irrégulière et généralement plus petits que des chloroplastes ordinaires, ils ne possèdent pas de riche réseau membranaire chlorophyllien et photosynthétique, mais de (parfois) quelques membranes non chlorophylliennes et des petites vacuoles dispersées dans le stroma condamnant ainsi la plante à l'hétérotrophie. C'est ce qu'on nomme l'albino bloc.

Mais le processus de verdissement est plus complexe encore, et un certain nombre de PAPs et de protéines du TAC sont également retrouvées dans le noyau sous leur forme mature, suggérant un import préalable aux plastés. Aussi, ces mêmes protéines sont essentielles pour mener à bien la complexe toile de signalisation nucléaire liée à la perception de la lumière, indiquant que verdissement et signalisation de la lumière sont deux phénomènes très étroitement imbriqués, critiques lors de l'établissement de la plantule.

La présente étude cherchera à comprendre comment ces processus sont liés notamment à travers l'étude de PAP8, pour révéler qu'à l'échelle moléculaire, la protéine présente deux domaines eux-mêmes intriqués et certainement requis lors de ces deux processus imbriqués.

N'est représenté qu'une NEP pour simplification. LPOR: Light Dependent Protochlorophyllide Oxidoreductase. cTP: chloroplast Transit Peptide. NLS : Nuclear Localisation Séquence. ROS: Reactive oxygen species. Co-fac : co-facteurs. Cphylle : Chlorophylle. PhAPGs & PhANGs : Photosynthesis Associated Plastid/Nuclear Genes respectivement.

II – 4) MODELE MOLECULAIRE DE LA BIOGENESE DU CHLOROPLASTE A LA LUMIERE

A - REGULATION DE L'EXPRESSION DES PAPS DANS LE NOYAU A LA LUMIERE

PERCEPTION DE LA LUMIERE PAR LES PHYTOCHROMES

Dès illumination en revanche, le schéma d'expression tissulaire des PAPS change pour être constant à l'échelle de la plante. Et bien qu'on ne connaisse pas de candidat régulateur de leur expression dans le noir, on sait que la lumière active rapidement leur expression dans le noyau dans l'ensemble du cotylédon.

La lumière est efficacement perçue par les phytochromes (Phy) dont l'un deux, PhyB est sous sa forme inactive (Pr) dans le cytosol à l'obscurité. Il s'active (Pfr) après perception de la longueur d'onde qui lui est spécifique (660 nm), et s'accumule dans le noyau où son potentiel à induire une réponse dépend d'une variété de facteurs. De concert avec les autres phytochromes, cela aboutit à la reprogrammation de plus d'un tiers du génome nucléaire. D'ailleurs cette chaîne de transduction du signal n'a rien de linéaire et ressemble plutôt à une toile complexe (Spalding and Folta, 2005), adaptant finement la physiologie de la plante à la lumière.

Lorsque étiqueté avec GFP et exprimé constitutivement, on voit PhyB s'accumuler rapidement dans le noyau où il forme d'abord une multitude de petits photocorps précoces. Ceux-ci s'agrègent en quelques heures en de plus gros et moins nombreux photocorps tardifs (Spalding and Folta, 2005). Cela aboutit au déclenchement de la photomorphogénèse, c'est-à-dire au verdissement progressif des plastes accompagnant l'expression de gènes qui régulent l'élongation de l'hypocotyle, l'ouverture progressive des cotylédons et du crochet apical de la plantule puis de l'expansion du mésophylle (voir figure 8).

De fait, les processus liés à la maturation des photocorps constituent un réel interrupteur moléculaire, puisqu'ils activent la photomorphogénèse en même temps qu'ils répriment les processus liés à la croissance à l'obscurité.

DEGRADATION DES PIFs & ACTIVATION DES PHANGs ET DES PAPS

Inhiber les PIFs désinhibe la photomorphogénèse et réprime la skotomorphogénèse

C'est notamment un pivot central de l'étiollement qui est disjoncté lors de l'apparition des photocorps, car jointe à la dégradation des PIFs. Ce sont des facteurs de transcription aux fonctions partiellement redondantes, nommés d'après leurs interactions avec les Phys (Phytochrome Interacting Factors), et qui contiennent d'ailleurs tous un motif APB (Active Phytochrome-B binding motif).

Les 5 PIFs et 2 PILs (PIF-Like) découverts sont des bHLH (basic Helix Loop Helix) qui reconnaissent un motif G-box (CACGTG) ou PBE-box (CACATG) sur leurs gènes cibles. Dans le noir PIF1, PIF3, PIF4, et PIF5 promeuvent notamment l'élongation de l'hypocotyle en tant que facteurs de transcription. Mais ce sont aussi des répresseurs transcriptionnels et PIF1, PIF3, et PIF5 répriment également l'activation de nombreux PhANGs, soit en recrutant d'autres partenaires (par exemple des histone désacétylases comme HDA-15), soit directement. C'est par exemple le cas pour les promoteurs des gènes GLK1 et GLK2, facteurs de transcription clefs impliqués dans l'activation d'enzymes nécessaires à la synthèse de chlorophylle (Yoo, Han and Chen, 2020).

Activer les phytochromes active la photomorphogenèse et inhibe la skotomorphogenèse

En effet après perception de la lumière, l'apparition de photocorps tardifs dans le noyau inhibe directement les PIFs par phosphorylation. D'autre part, la signalisation que les photocorps induisent modifie tout un réseau de protéasomes nucléaires aboutissant inexorablement à la dégradation des PIFs.

Et comme les promoteurs des gènes PAPs (de même que ceux des facteurs sigma) contiennent aussi un motif de liaison aux PIFs, la dégradation des PIFs désinhibe probablement l'induction des PAPs à la lumière (Yoo, Han and Chen, 2020). En parallèle sont activés de nombreux facteurs de transcription photomorphogénétiques clefs tel que HY5 (Yoo, Han and Chen, 2020), stabilisé en même temps que les photocorps tardifs remplacent les photocorps primaires dans le noyau après environ 4h d'illumination (Yamaguchi *et al.*, 1999; Pipitone *et al.*, 2021). Or HY5 est un facteur de transcription nucléaire clef dans la mise en place du programme développemental autotrophe de la plantule, et est notamment présumé activer l'expression du régulon des PAPs à la lumière (Liebers *et al.*, 2020). L'ensemble de ces événements mènent à une haute expression des PAPs ensuite adressées aux plastes pour leur subséquente complexation massive avec la PEP, phénomène estimé prendre dans le mésophylle entre 6 et 12 heures d'illumination (voir [chapitre 2](#) introduction).

En parallèle de l'activation de l'expression des PAPs dans le noyau, les PhANGs et les gènes nécessaires à la synthèse de chlorophylle *de novo* induits par les GLKs sont exprimés. L'ensemble intègre ainsi efficacement conversion photosynthétique des plastes et perception de la lumière ainsi que les processus développementaux qui y sont associés.

C - PERCEPTION DE LA LUMIERE ET ASSEMBLAGE DU COMPLEXE SE VEROUILLENT MUTUELLEMENT

LA PERCEPTION DE LA LUMIERE CONTROLE LARGEMENT L'ASSEMBLAGE DE LA PEP

En régulant l'expression tissulaire des PAPs, la lumière régule de fait l'assemblage du complexe transcriptionnel dédié aux PhAPGs dans le plaste. Mais la perception de la lumière elle-même constitue un verrou du verdissement, plus large encore que la complexation des PAPs avec la PEP.

En effet, aucun complexe PEP-PAPs n'est jamais détecté dans le double mutant *phyA-phyB* (*phyA-211-phyB-9*), et l'est à l'état de traces seulement dans le mutant *phyB* (*phyB-9*). Donc même si les transcrits des PAPs ont la possibilité de s'accumuler au préalable dans ces conditions, ceux-ci ne parviennent pas à se complexer à la PEP (après traduction et import) si la lumière est mal intégrée à la cellule, tant dans l'épiderme que dans le mésophylle. Par ailleurs, le quintuple mutant est certes affecté dans l'accumulation des PAPs, mais pas le double mutant *phyA-phyB* qui pourtant ne parvient pas à assembler le complexe.

De fait PhyA et PhyB constituent en tant que tels un verrou majeur de l'assemblage des PAPs sur la PEP, en plus d'être nécessaires à la synthèse des PAPs à lumière (Yang *et al.*, 2019; Yoo *et al.*, 2019). Les phytochromes sont également critiques à la synthèse de chlorophylle, en particulier PhyA et PhyB. En effet, le KO de tous les PHYs bloque fortement l'accumulation de chlorophylles chez *Arabidopsis* (-96%, et le double KO *phyA-211/phyb-9* suffit à réduire de moitié le taux de chlorophylle qui met par ailleurs bien plus de temps à s'accumuler (Yoo *et al.*, 2019). De la même manière, introduire la version de PhyB constitutivement active dans le noyau (version YHB) permet également de construire un complexe PEP-PAP à l'obscurité, échappant là encore à tous les verrous mentionnés.

Inversement, les PIFs en sont les répresseurs majeurs, puisque le mutant *pifq* (quintuple mutant) assemble le complexe PEP-PAP dans le noir comme un sauvage le ferait à la lumière (Yoo *et al.*, 2019). Donc les PIFs, en plus de réprimer largement les PhANGs dans le noyau à l'obscurité, y répriment également activement les PhAPGs en inhibant la formation du complexe PEP-PAP, bien que les mécanismes précis de cette répression inter-organellaire restent largement à déterminer. Ils pourraient par exemple tout aussi bien réprimer un inducteur de l'assemblage du complexe PEP-PAP dans les plastides, ou bien directement inhiber l'expression des PAPs, par exemple par compétition avec HY5 sur leurs promoteurs, ou bien les deux à la fois (Yoo, Han and Chen, 2020). Le raisonnement inverse est également valable avec les phytochromes à la lumière, dont on a vu que la mécanique d'activation de l'assemblage PEP-PAPs ne saurait être aussi simple que la seule activation de l'expression des PAPs dans le noyau.

LA PERCEPTION DE LA LUMIERE EST EN PARTIE SOUS CONTROLE DE LA PEP

Mais si le verdissement des plastes est étroitement imbriqué aux mécanismes liés à la perception de la lumière dans le noyau, la réciproque est tout aussi vraie.

Car la PEP (avec SIG2) est importante pour la synthèse de tRNA^{GLU}, ARN de transfert utilisé comme précurseur de la voie des tétrapyrroles d'une part et de la voie de l'hème d'autre part. Or cette dernière aboutit à la formation des phytochromobiline dans le cytosol pour former les photorécepteurs une fois incorporée aux apophytochromes (produits des gènes Phys) (Kohchi *et al.*, 2001). La perception de la lumière est donc sous verrou de l'activité de la PEP sur trnE – fusse-t-elle associée avec les PAPs lors de ces étapes précoces du développement, quand trnE est déjà bien visible dès 12 heures post-stratification à la lumière (Kanamaru *et al.*, 2001; Hanaoka *et al.*, 2005). Or si son expression est si précoce, il devient difficile de déterminer quelle est ensuite la part de l'activité de la PEP dans sa production à l'obscurité (et à l'échelle de la plante entière), malgré les diverses expérimentations réalisées dans ces conditions (Kanamaru *et al.*, 2001; Privat *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2009; Oh and Montgomery, 2013; Williams-Carrier *et al.*, 2014; Oh *et al.*, 2018).

De plus, il devient clair que les PAPs elles-mêmes verrouillent verdissement et développement lors de la transition skoto-photomorphogénèse. En effet, un certain nombre de PAPs, de même que d'autres protéines du TAC, sont adressées au noyau où elles sont nécessaires à la signalisation liée à la perception de la lumière.

D - LES PAPS ET PROTEINES DU NUCLEOÏDE SCellent ENSEMBLE VERDISSEMENT ET DEVELOPPEMENT

DES PAPS ET PROTEINES DU NUCLEOÏDE SONT ADRESSEES AU NOYAU

Le module Phy-PIF n'échappe en effet pas non plus à l'imbrication du verdissement et de la photomorphogénèse puisque les PAPs sont nécessaires à la maturation des photocorps dans le noyau, et donc à la signalisation qui y est associée. En fait, 6 des 12 PAPs ont au moins un NLS (« *Nuclear localisation Signal* ») prédit, ce sont PAP1, PAP2, PAP7, PAP8, PAP9, et PAP12 (Pfannschmidt *et al.*, 2015). Et au moins deux d'entre elles, PAP5 et PAP8, sont bien caractérisées comme adressées au noyau. De nombreuses autres protéines du TAC essentielles pour le verdissement y sont également retrouvées, et c'est notamment le cas de RCB et son paralogue NCP, ou encore de Why1 (Krupinska *et al.*, 2020).

Les NLS peuvent être prédits d'après la répétition d'arginines et/ou de lysines sur une dizaine ou vingtaine d'acides aminés qui les caractérisent, et peuvent être localisés aussi bien aux extrémités de la protéine

que dans le cœur de sa partie codante, et sont reconnus dans le cytosol par la machinerie d'import nucléaire selon une mécanique d'adressage post-traductionnel. Mais si la protéine est suffisamment petite pour passer en dessous du seuil d'exclusion nucléaire (60 kDa), un adressage y est possible même sans NLS (Wang and Brattain, 2007). Par ailleurs, il arrive parfois qu'un NLS prédit ne soit pas fonctionnel seul, et c'est par exemple le cas de PAP5 (Nevarez *et al.*, 2017). Aussi, la meilleure façon de valider un adressage nucléaire est encore de le tester. En l'occurrence ces protéines de la machinerie d'expression du plaste sont bien retrouvées par western-blot sur fractions nucléaires purifiées, mais on peut aussi les retrouver dans le noyau par immunomarquage histologique ou suivi de fusions traductionnelles fluorescentes en systèmes transitoires. Notez que parmi ces protéines duellement localisées, aucune fusion protéique étiquetée par fluorescence ne se retrouve *in vivo* par microscopie dans les noyaux avec cette méthode (Terasawa and Sato, 2005; Chen *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2014; Nevarez *et al.*, 2017; Liebers *et al.*, 2020), soit à cause d'un seuil de détection relativement bas, soit en raison de phénomènes encore inconnus.

Enfin, parmi les protéines du nucléoïde adressées au noyau, NCP, RCB, PAP5, et PAP8 sont démontrées comme nécessaires à une signalisation normale de la lumière dans le noyau.

CES PROTEINES SONT EGALEMENT NECESSAIRES A LA SIGNALISATION DES PHYS

En effet, aucun de ces quatre KO ne parvient à assembler des photocorps tardifs alors que PIF1 et PIF3 sont maintenus à la lumière. De la même manière, l'expression constitutive de PhyB ne supprime pas l'élongation de l'hypocotyle habituellement induite sous faible intensité lumineuse. Le tout indique chez ces KO albinos une déficience de la signalisation des Phytochromes, et donc de la photomorphogénèse en général (Chen *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2019; Yoo *et al.*, 2019; Liebers *et al.*, 2020). De plus chez le KO PAP8, des défauts supplémentaires d'induction de GLK1 et GLK2 sont observés, confirmant la détérioration de la voie de signalisation des Phys dans le noyau (Liebers *et al.*, 2020).

En outre, si les fonctions biochimiques de RCB, NCP, et PAP8 sont moins résolues dans ce compartiment, on connaît mieux celles de PAP5/HMR. On sait notamment son domaine 9 aa TAD (« *acidic transcriptional activator* ») en C-term important pour la transcription de gènes liés à l'élongation de l'hypocotyle dans le noir, également promus par les PIFs. Cela pourrait paraître antagoniste avec sa fonction photomorphogénétique, mais la dégradation à la lumière de PIF1 et PIF3 est en fait dépendante de l'activation de ce même TAD. Les auteurs suggèrent que PAP5 est à l'obscurité dans un contexte activateur de gènes de l'élongation de l'hypocotyle, où son taux protéique reste plutôt stable et permet d'alimenter le turnover des PIFs et donc leur efficacité, avec lesquels PAP5 interagit depuis son domaine N-terminal. Cette dégradation a d'ailleurs vraisemblablement lieu depuis son domaine RAD23, plus ou moins homologue de la protéine du même nom chez la levure et contenant un *ubiquitine-like domain* (Ubl) impliqué dans la machinerie de dégradation du protéasome (Chen *et al.*, 2010).

A la lumière PAP5 interagit avec les versions photo-actives des Phys depuis ses deux domaines PIRs (Phytochrome-Interacting Regions) et est nécessaire à leurs accumulation (Galvão *et al.*, 2012). Dans ce contexte lumineux, PAP5 devient donc un répresseur majeur de l'élongation de l'hypocotyle, tandis qu'il active la toile de signalisation des Phytochromes, et donc l'assemblage du complexe PEP-PAP dans les plastes (Qiu *et al.*, 2015) – d'où son second nom *Hemera* (HMR), de la déesse grecque du jour (Chen *et al.*, 2010).

Notez cependant qu'en ce qui concerne PAP5 et NCP au moins, leurs présence dans les plastes pour l'assemblage du complexe PEP-PAP constitue au moins autant un facteur limitant du verdissement que leur action dans le noyau elle-même, car supprimer les PIFs (*pifq*) dans un fond KO PAP5 ou NCP ne restaure pas de verdissement normal à la lumière, contrairement à leur suppression dans un KO RCB (Qiu *et al.*, 2015; Yoo *et al.*, 2019). D'ailleurs, photomorphogenèse et verdissement sont semble-t-il encore plus étroitement imbriqués qu'initialement pensé, et cela pourrait provenir du mécanisme d'adressage particulier sans doute employé par les protéines ici citées. En effet, tous leurs isoformes sont toujours retrouvés au même poids moléculaire par western blot dans les fractions totales, nucléaires, et chloroplastiques ; indiquant vraisemblablement un import de ces protéines particulières aux plastes en amont d'un adressage au noyau (Krupinska *et al.*, 2020), pourtant globalement en amont, semble-t-il, de la signalisation liée au verdissement.

E - CARACTERISER PAP8 POUR CARACTERISER LE NŒUD DEVELOPEMENTAL DE LA TRANSITION PHOTOSYNTHETIQUE : HYPOTHESE ET AXES DE RECHERCHE

ETUDIER PAP8 POUR DEFINIR L'IMBRICATION DU VERDISSEMENT DANS LE DEVELOPPEMENT

Sachant cela, si les nœuds développementaux que sont verdissement et photomorphogenèse semblaient déjà étroitement coordonnés par un ensemble de processus interdépendants, ils deviennent interprétables comme un seul et même phénomène. Or parmi les protéines de ce vaste nœud développemental, PAP8 présente un certain nombre d'avantages pour comprendre quels enjeux sont associés à quels compartiments en fonction de la lumière ou de l'obscurité.

Elle fait d'abord partie intégrante du complexe PEP-PAPs, contrairement à NCP et RCB qui y sont associés moins étroitement ou plus transitoirement, où RCB est plus critique dans le noyau et moins dans le plaste bien qu'ici son rôle ne puisse être mis en cause (Yoo *et al.*, 2019). PAP5 est également bien caractérisée dans le noyau mais présente les désavantages de ne pas avoir de NLS fonctionnel seul et de posséder un domaine PEST qui ne permet pas de tracer la protéine longtemps après illumination.

Sont en revanche prédits chez PAP8 un peptide d'adressage canonique aux plastes au N-termini, ainsi qu'un NLS dans la seconde moitié de son CDS (Liebers *et al.*, 2020). On doit donc pouvoir supprimer la localisation nucléaire de PAP8 en mutant son NLS afin de comprendre les enjeux de sa présence dans ce compartiment, sans pour autant faire face aux défauts pleiotropiques qui sont associés à la seule inactivation de la formation du complexe PEP-PAP dans les plastes.

De fait, malgré la nature énigmatique de la protéine, PAP8 est un choix stratégique pour caractériser comment les protéines nucléaires du nucléoïde contrôlent la biogenèse du chloroplaste chez *Arabidopsis thaliana*.

HYPOTHESE : PAP8 POURRAIT CORDONNER VERDISSEMENT ET PHOTOMORPHOGENESE

Détériorer en partie la localisation de PAP8 devrait donc nous en apprendre plus sur les mécanismes liés à sa présence dans le noyau, présumée imbriquer verdissement et développement à la lumière.

En l'occurrence, supprimer son adressage nucléaire en mutant 5 acides aminés sur son NLS (PAP8^{NLSm5}) entraîne un fort retard de verdissement et de croissance d'une part, phénotype qualifié de [DG] (« *Delayed Greening* »). D'autre part, la suppression de sa séquence d'adressage aux plastes (PAP8^{dCTP}), ne permet pas de supprimer le phénotype [Albinos], confirmant une fois de plus la nécessité d'assembler le complexe PEP-PAP dans les plastes pour leurs verdissement (Liebers *et al.*, 2020).

On pose alors l'hypothèse que la présence de PAP8 dans le noyau permet de coordonner verdissement et développement.

AXES DE RECHERCHE

Plusieurs stratégies génétiques sont alors dessinées pour mieux définir le(s) rôle(s) de PAP8 dans les deux compartiments d'adressage et si ceux-là sont indépendants, tant en termes de fonction que de mécanique d'adressage.

Une première approche consiste à réintroduire deux versions restreintes à un seul compartiment au sein d'une même plante, afin de déterminer si on peut découpler la fonction de PAP8 de sa localisation cellulaire et des voies de signalisations y étant associées. Si une telle plante présente une amélioration du verdissement, alors la fonction nucléaire de PAP8 pourra être supposée indépendante de sa fonction dans le plaste, en tous cas partiellement au moins. C'est ce qu'on appelle un test de double-hémi complémentation fonctionnelle.

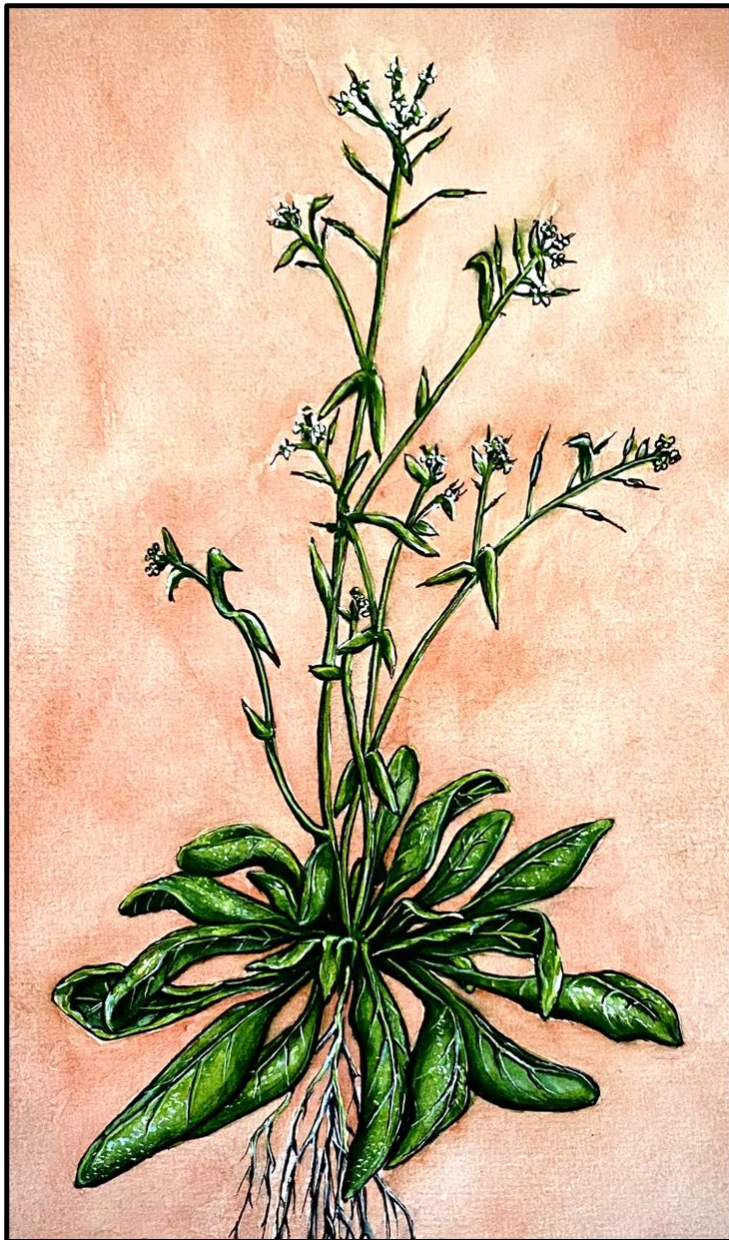
Alternativement, les défauts observés chez les plantes [DG] avec la version PAP8^{NLSm5} pourraient être dus à un défaut de signalisation dans les plastes (par changement structurel ou fonctionnel) induit par les 5 mutations ponctuelles du NLS. Deux stratégies sont alors pensées pour réintroduire une telle version dans le noyau, la première étant de replacer le NLS de PAP8 sur sa version mutée PAP8^{NLSm5}. Une amélioration de verdissement serait alors synonyme de fonctionnalité dans le plaste, auquel cas la manipulation des séquences d'adressages de PAP8 se révélerait être un puissant outil pour améliorer notre compréhension du nœud développemental entre photomorphogenèse et verdissement. Une seconde approche consiste à réintroduire la version PAP8^{NLSm5} dans le noyau, mais en utilisant cette fois le NLS du virus SV40. Comme dans les deux cas on remplace PAP8 dans le noyau sans le domaine fonctionnel qui pourrait recouvrir son NLS, on peut déterminer si celui-ci a une fonction dans ce compartiment selon la même approche expérimentale de test de complémentation fonctionnelle.

Cette deuxième version est par ailleurs étiquetée avec la GFP, de sorte à pouvoir déterminer son adressage subcellulaire à une résolution tissulaire, jusqu'ici uniquement réalisé à l'échelle de la plante. Aussi, on s'assurera que le plan de construction utilisé n'impacte pas la fonctionnalité de la fusion protéique *in planta* en faisant de même avec une version non mutée de PAP8 et sans NLS ajouté.

Enfin, afin de déterminer si les défauts de photocorps observés chez un albinos où PAP8 est absente sont dus spécifiquement à sa présence dans le noyau, on introduira la version étiquetée de PhyB exprimée constitutivement (PBG) dans un fond [DG] PAP8^{NLSm5}. Et pour s'assurer que l'assemblage du complexe PEP-PAPs en tant que tel ne constitue pas lui aussi un verrou de la formation des photocorps tardifs en tant que tel, on introduira également la version PBG dans deux fonds [albinos] mutés pour PAP3 ou PAP11, deux PAPs supposées restreintes aux plastes.

RESULTATS

PUBLICATION SCIENTIFIQUE 1^{ER} AUTEUR & CONTRIBUTIONS



CHAMBON ET AL., 2022, EN REVUE, IJMS

Figure 2: A PAP8 N-terminal translational fusion is functional.

Figure 3: The region with the predicted NLS provides functions in addition to the nuclear localization signal.

Figure 4: SV40 NLS fused to PAP8 provides a robust nuclear epidermal marker.

LIEBERS ET AL., 2020, EMBO JOURNAL

Figure 4. D, E, F, G: Pictures of representative genotypes obtained in the functional complementation test of *pap8-1* using pP8::PAP8-NLS_{m5} or pP8::PAP8_{DcTP}, both constructions without GFP tags.

Figure 5. B: Hypocotyl length measurements on *pap8-1* PBG seedlings.

Figure 5. I : RT-qPCR analysis on wild type, *pap8-1*, PBG and PBG *pap8-1* on GLK1 and GLK2.

Figure EV1. B, D, E: Greening assay on wild type and rescued *pap8-1* homozygous, Content of total chlorophylls (Chl(a+b)), Spectrophotometric analysis of pigments.

PAP8/PTAC6 IS PART OF A NUCLEAR PROTEIN COMPLEX AND DISPLAYS RNA RECOGNITION MOTIFS OF VIRAL ORIGIN

Louise Chambon¹, François-Xavier Gillet^{1,a}, Maha Chieb¹, David Cobess², Thomas Pfannschmidt^{1,b}, Robert Blanvillain^{1,©}

Affiliations: ¹ Univ. Grenoble-Alpes, CNRS, CEA, INRA, IRIG-LPCV, F-38000 Grenoble. ² Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, IBS, F-38000 Grenoble. ^a Current address: UMR 5240 MAP: CNRS, UCB, INSA, Bayer CropScience, Domaine Lyon Tech-La Doua 10, rue Dubois, Bât Lwoff, RDC 69622 Villeurbanne. ^b Current address: Leibniz Universität Hannover, Institute for Botany, Herrenhäuser Str. 2, 30419 Hannover, Germany. [©]Corresponding author: robert.blanvillain@univ-grenoble-alpes.fr.

ABSTRACT:

Chloroplast biogenesis depends on a complex transcriptional program involving coordinated expression of plastid and nuclear genes. In particular, photosynthesis associated plastid genes are expressed by the plastid-encoded polymerase (PEP) that undergoes a structural rearrangement during chloroplast formation. The prokaryotic-type core enzyme is rebuilt into a larger complex by addition of nuclear-encoded PEP-associated proteins (PAP1 to PAP12). Among the PAPs, some have been detected in the nucleus (PAP5 and PAP8) where they could serve a nuclear function required for an efficient chloroplast biogenesis. Here, we detected PAP8 in a large nuclear sub-complex that may include other subunits of the plastid-encoded RNA polymerase. We have made use of PAP8 recombinant proteins to decouple its nucleus- and chloroplast-associated functions and found hypomorphic mutants pointing at essential amino acids. While the origin of the PAP8 gene remained elusive, we have found in its sequence a micro-homologous domain located within a large structural homology with a Rhinoviral RNA-dependent RNA polymerase, highlighting potential RNA recognition motifs in PAP8. PAP8 *in vitro* RNA binding activity suggests that this domain is functional. Hence, we propose that the acquisition of PAPs may have occurred during evolution by different routes including lateral gene transfer.

Keywords: *Arabidopsis* PAP8/PTAC6; PEP/PAPs, Chloroplast, Biogenesis, RNA Recognition Motif

1. INTRODUCTION

Chloroplasts are of endosymbiotic origin and as remnant of their cyanobacterial ancestry they have retained a small but highly conserved genome. Plastid genomes are composed of nearly 120 genes encoding housekeeping and photosynthesis genes found in multiple copies of circular DNA (Sato et al., 1999). The components of the prokaryotic-type gene expression machinery such as the plastid-encoded RNA polymerase PEP, ribosomal proteins, rRNAs and tRNAs are found among the housekeeping genes (Jarvis and Lopez-Juez, 2013). Transcription of plastid genes is due to the activity of a nuclear-encoded phage-type RNA polymerase (NEP) and the prokaryotic-type multi-subunit PEP complex. The latter transcribes the vast majority of all genes with prokaryotic-type promoters containing -35 and -10 elements, supporting the metabolic functions of plastids (Puthiyaveetil et al., 2021). However, only a few plastid-encoded subunits are present in the major functional protein complexes (such as the photosystems) while most chloroplast proteins are encoded by nuclear genes and imported through the plastid envelope (reviewed in Kessler and Schnell 2009).

In the germinating seedling of angiosperms, ignition of chloroplast biogenesis requires light exposure (reviewed in Hernandez-Verdeja et al., 2020) leading to a complex morphological conversion of the organelle (reviewed in Liebers et al., 2017). At the transition from dark to light, a structural reorganization of the plastid-encoded polymerase (PEP) occurs when the catalytic core enzyme, composed of the α , β , β' , β'' subunits, is complexing with 12 nuclear-encoded proteins PAPs (PEP-associated proteins) (Steiner et al., 2011). Most of these proteins were previously described as part of the transcriptionally active chromosomes of the chloroplast (Pfalz et al., 2006). A common feature of the *PAP* genes is the albino syndrome developing in homozygous mutants that carry their respective loss-of-function alleles. These mutants are unable to produce a progeny and must be maintained through the harvesting of seeds from heterozygotes. The promoter activity of the *PAPs* is under the control of a common set of regulators with a typical profile exemplified with the *PAP8* promoter exhibiting epidermal specificity in the dark, followed by a rapid and transient peak in the mesophyll after light exposure (Liebers et al., 2018). Although the functions associated with the PAPs produced in the epidermis remain elusive, their presence can be accountable for the detection of a fully assembled PEP complex during skotomorphogenesis in *Arabidopsis* (Ji et al., 2020). On the other hand, the assembly of the PAPs to the catalytic core in the mesophyll cells exposed to light, corresponds to the strong production of PEP-

dependent transcripts. Therefore, the 12 PAPs play together an essential role in the early regulation of the PEP activity at the transition from skotomorphogenesis to photomorphogenesis.

According to their amino acid sequence and domain predictions, the PAPs have been classified into four functional groups (modeled by [Kindgren and Strand, 2015](#) and reviewed in [Pfannschmidt et al., 2015](#)): 1. PAPs related to DNA/RNA metabolism (PAP1, 2, 3, 5, 7; [Yagi et al., 2012](#); [Pfalz et al., 2006](#); [Chang et al., 2017](#); [Chen et al., 2010](#); [Galvao et al., 2012](#); [Gao et al., 2011](#); [Grübler et al., 2017](#)), 2. PAPs involved in redox-dependent regulatory processes (PAP6/FLN1, its homologous FLN2, and PAP10/TrxZ; [Arsova et al., 2010](#); [Huang et al., 2013](#)), 3. PAPs required for protection against reactive oxygen species (PAP4/FSD3 and PAP9/FSD2; [Myouga et al., 2008](#)) and 4. PAPs with yet unknown functions (PAP8/pTAC6, PAP11/MurE-like, PAP12/pTAC7; [Garcia et al., 2008](#); [Yu et al., 2013](#)). Although their molecular functions remain largely unknown, PAP8 and PAP12 could be placed between regulation and DNA/RNA metabolism of chloroplast gene transcription; in particular in the control of termination or transcriptional pausing through the binding to mitochondrial transcription termination factors (mTERFs). Indeed, PAP8/pTAC6 was found in additional recruitments at the mTERF5/MDA1-regulated transcriptional pause region of psbEFLJ ([Ding et al., 2019](#)) and as interacting protein of GUN1, a PPR protein involved in retrograde signaling ([Tadini et al., 2020](#)), while SL1/mTERF3 interacts with PAP12, PAP5, and PAP7 ([Jiang et al., 2020](#)).

We reported that PAP8 is a protein dually localized in nucleus and plastids with a nuclear pool that is potentially involved in proper timing of chloroplast biogenesis. In particular PAP8 interacts with PAP5/HMR, and is essential for phytochrome-mediated signal transduction ([Liebers et al., 2020](#)). While the presence of PAP8 only in the nucleus does not restore any aspect of the mutant albinism, mutation of its nuclear localization signal (NLS) allows greening in slow motion as if the nucleus was unable to follow on chloroplast biogenesis. To this respect, PAP8 has joined the growing crowd of dually localized proteins that may play an important role in the coordination of both nuclear and plastid gene expression ([Krause et al., 2012](#); [Krupinska et al., 2020](#)).

Here we demonstrate that PAP8 is part of a large protein complex in the nucleus. We also demonstrate that mutations in the NLS perturb more than just PAP8 localization. Should the amino acids involved in the NLS play an important role within the PEP complex, the functions of PAP8 in the nucleus and in the chloroplast may not be so easily separated. Indeed, homology searches indicate that these residues are within a conserved region that might be involved in some RNA-mediated functions that could be relevant in the nucleus and within the chloroplast PEP complex. The closest homologous sequence to PAP8 corresponds to a rhinoviral RNA-dependent RNA polymerase. We propose that PAP8 may have

appeared through lateral gene transfer during early terrestrialization of the green lineage. Such type of innovation is not rare in plants and a newly arrived viral gene may have followed the same mechanism as that responsible for the transfer of cyanobacterial genes into the nucleus setting for the protein a way back to the chloroplast.

METHODS

Accessions. TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) - *PAP8/pTAC6*: At1g21600; *PAP5/HMR/pTAC12*: At2g34640; *PAP7/pTAC14* At4g20130; *PAP12/pTAC7*: At5g24314; *PAP10/TrxZ*: At3g06730; *EF1α*: At5g60390.

Live Material and Growth Conditions. *Arabidopsis thaliana*; *pap8-1*: SALK_024431 (N524431), and Col-0: SALK_6000, Ai15 (*PAP8^{ΔCTP}*) and Ai10 (*PAP8^{NLSm5}*) described in (Liebers et al., 2020). *E. coli* DH5α strain (*lacZ-ΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1*) was used for cloning. *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 pMP90 was used for transgenesis. Rosetta™2 (DE3) (Novagen) cells were used for protein production with pAG21d (H6-*PAP8^{ΔCTP}*). Mustard seeds (*Sinapis alba*) were grown for 7 days on soil under a photoperiod of 16 h of white light / 8 h dark at 20°C in a growth chamber. Cotyledons were harvested at the end of the night to avoid starch granules, and immediately used for preparation of organelles in a cold room. *Arabidopsis* plants were grown on ½-strength MS media, sucrose 1% pH_{5.7} and 0.8% agar. Seeds were imbibed and stratified for 2 days at 4°C, before growth at 21°C for 3 days in darkness. Plants were then transferred to white light (30 μmol.m⁻².s⁻¹).

Biochemical purifications. Cotyledons (2 kg) were homogenized in ice-cold isolation buffer using a Waring blender and filtered through one layer of 56-μm-mesh nylon; detailed protocol and buffers as in Chieb et al., 2018. In short, organelles were isolated by differential centrifugation followed by Percoll step (80% / 40%) centrifugation yielding the nuclear fraction at the bottom, intact chloroplasts at the step interface, and broken chloroplasts (used for thylakoids) at the top. Chloroplast fraction was submitted to Heparin Sepharose Batch Binding, Elution, then Centricon 30 kDa giving sample “HS”. Then sample HS is subjected to Gel Filtration, Elution and Centricon 30 kDa giving sample “GF”. The thylakoid fraction is prepared from chloroplasts resuspended in homogenization buffer containing 1% n-dodecyl β-D-maltoside for solubilization of protein complexes, passed through a 10-ml glass potter, then centrifugated 16,000 g for 5 min at 4°C; the supernatant corresponds to sample “T”. Nuclear fraction 25 mL in lysis Buffer; centrifugation 750 g for 10 min; The pellet is resuspended in 10 mL Lysis, triton 0.5%, 10 min on ice plus stirring bar, then centrifugation at 750 g for 10 min. Pellet resuspended in 10 mL Lysis buffer; repeat as long as it is green. Resuspend the nuclei in equal pellet volume with Washing Buffer + Glycerol to 50% (2 mL). Nuclei sonicated with following parameters (1s/2s relapse) in 1 min cycles x 3 (3 min total). Samples are the centrifugated at 16,000 g 15 min; the supernatant corresponds to sample “N”. Nanodrop (N_{6x} protein 2 mg/mL and DNA 270 ng/μL). Loadings

for blue native gels: 50 μ L (45 μ L + 5 μ L Coomassie blue). Run 16 h at 4°C; then Coomassie blue running buffer exchanged with clear running buffer for 6 additional hours. Gels were scanned on a Chemidoc^{XRS}™ imaging system (BioRad). Gels were transferred to nylon membrane (Biorad), then block in TBS, Tween 0.1%, non-fat dry milk 5% w/v. The membrane was probed in TBS Tween 0.1%, with the primary antibody against PAP8 (Liebers et al. 2020); secondary antibody, Goat anti-Rabbit conjugated with a Horse Radish Peroxidase was used at a dilution of 1/5,000. At each step, membranes were washed (5 times, 5 min in a TBS-Tween 0.1%); Signal was detected using a chemiluminescent substrate (Biorad, ECL kit).

Cloning. Minipreps were performed using Qiagen kits and DNA in-gel purification using GeneClean III kit (MPBio). All cloning PCR were done using Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) or derivatives of pART27 (Blanvillain et al., 2011). pBB61: Alligator fragment PCR-amplified using opAt2S3_FSbflI, cctgcagggaaaccaattaacatagggt oGFPKDEL_RBstB, ttcgaaTTACAGCTCGTCCTTGTACAGC on pFP100 (gift of the Parcy Lab) removal of NcoI by point mutagenesis using oAliNlessF, ccatttacgaacgatagtcATGGTGAAGACTAATC and oAliNlessR, GATTAGTCTTCACCATgactatcgttcgtaaatgg. Alligator fragment clone *SbfI*, *BstBI* in pAi16 *SbfI*/*BstBI* (Liebers et al., 2020).

Transformation. Electro-competent *Agrobacterium* were transformed with binary plasmids containing our transgenes (see Appendix Table S1) selected on antibiotics Gentamycin, Rifampicin, and Spectinomycin for the plasmid carrying the transgene. Strains were then used for floral dip infiltration of the significant genotypes (Medium: 2.2 g MS salts, 1 mL Gamborg's 1000x B5 vitamins, 0.5% sucrose, 44 nM benzyl amino purine, 300 μ L/L Silwet L-77). *pap8-1* was used as the progeny of a heterozygous plant; transgenic plants were then selected to carry the segregating mutant allele *pap8-1*, yielding albino plants in the progeny and to carry the selection marker using the corresponding antibiotic or the GFP signal in mature seeds when using the "alligator" system (Bensmihen et al., 2004).

Transgenics characterization. gDNA preparation: leaf tissues were ground in 1.5-mL reaction tubes, then homogenized in 400 μ L of EB buffer (200 mM Tris HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS). After 5 minutes at 10 000 g, 400 μ L of supernatant was added to 400 μ L isopropanol. After 10 minutes at 10 000 g, the pellet was washed with 750 μ L of EtOH 80% and then dried. DNA was then suspended in 50 μ L of water. The PCR was done with indicated primers. PAP8 (op8_rtp_F + op8i2_R) pap8-1 (oPAP8_rtp_F + oLBb1.3) BB647 transgene (op8F257S + oP8E3_R) HPTII (ohpt1 et ohpt2). oPAP8_rtp_F, tgggtggtgatggagatatcg; oPAP8_rtp_R, ttgagacactgaagtctcg; op8i2_R, aaggaagtctcagaacaacgc; oLBb1.3, attttgccgatttcggaac; oP8E3_R, tagtcactcattgcacatcg; EF1 α : F, caggctgattgtgctgttcttatcat; R, cttgtagacatcctaagtgaaga. oHPT1, ttcgatgtaggagggcgctgg; oHPT2, ggtcaagaccaatgctggagc.

Statistical analysis. Percentages were compared using ϵ -test; statistical values were confronted to the table of normal distribution (Fisher Yates: Statistical tables for biological, agricultural, and medical research (Oliver and Boyd, Edinburgh)) with α set to 0.05 or to retrieve p-values.

Gene expression and protein sub-cellular localization. Transient expression in onion cells (bulb sliced to ~16 cm²) was conducted using the Biolistic PDS 1000/He Particle Delivery System (Biorad) (1100 psi, 10 cm traveling distance) with DNA onto 1 µm gold particles (Seashell Technology™) following instructions. After 16 to 40 h in the dark at 24°C, the epidermis was peeled and observed by fluorescence microscopy with a Nikon *AxioScope* equipped with FITC filters and an *AxioCam MRc* camera. Pictures acquired with the Nikon's *Zen* software. Confocal microscopy was performed on a Leica *TCS SP2* or a Zeiss *LSM800*. Protein localization of stably transformed plants was examined on cotyledons or hypocotyls.

rEMSA. Polyacrylamide gel 5%: Acrylamide/Bisacrylamide (29:1) 40%, TBE 1X, APS 10%, Temed 1%. Running buffer: TBE 10X: Tris Base, Boric Acid, EDTA pH 8. Binding Mix: rdr32 (probe) 100 nM, Buffer first-strand 5X, tRNA (0.2 mg/mL), DTT 1 mM, Glycerol 2%, RNasin (10 U/µL), PAP8 (from 0 to 8 µM). Polyacrylamide gel is polymerized with APS and Temed at room temperature. Wells were washed with a syringe filled with running buffer. Pre-run a t 4°C in running buffer for 1 hour at 90 volts. Meanwhile, the binding mix is prepared on ice. The probe is denatured using heat (95°C for 30 seconds) and then directly stored on ice to keep it single stranded (with a size equivalent the hairpin). The run takes about 75 minutes, at 90 volts, before in-gel cy5 detection using Amershan™ *imageQuant*.

Protein production. Rosetta2 cells were grown overnight in 50 mL LB with 100 µg/mL of carbenicillin and 34 µg/mL of chloramphenicol at 37°C. 1 L of LB + antibiotics was then inoculated and cultivated at 37°C to 0.1 OD₆₀₀. At 0.6 OD₆₀₀, the temperature was decreased to 16°C and 0.5 mM of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside was added. After an overnight induction, cells were harvested by centrifugation at 5,500 g, for 25 min, at 4°C. The cell pellet was resuspended and sonicated in 30 mL of lysis buffer: 50 mM Tris HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol, 20 mM imidazole pH 8.0 with a *Complete™* Protease inhibitor Cocktail tablet (Roche). The lysate was centrifuged at 15,000 g, for 40 min, at 4°C. The purification was performed at 20°C. After filtration, the supernatant was applied onto a NiNTA column in 50 mM Tris HCl, pH 8, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole pH 8. After elution, PAP8 was loaded on a Superdex 200 10/30 and eluted with 10 mM Tris HCl pH 8, 50 mM NaCl, 5 mM DTT.

RESULTS

1. PAP8 IS FOUND IN A NUCLEAR COMPLEX DURING PHOTOMORPHOGENESIS.

The detection of PAP8 in the nucleus and its ability to interact with PAP5 (Liebers et al., 2020) prompted the question of a possible PAP8-containing larger functional complex in the nucleus. Therefore, a large-scale organellar isolation was performed from 7-day-old cotyledons of *Sinapis alba* followed by a blue native separation of protein complexes (BN-PAGE, Figure 1A-E).

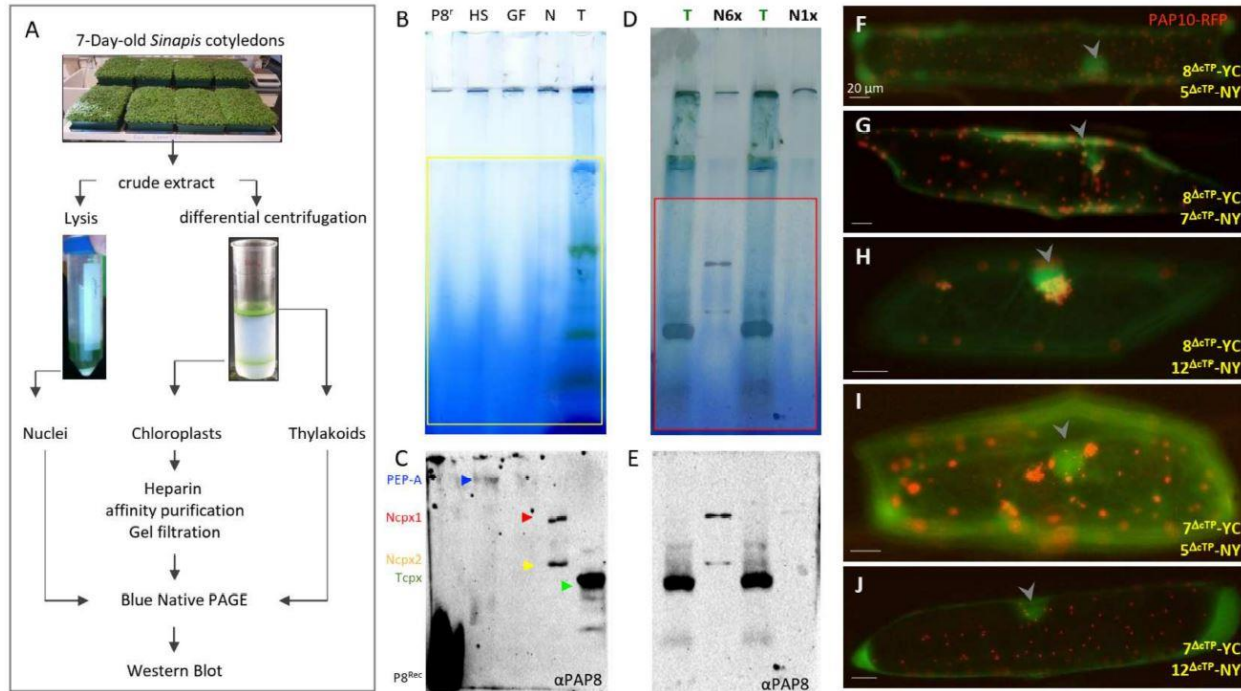


Figure 1. PAP8 is detected within a nuclear sub complex.

A : Organelle fractionation, purification scheme and sample processing; **b**, broken CP; **l**, intact CP and **n**, nuclei. BN PAGE, Blue native polyacrylamide gel electrophoresis. **B**, **D** : BN PAGE and corresponding western blot analyses in **C** and **E** using the PAP8 antibody. **P8r**, recombinant PAP8 protein purified from *E. coli*; **HS** Heparin Sepharose fraction of the iCP sample; **GF**, Gel filtration sample following **HS**; **N**, **N6x** and **N1x** different loading of the sonicated and soluble nuclear fraction see Methods. **T**, Thylakoid fraction from broken CP. **C** arrowheads blue for PEP-A red for the Ncp1 (large nuclear complex) yellow Ncp2 (smaller complex) green for the Thylakoid PAP8-containing complex and α PAP8 for the primary anti-PAP8 antibody. **F-J** : Bimolecular fluorescence complementation tests using in combination $PAP8^{\Delta CTP_YC}$ ($8^{\Delta CTP_YC}$) with $PAP5^{\Delta CTP_NY}$ ($5^{\Delta CTP_NY}$) in **F**; $8^{\Delta CTP_YC}$ with $PAP7^{\Delta CTP_NY}$ ($7^{\Delta CTP_NY}$) in **G**; $8^{\Delta CTP_YC}$ with $PAP12^{\Delta CTP_NY}$ ($12^{\Delta CTP_NY}$) in **H**; $7^{\Delta CTP_YC}$ $5^{\Delta CTP_NY}$ in **I** and $7^{\Delta CTP_YC}$ with ($12^{\Delta CTP_NY}$) in **J**; **PAP10-RFP** was used as internal positive control for transfection. Arrowheads indicate nuclei. transgenes expressed under CaMV35S promoter (See Liebers et al. 2020 for published control experiments in Fig. S6). Scale bars equal 20 μ m

PAP8 is detected in the Heparin-Sepharose chloroplastic PEP purified samples as shown in previous studies (Steiner et al., 2011), but also in two discrete complexes from the nuclear protein fraction at a lower molecular weight from that of the known 1-MDa PEP complex. The lower nuclear complex (Ncp2) may represent a subgroup of proteins that are present in the higher nuclear complex (Ncp1) as the abundance ratio of the two complexes can differ according to different preparations (Figure 1E). Interestingly the thylakoid fraction obtained from broken chloroplasts was used as a migration marker and revealed the presence of a small, but prominent PAP8-containing complex (Tcpx, Figure 1C, E). This thylakoid complex may represent a subpopulation of PAP8 that participates in the anchoring of the nucleoid to the photosynthetic membranes as reviewed by (Powikrowska et al., 2014). PAP8, being

associated with proteins from the larger TAC complex may form stable interactions with those tightly anchored to the photosynthetic membranes as it is predicted for pTAC16 (Ingelsson and Verner, 2012).

The detection of fairly large PAP8-containing nuclear complexes raised the question of their protein composition. Since we have identified several PAPs with predicted NLS (Pfannschmidt et al., 2015); and we recently described the interaction between PAP8 and PAP5/HMR (Liebers et al., 2020); other PAPs with NLS were tested as potential interactors in the nucleus using bi-molecular fluorescent complementation in onion epidermal cells (BiFC, Figure 1F-J). In transient assays using GFP translational fusions, PAP8 and PAP5/HMR showed weaker nuclear signal than plastid accumulation prompting us to use a Δ cTP version of the GFP fusion to increase nuclear pools. PAP8 gave a fluorescent signal with PAP5, PAP7 and PAP12 (Figure 1F-H) and PAP7 gave a fluorescent signal with PAP5 and PAP12 (Figure 1I, J). Therefore, some proteins from the PEP complex interact together in the nucleus, likely using similar interaction domains, without excluding that these nuclear complexes may also contain unknown partners.

2. PAP8 FUNCTIONAL FUSIONS

To follow the dually-localized PAP8, PAP8-GFP C-terminal translational fusions were cloned but failed to complement the *pap8-1* mutant (Liebers et al., 2020). Here, a second strategy consisted in inserting the GFP between the essential cTP and the sequence of the processed PAP8 protein (cTP8-GFP-PAP8 ^{Δ cTP}, Figure 2A). A new *targetP* search (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP>) on the recombinant protein predicted a chloroplast transit peptide with a likelihood of 0.9941 and a processing site (PS) at position 54-55 (VVK-VD) confirming that the translational fusion did not alter its predicted localization. However, the novel algorithm consistently shortens the cTP by 5 amino acids as compared to the obsolete *ChloroP* algorithm (PS at position 59-60 VDDVD-AD) previously used for the cloning designs (Liebers et al., 2020).

Functional complementation was tested with such GFP fusion under the control of the 1kb-PAP8 promoter sequence (pP8) in the *pap8-1* mutant. The double heterozygous PCR-screened primary transformants (Figure 2B) were tested for the ratio of albino phenotypes in single progenies (Figure 2C). Four tested lines (Z, γ , η , R) gave a ratio not significantly different from 1/16 albino phenotypes corresponding to the genotypic class of homozygous for *pap8-1* and azygous for the transgene "*pap8-1/pap8-1; tg/tg*" (Figure 2D, E). Hence, the recombinant transgene (genotypes "*pap8-1/pap8-1; tg/-*": that correspond to 3/16 of the F2 progeny) restores most of the PAP8 function in the *pap8-1* mutant. A minor defect corresponding to a pale green phenotype in the center of the rosette occurred, which did not affect the life cycle of the

plant or the production of seeds. The expression of the translational fusion GFP-PAP8 gave rise to similar fluorescent patterns as that of PAP8-GFP (Liebers et al., 2020). Under the viral promoter 35S, GFP was detected in the nucleoplasm and in plastids of transiently transformed onion cells (Figure 1F-I); whereas using the PAP8 promoter *in planta*, GFP was mainly detected in etioplast early after light exposure (Figure 2J).

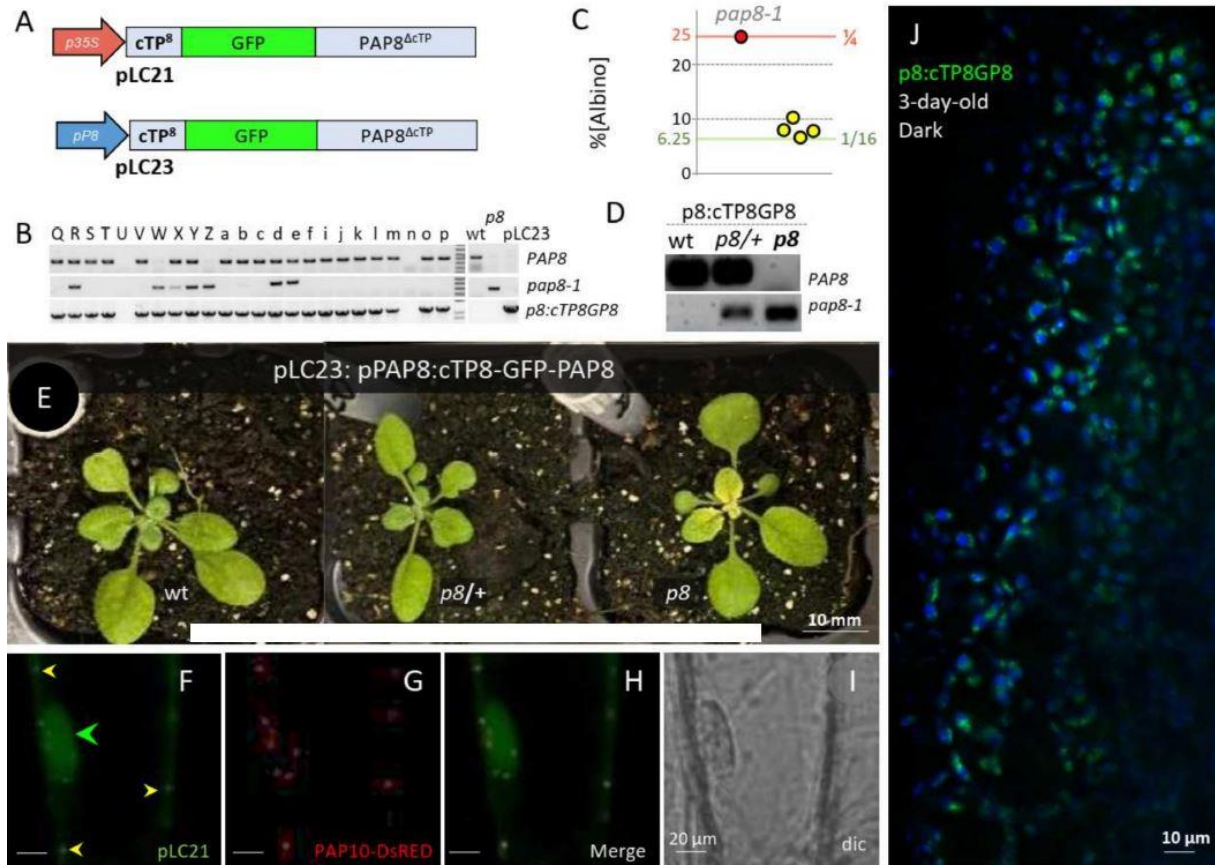


Figure 2. A PAP8 N-terminal translational fusion is functional.

A: Structure of the recombinant DNA for the production of GFP translational fusions p35S, CaMV35S promoter; pP8, 1-kb PAP8 promoter; cTP8, predicted chloroplast transit peptide from PAP8. **B:** Sample DNA gels for the PCR-based genotyping of the primary transformants (T1) according to (Liebers et al. 2020); wild type PAP8 allele, (*op8_rtp_F* + *op8i2R*); mutant allele *pap8-1*, (*op8_rtp_F* + *oLBb1.3*) and transgene *p8:cTP8GP8*, (*oGFP_Fmfe* + *oP8E3_R*). Wt, wild-type; *p8*, *pap8-1* genomic DNA and pLC23, plasmid DNA containing the transgene. The doubly heterozygous plants have all three bands. **C:** Dot plot of the percentage of albinos obtained in the segregating offspring from the doubly heterozygous plants as independent T1 (yellow spots). Functional complementation corresponds to a ratio of 1/16 (6,25%). ϵ -test, $\alpha=0.05$; Fisher Yates: the 4 tested lines Z, γ , η , R in yellow circles gave a ratio not significantly different from 1/16, $n_{[albino]}/N_{total}$: 27/353; 44/706; 22/284; 28/352 respectively ($\epsilon_Z=0.989$; $\epsilon_\gamma=0.019$; $\epsilon_\eta=0.943$; $\epsilon_R=1.181$; all $\epsilon < \mathcal{U}_{5\%}=1.96$). **D:** Single T2 plant genotyping, primers as in B; all plants positive for the transgene (*p8:cTP8GP8*, *pPAP8:cTP8-GFP-PAP8*), the status is given for the PAP8 locus as follow: wt, PAP8, PAP8, *p8/+*, PAP8/*pap8-1* and *p8*, *pap8-1/pap8-1*. **E:** three-week-old plants corresponding to representative genotypes given in D. **F-I:** Transiently expressed pLC21 (*p35S::cTP8-GFP-PAP8 Δ cTP*) in onion epidermal cells; dual localization in the nucleus (green arrowhead) and in plastids (yellow arrowheads); PAP10-RFP was used as internal positive control for transfection. **J** Confocal imaging on *Arabidopsis* cotyledons stably expressing *p8::cTP8-GFP-PAP8 Δ cTP* during skotomorphogenesis; the picture is a merge of two channels: GFP in green: protochlorophyllide in blue.

These results highlight that translational fusions on both sides of PAP8 gave a proper folding attested by the stability and localization of the fusion protein while only the cTP8-GFP-PAP8 retained the full molecular function. Harmlessness of GFP at the N-terminus contrasts with the deleterious effect of GFP imposing a steric hindrance at the C-terminus to the point of a total loss of functionality. We suspect a crucial physical interaction may take place at this site likely involving the conserved W³²⁷F³²⁸ amino acids. On the other hand, the cTP8-GFP-PAP8 provides a functional framework allowing for other interesting tags or domains to be fused to PAP8.

3. UNCOUPLING LOCALIZATION AND FUNCTION OF PAP8.

To separate the nuclear and the plastid pools of PAP8, two recombinant genes have been cloned: a construction with a deletion of the predicted chloroplast transit peptide (Δ cTP) and a construction carrying a mutated nuclear localization signal replacing the five positively charged lysine and arginine residues by glycine (NLS^{m5}) (Figure 3; Liebers et al., 2020). Since none of these two variants could complement the *pap8-1* phenotype, a strategy consisting in reuniting both variants in the same *pap8-1* plant was developed along with a tester clone (BB647), where the NLS sequence of PAP8 was re-introduced in the permissive context (see LC23) behind the cleavage site of the NLS^{m5} variant (Figure 3).

Despite the presence of both variants (Figure 3B) in the double hemi-complementation test (dhc), doubly heterozygous plants (*pap8-1/+; tg^{bb612}/-*; *tg^{Ai10}/tg^{Ai10}*) generated 1/4 of the delayed greening phenotype (Figure 3C) that did not show any improved greening compared to the NLS^{m5} line (Figure 3D). It was therefore concluded that either the PAP8 molecule needs to go through the plastid to be functional or that the mutations of the “NLS” produced a hypomorphic allele that has lost part of the molecular function required for full activity in plastids. To discriminate between these hypotheses, the BB647 clone (Figure 3A) was tested in functional complementation yielding similar results as the dhc line. The doubly heterozygous plants (*pap8-1/+; tg^{bb647}/-*) produced a progeny of 1/4 seedling with a delayed greening (Figure 3C) that was stronger than that of NLS^{m5} (Figure 3E). Therefore, the mutations in NLS^{m5} do not solely alter the nuclear localization signal; they have a stronger impact instead. Hence, the nuclear localization and the molecular function are very likely entangled within the same stretch of functional amino acids; rendering it difficult to alter one without modifying the other.

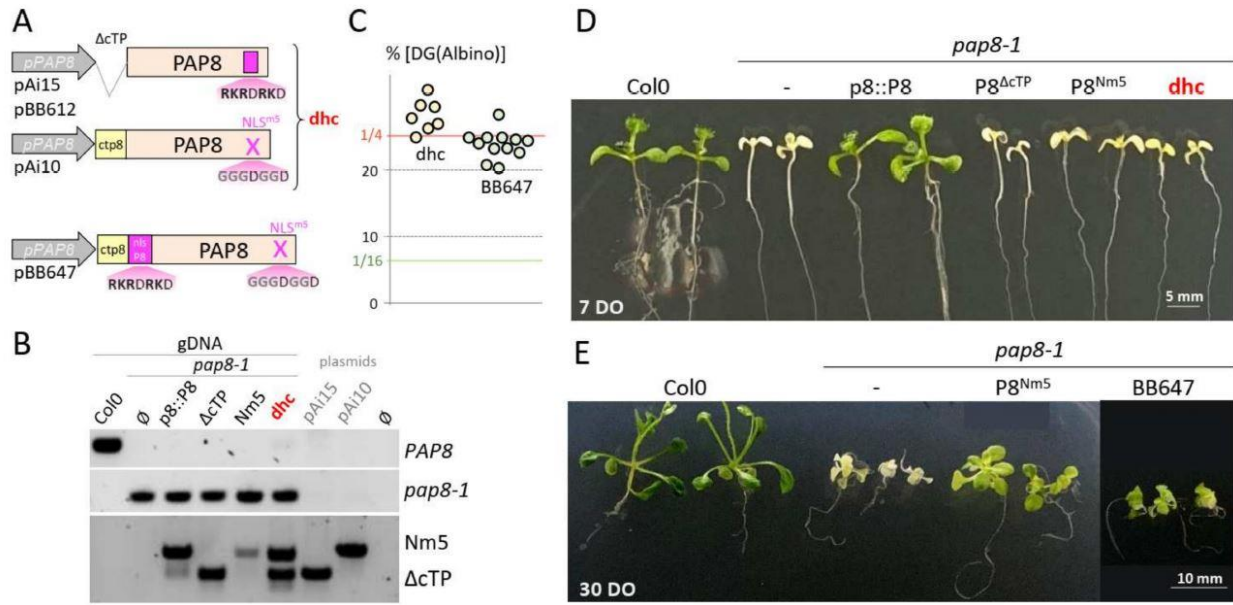


Figure 3. The region with the predicted NLS provides functions in addition to the nuclear localization signal.

A: Schematic illustration of the different PAP8 recombinant genes. cTP, chloroplast transit peptide; NLS, nuclear localization signal; m5, five substitutions leading to amino acid changes of K and R in G; dhc, double hemi-complementation test. **B:** PCR-based genotyping. Illustration of the selection of doubly heterozygous T1 plants (*pap8-1/+; pLC23/-*) samples #R, #Y, #d, #e; doubtful samples such as #X are evicted. **C:** Dot plot of the percentage of the delayed greening phenotype obtained in the segregating offspring from the doubly heterozygous plants from dhc (light orange dots) or independent T1 for BB647 (light green dots). A ratio of 1/4 (25%) corresponds to absence of genetic interaction between the transgene and the *pap8-1* allele: no complementation. (ϵ -test, $\alpha=0.05$; Fisher Yates) dhc #04: 44/148($\epsilon=1.26$); #19: 115/543($\epsilon=2.179$); #22: 63/234($\epsilon=0.663$); #33: 83/292($\epsilon=1.297$); #36: 44/149($\epsilon=1.212$); #40: 15/47($\epsilon=1.017$); #46: 98/373($\epsilon=0.558$) sum of all is 462 [Albino] over 1324 [WT] $\epsilon_{\text{somme}}=0.838 < \mathcal{U}_{5\%}=1.96$. BB647 #Na: 79/279($\epsilon=1.229$); #Za: 91/365($\epsilon=0.03$); #Ka: 53/235($\epsilon=0.897$); #Ab: 91/366($\epsilon=0.06$); #Ec: 73/314($\epsilon=0.734$); #Lb: 84/340($\epsilon=0.125$); #Ob: 65/279($\epsilon=0.672$); #Ub: 43/212($\epsilon=1.708$); #Vb: 55/229($\epsilon=0.348$); #Gc: 56/269($\epsilon=1.689$); #41: 65/266($\epsilon=0.214$); Sum: 755/3154($\epsilon_{\text{somme}}=1.397 < \mathcal{U}_{5\%}=1.96$). **D E:** 7-day-old (7 DO) or 30-day-old (30 DO) phenotype of the given genotypes.

In order to challenge these results with an independent cloning strategy as well as providing additional tools to study the PAP8 function, a recombinant PAP8 NLS^{m5} has been fused to the cTP of PAP4, the GFP and the monopartite NLS of SV40 (Figure 4A). Again, the doubly heterozygous plants (*pap8-1/+; tg^{LC16}/-*) produced ¼ of albino seeds showing no interaction of the transgene with the phenotype of *pap8-1* (Figure 4B, C); the expression of the transgene LC16, tested with the production of fluorescence (Figure 4F), did not allow the greening of *pap8-1* (Figure 4C). Using the viral promoter 35S, transiently transformed onion cells displayed strong GFP fluorescence in the nucleus with residual amounts in plastids only detectable when the signal was saturated in the nucleus (Figure 4D, E). In stably transformed plants using the promoter of PAP8 (Figure 4F), a strong nuclear signal was observed in the epidermal cells of the cotyledon while only some weak signal was detected in the etioplast early after skotomorphogenesis.

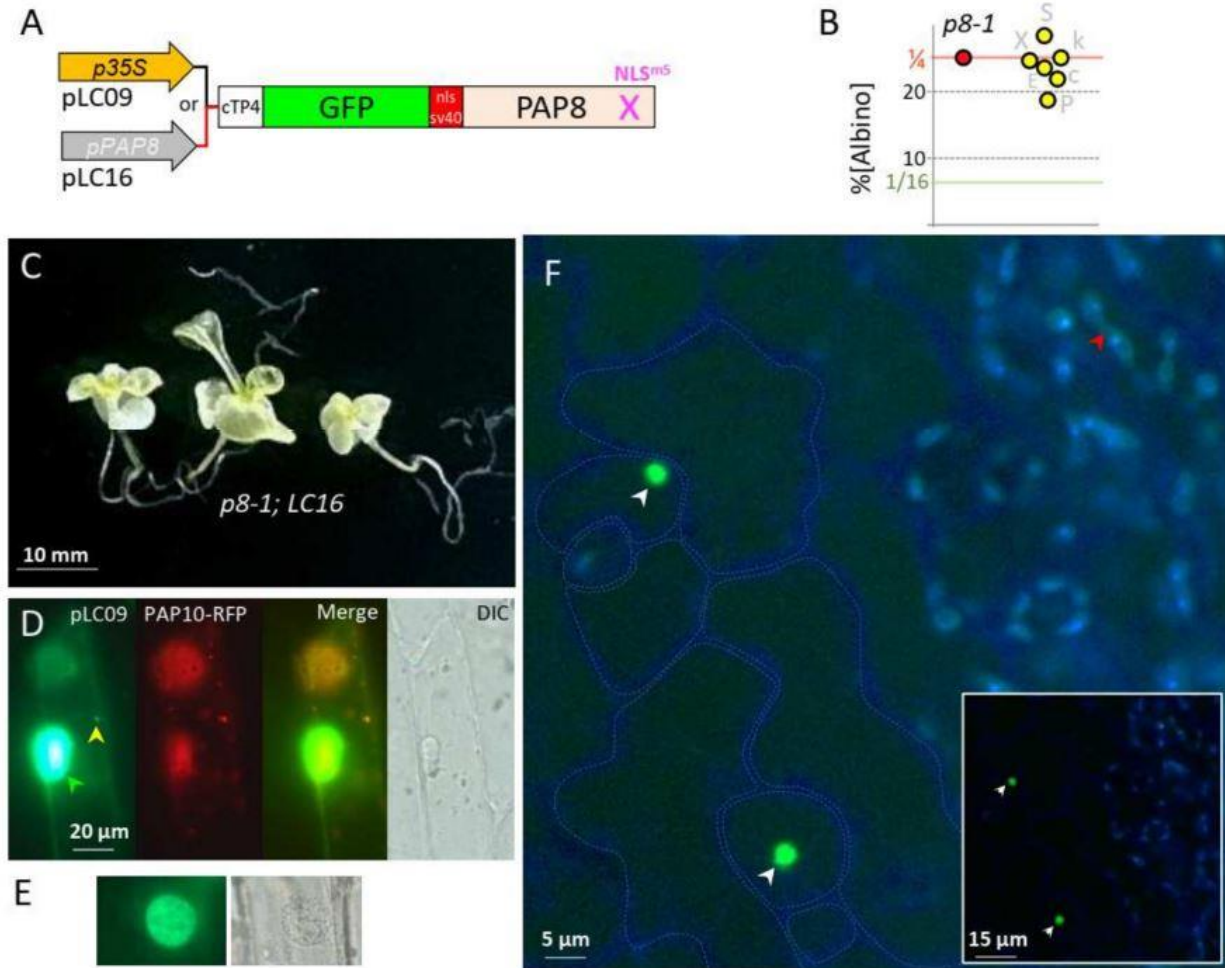


Figure 4. SV40 NLS fused to PAP8 provides a robust nuclear epidermal marker.

A: Schematic illustration of the PAP8 recombinant gene: cTP4-GFP-NLS^{SV40}-PAP8^{NLS^{SV40}}; cTP4 corresponds to the chloroplast transit peptide of PAP4 and NLS^{SV40}, the NLS from the simian virus 40 (SV40). The transgene is either under the control of CaMV35S promoter in pLC09, or the PAP8 promoter in pLC16. **B**: Dot plot of the percentage of albinos obtained in the segregating offspring from the doubly heterozygous independent T1 for LC16 (yellow dots). A ratio of 1/4 (25%) corresponds to absence of genetic interaction between LC16 and the pap8-1 allele: no complementation. LC16 #E: 137/566($\epsilon=0.441$); #X: 201/790($\epsilon=0.285$); #P: 118/616($\epsilon=3.685$); #k: 138/536($\epsilon=0.395$); #S: 199/682($\epsilon=2.4$); #c: 152/667($\epsilon=1.361$); Sum: 945/3857($\epsilon_{\text{somme}}=0.720 < \mathcal{U}_{5\%}=1.96$). **C**: 30-day-old phenotype of the genotype pap8-1, pap8-1; LC16. **D**: Transiently expressed pLC09 (p35S::cTP8-GFP-PAP8 ^{Δ CTP}) in onion epidermal cells; dual localization in the nucleus (green arrowhead) and in plastids (yellow arrowheads); PAP10-RFP was used as internal positive control for transfection. DIC, differential interference contrast image. **E**: non-saturated image of a nucleus and its corresponding DIC image. **F**: Confocal imaging on Arabidopsis cotyledons stably expressing pP8::cTP4-GFP-NLS^{SV40}-PAP8 ^{Δ CTP} during skotomorphogenesis; the picture is a merge of two channels: GFP in green: protochlorophyllide in blue; the blue channel has been electronically saturated to draw the cell contours in the epidermal layer; inset is the original image. White arrows show nuclei; the red arrow show reduced GFP signal.

This pattern is in agreement with previously published work on the epidermal specificity of the PAP8 promoter during dark growth (Liebers et al., 2018). In absence of the strong NLS from SV40, the protein pool of PAP8 is much weaker in the nucleus according to a dilution effect due to its distribution in all the

small plastids from the epidermal cell. Independently restoring the capacity of the protein to go into the nucleus with the addition of a strong NLS, overcoming the activity due to the cTP, indicates that there is a competition between the localization signatures present within the protein sequence. The absence of greening of *pap8-1* carrying such a recombinant protein further indicates that the mutations on the native NLS sequence of PAP8 alter more than its capacity to travel in the nucleus.

4. PAP8 MICRO-HOMOLOGY TO RDR6 REVEALS RNA BINDING MOTIFS IN PAP8

Classical blastP searches on PAP8 did not reveal any protein carrying similar domains other than PAP8 orthologs. However, other similarity searches on smaller parts of PAP8 allowed the discovery of a microhomology with the Rhinoviral RNA-dependent RNA polymerase RDR6, (Figure 5: μ , underlined sequence; Supplementary Figure 1).

The homology was extended using the structural homology searching program T-coffee-Expresso. The homologous regions were then mapped on the three-dimensional structure of RDR6 some of which being in close contact with the double stranded RNA molecule that was used to stabilize RDR6 (Figure 5B, Gong et al., 2013). This prompted an experiment of RNA electromobility shift assay (rEMSA) using PAP8 with the same RNA probe *rdr32* that is able to form very stable hairpins according to the *RNAfold* web server (Figure 5C). The electromobility of the free probe was changed by the addition of recombinant PAP8 (Figure 5D, Supplementary Figure 2A). The binding of PAP8 to *rdr32* though, could be out-competed by the addition of tRNAs. The shifted *rdr32* migrated approximately at the position where PAP8 was detected by western blot in such native gels (Supplementary Figure 2B). Although the *rdr32* probe is unrelated to the functional context of PAP8, the recombinant protein exhibited a marked RNA binding activity. This activity is likely not sequence specific (based on the effects of the competitors), but still supports the results from the structure prediction pointing to a function in RNA interaction. Additionally, PAP8 had an effect on the topology of the probe that was shifted from hairpins to dimers no matter whether it was boiled or not. This suggests that some unfolded regions of PAP8, as detected by NMR studies (Liebers et al., 2020) may open hairpins allowing inter-molecular interactions or topology modifications. Interestingly, the structural homology region between RDR6 and PAP8 partially includes the predicted NLS. Beside the control of PAP8 localization, this domain may hold an additional molecular function

associated with RNA. Then altering the NLS may also have affected this other function, producing the hypomorphic effect observed in the complementation tests.

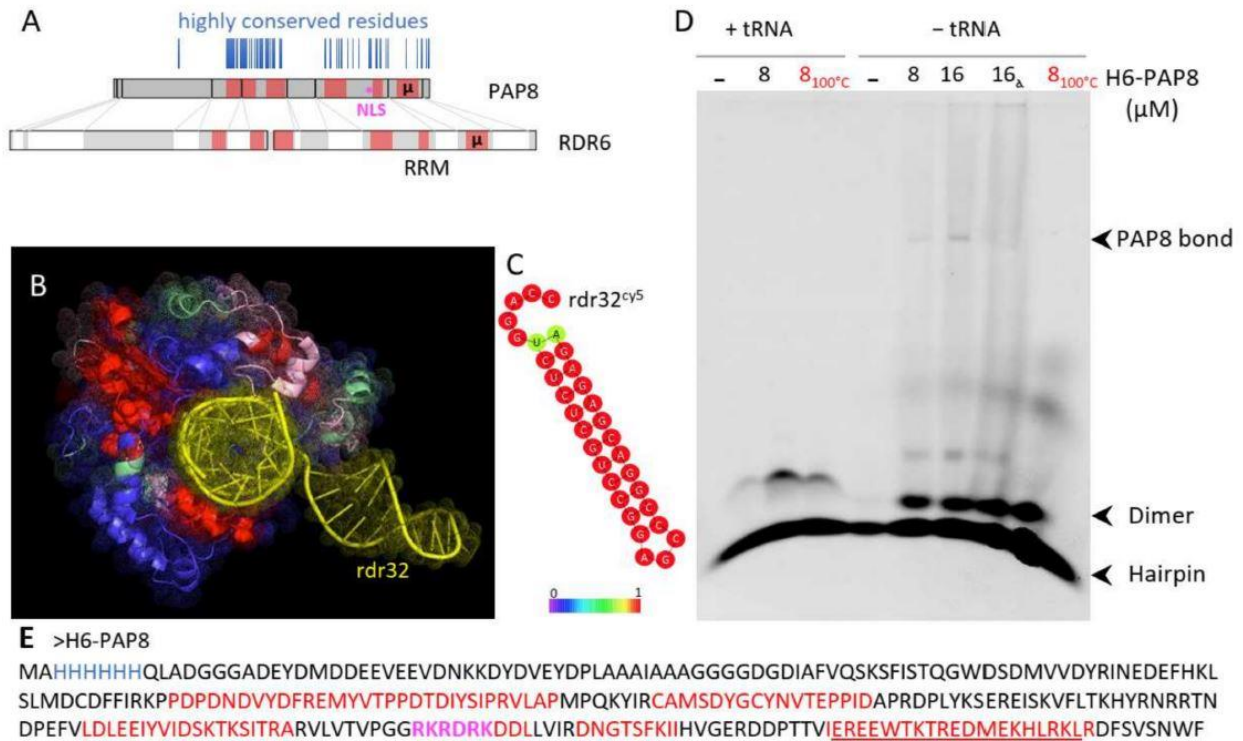


Figure 5: PAP8 micro-homology to RDR6 reveals RNA binding domains.

A: Domain mapping on the amino acid sequence of PAP8 according to the structural homology comparison with RDR6 (pdb:4K50) using T-coffee expresso. Highly conserved residues in the PAP8 orthologous family of proteins are represented as vertical blue lines; μ, amino-acid micro-homology between PAP8 and RDR6; RRM, RNA Recognition Motifs in RDR6. **B**: amino-acid painting of the three-dimensional fold of RDR6 according to the homology with PAP8: red, good; pink, average; green, bad; blue, absent in PAP8 and yellow, double stranded RNA sequence named *rdr32* hereafter. **C**: RNAfold server prediction for the topology of *rdr32* RNA sequence used as a *cy5*-marked probe. **D**: RNA electrophoretic mobility shift assay rEMSA using *rdr32^{cy5}* as RNA probe and H6-PAP8 produced in *E. coli*; 8_{100°C}, boiled PAP8 protein prior to setting the interaction assay with the probe; 16_α, 16 μM of PAP8 + PAP8 antibody (5% of 10 000x). H6-PAP8 amino acid sequence; histidine tag in blue; homology regions with RDR6 in red; micro-homology underlined and NLS in magenta.

DISCUSSION

The dual targeting of PAPs as demonstrated for PAP5 (Nevarez et al., 2017) and PAP8 (Liebers et al., 2020) as well as other proteins such as NCP (Yang et al., 2019) and RCB (Yoo et al., 2019) is apparently essential for chloroplast biogenesis. All of these proteins are linked both to the chloroplast transcriptional

apparatus and to the phytochrome signaling pathway. For example, PAP5/HMR is able to interact with the Phytochrome Interacting Factors PIF1 and PIF3 on a chromatin structure (Qiu et al., 2015). The PAP8-containing nuclear complexes and the possible interaction of the PAPs, as observed here with BiFC (Figure 1), suggest that the function of these proteins depend on their ability to interact with their partners in both the nucleus and chloroplasts. These dually-localized complexes may control gene expression at the chromatin level in the nucleus and in the nucleoids of chloroplasts. Hence, it is possible that PAP8 and other PAPs have been evolutionarily transferred into the chloroplast as a functional module mirroring a refined control of gene expression in plastid. In this context, PAP8-containing complexes may provide anterograde control from the nucleus building the photosynthetic apparatus and matching the plastid type to cell identity. Future work will consist in deciphering the composition of such nuclear complexes.

The presence of PAP8 in different compartments triggers questions of functionality. Does PAP8 play the same molecular function whether it is in the nucleus or in the chloroplast and are these compartmentalized functions dependent on each other. The uncoupling of these functions by using two distinct carriers (Δ cTP and NLS^{m5}) simultaneously would have provided a definitive proof only if they were totally independent. Instead, the phenotypic analysis revealed that the uncoupled nuclear function carried by Δ cTP does not provide any benefit to a plant carrying the NLS^{m5} recombinant gene. This suggests that the nuclear function of PAP8 is entirely masked by the inability of PAP8 to properly work during chloroplast biogenesis. In that context, it would be of interest to test whether uncoupling the genomes, in a *gun1* mutant background for example, would affect the phenotypes of plants carrying NLS^{m5} alone or in combination with Δ cTP. The recombinant gene BB647 (cTP8-N8-NLS^{m5}) is even a stronger hypomorphic allele since the 5-amino-acid substitution can potentially affect both nuclear and plastid functions. Future work could test other dually localized PAPs for which the NLS removal does not affect the molecular function of the protein.

The structural homology of PAP8 with the RNA Recognition Motifs of the Rhinoviral RNA dependent RNA polymerase is probably more informative about its function than about its origin. The possibility for the C-terminal end of PAP8 to visit the large groove of double-stranded nucleic acid, such as what is observed with RDR6, strengthens the hypothesis of the GFP steric hindrance in PAP8 function when fused to the C-terminus. One can speculate that PAP8 could handle RNA at the exit from the PEP catalytic core, changing its topology for efficient loading of the ribosome. This function is compatible with the finding of PAP8/pTAC6 at the *psbEFLJ* operon with a negative impact on pausing effect of mTERF5 (Ding et al., 2019).

Rough homology analyses done on several PAP genes indicate that most PAPs, if not all when considering their ability to get in the chloroplast with a cTP acquisition, appeared in the same window of time during evolution (Favier et al., 2021; Liebers et al., 2020). The common ancestor of mosses in the green lineage is surely one of the first taxon that displays every single component of the PEP associated complex including PAP8. It is then possible to speculate that, even in absence of Rhinoviruses in their present form, a viral gene transfer occurred during the period of terrestrialization preceding the great diversification of plant organs (De Vries et al., 2016). In the meantime, PAP8 and other PAPs could have acquired a cTP following the same mechanism that permitted to the massive cyanobacterial gene transfer their signaling towards the chloroplast (Bock and Timmis, 2008). It remains mysterious whether a nuclear function pre-existed the plastid one and how it was maintained throughout evolution if not to offer a potent toolkit to coordinate the expression of both plastid and nuclear genomes.

This study includes no data deposited in external repositories.

Acknowledgments

We acknowledge the platforms of the Grenoble Instruct-ERIC centre (ISBG; UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). This project received help from *MuLife* imaging facility; platform access was supported by FRISBI (ANR-10-INBS-05-02) and GRAL, a project of the University Grenoble Alpes graduate school (“Ecoles Universitaires de Recherche”) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003). IBS acknowledges integration into the Interdisciplinary Research Institute of Grenoble (IRIG, CEA). The work was supported by the *Agence Nationale de la Recherche* (grant ANR-17-CE11-0031-02). The project received further support by institutional grants to the *Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale* by Labex Grenoble Alliance of Integrated Structural Biology (GRAL) and ANR-17-EURE-0003. We thank Andres Guerrero-Criado, Suzanne Coveley, Rémi Toutain, Fanny-Laure Thomassin and Ludovic Mayran for help with cloning and BiFC; Fabien Chevalier for help with the BN-PAGE protocole. Sara-Paola Nastasi for help with the rEMSA experiments; Christel Carles for critical reading of the manuscript.

Author contributions. RB, DC, TP designed research. LC, FXG, MC, DC, RB, performed research. DC, TP, RB analyzed data. RB wrote the paper with contributions from LC, DC and TP. All authors approved the paper.

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE

LA FORMATION DE PHOTOCORPS TARDIFS DANS LE NOYAU DEPEND DE L'ASSEMBLAGE DU COMPLEXE PEP-PAP

Le NLS de PAP8 pourrait donc être important pour les fonctions de la protéine dans le noyau, mais on ne sait pas si cela concerne spécifiquement la maturation des photocorps. Pour le tester, nous introduisons la version constitutive et étiquetée de PhyB 35S::PhyB-GFP (PBG) dans le fond génétique *pap8-1* exprimant PAP8^{NLSm5} [DG] et en étudier le phénotype. On regardera notamment la formation des photocorps ainsi que le dé-étiolement de l'hypocotyle sous faible intensité lumineuse, intense dans le fond sauvage et très modérée dans le fond *pap8-1* (Liebers et al. 2020).

Il était stratégiquement plus favorable de transformer le fond mutant hétérozygote *pap8-1/+*, dont le développement n'est pas altéré, puis de sélectionner les différents génotypes en T1 et en T2. Les transformants primaires sont d'abord sélectionnés sur le critère de fluorescence de l'hypocotyle résultant de l'expression de PBG, puis parmi celles-ci les plantes ayant perdu l'allèle sauvage PAP8 sont utilisées pour analyse des photocorps par microscopie à épifluorescence. Les T1s hétérozygotes (*pap8-1/+*) de phénotype sauvage sont repiqués et une seconde analyse des photocorps et de l'élongation de l'hypocotyle est effectuée en T2 dans les différents fonds génétiques.

Après 3 à 4 jours de croissance, le degré de verdissement des [DG] est difficilement distinguable des [albinos], mais deux classes de phénotypes d'élongation de l'hypocotyle [court] et [long] sont clairement distinguées dès la T1 et confirmées en T2 ; et montrent que les KOs porteurs du transgène PAP8^{NLSm5} dé-étioient mieux que les KOs sans (Figure sup 1 A). Cela dit, les [DG] PBG ne présentent pas la réponse optimale observée chez un [wt] PBG, indiquant que certains défauts d'élongation persistent dans le KO PAP8^{NLSm5}. A l'échelle cellulaire, on constate également dès la T1 qu'ajouter PAP8^{NLSm5} restaure l'apparition de photobodies tardifs (1.8 à 2 µm), alors que les KOs n'y parviennent pas et présentent de nombreux petits photocorps dispersés dans le noyau (Figure sup 1 B).

Puisque la version PAP8^{NLSm5} est restreinte aux plastes, nous en déduisons que la maturation des photocorps ne requiert pas une présence absolue de PAP8 dans le noyau. En outre, la fonction de la protéine portée par les acides aminés de son NLS n'est pas en lien direct avec les photocorps du noyau (Chambon et al., 2022), car ceux-là ne sont pas perturbés dans ce fond génétique. On pourrait donc penser que les défauts de maturation des photocorps observés dans le KO *pap8-1* résultent d'une absence du complexe PEP-PAPs dans les plastes, défaut en l'occurrence partiellement restauré chez un [DG] PAP8^{NLSm5} puisqu'un certain verdissement y est observé (Liebers et al., 2020 ; Chambon et al., 2022).

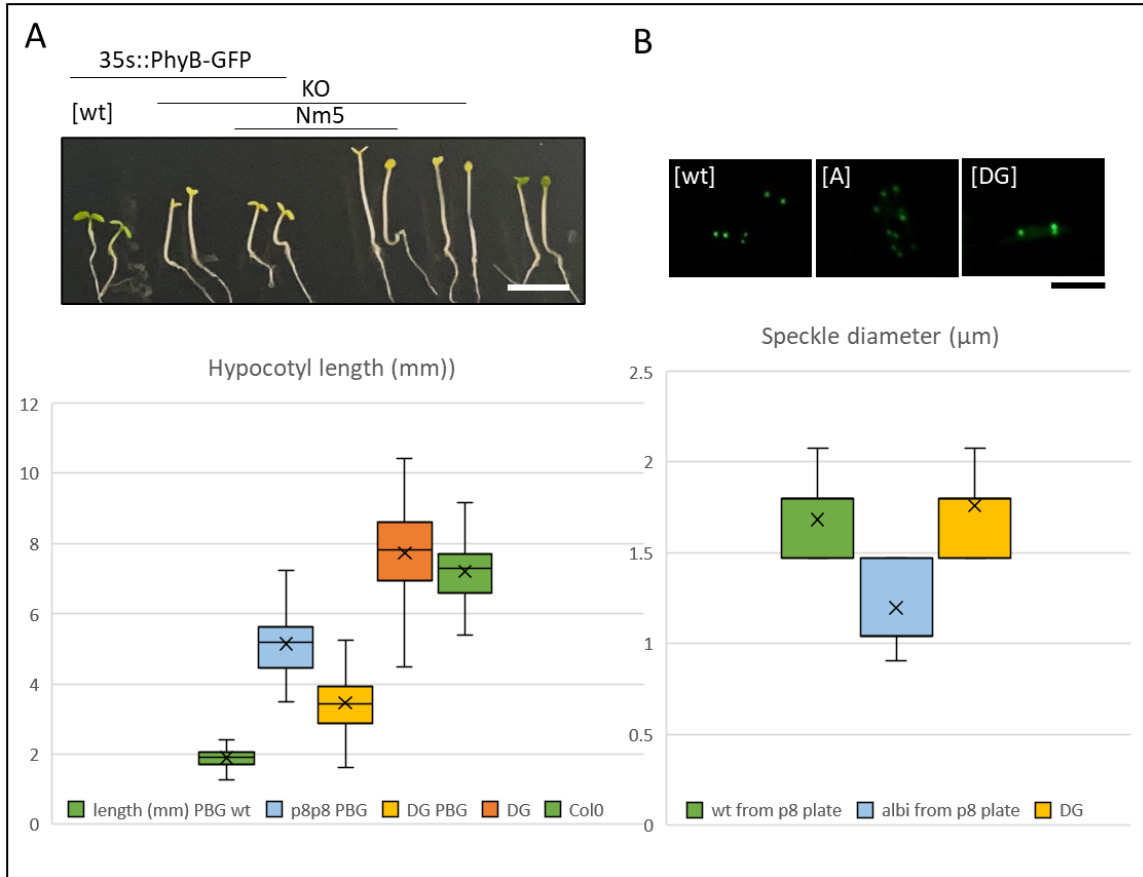
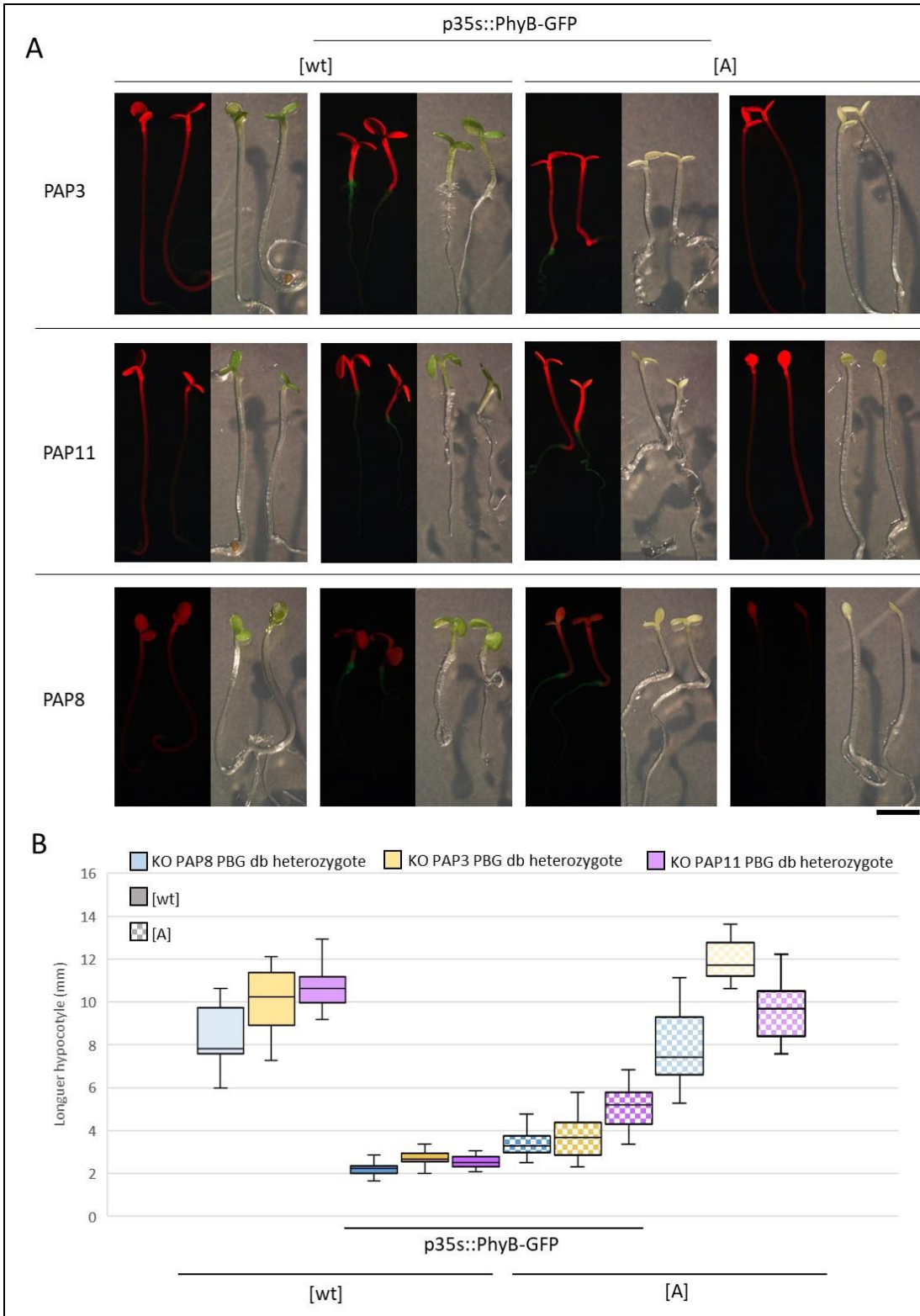


Figure sup 1 : Test de la réponse PBG dans un fond $PAP8^{NL5m5}$ après 3 jours de croissance sur milieu MS sucrose 1% sous lumière rouge (660nm) à $10\mu E$ d'intensité lumineuse. A : Plantules représentatives [sauvage] ([wt]) et [Albinos] ([A]) issues de double hétérozygotes $pap8-1/+$ PBG. Les plantes [DG] et [DG] PBG sont issues de lignées ne ségrégant plus aucun des trois allèles, les mesures présentées sous l'illustration des phénotypes observés. La différence d'élongation des hypocotyles entre [A] et [DG] PBG a par ailleurs été vérifiée en T1 et T2 sur une lignée ségrégant les 3 allèles. Un graphique en boîte à moustache où la médiane de la mesure d'une quinzaine de plantules au moins par génotype est présenté. La barre d'échelle représente 4 mm. B : Mesure de la taille des photocorps observés par microscopie à épifluorescence dans l'hypocotyle. Les plantes correspondant aux génotypes illustrés en A sont montrées sous l'illustration de photocorps représentatifs des observations, résultats également vérifiés en amont en T1 et T2. Au moins une dizaine de noyaux par génotypes sont imagés et analysés avec ImageJ. La barre d'échelle représente $10\mu m$. KO ou p8p8 pour knock-out mutant (homozygote $pap8-1$), et Nm5 pour $PAP8^{NL5m5}$.

D'après les prédictions de séquences, PAP3/pTAC10 et PAP11/AtMurE sont deux protéines PAPs strictement chloroplastiques sans NLS (Pfannschmidt et al., 2015). En outre, les mutants $pap3/ptac10$ et $pap11/atMurE$ développent le syndrome albinos des PAPs, et représentent donc un matériel de choix pour tester si le défaut des photocorps est un effet strictement chloroplastique. La réponse PBG est donc testée dans ces deux fonds mutants albinos.

Or on constate que contrairement aux plantules [DG], les KOs PAP3 et PAP11 [A] exprimant PBG ne parviennent ni à inhiber l'élongation de l'hypocotyle, ni à produire les photocorps tardifs (Figure sup 2).



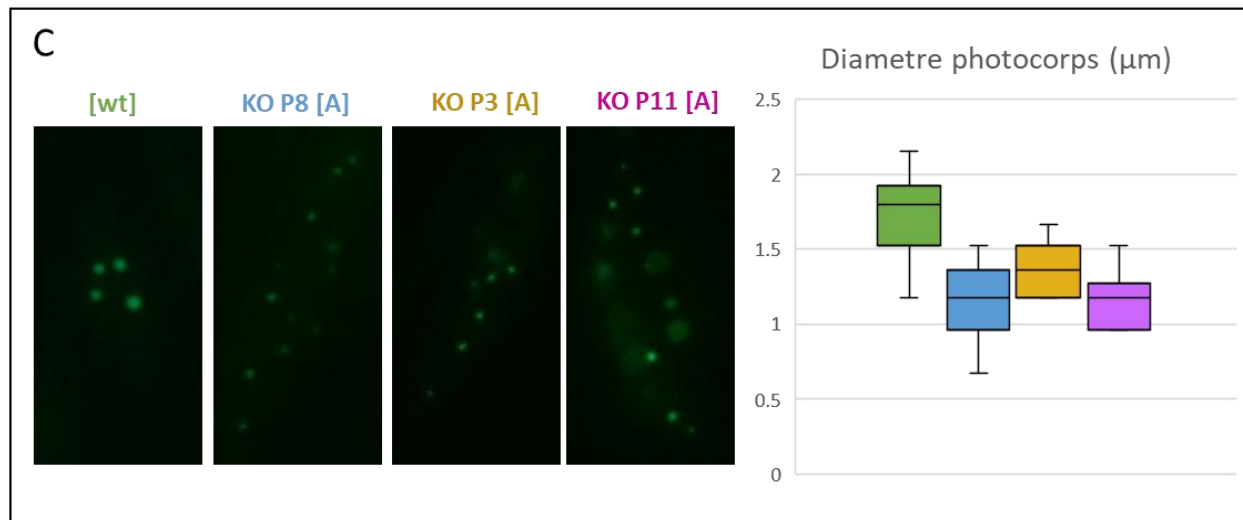


Figure sup 2 : Test de la réponse PBG dans des fonds KO PAP3 (P3) et PAP11 (P11) après 4 jours de croissance sur milieu MS sucrose 1% sous lumière rouge (660nm) à 10µE d'intensité lumineuse en T2. Les résultats confirment les observations réalisées en T1. **A** : Plantules représentatives [wt] et [A] issues de double hétérozygotes en T2. Les images sont prises sous loupe binoculaire équipée de lasers excitant la GFP et dont le pic d'excitation déborde légèrement sur celui de la chlorophylle, émettant une lumière rouge. Un graphique en boîte à moustache du diamètre des photocorps est présenté en **B**, où la médiane de la mesure d'une quinzaine de plantules au moins par génotypes est analysé. Les couleurs pleines sont choisies pour les phénotypes [wt] PBG des différents fonds génétiques utilisés, et les couleurs en damiers pour les phénotypes albinos. Le bleu est choisi pour les plantes issues de parents double hétérozygotes pap8-1 PBG, l'ocre pour le mutant pap3, et le parme pour le mutant pap11. La barre d'échelle représente 2mm. **C** : Mesure de la taille des photocorps observés par microscopie à épifluorescence dans l'hypocotyle. Les plantes correspondent aux génotypes analysés en A et B. Au moins une dizaine de noyaux par génotypes sont imagés et analysés. La barre d'échelle représente 10µm. KO pour knock-out mutant.

Etant donné que les défauts de photocorps ne sont pas observés dans un fond où PAP8 n'est adressé qu'aux plastides, mais qu'ils le sont dans des fond albinos pour lesquels les PAPs mutées sont adressées exclusivement aux plastides, on en conclue que la formation du complexe PEP-PAPs dans les plastides est un facteur limitant de la formation des photocorps tardifs dans le noyau lors de la photomorphogénèse.

Néanmoins on sait que PAP8 forme un sous complexe nucléaire avec d'autres PAPs (Chambon et al., 2022), dont PAP5 pour laquelle le mécanisme de signalisation sur l'axe Phy-PIF est bien caractérisé. De fait, le rôle de PAP8 dans le noyau quant à la formation des photocorps et de la signalisation qui en découle ne saurait être écarté, mais il est subordonné à la bonne formation du chloroplaste.

Cette hiérarchie vient bouleverser le paradigme qui consistait à penser que la photomorphogénèse est préexistante à la biogénèse du chloroplaste alors que les deux processus semblent bien interdépendants, avec une intervention des facteurs chloroplastiques bien plus précoce qu'anticipé. Le fond PBG permet de révéler cette hiérarchie car la surproduction de phytochromes sous forme d'apoprotéine vient défier le chloroplaste sur la capacité de production de la phytochromobiline pour former le récepteur fonctionnel (Pr ou Pfr). Or on sait en effet les PAPs être indispensables à une activité accrue de la PEP,

permettant notamment l'induction très intense du tRNA-E, précurseur essentiel de la voie des tétrapyrroles et de l'hème (Cf chapitre II de l'introduction).

EXPRIMER CONSTITUTIVEMENT GLK1 NE SUPPRIME PAS LE PHENOTYPE [DG]

Au niveau moléculaire dans le noyau, on sait les albinos homozygotes *pap8-1* avoir un défaut d'activation post-traductionnel du facteur de transcription HY5. Celui-ci n'est pas stabilisé à la lumière et reste donc fortement dégradé par le protéasome alors qu'il devrait être au contraire stabilisé. En conséquence, la voie de transcription en aval de HY5 est perturbée, notamment les facteurs de transcriptions GLK1 et GLK2 (en grande partie responsables de l'expression des PhANGs), dont l'expression post-illumination est très impactée dans le fond KO *pap8-1* (Liebers et al., 2020).

Il serait envisageable de contourner ces défauts moléculaires en produisant une version constitutivement active de HY5 dans le fond génétique *pap8-1*, ou bien plus simplement d'y exprimer de manière constitutive les GLKs. Mais un problème se poserait alors : l'absence de PAP8 dans le chloroplaste continuerait de perturber l'expression des PhANGs en ne permettant toujours pas l'assemblage de l'appareil photosynthétique, menant au défaut d'expression des PhANGs classiquement observés chez les albinos par couplage des génomes. On teste alors la possibilité de supprimer le défaut lié à l'absence de PAP8 dans le noyau en surexprimant les GLKs dans le fond PAP8^{NLSm5} et ainsi nous affranchir des problèmes pleiotropiques causés par l'albinisme de la plante. Une telle suppression constituerait une première évidence fonctionnelle de PAP8 dans le noyau.

Dans un premier temps, il s'agit de tester l'expression de ces gènes dans le fond PAP8^{NLSm5} par RT-PCR. On constate qu'après une journée de lumière continue, les deux fonds génétiques homozygotes *pap8-1* sont aussi impactés l'un que l'autre pour l'expression des GLKs, peu importe l'expression de la version PAP8^{NLSm5} dans les plastes, et peu importe la maturation des photocorps (Figure sup 3 A-D). Cela confirme donc l'importance de PAP8 dans l'expression des gènes GLKs à la lumière, et place PAP8 dans la cascade de signalisation induite par la lumière entre les Phys et les GLKs. Néanmoins, on ne sait toujours pas si c'est l'absence de PAP8 dans le noyau directement qui est la cause du défaut des GLKs, ou si cela est dû à une fonction manquante dans le plaste induite par les mutations de son NLS. En effet, nous n'avons pas trouvé le contexte permettant d'inhiber l'adressage aux noyaux sans altérer de manière plus profonde la fonctionnalité de la protéine (Chambon et al., 2022), et qui pourrait également opérer dans le noyau pour l'induction des GLKs.

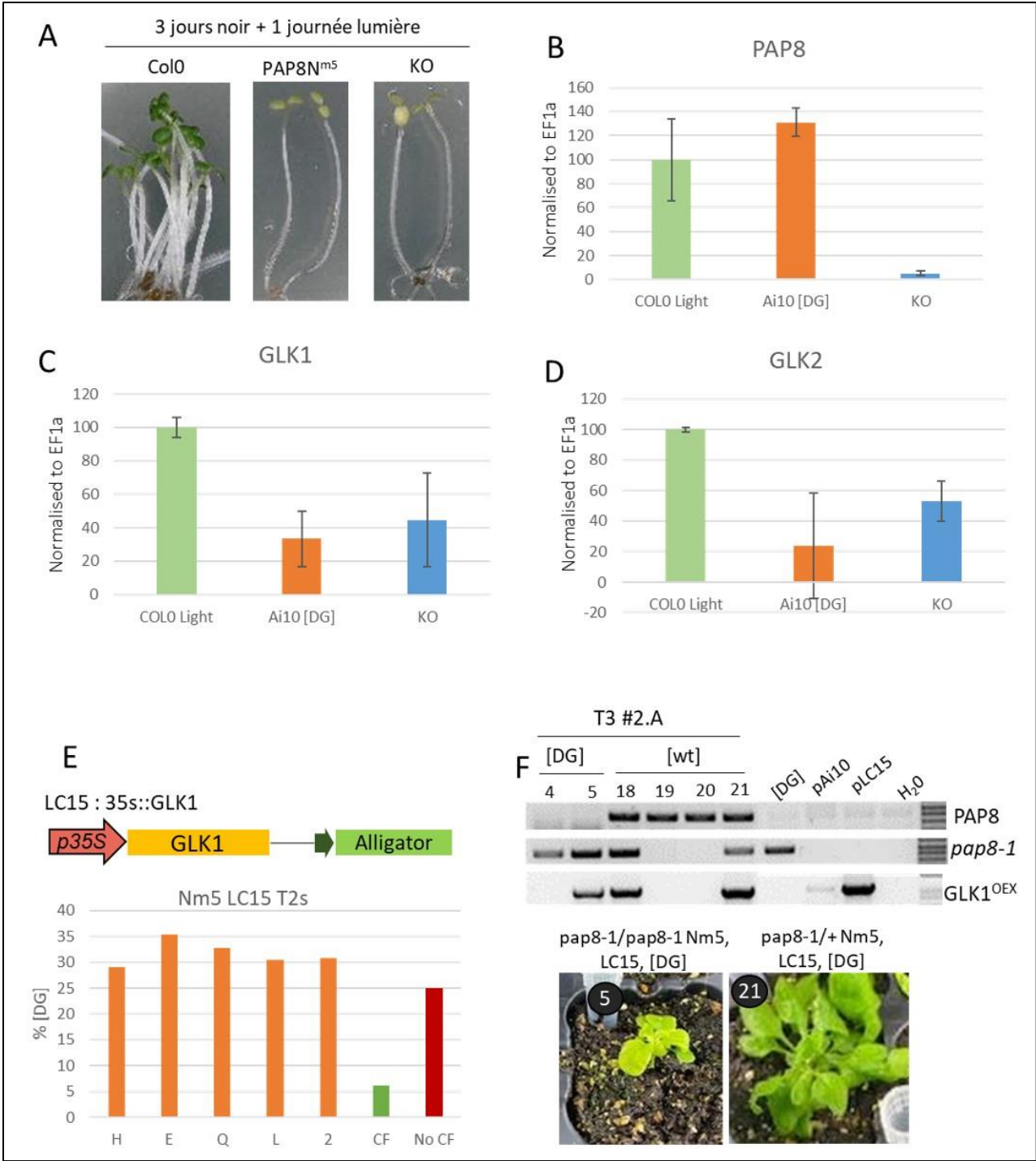
Enfin, la diminution des GLKs dans un fond PAP8^{NLSm5} pourrait tout aussi bien être une cause qu'une conséquence du phénotype [DG]. Pour le tester, les hétérozygotes *pap8-1/+ PAP8^{NLSm5}* sont transformés avec le CDS de GLK1 exprimé constitutivement sous promoteur du virus de la mosaïque p35S (construction

LC15). Les plantules sont sélectionnées par le système Alligator (pAt2S3 :GFP_{er}) sur la fluorescence de leurs graines sèches. D'après la ségrégation des phénotypes en T1, l'expression constitutive de GLK1 ne supprime pas le phénotype [DG] chez les 5 lignées testées, car celles-ci produisent environ 1/4 de plantules [DG]. Autrement dit, exprimer constitutivement GLK1 n'améliore pas le verdissement du quart homozygotes *pap8-1* PAP8^{NLSm5} ayant reçu le transgène LC15 (Figure sup 3 E). De la même manière, un suivi dans le temps de ces plantes sur une lignée ne montre pas de différence majeure parmi les phénotypes [DG] exprimant ou non LC15 (Figure sup 3 F).

On en conclue que le retard de verdissement [DG] n'est pas simplement dû au retard d'induction de GLK1 dans ce fond génétique, et que l'absence de PAP8 dans le noyau dans sa version PAP8^{NLSm5} conduit à des défauts bien plus vastes que la seule cascade de signalisation HY5-GLKs-PhANGs.

PAP8^{NLSm5} constituant un allèle hypomorphe, il sera intéressant d'évaluer la part du défaut chloroplastique liée aux mutations des lysines (K) et arginines (R) de ce NLS, et d'autres combinaisons de mutations pourraient également être testées. Nous pourrions aussi changer de modèle génique avec l'utilisation d'autres PAPs bilocalisées. PAP12 à ce titre semble un candidat très prometteur par sa petite taille et son NLS bien identifié.

Figure sup 3 : Caractérisation des défauts GLKs dans un fond PAP8^{NLSm5}. A : Des plantes *pap8-1* (KO) *pap8-1* PAP8^{NLSm5} (Ai10) sont cultivées sur MS sucrose 1% trois jours dans le noir suivis d'une journée d'illumination continue à 30μE, et l'expression de PAP8, GLK1, et GLK2 est testé par RT-PCR en B, C, D. L'expression de ces gènes est normalisée à l'expression de EF1a et rapportée à l'échantillon sauvage Col0, et la barre d'erreur calculée sur l'écart type des valeurs obtenues sur les duplicatas biologiques. E : Construction LC15 insérée par agro-infiltration dans un fond génétique *pap8-1/+* PAP8^{NLSm5}. Les transformants primaires sont sélectionnés sur la fluorescence de leurs graines (système alligator), les hétérozygotes *pap8-1/+* positifs pour le transgène LC15 par génotypage sont plantés sur milieu MS, et les phénotypes [DG] comptés après une semaine de croissance sur un minimum de 150 plantes par lignées. En rouge et en vert sont indiqués les proportions mendéliennes en cas de suppression de phénotype [DG] (CF, vert) ou sans suppression (No CF, rouge). F : Génotypage PCR en T3 des filles de la lignée 2.A ségréguant l'allèle *pap8-1*, PAP8, et LC15. Le transgène est détecté avec un couple d'oligos amplifiant une partie du promoteur p35S et du CDS de GLK1. Les plantes T3 correspondantes ne montrent pas de différence de verdissement après un mois de croissance. GLK1^{OEX} pour expression constitutive de GLK1. KO pour knock-out mutant (homozygote *pap8-1*), et Nm5 pour PAP8^{NLSm5}.



LA SEQUENCE N-TERMINALE DE PAP1 NE PERMET PAS D'OBTENIR UNE FUSION ETIQUETEE ET FONCTIONNELLE DE PAP8

Afin de tester différentes configurations d'adressage de GFP-PAP8 en comparaison d'une séquence que l'on sait fonctionnelle (LC23, Chambon et al., 2022), nous avons également testé le cTP prédit de PAP1 (Pfannschmidt et al., 2015), protéine déjà caractérisée comme adressée aux plastes (Yagi et al., 2012), car un NLS (R₄₈-R₅₅) y est prédit en N-terminus de sa séquence, après le site de clivage du cTP entre C₃₀ et S₃₁ (**MSLLFLNPPFPNSIHPIPRRAAGISSIRC₃₀S₃₁ISAPEKKPRRRRKQKRGDG**, où est souligné le NLS prédit). Aussi, bien que PAP1 ait déjà été utilisé comme témoin négatif de western-blot sur fractions nucléaires purifiées (Pfalz et al., 2015), la protéine est quand même suspectée d'être adressée aux noyaux (Pfannschmidt et al., 2015), où elle semble également impliquée dans la transcription de *GLK1* et *GLK2* (Andreeva et al., 2020) lors de la photomorphogénèse.

Les 152 premières paires de bases du CDS de PAP1 ont donc été clonées et ajoutées à la version GFP-PAP8^{NLSm5}. La construction cTP¹-NLS¹-GFP-PAP8^{NLSm5} correspondante est nommée BB633. Comme pour les transgènes LC16, LC23, et BB647, les transformants primaires BB633 sont sélectionnés sur hygromycine, puis les T1s [wt] génotypées après repiquage sur terre. Or chacune des 9 lignées hétérozygotes *pap8-1/+* positives pour BB633 ségrégent 1/4 d'[albinos] en T2, indiquant que la fusion protéique cTP¹-NLS¹-GFP-PAP8^{NLSm5} ne permet pas de restaurer un phénotype sauvage parmi les ¾ d'albinos qui le possèdent (Figure sup 5 A-C). D'ailleurs, les albinos génotypés en T2 sont bien positifs en PCR pour le transgène (Figure sup 5 D-E). On en conclue que version BB633 de PAP8 n'est pas fonctionnelle pour compléter le phénotype [Albinos] du mutant *pap8-1*.

Par ailleurs, la cassette d'expression utilisée pour générer la construction BB633 avait été testée en système transitoire dans l'épiderme d'oignon, où la GFP est visible dans les plastes et les noyaux de l'épiderme d'oignon (Figure sup 5 F). Un fort signal est observé dans les cellules, dont l'une d'elles est montré en figure 5 G, indiquant un adressage actif de la fusion protéique aux noyaux. Cela dit, la fusion BB633 (même cassette d'expression cTP¹-NLS¹-GFP-PAP8^{NLSm5} en vecteur binaire) n'a pas été testé en biolistique, mais en microscopie confocale sur une lignée transgénique. Le faible signal GFP ne permettait pas de conclure de manière irréfutable sur la localisation de la protéine de fusion dans les chloroplastes et dans les noyaux (résultats non montrés).

Il est donc concevable que BB633 ne complète pas le phénotype du mutant *pap8-1* simplement parce que la construction n'est pas correctement adressée aux les plastes. D'avantage de lignées devraient être testées et les tests plus poussés tels que des analyses de western blot, notamment pour vérifier que la protéine est à la taille attendue et si elle s'accumule correctement dans les noyaux et les plastes.

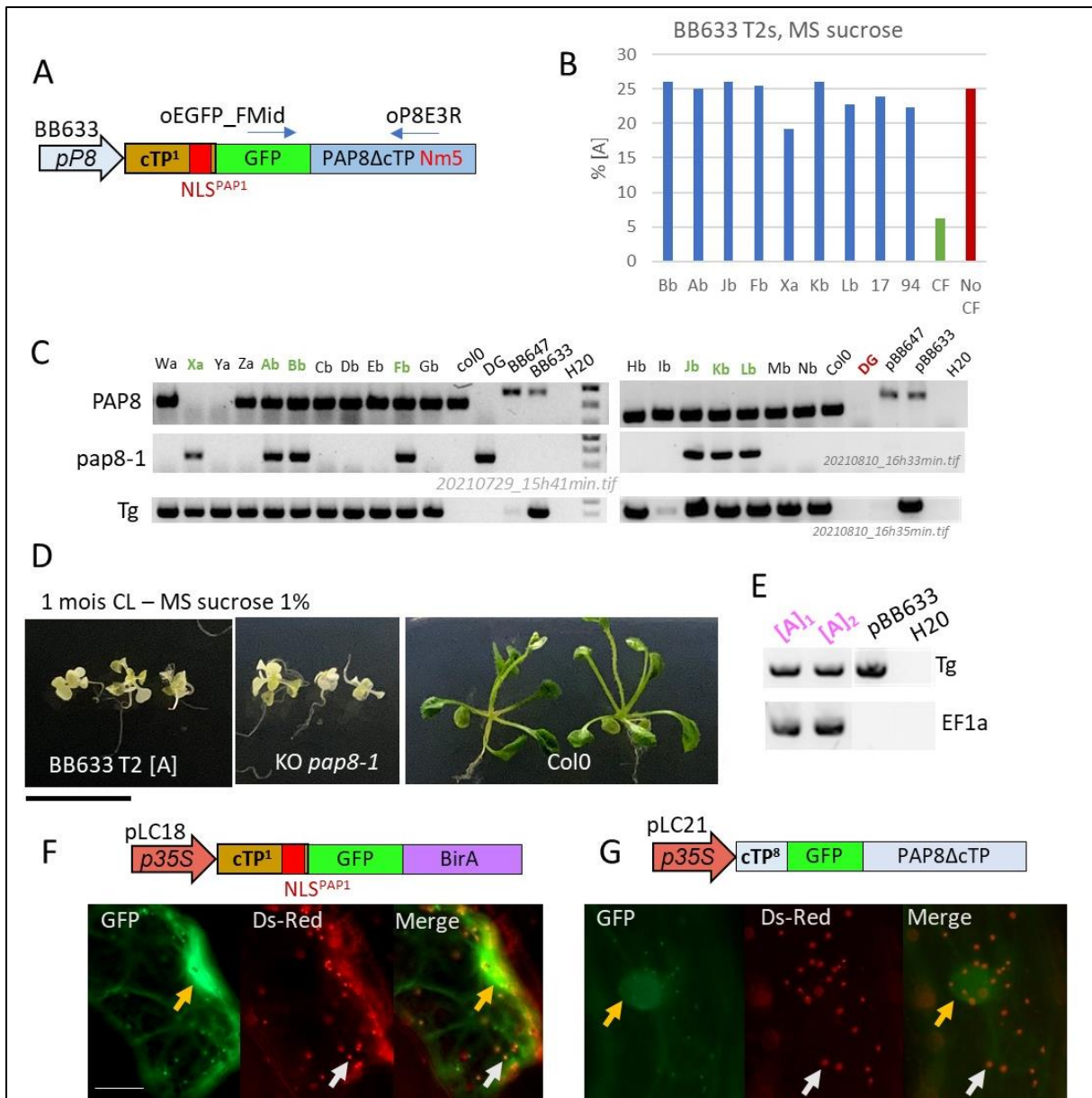


Figure sup 5: Test de complémentation fonctionnelle d'un KO pap8-1/pap8-1 par expression de BB633.
A, B, C : Test de complémentation fonctionnelle en T2. **A :** Construction insérée par agro-infiltration dans un fond génétique pap8-1/+. Les oligos utilisés pour détecter la présence du transgène par génotypage de l'ADN génomique purifié sont indiqués en **C**. Les transformants primaires sont sélectionnés sur hygromycine, et la descendance des T1s hétérozygotes pap8-1/+ positifs pour le transgène BB633 par génotypage sont repiqués en terre. En **B** sont comptés les pourcentages d'albinos après une semaine de croissance sur un minimum de 250 plantes par lignées. En rouge et en vert sont indiquées les proportions mendéliennes en cas de suppression de phénotype (vert, CF) ou pas (rouge, No CF). **D :** Phénotype de KOs avec et sans la construction BB633 après un mois de croissance sur sucrose 1%. Des albinos issus de la lignée présentée sont sacrifiés pour vérifier la présence du transgène (Tg) par PCR en **E**, où le plasmide contenant la construction (pBB633) est employé comme témoin. La barre d'échelle représente 2cm. **F, G :** Tests d'expressions transitoires par bombardement d'épiderme d'oignon avec la construction indiquée, où pLC18 a servi de vecteur d'insertion pour la construction BB633 insérée in planta. Notez que les temps d'exposition sont différents entre les images issues des deux constructions présentées. Les flèches jaunes indiquent le noyau, les blanches indiquent les plastes marqués par p35S::PAP10-DsRed. Une troisième image combinant les images obtenues sur les deux canaux est fournie à droite. La barre d'échelle représente 20µm. KO pour knock-out mutant (homozygote pap8-1), et Nm5 pour PAP8^{NLSm5}.

OUVERTURE : fonctionnalisation des PAPs



DIVERGENCE FONCTIONNELLE D'AU MOINS UNE PAP CHEZ LA MOUSSE

On l'a vu, les PAPs sont fondamentales dans les processus liés à l'identité photosynthétique des plastes, tant pour l'assemblage du complexe PEP-PAPs que pour les événements cellulaires qui en résultent (et/ou qui les précèdent). Néanmoins, la présence d'une partie des PAPs dans le noyau reste au moins aussi importante que mystérieuse, et reste encore difficile à évaluer. D'ailleurs les « échos » vraisemblables de certaines d'entre elles (Krupinska *et al.*, 2020), notamment PAP8, permettent sans doute d'intégrer ensemble développement et identité photosynthétique à des précurseurs qui s'accumulent dans le noir, voir peut être à d'autres comme en atteste leur expression dans des tissus non photosynthétiques (Pfalz *et al.*, 2006). Cela dit de nombreuses zones d'ombres demeurent, et on ne connaît toujours pas les mécanismes précis de ces processus développementaux tant ils sont intriqués.

Quasiment toutes les PAPs découvertes par analyses phylogénétiques sont extrêmement bien conservées, et on les retrouve toutes chez la mousse *Physcomitrium patens*, indiquant que leur première réunion au sein d'un même génome correspond à une ère géologique où la lignée verte commence à s'affranchir du milieu aquatique pour conquérir le monde terrestre. Aussi ces plantes possèdent bien des chloroplastes, mais les mousses sont peu tissularisées et les tissus peu différenciés, et donc avec une famille de plastes plus restreinte. Enfin, leurs cycles de vie très éloigné des plantes terrestres de radiations plus récentes rendent les comparaisons difficiles, mais c'est le seul organisme non-angiosperme pour lequel un KO PAP est disponible. En l'occurrence, une équipe a pu décrire le KO de PAP11 (Pp-MurE), dont les cellules possèdent des macro-chloroplastes incapables de se diviser. Ce phénotype ne peut pas être supprimé avec le gène issu d'*Arabidopsis* (At-MurE), dont le mutant ne présente pas les mêmes défauts (Machida *et al.*, 2006), les plastes y étant simplement albinos comme pour tous les autres mutant PAPs.

Cela indique que chez la mousse, cette PAP au moins est nécessaire pour la division du chloroplaste et que cette fonction a divergé entre la mousse et les plantes supérieures depuis la fonction initiale qu'elle assurait chez l'ancêtre commun (Garcia *et al.*, 2008). Mais aller plus loin dans le raisonnement est complexe, car la machinerie d'expression du plaste de la mousse semble relativement éloignée de celle des plantes vascularisées, les NEPs ne semblant pas y être adressées (Yagi and Shiina, 2014).

Cuscuta epithymum (Solenacée)



Dessin de plastes de *Cuscuta* depuis Sherman et al., 1999

VEGETAUX SANS PAPS & INTEGRATION DU VERDISSEMENT DANS LE DEVELOPPEMENT

Les gymnospermes (résineux) possèdent une plus large famille de plastes que les mousses, mais n'ont en revanche aucune PAP fonctionnelle, cette importante perte de gènes indiquant peut-être que l'essentialisation des PAPS sur la PEP est postérieure à la séparation des gymnospermes. Mais il est surtout troublant d'associer cet événement évolutif au processus de synthèse des chlorophylles, dont l'étape est indépendante de la lumière chez les gymnospermes. En effet, chez les résineux le verdissement est constitutif, et dans le noir les plantes ne développent pas d'étioplastes mais des étiochloroplastes avec une POR pouvant s'activer indépendamment de la lumière (Solymosi and Aronsson, 2013).

En outre un travail plus poussé dans l'alignement de séquences de génomes d'espèces disponibles (réalisé dans notre équipe par Elena Nicollin, stagiaire de Licence), montre que si les PAPS sont effectivement présentes chez les mousses, elles ne le sont plus chez la plupart des plantes de radiation ancienne apparues ensuite. Seules les Sélaginelles – parmi les premières plantes vascularisées et par ailleurs décrites sans NEPs (Yagi and Shiina, 2014), conservent les 11 premières PAPS. Les PAPS resurgissent toutes chez *Amborella*, néanmoins aucune autre angiosperme basale n'indique une incongruence phylogénétique sur le clade des « ANA grade ». Elles sont ensuite toutes conservées chez angiospermes de radiation plus récente à l'exception des Saxifragales, pour lesquelles les données sont sans doute très fragmentaires. Toutefois (à part peut-être chez quelques espèces) peu de données sur la régulation du verdissement sont disponibles et encore moins à l'échelle moléculaire, et il est donc difficile de trouver un point commun aux plantes qui ne possèdent pas les PAPS. En revanche, toutes celles qui les possèdent semblent faire une transition skoto-photomorphogénétique où le verdissement est induit par la lumière.

Parmi les genres plus récents qui contiennent à priori les PAPS, on retrouve les Solanales avec par exemple les lyserons, tomates et pommes de terre, mais aussi la famille des cuscutes, plantes qui en parasitent bien d'autres. Aussi comme de nombreux parasites, cette famille a perdu les gènes codant pour la PEP dans le plastome, mais retient quand même quelques PhAPGs (Mcneal *et al.*, 2007), qui semblent exprimés et fonctionnels puisque la plante parvient à verdier. Cela dit, ce verdissement ne s'opère que lorsque les plantes sont plongées dans l'obscurité totale ou alors exposées à de faibles intensités lumineuses. Dans ces conditions les chloroplastes ne possèdent pas de thylakoïdes stromaux mais uniquement des granas composés de quelques lamellae, confortant l'hypothèse selon laquelle l'apparition des thylakoïdes stromaux n'est possible que lorsque la PEP commence à être très active dans le mésophylle de plantules d'*Arabidopsis* entre 8 et 12 h d'illumination, c'est-à-dire après l'arrivée massive des PAPS dans les plastes, après ou en parallèle de leur néosynthèse dans le cytosol (cf chapitre 2 de l'introduction).

Si au contraire la plante se développe à la lumière, alors elle est plus proche de plantes entièrement hétérotrophes et devient crème (ivoire), rouge ou jaunâtre, mais surtout pas verte, couleurs ne correspondant au niveau cellulaire qu'à des leucoplastes ou chromoplastes (Laudi, Bonatti and Fricano,

1974; Sherman, Pettigrew and Vaughn, 1999). Malheureusement, le génome nucléaire de cette famille n'est pas séquencé. Et bien que le genre des Solanales conserve les PAPs, on peut penser que les cuscutes les ont perdues en même temps qu'elles ont perdu la régulation du verdissement à la lumière. On peut sinon imaginer qu'elles conservent les PAPs en tant que Solanales, même si elles ne sont plus nécessaires à ce type de régulation. Dans ce scénario, il serait de choix de savoir dans quel compartiment cellulaire on les retrouve, et si leur accumulation dépend encore de la lumière.

DES PLANTES SANS PEP PARVIENNENT A VERDIR A LA LUMIERE

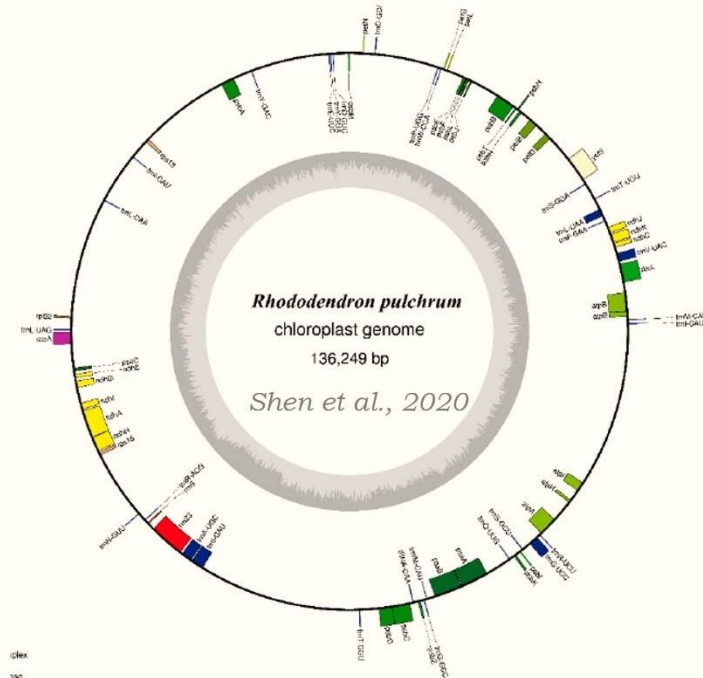
Les Ericales sont un autre groupe qui retient les PAPs, et comprend notamment une riche variété de Rhododendrons, arbustes acidophiles au feuillage vert persistant ou semi-persistant. Et parmi les quelques plastomes séquencés du millier d'espèces du genre, tous conservent le cœur rpo de la PEP dans le plastome [*Rhododendron delavayi* (Li *et al.*, 2020), *Vaccinium oldhamii* (Kim 2019), *Vaccinium macrocarpon* (Fajardo, Senalik and Ames, 2012)]. Par contre *Rhododendron pulchrum*, bien qu'à priori similaire aux autres Rhododendrons, ne conserve plus la PEP du tout (Shen *et al.*, 2020) de même que la plupart des gènes de classe III et beaucoup de classe II (les tRNAs en revanche sont présents).

L'absence de PEP comparée à la présence de PhAPGs implique que cette espèce possède au moins une NEP ou un équivalent pour les exprimer, peut-être les deux puisque les rhododendrons sont des dicotylédones. Cela dit, s'il est connu que les plantes non photosynthétiques hétérotrophes transcrivent sans doute l'ensemble de leurs plastome en utilisant des NEPs, celles connues pour conserver des PhAPGs (*Cuscuta*, voir plus haut) ne verdissent quasiment pas, ou en tous cas pas à la lumière.

Malheureusement encore une fois le génome nucléaire de *R. pulchrum* n'est pas disponible, et on ne sait pas si l'espèce conserve les PAPs. Si elles sont toujours présentes et fonctionnelles comme chez *Arabidopsis*, cela confirmerait certes le rôle des PAPs dans l'identité verte des plastes à la lumière, mais de manière générale et peut être moins spécifiquement sur la PEP. Peut-on alors les imaginer également importantes pour une régulation liée à une ou aux deux NEPs ? Il est en effet intrigant de voir que la fusion LC23 est bien visible dans les étiooplastes du mésophylle lorsque le corps prolamellaire des étiooplastes est encore bien visible, alors que les plantules sortent à peine de l'obscurité pour être montées sur lames (Chambon *et al.*, 2022). Seule une observation fiable de la fluorescence de plantes exprimant LC23 après fixation permettrait d'envisager que les PAPs (ou au moins PAP8) sont adressées dans les étiooplastes du mésophylle à l'obscurité, mais pour une autre fonction que la formation du complexe PEP-PAP – le cœur enzymatique de la PEP y étant supposé désassemblé (Cf chapitre II de l'introduction).



Rhododendron pulchrum (Ericacée)



Mais l'existence d'un tel système pose une autre question plus fondamentale encore. On peut en effet envisager que la divergence du plastome de *R. Pulchrum* soit la raison de sa lisibilité par les NEPs, capables d'y faire verdier les plastes à elles seules. Or on l'a vu, chez *Arabidopsis* et les céréales, supprimer la formation du complexe PEP-PAPs mène invariablement au même phénotype albinos. On sait également que l'activité des NEPs est inchangée voir augmentée chez ces mutants, alors qu'elle finit toujours par diminuer avec l'âge chez les sauvages. Aussi, pourquoi ne pas imaginer que si la formation du complexe PEP-PAPs est importante pour augmenter l'activité de la PEP lors du verdissement, elle l'est aussi pour diminuer celle des NEPs dans un environnement lumineux ? Auquel cas on pourrait attribuer l'identité albino plaste chez *Arabidopsis* à l'absence de complexe PEP-PAPs, mais aussi au maintien d'un certain degré d'activité des NEPs. Or comme chez *R. Pulchrum* de nombreux gènes sont absents du plastome (par exemple ClpP), cette divergence expliquerait pourquoi l'activité de(s) NEP(s) n'est pas délétère, mais vraisemblablement optimale pour l'expression des PhAPGs et le verdissement des plastes à la lumière chez cette espèce. Néanmoins il ne s'agit que de scénarios, pour le moment difficilement vérifiables.

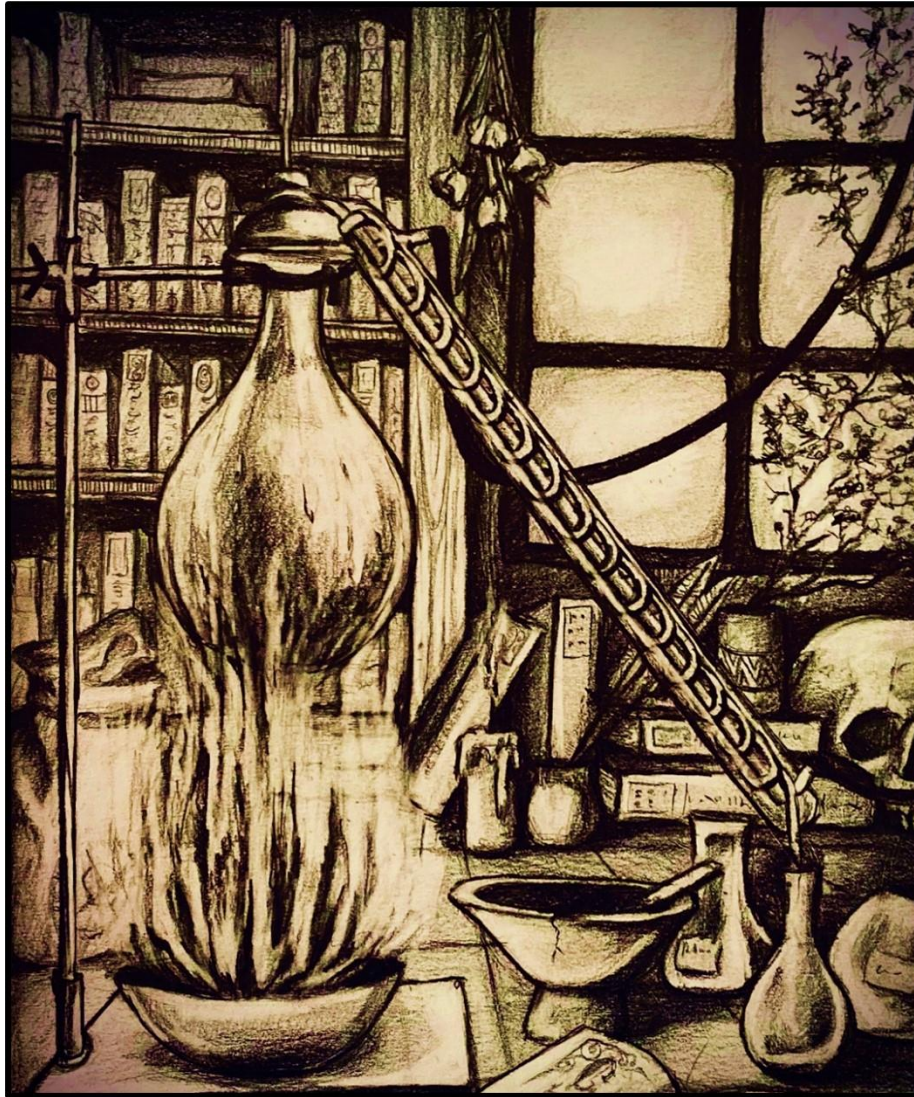
Quoi qu'il en soit, de nombreuses questions demeurent malgré 20 ans de recherches sur l'expression du génome et de l'identité des plastes. Et plus le savoir s'enrichit, plus la vérité se voile.

Monotropa hypopitys
(Ericacée)



Dessin d'un plaste de *Monotropa*
depuis Duddridge & Read, 1982

MATERIEL ET METHODES



CLONAGES & BIOLOGIE MOLECULAIRE

PRINCIPE DU TA-CLONING

En raison des différentes questions biologiques posées, plusieurs clonages ont été réalisés, et tous sont produits selon la même méthode. Ce sont les matrices utilisées qui changeront en fonction des objectifs visés. Un exemple des différentes étapes à partir de LC01 est montré figure 1.

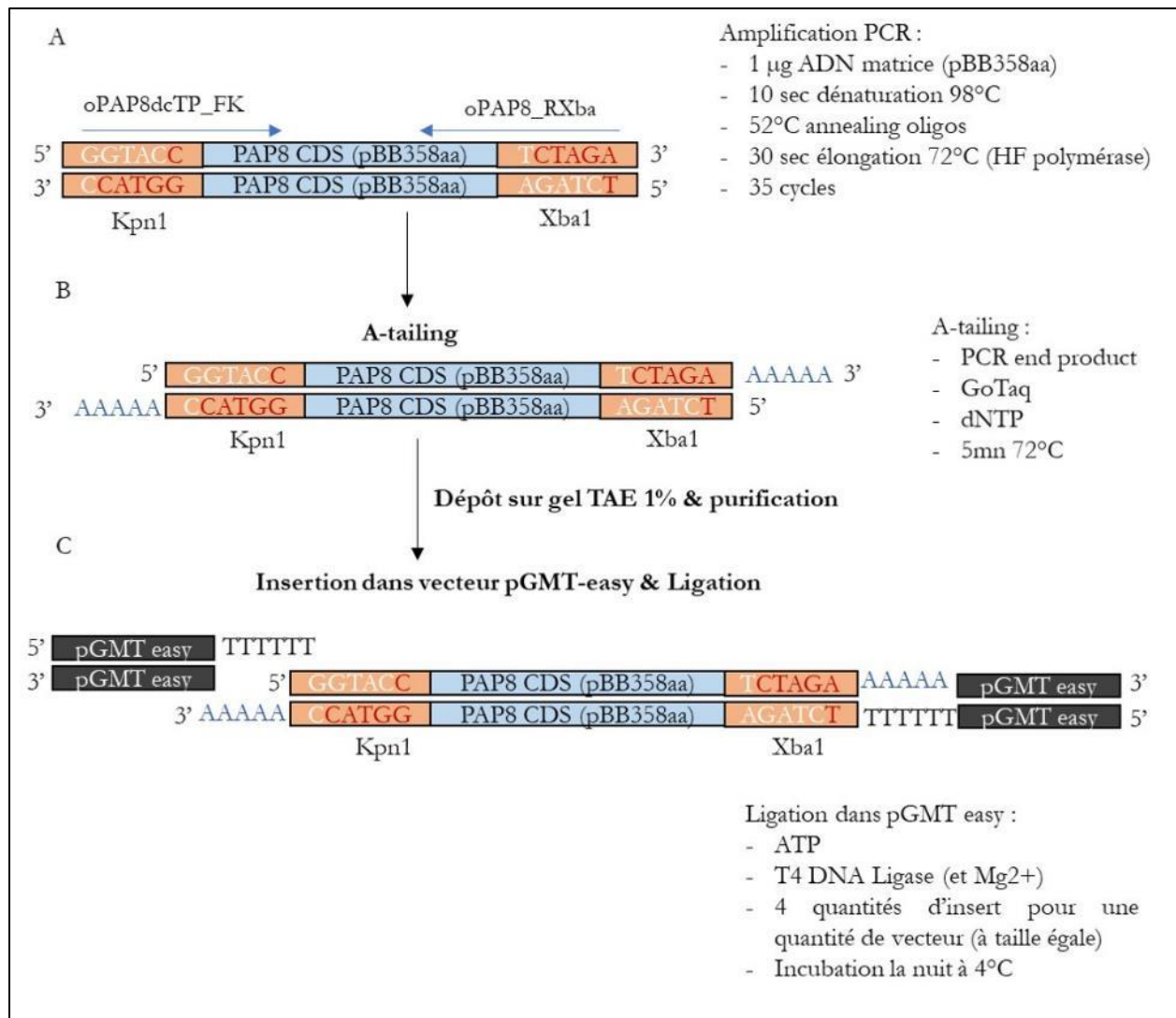


Figure 1 : Principe de clonage par TA-cloning dans vecteur pGMT-easy utilisés pour générer pLC01, pLC02, pLC13, et pLC14. Sont ici représentés la matrice et oligos utilisés pour générer pLC01. **A** : Les oligos choisis recouvrent partiellement les extrémités d'une portion de la matrice en ajoutant des sites de restriction enzymatique nécessaires aux clonages subséquents. L'étape de PCR est indiquée à droite du schéma. **B** : Une queue poly-A est ensuite ajoutée en fin de réaction aux extrémités 3' de l'amplicon. **C** : L'insert ainsi préparé puis purifié est inséré par complémentarité de base avec le vecteur, et la T4-DNA ligase est utilisée dans les conditions habituelles indiquées pour ligaturer les extrémités 5' et 3' de chaque brin d'ADN.

Il s'agit d'abord d'isoler le CDS souhaité par PCR en utilisant des amorces qui recouvrent les extrémités 5' et 3' du fragment d'intérêt, sur lesquels sont ajoutés des sites de restriction enzymatiques différents. De fait, l'amplicon généré en fin de PCR porte le fragment d'intérêt flanqué par les deux sites de restriction, et est donc orienté. Afin de générer le moins d'erreurs de réplifications possible, l'enzyme HF (HighFidelity) Polymerase (Promega) est utilisée pour l'amplification du fragment. Aussi, on prend soin de ne pas rompre la phase ouverte de lecture de l'insert avec les primers dessinés.

La moitié du volume réactionnel après PCR est mis en présence d'un mix PCR sans oligo contenant dNTPs et TaqPolymerase pour générer une queue poly-alanine à l'extrémité 3' des amplicons. Après réaction, le produit PCR est déposé sur gel TAE 1% (40mM Tris-Acétate, 1mM EDTA, pH 8) et est purifié après migration avec le kit d'extraction sur gel GeneClean® III, après dissolution du gel contenant l'amplicon à purifier dans une solution à l'iode à 60°C pendant 3 minutes environ. On utilise pour déterminer la taille de l'amplicon l'échelle 1 kb+ (Fisher) et l'intercalant SYBRSafe (Invitrogen) pour visualiser l'amplicon après migration, de même que dans chacun des gels effectués.

Après élution dans l'eau, le fragment purifié est inséré par TA cloning dans le vecteur pGEM®-T Easy (Promega), un vecteur circulaire ouvert dont les extrémités 3' présentent une queue poly T. La réaction de ligation s'opère alors par complémentarité de base en présence de T4 DNA ligase et d'un tampon contenant de l'ATP. La réaction s'opère à 4°C sur la nuit, pour éviter que ce dernier ne se dégrade à température ambiante. Pour des conditions de ligation optimales, quatre quantités d'inserts pour une quantité de vecteur, à taille égale, sont mis en présence de la ligase. Les produits de ligation correspondants, dans cette étude pLC01, pLC02, pLC13, et pLC14, sont isolés par transformation et miniprep tel que décrit ci-dessous. Comme les inserts de ces plasmides sont générés par PCR, on séquence le clone obtenu (indiqués par ** dans figure 3 et 6) après une première validation par restriction enzymatique avant utilisation pour clonages subséquents.

TRANSFORMATION BACTERIES DH5-ALPHA

Après les étapes de ligation, des souches thermo-compétentes DH5-alpha d'*E-coli* sont transformées par choc thermique 45 secondes à 42 °C. Après une période de repos de 20 mn sous agitation en milieu riche (SOC medium), les bactéries transformées sont étalées sur milieu LB agar et carbeniciline (Carb) (50mg/mL) que porte le vecteur pour sélectionner les transformants.

Pour les plasmides pLC01, pLC02, pLC13, et pLC14, du X-Gal (20mg/mL) et de l'IPTG (0.2 mg/mL) sont également ajoutés, car si l'insertion a eu lieu, alors le gène codant pour la Beta-galactosidase contenue dans la cassette d'insertion du vecteur pGEM-T Easy est interrompu, les colonies ne parviennent pas à oxyder le produit X-Gal et restent blanches. Après une nuit d'incubation à 37°C, les colonies blanches sont donc re-suspendues individuellement dans du milieu LB liquide avec Carb. Ces cultures sont laissées sous

agitation à 37°C la nuit, et les plasmides sont isolés par miniprep avec le kit QIAep Spin Miniprep kit (Qiagen), avant d'être vérifiés par restriction enzymatique tel que décrit ci-après.

CLONAGE PAR RESTRICTION ENZYMATIQUE

Les plasmides sont double digérés avec deux enzymes de restriction flanquant la région d'intérêt, de même que le futur vecteur d'insertion s'il s'agit de générer un insert. Pour cela, 1µg de plasmide sont digérés avec 1µL de chaque enzyme de restriction, en présence du buffer CutSmart® (NEB) à 37 °C pendant 2 heures. Après vérification de la taille des bandes obtenues, les produits de digestion sont déposés sur gel et après purification, mit en présence de T4 DNA ligase tel que décrit précédemment. Ont ainsi pu être générés l'ensemble des constructions présentées ci-après. Le principe que suit ce type de clonage par restriction enzymatique est indiqué figure 2.

MATRICES ET VECTEURS D'INSERTION EMPLOYES

Les 4 inserts correspondants aux plasmides pLC01, pLC02, pLC13, et pLC14 servent de base pour répondre à différentes questions et sont générés depuis trois matrices différentes.

Les clonages ayant pour objectif de tester la fonctionnalité de la protéine de fusion GFP-PAP8 *in planta* sont générés à partir du CDS de PAP8. Cette matrice est disponible depuis le plasmide pBB358, déjà décrit dans (Liebers *et al.*, 2020), et correspond à pLC01. Ce plasmide sert ensuite de base aux clonages par restriction enzymatique présentés figure 4.

Les clonages permettant de déterminer la fonctionnalité de la version PAP8^{NLSm5} *in planta* utilisent la matrice pAi02a, dont 5 acides aminés ont été remplacés sur le NLS de PAP8 (arginines en alanines), également publié et décrit dans (Liebers *et al.*, 2020). Le clone correspondant est nommé pLC02. Comme pour pLC01, les sites de restriction flanquant l'insert généré sont Kpn1 en 5' et Xba1 en 3'. Les clonages correspondants sont récapitulés figure 5.

Enfin, les clonages tirant partie du NLS contenu dans le cTP de PAP1 sont générés à partir de l'extrémité 5' du cDNA de PAP1, avec des oligos portant les sites de restriction Xho1 et BamH1. Une version est dessinée pour correspondre au vecteur pKP16 (pLC14), une autre sans interruption de phase ouverte de lecture dans le vecteur pBB421 (pLC13). Les clones ainsi générés sont présentés figure 6, et servent de base à la création de pBB633 (voir dernier chapitre du matériel supplémentaire).

Ces différentes briques pourront donc être subséquentement insérées dans des vecteurs d'intérêt disponibles et qui portent les mêmes sites de restrictions.

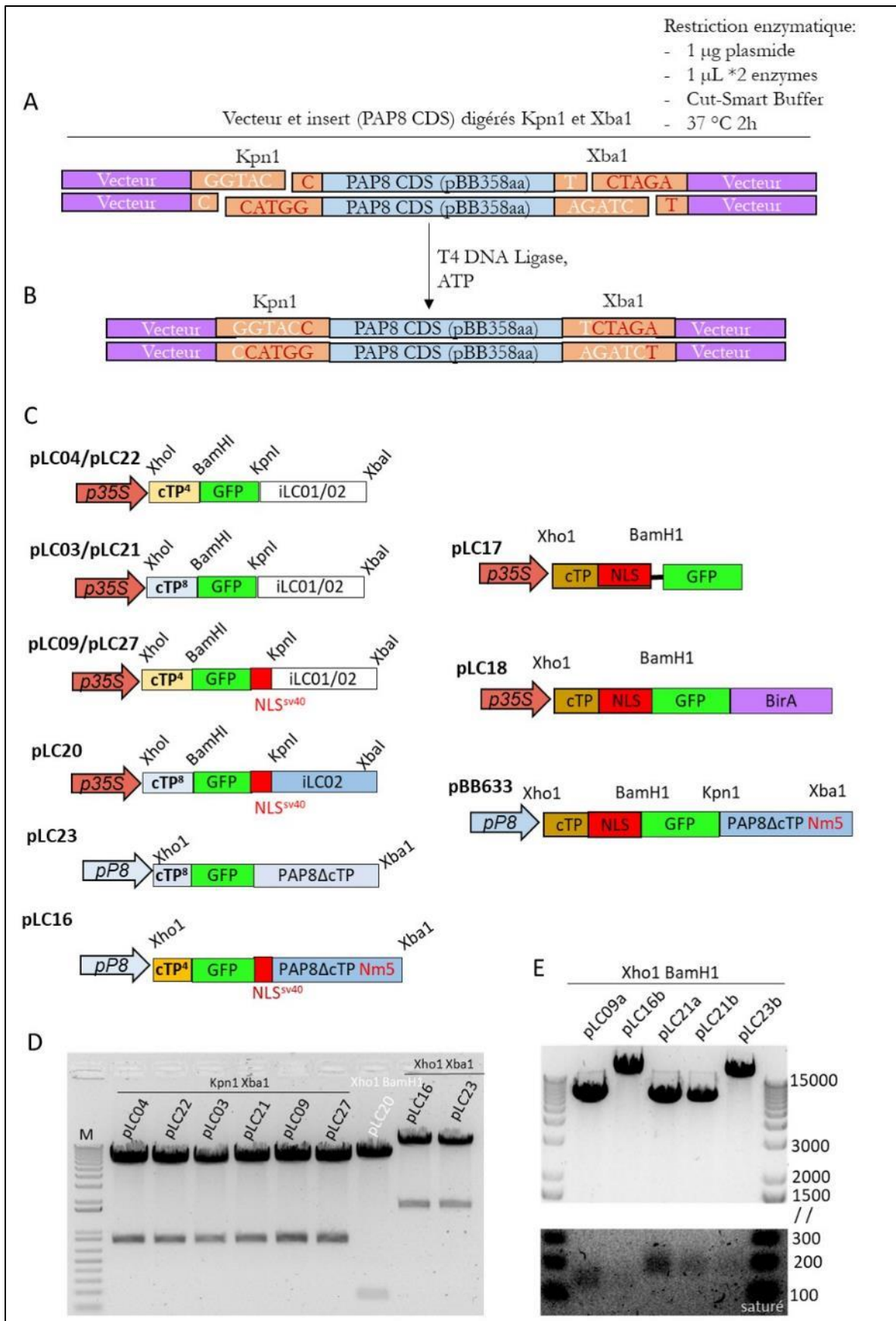


Figure 2 : Principe de clonage par restriction enzymatique utilisé pour générer les plasmides présentés en C. Ici sont représentés les clonages issus de pLC01. **A** : Après digestion enzymatique des plasmides dans les conditions indiqués à droite du schéma, les bandes correspondant au vecteur et à l'insert sont séparées sur gel puis purifiées. Comme ils ont tous deux été digérés par les mêmes enzymes, les extrémités s'assemblent par complémentarité de base. Aussi, comme les enzymes utilisées sont différentes, l'insert est orienté dans le vecteur. **B** La T4-DNA ligase est utilisée dans les conditions habituelles indiquées pour ligaturer les extrémités 5' et 3' de chaque brin d'ADN. **C** Schema des différentes constructions obtenues utilisables en biolistique (pP35s). Les constructions sous promoteur PAP8 (pP8) sont utilisables en biolistique et transformables dans les plantes par agrobacterium **D** : Produit de digestion enzymatiques montrant inserts et vecteurs initiaux, et **E**) pour illustrer la taille de la séquence codant pour le cTP prédite et utilisée

Trois vecteurs d'insertion sont fréquemment utilisés. pBB421 et pBB496 sont deux vecteurs d'insertions présentant le gène de résistance à la carb. Ils possèdent également le promoteur constitutif du virus de la mosaïque pCAMV35s flanqué des sites de restriction Sac1 et Xho1 (en 5' et 3' respectivement). Se situe ensuite soit le cTP de PAP4 dans pBB421, soit le cTP de PAP8 dans pBB496. En 3' de ces deux régions sont placés les sites de restriction BamH1. La GFP puis la BirA sont ensuite placées côte à côte et avec en 3' Kpn1 et Xba1 respectivement. Le vecteur d'insertion pBB599 pour lequel le NLS^{sv40} est ajouté est également sélectionné sur carb. Le vecteur d'insertion pBB389 est utilisé car sous promoteur PAP8, suffisant pour restaurer une expression normale du gène (Liebers et al., 2018) y est cloné et est en vecteur binaire, i.e. transformable chez la plante par agro-infiltration. Il contient d'ailleurs les gènes de résistance à la spectinomycine (antibiotique procaryotique) et à l'hygromycine (drogue eucaryotique). De la même manière, le vecteur d'insertion pBB612 peut être utilisé aux mêmes fins, mais en place du gène de résistance à l'hygromycine se trouve le système génétique permettant de sélectionner les graines sèches sur la fluorescence de leurs graines (système de sélection alligator).

BIOLISTIQUE

La localisation des protéines de fusion GFP générées par clonage sont vérifiées par biolistique dans l'épiderme de l'oignon.

Pour cela, 3µg du plasmide d'intérêt sont déposés sur 1.5 µg de bille d'or (*Sea Shell Technology*). En parallèle sont ajoutés 600 ng de pBB301 (p35s ::PAP10-DsRed), marqueur du TAC dans les plastes comme décrit dans (Liebers et al., 2020). Après binding, précipitation, et rinçage à l'éthanol, 0.5µg de billes d'or ainsi préparées sont déposées sur un film inséré dans un canon à particule. Le disque de rupture prévu dans le dispositif se rompt avec la pression qui augmente par mise sous vide, ce qui a pour effet de lancer à haute vitesse les billes décorées des plasmides d'intérêt dans le tissu épidermique de l'oignon.

Les échantillons ainsi transformés transitoirement sont laissés à température ambiante dans le noir entre 24 et 48 heures avant observation. Les zones tissulaires marquées sont d'abord sélectionnées sous loupe

binoculaire à fluorescence, puis la zone de l'épiderme est excisée au scalpel et pelée pour être montée sur lame et observée sous microscope optique à fluorescence.

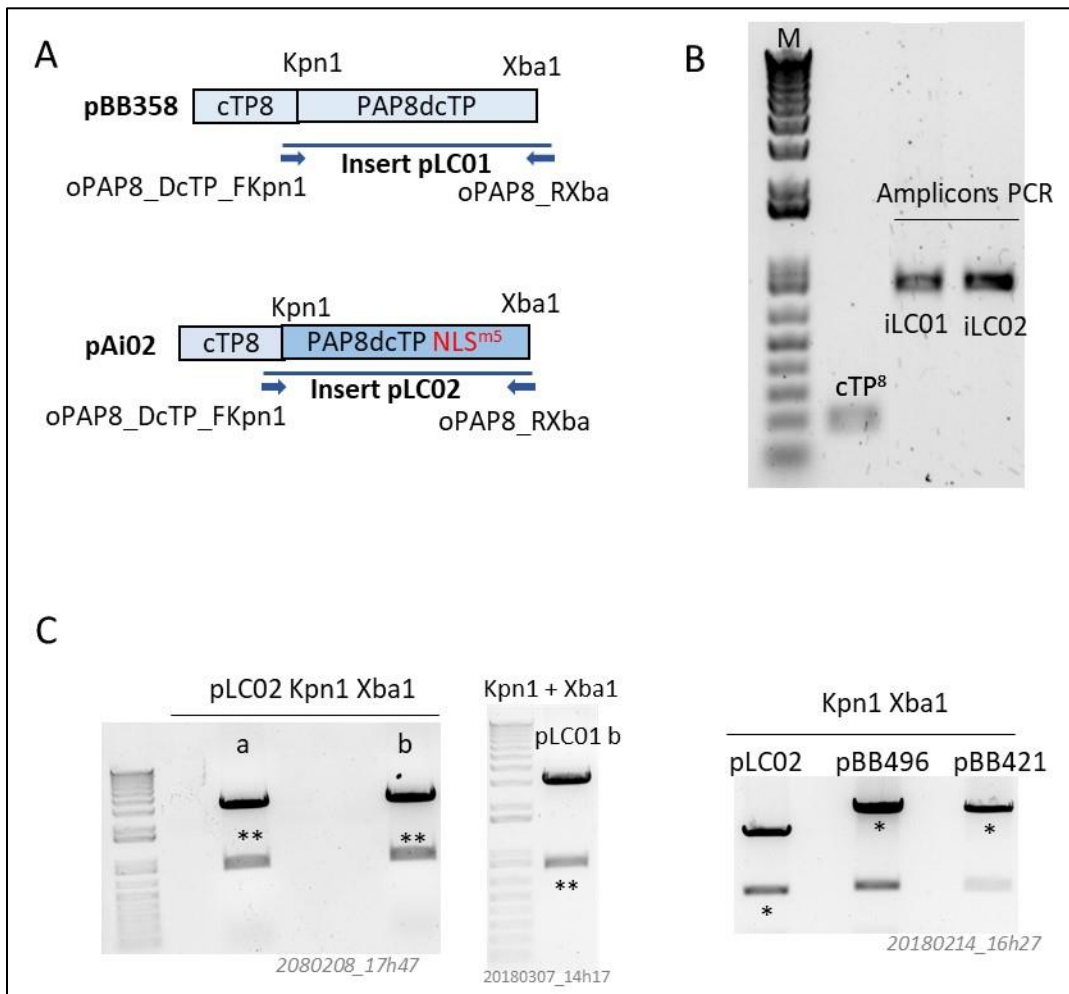


Figure 3 : Génération de pLC01 et pLC02 et clonages subséquents. A : Schéma des matrices et oligos utilisés pour générer les inserts de pLC01 et pLC02. **B :** Produit PCR après A-tailing correspondants et migration dans gel TAE1%. La taille du cTP de PAP8 est indiquée pour comparaison. **C :** Plasmides pLC01 et pLC02 double digérés Kpn1 Xba1 et séparés sur gel. Les bandes marquées d'une ** sont isolées et envoyées au séquençage pour vérification Est aussi montré un exemple de préparation aux clonages tel que montré en A, ici pLC03 et pLC04 à partir des vecteurs pBB496 et pBB421 respectivement. Les bandes marquées d'une * sont purifiées et mises en présence de T4 DNA-ligase.

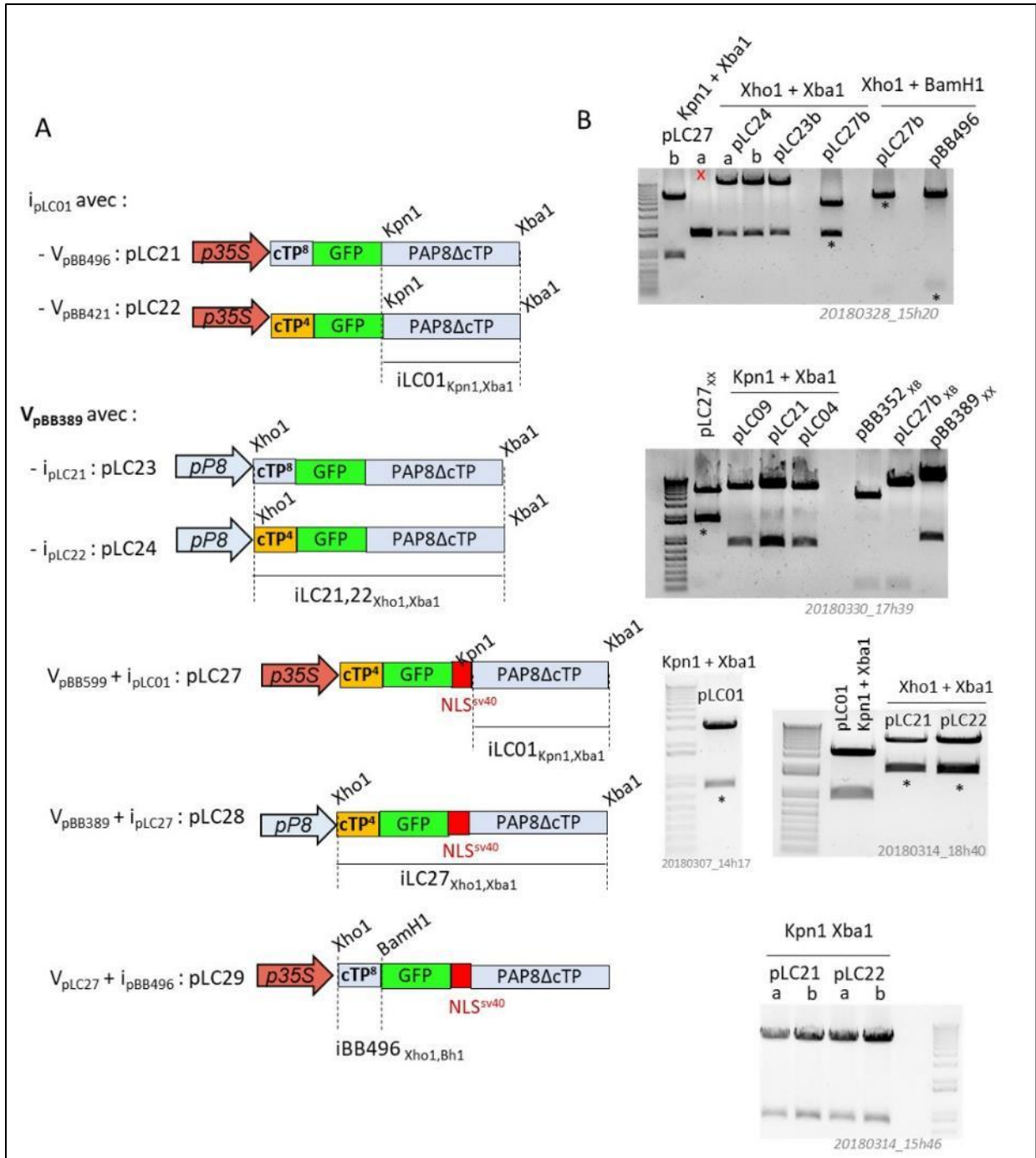


Figure 4 : Génération des plasmides utilisables en biolistique et chez la plante, générés à partir de pLC01. A : schéma des constructions générées à partir de pLC01. B : Produits de digestion des différents vecteurs et inserts tels qu'indiqué en A. Les bandes marquées d'une * correspondent aux inserts ou aux vecteurs utilisés après purification

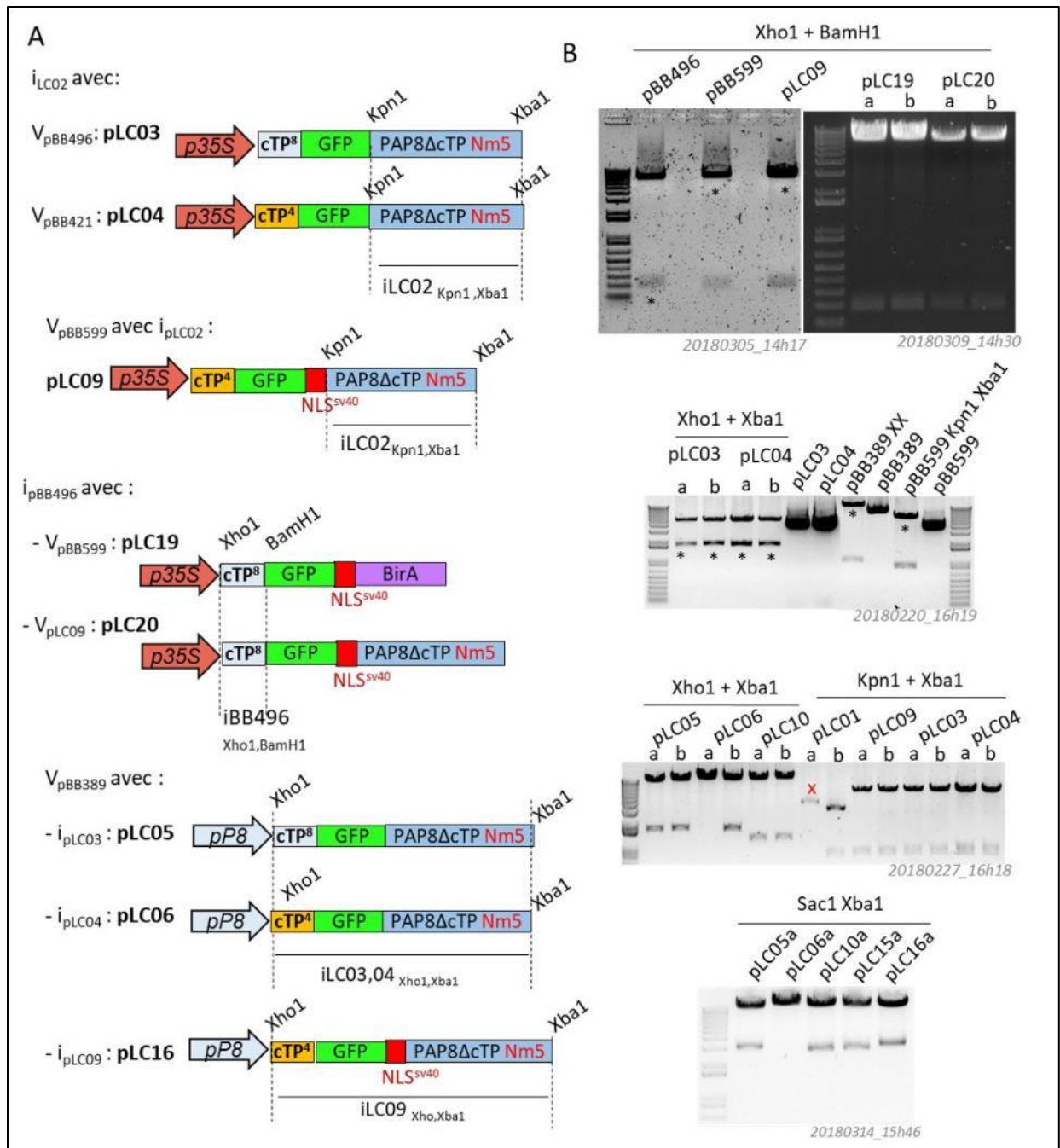


Figure 5 : Génération des plasmides utilisables en biolistique et chez la plante, générés à partir de pLC02. A : schéma des constructions générées à partir de pLC02. B : Produits de digestion des différents vecteurs et inserts tels qu'indiqué en A. Les bandes marquées d'une * correspondent aux inserts ou aux vecteurs utilisés après purification.

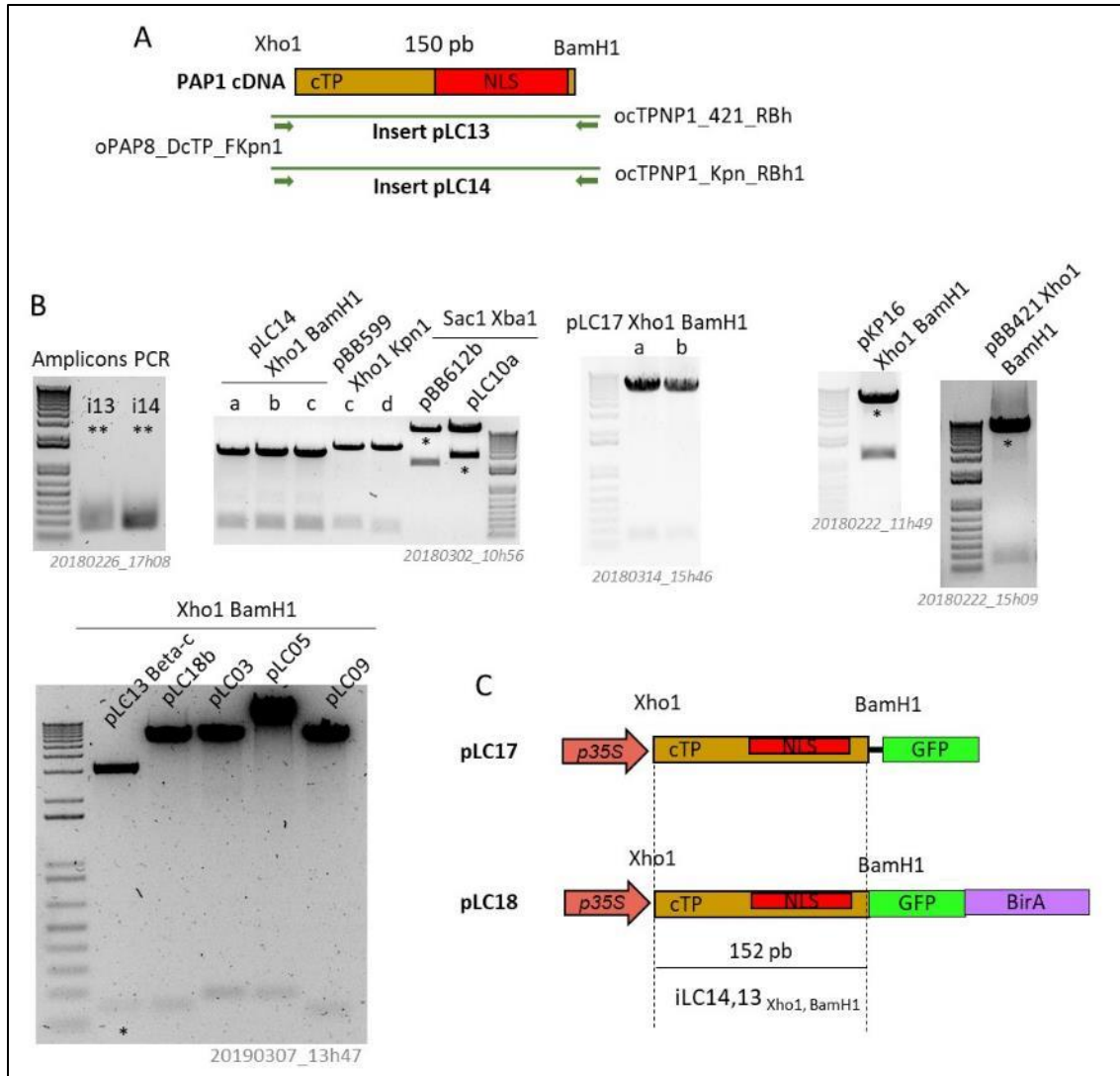


Figure 6 : Génération de pLC13 et pLC14 par TA-cloning et clonages par restriction enzymatique subséquents. A : Schéma des matrices et oligos utilisés pour générer les inserts de pLC13 et pLC14. **B :** Produits PCR après A-tailing correspondants et migration dans gel TAE1%. Les plasmides pLC13 et pLC14 double digérés Kpn1 Xba1 et séparés sur gel. Les bandes marquées d'une ** sont isolées et envoyées au séquençage pour vérification. Les gels pour générer pLC18 et pLC17 à partir des vecteurs pBB421 et pKP16 respectivement sont également montrés. Les bandes marquées d'une * sont purifiées et mises en présence de T4 DNA-ligase. **C :** Schéma des constructions utilisables en biolistique.

TRANSFORMATION STABLE CHEZ ARABIDOPSIS THALIANA ET OBTENTION DES TRANSFORMANTS PRIMAIRES

TRANSFORMATION STABLE D'ARABIDOPSIS THALIANA PAR FLORAL DIP (ADAPTE DE BECHTOLD ET AL., 2020)

100 ng du plasmide d'intérêt sont ajoutés à une culture liquide d'une souche électro-compétente d'Agrobacterium tumefaciens (souche GV3101/pMP90) soumise à un choc électrique de 1770 Volts

pendant 5 ms. Les bactéries ainsi transformées sont ensuite étalées sur milieu sélectif après une période de 3 heures sous agitation à 28°C en milieu riche (SOC medium). La rifampicine (50mg/mL) et la gentamycine (20mg/mL) sont ensuite utilisées pour maintenir la souche de départ, et la spectinomycine (50mg/mL) pour sélectionner les transformants (voir partie clonage). Après deux jours à 28°C, les boîtes sont raclées et les bactéries re-suspendues en milieu LB liquide avec antibiotiques de résistance. Après une nuit sous agitation à 28°C, les cultures sont suspendues et laissées sous agitation de sorte à obtenir une DO₆₀₀ comprise entre 1.8 et 2.4. Après élimination du milieu de culture par centrifugation à 3500 rpm pendant 30 mn, les culots sont re-suspendus dans le milieu d'infiltration 1/2 MS, 5% sucrose supplémenté de BAP (Benzylaminopurine) et de Silwet L-77. Des plantes présentant de nombreux bourgeons clos, et dont les siliques et fleurs ouvertes ont été coupées, sont mises en présence du milieu d'infiltration ainsi préparé pendant 4 mn, puis laissées en conditions humides et sombre pendant deux jours par ensachement complet des plantes. Les sachets sont ensuite enlevés et sont ensachées les hampes florales.

CULTURE IN VIVO & IN VITRO DES PLANTES

Les plantes sont ensuite cultivées en terre en chambre standard en condition de jours longs (16 heures jour, 8 heures nuit) à 23 °C, sous 80 µE d'intensité lumineuse jusqu'à maturité. Les graines sont récoltées un à deux mois plus tard après totale dessiccation. Celles-ci sont ensuite stérilisées en milieu liquide pendant 5 mn (eau de javel 6.5%, 0.02% Triton x-100) et rincées à l'eau, plantées sur milieu MS (1x Sels et vitamines du mélange Murashige and Skoog et MES), avec ou sans sucrose 1%, où le pH est équilibré à 5.7 avec du KOH pour une culture *in vitro*. Les graines ainsi plantées sont stratifiées entre 2 à 3 jours à 4°C dans le noir enveloppé de plusieurs couches d'aluminium. Les boîtes sont ensuite cultivées *in vitro* à 23°C sous lumière continue, et l'intensité lumineuse et son spectre réglés en fonction des conditions expérimentales requises.

FOND GENETIQUE

Sauf mention contraire, toutes les plantes analysées ici sont d'écotype Columbia-0 (SALK-6000). Le knock-out *pap8-1* est une mutation récessive, menant à un phénotype [A] à l'état homozygote. On transforme donc toujours des plantes issues de parents hétérozygotes *pap8-1/+*. Comme la mutation suit des proportions mendéliennes, la descendance présentera 25% [A] et 75% [wt], dont 2/3 d'hétérozygotes et 1/3 (soit 25% au total) de sauvages ne possédant plus l'allèle muté. De même, le fond homozygote *pap8-1/pap8-1* Nm5 [DG] n'est pas utilisé en raison de la lenteur de sa croissance, et on lui préférera un fond [wt] hétérozygote *pap8-1/+* PAP^{B^{NLS}m5}. Enfin les plantes *pap8-1/+* PBG sont reprises des travaux ayant servi à la publication (Liebers et al., 2020), et les KOs PAP3 et PAP11 transformées avec PBG correspondent aux lignées (déjà disponibles au laboratoire) F52-10D et F51-20A respectivement.

SELECTION EN T1 ET CONDITIONS DE CROISSANCE

Peu importe le transgène utilisé, étant donné le faible taux de transformants primaires (T1) (0.1 à 2%) et la ségrégation mendélienne de l'allèle *pap8-1*, ce sont la plupart du temps des plantes T1 de phénotype [wt] qui sont sélectionnées et repiquées. En fonction du plasmide utilisé et du marqueur de sélection employé, plusieurs méthodes de sélection sont utilisées en première génération (T1).

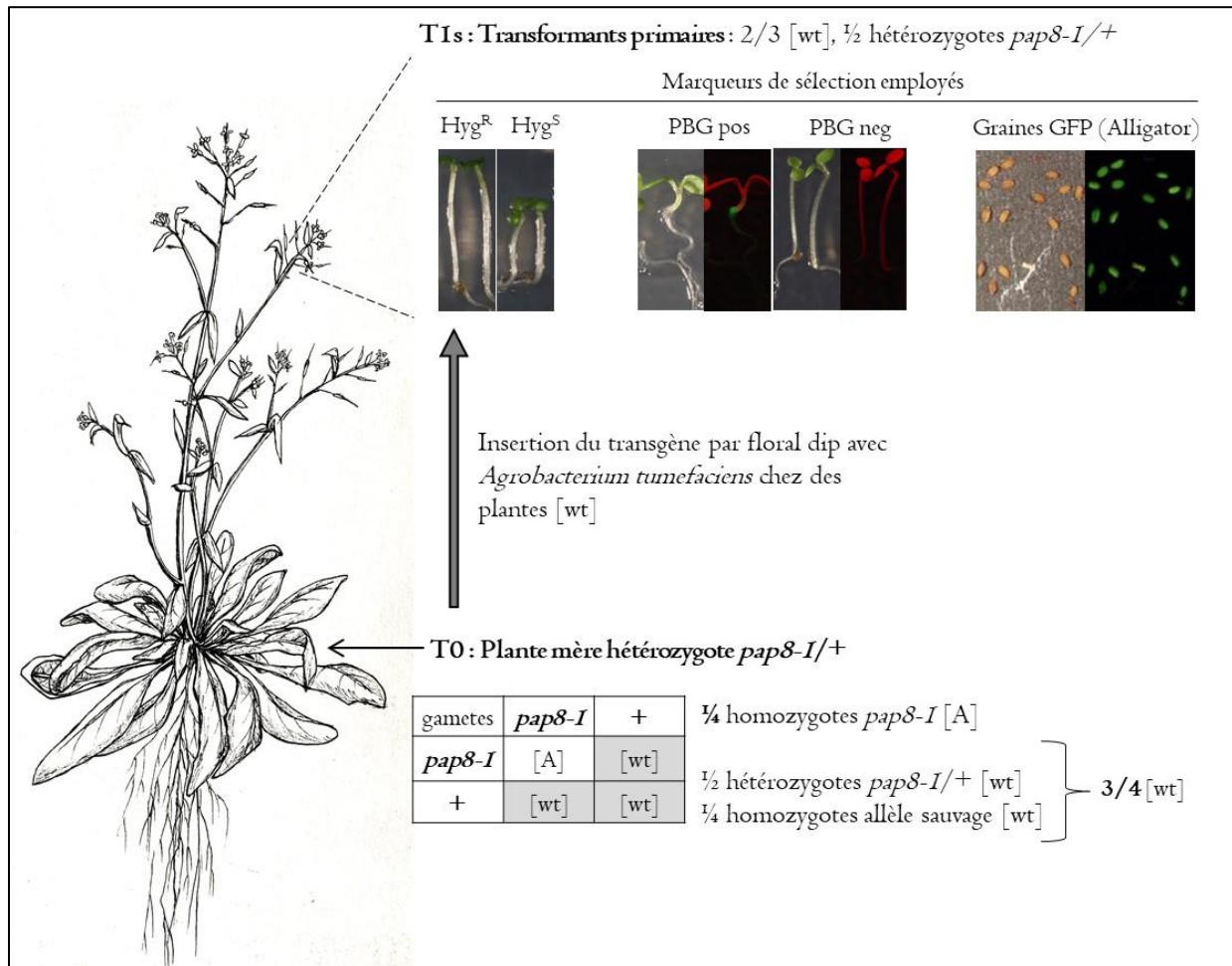


Figure 7 : Étapes de sélection en T1 utilisées pour l'étude.

La plante mère T0 est issu d'un parent hétérozygote ségrégant la mutation récessive et sporophytique létale *pap8-1*, dont la ségrégation des allèles et des phénotypes correspondants est indiquée à côté de la rosette. Après transformation par agrobacterium des bourgeons floraux de cette plante et maturation des graines, celles-ci sont plantées de sorte à isoler la progéniture ayant reçu le transgène (T1, selon différents critères en fonction du marqueur de sélection employé). Les photos présentées ici sont prises sous loupe binoculaire équipée d'un filtre GFP. Se référer au corps de texte pour plus de détails.

Lorsque le plasmide employé pour transformation porte le gène *hptII* (résistance à l'hygromycine), les graines issues de la plante mère transformée (T0) sont plantées sur milieu MS, sucrose 1%, 30µg/mL Hygromycine (2000x), et sont transférées sous faible intensité lumineuse (9 µE) rouge (660 nm) et

continue pendant une semaine. L'hygromycine étant un inhibiteur de synthèse protéique, les plantules sensibles à la molécule ne parviennent pas à s'étioler dans ces conditions, contrairement aux transformants primaires qui y sont insensibles. Afin de vérifier l'élongation des vrais positifs en T1, sont testés en parallèle des graines *pap8-1/+* non transformées, à la fois sur milieu non sélectif et sur hygromycine. Les plantes sélectionnées sont ensuite repiquées sur terre et transférées en chambre de culture en conditions jour longs, comme indiqué plus haut.

Les plantules issues de T0 transformée avec 35s::PhyB-GFP (PBG) sont soumises aux mêmes conditions de croissance que les plantules sélectionnées sur hygromycine, mais sont plantées sur milieu non sélectif. Les T1s sont ici sélectionnées sur la fluorescence et la taille de leurs hypocotyles sous loupe binoculaire équipée d'un filtre GFP (longueur d'onde d'excitation comprise entre 395 et 475 nm), puis repiquées en pleine terre.

Enfin, lorsque les graines portent le système de sélection alligator (marque à la GFP une protéine de réserve des graines), les graines sèches issues de T0 sont triées sous loupe binoculaire sur critère de fluorescence. Afin d'éliminer les faux négatifs, un second tri peut être effectué 24h après stratification.

GENOTYPAGE EN T1 ET T2

Après avoir atteint le stade rosette, les plantes sélectionnées sont génotypées après une première étape d'extraction rapide d'ADN génomique (ADNg). A cet effet, environ un centimètre carré de feuille est prélevé individuellement pour chaque plante et broyée à l'aide d'un piston, puis re-suspendu dans du tampon Edwards (TrisHCl 1M, SDS 20%, 5M NaCl, 0.5M EDTA). Après centrifugation, l'ADN présent dans le surnageant précipite à volume équivalent dans de l'isopropanol. Une nouvelle étape de centrifugation permet de culoter l'ADN, alors rincé avec de l'éthanol 80%. Lorsque les tubes sont secs, le culot d'ADN est resuspendu dans 50µL d'eau.

Un génotypage par PCR des T1s est ensuite effectué. Deux couples de primers dans des mélanges réactionnels différents sont utilisés afin de tester l'homozygotie de l'allèle *pap8-1*. Le couple oP8_RTpF, oP8i2R détermine la présence de l'allèle sauvage, et le couple oP8_RTpF, oLBb1.3 l'allèle muté. De fait, chez un homozygote on n'observe un amplicon que pour un couple, tandis qu'on en observe un pour les deux couples chez un hétérozygote. La présence du transgène est ensuite déterminée par un couple de primers qui lui est spécifique.

TEST DE COMPLEMENTATION FONCTIONNELLE

Si la transformation de la plante avait pour but de tester la fonctionnalité du transgène *in planta*, alors des graines T2s issues des T1 double hétérozygotes identifiés par PCR sont plantés sur milieu MS sucrose 1%. Après une stratification de deux à trois jours, les plantules germent sous lumière continue d'intensité modérée (30µE) afin de ménager les plantules albinos, et après une à deux semaines, la ségrégation des phénotypes, sur un minimum de 150 et jusqu'à 500 plantes T2, est analysé par lignée T1. Afin de ne pas manquer les individus albinos plus chétifs, les plantes sont épilées une à une de la boîte à la pince.

En fonction du taux d'albinos compté et connaissant le génotype de la T1, on pourra alors déterminer si le transgène inséré dans le génome de la plante est fonctionnel ou pas.

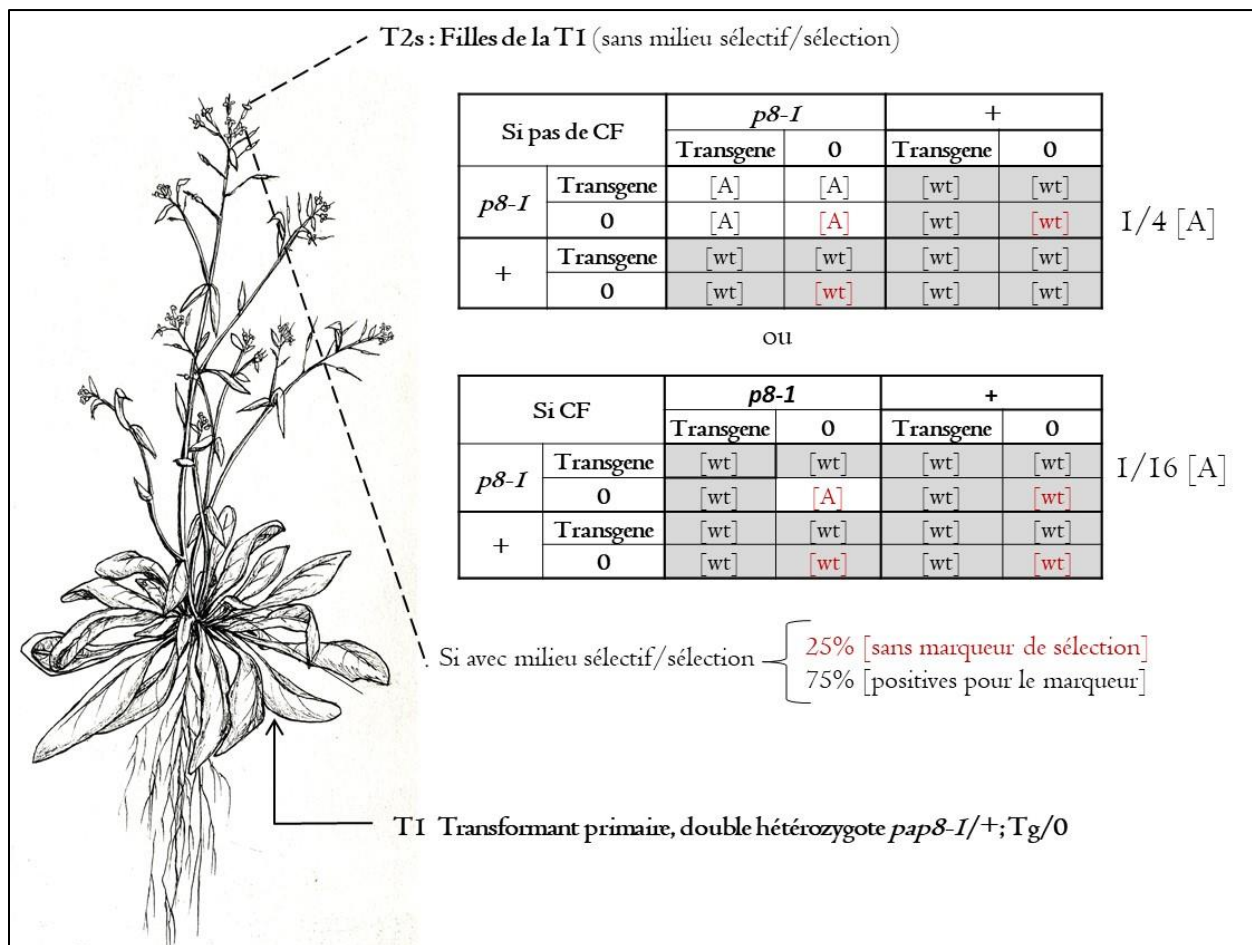


Figure 8 : Analyse de complémentation fonctionnelle par ségrégation des phénotypes en T2.

Après sélection (tel qu'illustré figure 7), et confirmation de la présence du transgène en T1 par génotypage PCR, les graines issues des différentes lignées sont plantées sur milieu non sélectif pour comptage des phénotypes, permettant de déterminer le succès ou l'échec de la complémentation fonctionnelle (CF). Un tableau de gamètes en T2 est présenté pour les deux conditions. Les T2s peuvent par ailleurs être plantées sur milieu sélectif (ou avec sélection) si l'on souhaite s'assurer du taux d'insertion du transgène (en rouge).

En effet, s'il n'y a pas de complémentation fonctionnelle, alors la plante mère continuera de ségréger $\frac{1}{4}$ d'[A] à la génération suivante, car le transgène n'aura pas sauvé la mutation *pap8-1* à l'état homozygote. En revanche, s'il y a complémentation fonctionnelle, la T1 donnera $\frac{1}{16}$ d'[A] en T2, correspondant au quart du quart homozygote *pap8-1* qui n'a pas reçu le transgène.

Afin d'éviter d'éventuels problèmes d'insertions multiples, plusieurs filles de T1 (lignées) sont comptées.

Le taux d'insertion du transgène est également vérifié en T2. Comme le marqueur de résistance ségrége dans des conditions mendéliennes en cas d'insertion unique, et que la résistance est un caractère dominant, on peut déterminer comment est inséré le transgène dans les lignées T1s en comptant le nombre de plantes positives en T2. Si les plantes sont sélectionnées sur hygromycine, alors on vérifie que 75% des T2 sont résistantes à l'hygromycine tel que précédemment décrit. De même, on vérifiera que 75% des graines des T1s sont fluorescentes pour une section sur alligator, et que 75% des plantules en T2 ont des collets fluorescents si transformées avec PBG.

Sur ce principe, si on souhaite fixer le transgène à l'état homozygote, alors on sélectionne les T2 en fonction de la ségrégation du marqueur de sélection en T3, où l'on cherche 100 % de plantules marquées. Il faudra toutefois s'assurer que le KO de fond ségrége encore (ou fixé, dans le cas de complémentations fonctionnelles).

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE CHEZ LA PLANTE

GENOTYPES EMPLOYES ET CONDITIONS DE CULTURES

Pour déterminer le taux d'accumulation des transcrits dans les différents fonds génétiques testés, on choisit soit un fond hétérozygote *pap8-1/+* [A], soit un fond homozygote *pap8-1* pour lequel le transgène Nm5 est fixé, et dont la progéniture sera donc [DG] à 100%. Si un transgène est ajouté à ces deux fonds, on choisit une lignée T2 pour laquelle les T3s ne ségrégent plus le marqueur de sélection correspondant.

Les graines sont ensuite plantées sur milieu MS et stratifiées pendant deux à 3 jours à 4°C, puis mises à germer soit sous lumière continue blanche (30 μ E), soit sous lumière rouge continue (10 μ E), soit dans le noir pendant 3 jours. Dans ces deux dernières conditions, l'hypocotyle atteint une taille d'environ 1 cm. Si les plantules ont poussé dans le noir, alors le prélèvement des échantillons a lieu en chambre noire sous lumière dont le pic d'émission est proche du rouge lointain (760 nm), longueur d'onde pour laquelle les phytochromes s'éteignent. Une journée supplémentaire de lumière continue blanche peut également être appliquée à ces mêmes échantillons avant récolte. Chaque génotype est récolté au minimum en duplicata.

RNA EXTRACTION ET SYNTHÈSE DE CDNA

100 à 200 mg de plantules sont ainsi récoltés et instantanément congelés dans de l'azote liquide, puis broyés avec un mortier et Pilon dans l'azote. Le broyat est re suspendu dans un tampon de lyse RLT du kit d'extraction d'ARN Quiagen RNeasy® *plants*, supplémenté de B-mercaptoéthanol 1000x puis transféré dans les colonnes violettes du kit. Après centrifugation, le surnageant débarrassé des débris cellulaires est déposé sur les colonnes roses du kit, qui isolent cette fois ci les ARNs totaux. Après deux lavages dans le les tampons adéquats du kit, les ARNs purifiés présents dans les colonnes sont élués avec de l'eau et dans la glace pendant une heure.

5µL sont ensuite déposé sur gel 1% TAE afin de vérifier leur intégrité et la qualité de la préparation. Le rapport d'absorbance A260/280 et A260/A230 ainsi que leurs concentrations sont également déterminés par mesure nanodrop.

Le volume à prélever pour obtenir 200ng d'ARN est ainsi déterminé et traité à la ezDNase, tel que préconisé par le kit superscript-IV™ (Invitrogen). Ce même kit est ensuite utilisé pour la synthèse de cDNAs à partir des ARNs traités.

SEMI qPCR

Une première amplification par PCR sur le gène de ménage EF1a est effectuée avec le couple de primers oEF1aF, oEF1aR. Comme ils se font face sur deux exons adjacents, ils permettent également de vérifier l'absence de bande génomique, i.e sans intron après dépôt et migration sur gel. Il en va de même pour les primers amplifiant GLK1 et GLK2 en semi qPCR (oGLK1_F, oGLK1_R et oGLK2_F, oGLK2_R respectivement). En revanche, les couples de primers utilisés pour amplifier PAP8 (oP8_F1s, oP8_F97s, oP8E3R ou oP8rtp_F, oP8rtp_R) ne permettent pas de visualiser les introns des bandes génomiques dans nos conditions d'élongation, car l'ensemble forme un amplicon trop long pour nos temps d'élongation de 20 sec. Les nombres de cycles employés pour chaque gène sont indiqués à côté des gels des RT-PCR correspondants. La température d'annealing employée pour chacun des couples est de 52°C, pendant 20 secondes. Ces différents couples sont testés en semi qPCR après avoir déterminé les volumes de cDNAs à prélever pour obtenir un signal EF1a équivalent homogène entre chaque échantillon.

L'intensité des bandes, déposé à volume égal sur gel 1% TAE, est ensuite déterminé par ImageJ puis rapporté au signal EF1a amplifié dans le même fond génétique. Celui-ci peut ensuite être rapporté au fond génétique de référence, par exemple Col0 lumière.

qPCR

Après avoir équilibré les cDNAs sur EF1alpha comme décrit précédemment, ceux-ci sont individuellement dilués 10 à 20x, puis une gamme est réalisée sur le regroupement de ceux-ci. L'ensemble est déposé sur une plaque qPCR tel que présenté ci-dessous, avec systématiquement 3 couples de primers différents et un maximum de 6 échantillons testés. De fait, l'efficacité des primers est calculée pour chaque plaque, et inclue dans le calcul des Ct des 3 gènes testés dans 6 conditions, en triplicata sur la plaque. Enfin, deux puits par mélange d'oligos sont réservés pour témoin négatif, dans lesquels sont ajoutés 2µL d'eau à la place de cDNA.

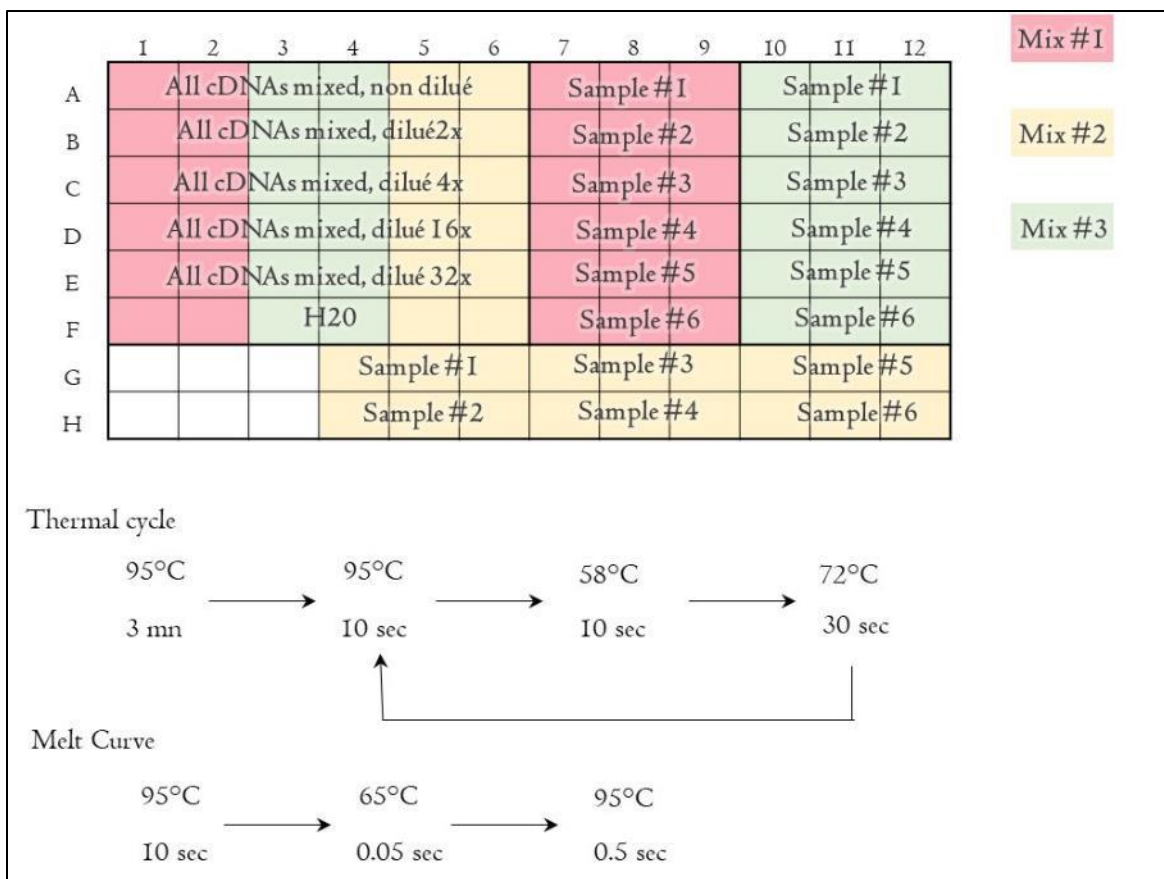


Figure 9 : Plan de plaque typique employé en qPCR. . Trois mélanges réactionnels (mixs) correspondant à un couple d'oligos sont disposés sur la plaque. Chaque échantillon est testé en triplicata sauf pour les gammes qui le sont en duplicata. De fait, efficacité et Ct sont calculés pour chaque plaque. Un exemple de cycle thermal utilisé ainsi que de melt-curve en fin de PCR est indiqué.

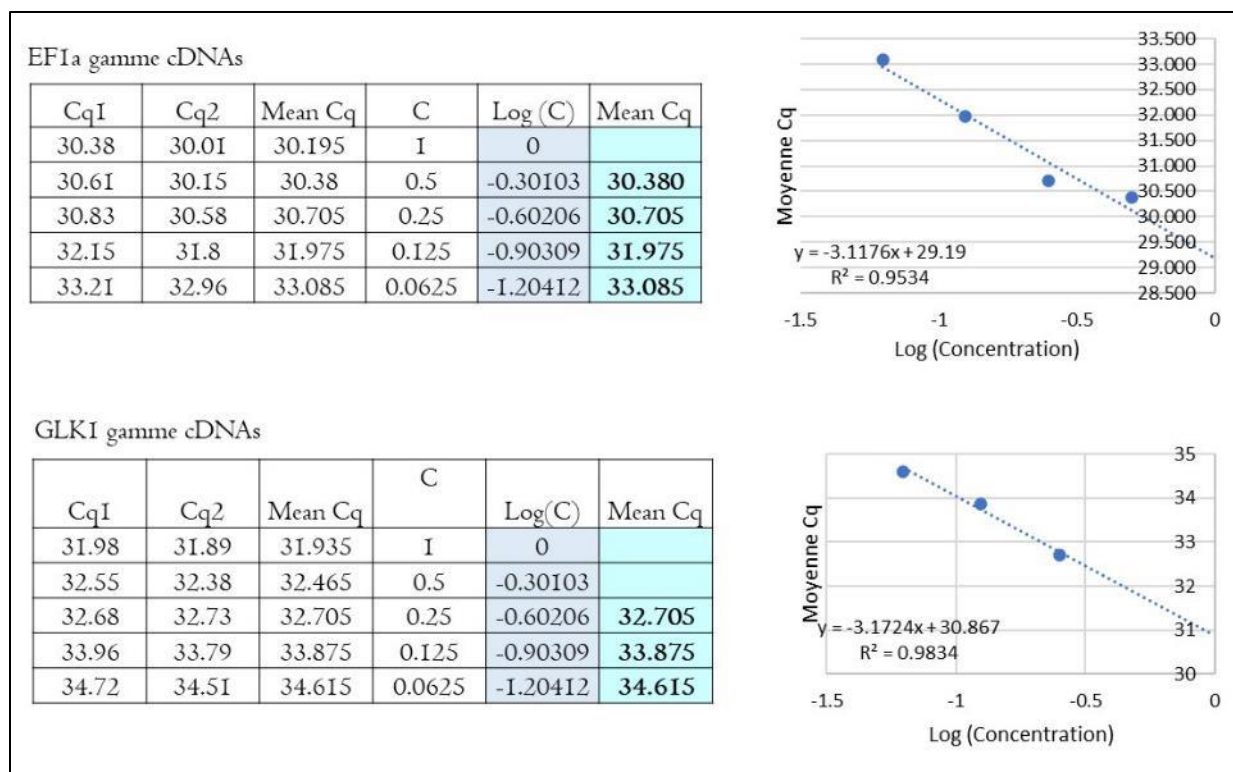


Figure 10 : Méthode de détermination d'efficacité de primers et des Ct des échantillons. Une gamme de dilution regroupant tous les cDNAs est utilisée (dilution de 2 en 2). Les valeurs des Ct sont reportées en fonction du log de la concentration. Si des points aberrants existent, ceux-ci sont éliminés si l'ensemble est par ailleurs cohérent aux autres plaques testées dans les mêmes conditions et pour les mêmes échantillons. Le coefficient directeur de la courbe indique l'efficacité des primers, qui doit être proche de 2 (d'après le canon du doublement exponentiel en PCR). S'il est impossible d'obtenir une efficacité de primer cohérente, alors les conditions PCR sont optimisées

Le mélange réactionnel de 10 μ L est composé de 1.2 μ L du couple d'oligos choisi, 5 μ L SYBR Green (ThermoFisher), et de 2 μ L cDNA 20x. La plaque ainsi préparée est analysée par qPCR (Thermocycler BioRad T100™), généralement selon le cycle thermal indiqué ici. Une melt-curve en fin de cycle est également programmée afin de vérifier la qualité des amplicons générés par le couple de primer utilisé.

L'efficacité des primers est ensuite calculé par la formule Efficacité (E) = $10^{(-1/(pente))}$; où la pente correspond au coefficient directeur de la courbe Mean Cq = f[log(C)]. Dans cet exemple, on obtient pour EF1alpha une efficacité de 2.09 Et pour GLK1 de 2.06. Notez que les points aberrants (les plus concentrés) sont ici enlevés dans le calcul de l'efficacité si ceux-ci diminuent la linéarité de la courbe, notamment vu avec le coefficient R qui doit être proche de 1.

Si ces paramètres sont validés, alors la valeur moyenne des Ct de l'échantillon considéré est rapporté à la moyenne des Cts de EF1a sur ce même échantillon. L'efficacité des primers, qui doit être proche de 2 est prise en compte, et l'expression du gène d'intérêt (GOI) normalisé à EF1a est calculée avec la formule :

$$dCt = E_{GOI} (Ct_{GOI} - Ct_{EFI\alpha})$$

L'opération est étendue à chacun des échantillons pour obtenir les Cts relatifs de chacun des gènes étudiés. Ceux-ci sont alors recoupsés à la valeur de la condition de référence, par exemple Col0 Light. Plus le Ct d'un gène normalisé est petit, plus celui-ci est exprimé. La liste des primers utilisés est disponible dans le matériel supplémentaire relatif à la publications Liebers et al., 2020.

QUANTIFICATION CHLOROPHYLLE

L'extraction de chlorophylle d'environ 100 mg de plantules est réalisé après broyage à l'azote et re-suspension dans une solution d'acétone 80% (dans tampon 1M Tris-HCl, pH 7), vortexés, et les débris enlevés après 5mn de centrifugation à 13200 rpm à 4°C. Le spectre d'émission complet est relevé (de 400 à 700 nm) par spectrophotométrie (Safas SP2000V Monaco), et les échantillons laissés à 4°C entre deux mesures. Les teneurs en chlorophylle a, b et totales sont ensuite rapportées aux masses prélevées après avoir été calculées telles que :

$$\text{Chlorophylle a} = 12.25 \times A_{664} - 2.55 \times A_{647}$$

$$\text{Chlorophylle b} = 20.31 \times A_{647} - 4.91 \times A_{664}$$

$$\text{Chlorophylle a+b} = 17.76 \times A_{647} - 7.34 \times A_{664}$$

MICROSCOPE A FLUORESCENCE

Les graines des plantes identifiées comme exprimant PBG et ségrégant le KO PAP sont étudiées après 3 jours de croissance sous lumière rouge (660 nm).

Les plantes poussent verticalement en frôlant la gélose car les boites carrées sont disposées verticalement sous la lampe. Une photo est réalisée après 3 jours et le taille des hypocotyles est directement mesurée sur imageJ. Une photo d'illustration avec deux plantules représentatives par condition est également prise sous loupe binoculaire, avec et sans filtre GFP.

Les plantules ensuite sélectionnées sont montées sur lame sans fixation préalable, et observées sous microscope à épifluorescence Nikon Axioscope A1, équipé d'une caméra AxioCam MRc. L'émission de fluorescence de la GFP après excitation à 488nm, préférentiellement sous objectif à fort grossissement

(60x immersion à l'huile), sinon à l'objectif 40x (immersion à l'eau), et les images acquises avec le logiciel Nikon Zen softwares.

Des plantules n'exprimant pas la GFP sont utilisées comme contrôle négatif. Les noyaux des plantules positives sont photographiés (Zeiss et Zen softwares), et la taille des photocorps déterminée sur ImageJ et rapportée aux valeurs publiés (Chen et al., 2010), tel que pour (Liebers, Gillet, et al., 2020). Ces opérations peuvent s'effectuer dès la T1.

MICROSCOPIE CONFOCALE

Après 3 jours de croissance sur milieu MS dans le noir, les plantes transformées sont observées sans fixation préalable sous microscope confocal (Zeiss instruments, LSM880, logiciel d'acquisition et de traitement des images Zen). La GFP est excitée par un laser à longueur d'onde 488 nm, et 1.41 Airy units, correspondant à des sections de 1µm. Comme l'expression de la fusion protéique sous promoteur endogène PAP8 est faibles, les images sont prises avec un gain de 800. L'autofluorescence de la chlorophylle est mesurée avec un gain de 700 après excitation à une longueur d'onde de 633nm.

GUS ET INCLUSION DANS UN FOND MUTANT HYS

Des plantules exprimant la construction pP8::GUS sont récupérées après 3 jours de croissance à l'obscurité et fixées dans l'acétone 90 % dans le noir. Les plantules de ces boîtes sont ensuite transférées 4 et 24 heures sous lumière blanche à 90 µE d'intensité lumineuse. Les plantules sont ensuite rincées dans la solution GUS 4X sans réactifs, d'abord sans puis avec ferri-ferro (NaPO_4 1M, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 100mM, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 100mM, Triton x-100 10%, EDTA 0.5mM, pH 7). Les plantules sont ensuite immergées dans la solution GUS avec réactif (X-GLUC 2mM, Gold Biotechnology, dans DMSO), et la formation de bulle d'air est évitée par mise sous vide 10 mn. Après rupture du vide, les plantes incubent à 37°C dans la solution GUS avec réactif, puis rincées avec des bains successifs d'éthanol, de 15 à 95% (et pas de 15 à 30), pendant 15 mn.

Par bains successif d'éthanol, les échantillons reviennent dans 50% d'éthanol avant d'être immergés 15 mn dans le bain de fixation (50% EtOH, 5% acide acétique, 3.7% Formaldéhyde). Les échantillons sont ensuite rincés dans des bains d'éthanol à 50% qui remontent successivement jusqu'à 100%. Le dernier bain d'Ethanol est supplémenté d'éosine 0.1% afin de visualiser les tissus lors des prochaines étapes de coupe, mais celui-ci est de nouveau rincé de sorte à ne pas saturer les tissus d'une coloration autre que la réaction de GUS.

Des bains successifs dans l'histoclear sont ensuite effectués (25, 50, 75, et 100 % histoclear, par ailleurs dans EtOH). Des pastilles de paraplaste sont ensuite ajoutés et les échantillons incubés à 42°C jusqu'à ce

que la cire soit dissoute. Celle-ci est alors enlevée et renouvelée deux à trois fois de sorte à éliminer l'histoclear. Les échantillons ainsi préparés sont déposés dans des contenants adéquats, et les échantillons pris dans la cire taillés après refroidissement. Ceux-ci sont découpés longitudinalement ou transversalement au microtome, puis déposés sur lame tiède pour assurer la prise du ruban. Les lames sont ensuite déposées dans des bains successifs d'histoclear de concentration croissante afin de solubiliser la paraffine. L'histoclear est à son tour rincé par bains successifs d'éthanol, de concentration décroissante, puis les lames sont déposées dans un dernier bain d'eau. Après séchage et dépôt d'une goutte de glycérol 25%, les lamelles sont ensuite déposées et scellées au vernis avant observation au microscope optique.

Notez que les résultats ne sont pas montrés dans le présent manuscrit, car aucune différence n'était visible entre les deux lignées KOs hy5 (cz-71, écotype Landsberg Erecta) et les lignées contrôle pP8 ::GUS en fond sauvage (écotype Columbia 0).

AUTRES CONTRIBUTIONS PENDANT LE DOCTORAT



ENSEIGNEMENT

40 Heures MEP202, Travaux pratiques de physiologie végétale aux premières années de licence sciences de la vie à l'Université Grenoble Alpes (Responsable UE : Rolland Douzet)

34 Heures BIO 201 : Travaux dirigés de biologie cellulaire générale aux premières années de licence sciences de la vie à l'Université Grenoble Alpes (Responsable UE : Françoise Cornillon)

12 Heures BIO 402 : Travaux dirigés et travaux pratiques de biologie végétale aux deuxièmes années de licence sciences de la vie à l'Université Grenoble Alpes (Responsable UE : Olivier Lerouxel)

COMMUNICATIONS ORALES

Poster: Nuclear-encoded PAP8 protein as new coordinator of chloroplast biogenesis during plant development. Prix du meilleur poster à la conférence *Jacques Monod* d'octobre 2019 :*Rétrograde Signaling*, à Roscoff, France.

DIFFUSION D'IDÉES

Création d'un workshop au laboratoire : 'Science for dummies' pour les Etudiants et jeunes ITAs du LPCV (Laboratoire de physiologie cellulaire et végétale), avec le chaleureux soutien de la direction

Représentante du personnel non permanent de l'Institut INRAE, Grenoble, Juin 2021 – Décembre 2021

Représentante du personnel non-permanent au LPCV, Juillet 2019 – Décembre 2021

ILLUSTRATIONS

Participation picturale au commentaire paru dans la revue *New Phytologist* : « *WRKY-ing in the light* » (Demarsy, 2022)

Toutes les figures et autres peintures de ce présent document

Projet pictural et narratif basé sur la poésie du fonctionnement d'une cellule végétale. Pour le moment personnel, mais je l'espère bientôt publié sous forme de livre

REMERCIEMENTS



Cet ouvrage vient certes très modestement alimenter la vaste Bibliothèque du savoir, mais sa réalisation a eu à mon échelle (si petite !) un tel impact qu'il serait impensable de ne pas remercier ceux qui m'ont accompagné dans cette folle aventure.

D'abord Robert. Je sais que ma naïveté et spontanéité nous auront parfois joué quelques tours, et je ne sais pas comment vous remercier d'avoir quand même réussi à me guider tout en me laissant libre. Je suis très heureuse d'avoir passé ces quelques années au PCV en votre compagnie, où je n'oublierai pas votre gentillesse ni celle de Christel. D'ailleurs tu as toute ma gratitude pour ta patience et ton empathie. Je te l'ai déjà dit plusieurs fois, tu as aussi toute mon admiration !

Bien sûr je remercie aussi chaleureusement les membres de mon comité de suivi individuel de thèse, qui ont su briller tant sur la science que par leur grande intelligence émotionnelle (sans laquelle la poursuite de ces travaux m'aurait été bien ardue). C'est donc avec une immense gratitude pour vous, Claude, Gabrielle, et Fredy, que je fini ce cycle d'études.

Christel et Kateryna, merci de m'avoir appris quelques ficelles d'histologie, clairement une de mes manip préférées. Et merci à Morgane et Seb de m'avoir aidé avec la microscopie confocale, j'ai beaucoup appris avec vous. Je vous remercie sincèrement pour ces précieux coups de main.

FX je chante tes louanges quotidiennement. C'était très formateur et un honneur de travailler à tes côtés, et je te remercie sincèrement d'avoir toujours été honnête et bienveillant avec moi. Thomas, I thank you very much to have put your trust in me for the M2 internship. Most of all, you were always insisting on the mysteries and hidden beauties of the subject with such enthusiasm, that it has been truly inspiring for me. And for that you have all my gratefulness, sincerely.

Marie et Fabien, vous le savez déjà mais vous avez toute mon affection et je vous souhaite autant de bonheur dans votre vie que vous faites preuve d'humanité. Et puis de manière générale, merci à l'équipe de m'avoir laissé évoluer en toute liberté et d'avoir laissé trainer un bazar sans nom.

Puis comment ne pas remercier certains des professeurs décisifs à ma scolarité et sans lesquels cela ferait bien longtemps que ma vie serait tout autre ? Jamais je ne vous oublierai, vous qui avez aiguisé mon regard et tissé avec moi les fils de mon destin.

Ilya, sans toi je n'aurais jamais su conserver le peu de confiance en moi nécessaire à cette vie de sciences. Comme j'ai de la chance d'avoir été une de tes élèves ! Merci encore à toi et à Monsieur Rhabi de m'avoir transmis cet amour de la science qui ne m'a plus jamais quitté ensuite. Aurélien tu m'a tellement aidé, ne serait-ce que par la poudre d'Aur qui te nimbe tout entier de bienveillance. Depuis toutes ces années tu es et restera toujours un modèle en mon cœur, où je conserve précieusement notre amitié. Corinne vous avez également une place particulière parmi ces professeurs, car sans votre appui à la fin de la licence il est certain que j'aurai tout abandonné. Alors je ne sais pas comment vous remercier d'avoir cru en moi à

cette époque tant j'en suis reconnaissante. Je suis très fière de vous compter parmi les membres de mon jury, et j'espère sincèrement que vous trouverez de l'intérêt à cet ouvrage.

Enfin bien sûr comment ne pas remercier vous, personnel du PCV, loin d'être impersonnel à mes yeux. D'ailleurs comme il serait erroné de vous comparer entre vous tant je vous apprécie tous, je me permets de vous ranger par ordre alphabétique. Adrien c'est trop triste que tu sois resté si peu de temps dans l'équipe, c'était trop le feu de bosser avec toi ! Antonin, tu m'as fait tellement rire que j'ai très certainement gagné plusieurs années de vie ! Merci mille fois d'avoir rendu la besogne plus légère, j'ai hâte que les beaux jours reviennent pour aller boire des binouzes pendant que tu pleures de joie devant un match de rugby. Baptiste tu as si bien su m'écouter que je t'en suis sincèrement reconnaissante. Je suis tellement heureuse que tu aies trouvé ton bonheur partout où il était possible de le faire ! Ben merci de m'avoir motivé à vous donner des coups, ça m'a fait un bien fou et j'ai hâte de reprendre ! Caro tu est tellement pure toi aussi, et ta sincérité et bienveillance m'ont beaucoup touché. Je te souhaite tout le bonheur que tu mérites tant. Claude tu es un vrai rayon de soleil, et le fait que ton thésard l'a clamé en en dit long. Merci mille fois pour tout, j'espère qu'on pourra se rencontrer avec tes filles et boire des canons ! Damien merci à toi et à Wass, vous êtes tellement ouverts d'esprit que c'est toujours un plaisir de passer du temps avec vous. J'ai hâte qu'on se revoie !! Merci Denis pour les publications et les protocoles, et surtout pour ta curiosité sur mes projets bizarres ! J'ai hâte de pouvoir l'enrichir avec ton savoir. Elise tu es la meilleure, et je te remercie de ne pas te fâcher quand je te le répète tout le temps. Mais je le pense sincèrement, au moins autant que je t'admire et t'aime tant. Elodie comme je suis heureuse de t'avoir rencontré, je souhaite sincèrement le clair de lune te guider tout au long du chemin, dans la paix et la douceur d'une nuit d'été. Etienne, un jour on sera richissimes et je t'en remercie d'avance ! Mais je te remercie surtout d'être si altruiste et chaleureux avec moi, c'était trop cool ces moments avec vous tous. Fabien merci d'être aussi sincère et si jovial, c'est toujours du fun en boîte d'être avec toi, je t'en supplie ne change pas ! Il me tarde de venir trainer chez toi entouré de tes bonnes ondes. JB c'est trop dommage que l'IBS soit pas dans le C2, c'était toujours frais de te voir même en coup de vent. Jerem que la force soit avec toi, quoi que tu en dises tu es une belle personne ! Juliette merci pour ces semi-piqueniques du midi au C2, c'était toujours un plaisir de parler avec toi en toute honnêteté, sans zèle et sans jugement. Gaby, bien sûr il y a eu le CSI mais il y a eu toi tout court, merci pour toutes ces discussions qu'on a eues, elles m'ont tellement apaisées. Tu es une personne rayonnante, et tous les gens qui te côtoient quotidiennement sont clairement des petits veinards. Gaétan c'est fou comme j'ai de l'affection pour toi, tu es tellement pur ! Merci d'avoir été à mes côtés lors de ton passage ici, c'était trop le bonheur pour moi. Seb tu es l'incarnation même de la chevalerie, et je pourrais certes te remercier pour un millier de choses, mais c'est bien pour la personne que tu es toi que j'ai tant de gratitude. Merci d'être mon ami que j'affectionne tant. Manon, ton aide m'a été inestimable, je t'en suis si reconnaissante. Manu, je n'oublierai jamais tes mots : « L'excellence, ce n'est pas être meilleur que les autres, c'est se dépasser ». Rose ce nom te va si bien, c'est toute la parfaite essence des fleurs qui te caractérise. Yiorgos, you are

truly an elevated soul...! I could thank you only for the fact that you never judge my foolishness, but you shall first be thanked for all the kindness that definitively defines you. Vangesh, merci d'avoir partagé tes marqueurs avec moi et d'avoir toléré l'entropie qui finit toujours par déborder de ma paillasse et de mon bureau... Mais plus sérieusement, je te remercie pour toute l'humanité que tu distilles sous ton masque de futur chef de labo. Et puis je manque trop de place pour vous citer tous, mais sachez que j'ai beaucoup de gratitude pour vous aussi, Greg et ta machine à laver qui avez su effacer mes louiseries au café, François de ne pas me juger sur mes questions sur les bambous ou sur mes papiers administratifs faits à l'arrache, ou encore le staff admin de m'avoir aidé pour cette tare. Et puis Sylvie pour tes nombreux coups de mains et discussions au détour d'un couloir, et surtout Norbert pour avoir tenté de me réconcilier avec une voie qui semble pourtant si éloignée de la mienne. Merci à tous d'avoir tartiné mon cœur avec tant de miel !

Merci mille fois Hugo pour tes encouragements, j'aimerais que tu aies autant d'admiration pour toi qu'on en a pour toi ! Et Camille, j'ai tellement appris et progressé avec toi que c'en est presque invraisemblable. Merci d'être un ami depuis tout ce temps ! Mon petit Matisse quel bonheur de t'avoir rencontré, je me sens si petite à coté de toi ! C'est sincèrement que je te compte parmi mes amis les plus chers. Merci de m'accorder ta confiance et de me faire découvrir ces belles âmes qui t'entourent, n'est-ce pas Théo !

Ma famille d'amour, comme je vous aime. C'est presque ridicule de réécrire ici à quel point je suis reconnaissante pour tout le soutien que vous m'avez apporté. Merci de m'avoir donné quantité de force et d'encouragements. J'ai tellement hâte de vous rendre la pareille et de prendre soin de vous comme il se doit ! Merci ma mouette chérie, merci ma sœur chérie, et merci pouss pouss d'amour, du fond de mon petit cœur. On trinquera bientôt à la gloire des 4 mousquetaires !

Enfin à la mode scientifique, les dernières personnes à être ici cités sont les garants de ce présent manuscrit. Merci encore d'avoir accepté d'évaluer ce travail, quelque peu atypique je vous le concède, mais que j'espère être à la hauteur de l'admiration que je vous porte. Merci mille fois pour ce beau cadeau que vous m'aurez accordé, Ben, Kamel, Jean-Gabriel, Corine, Norbert, Clara, et Emilie.

BIBLIOGRAPHIE



- Allorent, G. *et al.* (2013) 'Plastid gene expression during chloroplast differentiation and dedifferentiation into non-photosynthetic plastids during seed formation', *Plant Molecular Biology*. Springer Netherlands, 82(1–2), pp. 59–70. doi: 10.1007/s11103-013-0037-0.
- Azevedo, J., Courtois, F. and Lerbs-Mache, S. (2006) 'Sub-plastidial localization of two different phage-type RNA polymerases in spinach chloroplasts', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 34(2), pp. 436–444. doi: 10.1093/nar/gkj451.
- Baba, K. *et al.* (2004) 'Organellar gene transcription and early seedling development are affected in the *rpoT*; 2 mutant of *Arabidopsis*', *The Plant Journal*, 38, pp. 38–48. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02022.x.
- Bai, B. *et al.* (2017) 'Extensive translational regulation during seed germination revealed by polysomal profiling', *New Phytologist*, 214, pp. 233–244. doi: 10.1111/nph.14355.
- Bar-On, Y. M., Phillips, R. and Milo, R. (2018) 'The biomass distribution on Earth', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(25), pp. 6506–6511. doi: 10.1073/pnas.1711842115.
- Barton, K. A., Schattat, M. H. and Jakob, T. (2016) 'Epidermal Pavement Cells of *Arabidopsis* Have Chloroplasts', *Plant physiology*, 171(June), pp. 723–726. doi: 10.1104/pp.16.00608.
- Blomqvist, L. A. and Ryberg, Å. M. (2008) 'Proteomic analysis of highly purified prolamellar bodies reveals their significance in chloroplast development', pp. 37–50. doi: 10.1007/s11120-007-9281-y.
- Börner, T. *et al.* (2015) 'Chloroplast RNA polymerases: Role in chloroplast biogenesis', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier B.V., 1847(9), pp. 761–769. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.02.004.
- Bramham, L. and Pyke, K. (2017) 'Changing Plastid Dynamics within Early Root and Shoot Apical Meristem-Derived Tissue', *Bioscience Horizons*, 10, pp. 1–10.
- Bykowski, M. *et al.* (2020) 'Spatial Nano-Morphology of the Prolamellar Body in Etiolated *Arabidopsis thaliana* Plants With Disturbed Pigment and Polyprenol Composition', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(October), pp. 1–16. doi: 10.3389/fcell.2020.586628.
- Charuvi, D. *et al.* (2012) 'Gain and Loss of Photosynthetic Membranes during Plastid Differentiation in the Shoot Apex of *Arabidopsis*', *The Plant Cell*, 24(March), pp. 1143–1157. doi: 10.1105/tpc.111.094458.
- Chen, M. *et al.* (2010) '*Arabidopsis* HEMERA/pTAC12 Initiates photomorphogenesis by phytochromes', *Cell*, 141(7), pp. 1230–1240. doi: 10.1016/j.cell.2010.05.007.
- Courtois, F. *et al.* (2007) 'Phage-Type RNA Polymerase RPOTmp Transcribes the *rrn* Operon from the PC Promoter at Early Developmental', *Plant Physiology*, 145(November), pp. 712–721. doi: 10.1104/pp.107.103846.
- Dalal, V. *et al.* (2018) 'Transcriptome analysis highlights nuclear control of chloroplast development in the shoot apex', *Nature Scientific Reports*, (January), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-018-27305-4.
- Demarsy, E. *et al.* (2006) 'Building Up of the Plastid Transcriptional Machinery during Germination and Early Plant Development 1', *American Society of Plant Biologists*, 142(November), pp. 993–1003. doi: 10.1104/pp.106.085043.
- Demarsy, E. *et al.* (2012) 'Characterization of the plastid-specific germination and seedling establishment transcriptional programme', *Journal of Experimental Botany*, 63(2), pp. 925–939. doi:

10.1093/jxb/err322.

Demarsy, E. (2022) 'WRKY-ing in the light', *New Phytologist*, 5, pp. 5–7. doi: 10.1111/nph.18147.

Demoulin, C. F. *et al.* (2019) 'Free Radical Biology and Medicine Cyanobacteria evolution : Insight from the fossil record', *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier B.V., 140(March), pp. 206–223. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.007.

Fajardo, D., Senalik, D. and Ames, M. (2012) 'Complete plastid genome sequence of *Vaccinium macrocarpon* : Structure , gene content , and rearrangements revealed by next generation sequencing', *Tree Genetics & genomes*, (May 2014). doi: 10.1007/s11295-012-0573-9.

Floris, D. and Kühlbrandt, W. (2021) 'Molecular landscape of etioplast inner membranes in higher plants', *Nature Plants*. Springer US, 7(April), pp. 514–523. doi: 10.1038/s41477-021-00896-z.

Fujii, S. *et al.* (2019) 'Galactolipids Are Essential for Internal Membrane Transformation during Etioplast-to-Chloroplast Differentiation Special Focus Issue – Regular Paper', 60(March), pp. 1224–1238. doi: 10.1093/pcp/pcz041.

Galvão, R. M. *et al.* (2012) 'Photoactivated phytochromes interact with HEMERA and promote its accumulation to establish photomorphogenesis in *Arabidopsis*', *Genes and Development*, 26(16), pp. 1851–1863. doi: 10.1101/gad.193219.112.

Gao, Z. P. *et al.* (2011) 'A functional component of the transcriptionally active chromosome complex, *Arabidopsis* pTAC14, interacts with pTAC12/HEMERA and regulates plastid gene expression', *Plant Physiology*, 157(4), pp. 1733–1745. doi: 10.1104/pp.111.184762.

Garcia, M. *et al.* (2008) 'An *Arabidopsis* homolog of the bacterial peptidoglycan synthesis enzyme MurE has an essential role in chloroplast development', *Plant Journal*, 53(6), pp. 924–934. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03379.x.

Gilkerson, J. *et al.* (2012) 'The plastid-localized pfkB-type carbohydrate kinases FRUCTOKINASE-LIKE 1 and 2 are essential for growth and development of *Arabidopsis thaliana*', *BMC Plant Biology*, 12(July). doi: 10.1186/1471-2229-12-102.

Hanaoka, M. *et al.* (2005) 'Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis', *EMBO reports*, 6(6), pp. 545–550. doi: 10.1038/sj.embor.7400411.

Hricova, A., Quesada, V. and Micol, J. (2006) 'The SCABRA3 Nuclear Gene Encodes the Plastid RpoTp RNA Polymerase , Which Is Required for Chloroplast Biogenesis and Mesophyll Cell Proliferation', *Plant Physiology*, 141(July), pp. 942–956. doi: 10.1104/pp.106.080069.942.

Jeon, Y. *et al.* (2012) 'S1 domain-containing STF modulates plastid transcription and chloroplast biogenesis in *Nicotiana benthamiana*', *New Phytologist*, 193(2), pp. 349–363. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03941.x.

Ji, Y. *et al.* (2021) 'A fully assembled plastid-encoded RNA polymerase complex detected in etioplasts and proplastids in *Arabidopsis*' , (July 2020), pp. 435–446. doi: 10.1111/ppl.13256.

Kanamaru, K. *et al.* (2001) 'An *Arabidopsis* sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts', *Plant and Cell Physiology*, 42(10), pp. 1034–1043. doi: 10.1093/pcp/pce155.

Kindgren, P. and Strand, Å. (2015) 'Chloroplast transcription, untangling the gordian knot', *New Phytologist*, 206(3), pp. 889–891. doi: 10.1111/nph.13388.

- Kohchi, T. *et al.* (2001) 'The Arabidopsis HY2 Gene Encodes Phytochromobilin Synthase, a Ferredoxin-Dependent Biliverdin Reductase', *The Plant Cell*, 13(2), p. 425. doi: 10.2307/3871286.
- Kowalewska, Ł. *et al.* (2016) 'Three-dimensional visualization of the internal plastid membrane network during runner bean chloroplast biogenesis . Dynamic model of the tubular- lamellar transformation Three-Dimensional Visualization of the Tubular-Lamellar Transformation of the Intern', *The Plant cell*, 28(May), pp. 875–891. doi: 10.1105/tpc.15.01053.
- Kowalewska, Ł., Bykowski, M. and Mostowska, A. (2019) 'Spatial organization of thylakoid network in higher plants Łucja Kowalewska , Michał Bykowski & Agnieszka Mostowska', *Botany Letters*. Taylor & Francis, 00(00), pp. 1–18. doi: 10.1080/23818107.2019.1619195.
- Krasuska, U. *et al.* (2015) 'Switch from heterotrophy to autotrophy of apple cotyledons depends on NO signal', *Planta*, 242(5), pp. 1221–1236. doi: 10.1007/s00425-015-2361-x.
- Krause, K. *et al.* (2005) 'DNA-binding proteins of the Whirly family in Arabidopsis thaliana are targeted to the organelles', *FEBS Letters*, 579(17), pp. 3707–3712. doi: 10.1016/j.febslet.2005.05.059.
- Krupinska, K. *et al.* (2014) 'WHIRLY1 is a major organizer of chloroplast nucleoids', *Frontiers in Plant Science*, 5(September), pp. 1–11. doi: 10.3389/fpls.2014.00432.
- Krupinska, K. *et al.* (2020) 'Genome communication in plants mediated by organelle–nucleus-located proteins', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375(1801). doi: 10.1098/rstb.2019.0397.
- Laudi, G., Bonatti, P. M. and Fricano, G. (1974) 'ULTRASTRUCTURE OF PLASTIDS OF PARASITIC HIGHER PLANTS . V . INFLUENCE OF LIGHT ON', *Israel Journal of Botany*, 23:3(May 2015), pp. 145–150. doi: 10.1080/0021213X.1974.10676845.
- Lewak, S. (2011) 'Metabolic control of embryonic dormancy in apple seed: Seven decades of research', *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(1), pp. 1–24. doi: 10.1007/s11738-010-0524-8.
- Li, H. *et al.* (2020) 'Long-reads reveal that Rhododendron delavayi plastid genome contains extensive repeat sequences , and recombination exists among plastid genomes of photosynthetic Ericaceae', *PeerJ*. doi: 10.7717/peerj.9048.
- Liang, Z. *et al.* (2018) 'Thylakoid-Bound Polysomes and a Dynamin-Related Protein , FZL , Mediate Critical Stages of the Linear Chloroplast Biogenesis Program in Greening Arabidopsis Cotyledons [OPEN]', *The Plant cell*, 30(July), pp. 1476–1495. doi: 10.1105/tpc.17.00972.
- Liang, Z. *et al.* (2022) 'Electron tomography analysis of the prolamellar body and its transformation into grana thylakoids in the cryofixed', *BioRxiv preprint*. doi: <https://doi.org/10.1101/2022.04.04.487035>.
- Liebers, M. *et al.* (2017) 'Regulatory Shifts in Plastid Transcription Play a Key Role in Morphological Conversions of Plastids during Plant Development.', *Frontiers in plant science*. Frontiers Media SA, 8, p. 23. doi: 10.3389/fpls.2017.00023.
- Liebers, M. *et al.* (2018) 'PAP genes are tissue- and cell-specific markers of chloroplast development', *Planta*. Springer Berlin Heidelberg, 248(3), pp. 629–646. doi: 10.1007/s00425-018-2924-8.
- Liebers, M. *et al.* (2020) ' Nucleo-plastidic PAP 8/ pTAC 6 couples chloroplast formation with photomorphogenesis ', *The EMBO Journal*. doi: 10.15252/embj.2020104941.
- Liere, K. and Weihe, A. (2011) 'The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts:

Composition, function, and regulation', *Journal of Plant Physiology*. Urban & Fischer, 168(12), pp. 1345–1360. doi: 10.1016/J.JPLPH.2011.01.005.

Lopez-Juez, E. and Pyke, K. A. (2005) 'Plastids unleashed: Their development and their integration in plant development', *International Journal of Developmental Biology*, 49(5–6), pp. 557–577. doi: 10.1387/ijdb.051997el.

Machida, M. *et al.* (2006) 'Genes for the peptidoglycan synthesis pathway are essential for chloroplast division in moss', *PNAS*, 103(17), pp. 6753–6758.

Majeran, W. *et al.* (2012) 'Nucleoid-Enriched Proteomes in Developing Plastids and Chloroplasts from Maize Leaves : A New Conceptual Framework for Nucleoid Functions 1 [C][W][OA]', 158(January), pp. 156–189. doi: 10.1104/pp.111.188474.

Maréchal, A. *et al.* (2009) 'Whirly proteins maintain plastid genome stability in Arabidopsis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(34), pp. 14693–14698. doi: 10.1073/pnas.0901710106.

McGrath, C. (2021) 'Highlight: The Colorful History of Plastids', *Genome Biology and Evolution*, 12(7), pp. 991–992. doi: 10.1093/GBE/EVAA116.

Mcneal, J. R. *et al.* (2007) 'Complete plastid genome sequences suggest strong selection for retention of photosynthetic genes in the parasitic plant genus *Cuscuta*', (February). doi: 10.1186/1471-2229-7-57.

Mechela, A., Schwenkert, S. and Soll, J. (2019) 'A brief history of thylakoid biogenesis †', *The Royal Society Publishing*, (9).

Melonek, J. *et al.* (2010) 'Whirly1 in chloroplasts associates with intron containing RNAs and rarely co-localizes with nucleoids', *Planta*, 232(2), pp. 471–481. doi: 10.1007/s00425-010-1183-0.

Minagawa, J. and Takahashi, Y. (2004) 'Structure , function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins Structure , function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins', *Photosynthesis Research*, (May 2014). doi: 10.1007/s11120-004-2079-2.

Nevarez, P. A. *et al.* (2017) 'Mechanism of dual targeting of the phytochrome signaling component HEMERA/pTAC12 to plastids and the nucleus', *Plant Physiology*, 173(4), pp. 1953–1966. doi: 10.1104/pp.16.00116.

Oh, S. *et al.* (2018) 'Transcriptome and phenotyping analyses support a role for chloroplast sigma factor 2 in red-light-dependent regulation of growth, stress, and photosynthesis', *Plant Direct*, 2(2), pp. 1–17. doi: 10.1002/pld3.43.

Oh, S. and Montgomery, B. L. (2013) 'Phytochrome-induced SIG2 expression contributes to photoregulation of phytochrome signalling and photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*', *Journal of Experimental Botany*, 64(18), pp. 5457–5472. doi: 10.1093/jxb/ert308.

Pfalz, J. *et al.* (2006) 'pTAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression', *Plant Cell*, 18(1), pp. 176–197. doi: 10.1105/tpc.105.036392.

Pfalz, J. *et al.* (2015) 'ZmpTAC12 binds single-stranded nucleic acids and is essential for accumulation of the plastid-encoded polymerase complex in maize', *New Phytologist*, 206(3), pp. 1024–1037. doi: 10.1111/nph.13248.

- Pfalz, J. and Pfannschmidt, T. (2013) 'Essential nucleoid proteins in early chloroplast development', *Trends in Plant Science*. Elsevier Current Trends, 18(4), pp. 186–194. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2012.11.003.
- Pfannschmidt, T. *et al.* (2000) 'The multisubunit chloroplast RNA polymerase A from mustard (*Sinapis alba* L.): Integration of a prokaryotic core into a larger complex with organelle- specific functions', *European Journal of Biochemistry*, 267(1), pp. 253–261. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.00991.x.
- Pfannschmidt, T. *et al.* (2015) 'Plastid RNA polymerases: orchestration of enzymes with different evolutionary origins controls chloroplast biogenesis during the plant life cycle', *Journal of Experimental Botany*. Oxford University Press, 66(22), pp. 6957–6973. doi: 10.1093/jxb/erv415.
- Pfannschmidt, T. *et al.* (2020) 'Retrograde signals from endosymbiotic organelles : a common control principle in eukaryotic cells', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375.
- Pfannschmidt, T. and Link, G. (1994) 'Separation of two classes of plastid DNA-dependent RNA polymerases that are differentially expressed in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings', *Plant Molecular Biology*, 25(1), pp. 69–81. doi: 10.1007/BF00024199.
- Pfannschmidt, T. and Link, G. (1997) 'The A and B forms of plastid DNA-dependent RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba* L.) transcribe the same genes in a different developmental context', *Molecular and General Genetics*, 257(1), pp. 35–44. doi: 10.1007/s004380050621.
- Pipitone, R. *et al.* (2021) 'A multifaceted analysis reveals two distinct phases of chloroplast biogenesis during de-etiolation in *Arabidopsis*', pp. 1–32.
- Pogson, B. J., Ganguly, D. and Albrecht-borth, V. (2015) 'Biochimica et Biophysica Acta Insights into chloroplast biogenesis and development ☆ blade', *BBA - Bioenergetics*. Elsevier B.V., 1847(9), pp. 1017–1024. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.02.003.
- Pogson, B. J., Ganguly, D. and Albrecht-Borth, V. (2015) 'Insights into chloroplast biogenesis and development', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier B.V., 1847(9), pp. 1017–1024. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.02.003.
- Ponce-Toledo, R. I., López-García, P. and Moreira, D. (2019) 'Horizontal and endosymbiotic gene transfer in early plastid evolution', *New Phytologist*, 224(2), pp. 618–624. doi: 10.1111/nph.15965.
- Pribil, M., Labs, M. and Leister, D. (2014) 'Structure and dynamics of thylakoids in land plants', *Journal of Experimental Botany*, 65(8), pp. 1955–1972. doi: 10.1093/jxb/eru090.
- Prikryl, J. *et al.* (2008) 'A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis', *Nucleic Acids Research*, 36(16), pp. 5152–5165. doi: 10.1093/nar/gkn492.
- Privat, I. *et al.* (2003) 'Characterization of *Arabidopsis* plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3', *Plant Molecular Biology*, 51(3), pp. 385–399. doi: 10.1023/A:1022095017355.
- Qiao, J. *et al.* (2011) 'Two novel proteins, MRL7 and its paralog MRL7-L, have essential but functionally distinct roles in chloroplast development and are involved in plastid gene expression regulation in *Arabidopsis*', *Plant and Cell Physiology*, 52(6), pp. 1017–1030. doi: 10.1093/pcp/pcr054.
- Qiu, Y. *et al.* (2015) 'Hemera couples the proteolysis and transcriptional activity of phytochrome interacting actors in *Arabidopsis* photomorphogenesis', *Plant Cell*, 27(5), pp. 1409–1427. doi:

10.1105/tpc.114.136093.

Rudowska, Ł. *et al.* (2012) 'Biochimica et Biophysica Acta Chloroplast biogenesis — Correlation between structure and function ☆', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817, pp. 1380–1387. doi: 10.1016/j.bbabi.2012.03.013.

Sakamoto, W., Miyagishima, S. and Jarvis, P. (2008) 'Chloroplast Biogenesis: Control of Plastid Development, Protein Import, Division and Inheritance', *The Arabidopsis Book - American Society of Plant Biologists*, 6, p. e0110. doi: 10.1199/tab.0110.

Sato, S. *et al.* (1999) 'Complete Structure of the Chloroplast Genome of *thaliana ssc*', 290, pp. 283–290.

Schmitz-Linneweber, C. and Small, I. (2008) 'Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression', *Trends in Plant Science*, 13(12), pp. 663–670. doi: 10.1016/j.tplants.2008.10.001.

Semenova, G. A. *et al.* (2019) 'The Effects of Lead on the Meristem of Wheat Seedlings', (December). doi: 10.4236/cellbio.2019.83003.

Shen, J. *et al.* (2020) 'The Complete Plastid Genome of *Rhododendron pulchrum* and Comparative Genetic Analysis of Ericaceae Species', *Forests*, 11(158), p. 14.

Sherman, T. D., Pettigrew, W. T. and Vaughn, K. C. (1999) 'Structural and Immunological Characterization of the *Cuscuta pentagona* L. Chloroplast', *Plant Cell Physiology*, 40(6), pp. 592–603.

Solymosi, K. *et al.* (2004) 'Plastid differentiation and chlorophyll biosynthesis in different leaf layers of white cabbage (*Brassica oleracea* cv. *capitata*)', *Physiologica Plantarum*, 121(Whatley 1977), pp. 520–529. doi: 10.1111/j.1399-3054.2004.00349.x.

Solymosi, K. and Aronsson, H. (2013) *Chapter 3 Etioplasts and Their Significance in Chloroplast Biogenesis*. doi: 10.1007/978-94-007-5724-0.

Solymosi, K. and Keresztes, Á. (2012) 'Plastid Structure, Diversification and Interconversions II. Land Plants Plastid Structure, Diversification and Interconversions II. Land Plants', (August 2014). doi: 10.2174/2212796811206030003.

Solymosi, K. and Schoefs, B. (2010) 'Etioplast and etio-chloroplast formation under natural conditions: The dark side of chlorophyll biosynthesis in angiosperms', *Photosynthesis Research*, 105(2), pp. 143–166. doi: 10.1007/s11120-010-9568-2.

Spalding, E. P. and Folta, K. M. (2005) 'Illuminating topics in plant photobiology', *Plant, Cell and Environment*, 28(1), pp. 39–53. doi: 10.1111/j.1365-3040.2004.01282.x.

Steiner, S. *et al.* (2011) 'Identification of essential subunits in the plastid-encoded RNA polymerase complex reveals building blocks for proper plastid development', *Plant Physiology*, 157(3), pp. 1043–1055. doi: 10.1104/pp.111.184515.

Tadini, L. *et al.* (2020) 'The plastid transcription machinery and its coordination with the expression of nuclear genome: Plastid-Encoded Polymerase, Nuclear-Encoded Polymerase and the Genomes Uncoupled 1-mediated retrograde communication', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375.

Tejos, R. I., Mercado, A. N. A. V and Meisel, L. E. E. A. (2010) 'Analysis of chlorophyll fluorescence reveals stage specific patterns of chloroplast-containing cells during *Arabidopsis* embryogenesis', *Biol Res*,

43(43), pp. 99–111.

Terasawa, K. and Sato, N. (2005) 'Visualization of plastid nucleoids in situ using the PEND-GFP fusion protein', *Plant and Cell Physiology*, 46(4), pp. 649–660. doi: 10.1093/pcp/pci070.

Thomson, S. M., Pulido, P. and Jarvis, R. P. (2020) 'Protein import into chloroplasts and its regulation by the ubiquitin-proteasome system', *Biochemical Society Transactions*, 48(1), pp. 71–82. doi: 10.1042/BST20190274.

de Vries, J. and Archibald, J. M. (2017) 'Endosymbiosis: Did Plastids Evolve from a Freshwater Cyanobacterium?', *Current Biology*. Elsevier Ltd, 27(3), pp. R103–R105. doi: 10.1016/j.cub.2016.12.006.

Wang, R. and Brattain, M. G. (2007) 'The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60 kDa', *FEBS Letters*, 581(17), pp. 3164–3170. doi: 10.1016/j.febslet.2007.05.082.

Williams-Carrier, R. *et al.* (2014) 'A major role for the plastid-encoded rna polymerase complex in the expression of plastid transfer RNAs', *Plant Physiology*, 164(1), pp. 239–248. doi: 10.1104/pp.113.228726.

Woodson, J. D. *et al.* (2014) 'Sigma factor-mediated plastid retrograde signals control nuclear gene expression', *Plant Journal*, 73(1), pp. 1–13. doi: 10.1111/tpj.12011.Sigma.

Yadav, D. *et al.* (2019) 'Biochemical and Biophysical Research Communications Initial proplastid-to-chloroplast differentiation in the developing vegetative shoot apical meristem of Arabidopsis', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 519(519), pp. 391–395. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.09.019.

Yagi, Y. and Shiina, T. (2014) 'Recent advances in the study of chloroplast gene expression and its evolution', *Frontiers in Plant Science*, 5(FEB), pp. 1–7. doi: 10.3389/fpls.2014.00061.

Yamaguchi, R. *et al.* (1999) 'Light-dependent Translocation of a Phytochrome B-GFP Fusion Protein to the Nucleus in Transgenic Arabidopsis', *Cell*, 145(3), pp. 437–445.

Yang, E. J. *et al.* (2019) 'NCP activates chloroplast transcription by controlling phytochrome-dependent dual nuclear and plastidial switches', *Nature Communications*. Springer US, 10(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41467-019-10517-1.

Yoo, C. Y. *et al.* (2019) 'Phytochrome activates the plastid-encoded RNA polymerase for chloroplast biogenesis via nucleus-to-plastid signaling', *Nature Communications*. Springer US, 10(1), pp. 1–16. doi: 10.1038/s41467-019-10518-0.

Yoo, C. Y., Han, S. and Chen, M. (2020) *Nucleus-to-plastid phytochrome signalling in controlling chloroplast biogenesis*, *Annual Plant Reviews Online*. doi: 10.1002/9781119312994.apr0615.

Yu, Q. B. *et al.* (2014) 'AtECB1/MRL7, a thioredoxin-like fold protein with disulfide reductase activity, regulates chloroplast gene expression and chloroplast biogenesis in Arabidopsis thaliana', *Molecular Plant*, 7(1), pp. 206–217. doi: 10.1093/mp/sst092.

Zhou, W. *et al.* (2009) 'The Arabidopsis gene YS1 encoding a DYW protein is required for editing of rpoB transcripts and the rapid development of chloroplasts during early growth', pp. 82–96. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03766.x.