



**HAL**  
open science

# Les antennes photosynthétiques chez *Chlamydomonas reinhardtii* : biogénèse, fonction et régulation

Sandrine Bujaldon

► **To cite this version:**

Sandrine Bujaldon. Les antennes photosynthétiques chez *Chlamydomonas reinhardtii* : biogénèse, fonction et régulation. Physiologie [q-bio.TO]. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS346 . tel-04336988

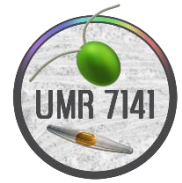
**HAL Id: tel-04336988**

**<https://theses.hal.science/tel-04336988v1>**

Submitted on 12 Dec 2023

**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.



Sorbonne Université

École doctorale 515 "Complexité du Vivant"

*Laboratoire de biologie du chloroplaste et perception de la  
lumière chez les micro-algues*

# Les antennes photosynthétiques chez *Chlamydomonas reinhardtii* : biogénèse, fonction et régulation

Par **Sandrine Bujaldon**

Thèse de doctorat

Présentée et soutenue publiquement le 24 novembre 2023

Devant un jury composé de :

**Zhou Xu**, Directeur de Recherche, Président du jury  
CNRS – Sorbonne Université, UMR7238 – Institut de Biologie Paris-Seine

**Xenie Johnson**, Directrice de Recherche, Rapporteur  
CEA - Aix-Marseille Université - UMR7265 - Institut Biosciences et biotechnologie d'Aix-Marseille

**Roberto Bassi**, Professeur, Rapporteur  
Université de Vérone – Département de Biotechnologie - Italie

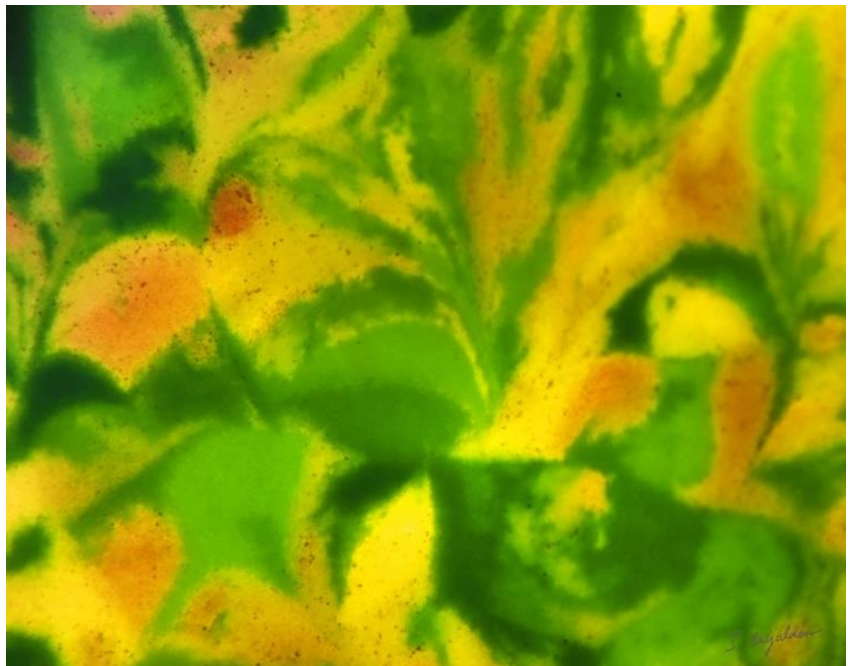
**Guillaume Allorent**, Chargé de Recherche, Examinateur  
CNRS - Université Grenoble Alpes – LPCV UMR5168

**Cécile Raynaud**, Directrice de Recherche, Examinatrice  
CNRS – Université Paris-Saclay, UMR9213 - Institut des Sciences des Plantes – Paris-Saclay

**Francis-André Wollman**, Directeur de Recherche, Directeur de thèse  
CNRS - Sorbonne Université, UMR7141 – Institut de Biologie Physico-Chimique

# Les antennes photosynthétiques chez *Chlamydomonas reinhardtii* : biogénèse, fonction et régulation

« Micro-jungle »



## Description :

La photosynthèse permet à des organismes d'utiliser l'énergie lumineuse et l'eau pour fixer le dioxyde de carbone atmosphérique, produire de la matière organique et du dioxygène. Les chlorophylles, qui donnent la couleur verte des végétaux et des algues, sont des pigments qui jouent un rôle primordial puisqu'ils capturent et canalisent l'énergie du soleil pour déclencher les réactions de la photosynthèse. La micro-algue *Chlamydomonas reinhardtii* est utilisée comme organisme modèle pour étudier ce processus. Sur cette image, on observe des cellules de *Chlamydomonas*, d'un diamètre de seulement quelques millièmes de millimètres, issues d'un croisement d'une souche sauvage de couleur verte avec une souche mutée dans un gène impliqué dans la voie de biosynthèse des chlorophylles. En plus de la perte de la pigmentation verte, ce mutant accumule un pigment rouge foncé, la protoporphyrine IX.

Technique de prise de vue : appareil photographique sur stéréomicroscope.

Date de prise de vue : 29/06/2021

Crédits de l'image : Sandrine BUJALDON, Laboratoire de biologie du chloroplaste et perception de la lumière chez les micro-algues (UMR7141 – CNRS/Sorbonne Université).

Au terme de plus de quatre années consacrées à la réalisation de cette thèse, ce moment s'offre enfin à moi pour exprimer ma gratitude. À l'époque, alors que je me questionnais sur ma capacité et la faisabilité de poursuivre un doctorat, tout en occupant un poste d'ingénieure au laboratoire, la majorité des personnes m'ont encouragée, sauf quelques-uns qui m'ont conseillé de ne pas commettre cette 'erreur'. J'avais bien compris leurs raisons et en avais tenu compte. Certaines sont devenues encore plus évidentes à mesure que j'avançais dans ce travail de thèse et d'autres pendant l'écriture de ce manuscrit. Toutefois, j'ai fait ce choix en toute conscience, même si la confiance en mes compétences a toujours été ébranlée par des doutes persistants. Et malgré le fait que mes années passées au laboratoire avant la thèse constituaient un avantage indéniable par rapport à un jeune étudiant, ma charge de responsabilités au laboratoire n'était en aucun cas moins exigeante. Au moment où j'écris ces mots, j'espère seulement que mes petites Chlamy que je veille depuis de (trop) nombreuses années ne me feront pas défaut pour ces derniers mois de négligence.

Pour commencer, j'adresse ma profonde reconnaissance à Francis-André Wollman, pour son soutien inestimable, son expertise et sa disponibilité. Sa capacité à me pousser au-delà de mes limites a été un véritable moteur de développement personnel, bien que cela ait parfois représenté un énorme défi. Mon seul regret, pendant cette période, est de ne pas avoir réussi à l'entraîner plus souvent à une paillasse.

Je tiens à remercier chaleureusement Xenie Johnson, Roberto Bassi, Guillaume Allorent, Cécile Raynaud et Zhou Xu qui ont volontiers accepté de participer en tant que membres de ce jury de thèse.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance envers les membres de mon comité de thèse, Cécile Raynaud, Stéphane Lemaire et Emmanuèle Mouchel-Vielh, pour leur investissement en temps et leurs précieux conseils. Cécile a été une confidente de tous les moments, merci pour sa bienveillance et ce soutien exceptionnel.

Merci à Angela Falciatore, pour avoir accepté que je fasse cette thèse au laboratoire et pour son soutien et ses encouragements.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont encouragé à entreprendre cette aventure. La liste est tellement longue que je ne pourrais pas la détailler ici et il est fort probable que j'en oublierai certaines. Cela comprend évidemment tous les membres actuels de l'UMR7141 et les anciens, qui sont partis. Cependant, je tiens à remercier en particulier Benjamin Bailleul, pour ses précieux conseils, son humour et surtout son amitié. Et quel talent ! Ses petites chansons improvisées me manquent. Matthieu, un frère d'anniversaire, cela crée des liens uniques, de bons souvenirs, et finalement, on aura aussi réalisé et terminé notre thèse presque en même temps. Frédéric Chaux, pour sa bonne humeur et pour avoir initié une belle collaboration avec cette excellente idée de séquençage Nanopore, comme quoi les moments autour d'un verre sont bénéfiques à bien des égards. Clotilde (sans H !) et Ingrid pour leur soutien, Julien, Katia, Richard, Stephan, Amel et Sophie. Je remercie également Aliénor et Isabelle (de l'ENS), qui achèvent également leur doctorat, avec qui j'ai pu collaborer, et même si mon rôle se limitait à des conseils, cela m'a été très bénéfique. Et merci à Mercotte et Xavier pour avoir animé nos mercredis soir.



# Sommaire

<b>Chapitre 1</b> - Introduction générale.....	9
<b>Chapitre 2</b> - Biogenèse des antennes photosynthétiques .....	35
<i>Introduction</i> .....	37
<b>Partie A.</b> Importation des protéines LHC dans le chloroplaste & Intégration et assemblage des LHC dans les membranes des thylakoïdes.....	43
Discussion et perspectives.....	85
<b>Partie B.</b> Biosynthèse des chlorophylles et leur régulation.....	89
Conclusion .....	104
<i>Discussion et perspectives</i> .....	105
<b>Chapitre 3</b> - Régulation de la capture de l'énergie lumineuse et de la photochimie .....	107
<i>Introduction</i> .....	107
<b>Partie A.</b> Une étude fonctionnelle et génétique des mutants de transitions d'état ( <i>stt7</i> ).....	117
Discussion et perspectives.....	142
<b>Partie B.</b> Une étude de l'induction d'extinction non photochimique de la fluorescence (NPQ-qE) .....	145
Discussion et conclusion .....	177
<b>Conclusion générale</b> .....	185
Matériel et méthodes.....	187
ANNEXES .....	197
Liste des tableaux .....	207
Liste des figures.....	208
Table des abréviations.....	211
BIBLIOGRAPHIE .....	213
Table des matières .....	229

## ABSTRACT

Photosynthesis is the biological process that converts light into chemical energy. It occurs within the chloroplasts of plant cells. Inside these organelles, light energy is absorbed by chlorophyll antennas (light-harvesting complexes or LHC), composed of proteins and pigments, chlorophylls and carotenoids. While chloroplasts possess their own genome, most of the genes have been transferred to the nucleus, thus implying the presence of an efficient protein import and assembly machinery within this organelle. The functioning of the photosynthetic apparatus is also finely regulated, particularly to prevent damage that could be caused by excess light energy.

The aim of this thesis was to investigate how the synthesis and assembly processes of photosynthetic antennas and the photoprotective and acclimation responses to changes in light conditions, to further characterize their interactions. In this study, we have collected some observations concerning the synchronization of the two biosynthesis pathways, chlorophyll and LHC proteins, within the chloroplast. Understanding this synchronization will be crucial in order to understand how organisms adapt to natural variations in light intensity.

We used the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a biological model for its exceptional genetic features. For instance, the analysis of mutants has demonstrated the significance of proteins like cpSRP43 and ALB3.1 in the biogenesis of photosynthetic antennae while also suggesting an alternative pathway. A genetic analysis has precisely identified unexpected genomic rearrangements in a mutant strain of *Chlamydomonas* commonly used for studies on *Chlamydomonas*' acclimation to environmental changes. Finally, we have uncovered the significance of a new genetic context –which is yet to be dissected- that specifies the variable properties of the main photoprotection mechanism in this microalgae.

## RÉSUMÉ

La photosynthèse est le processus biologique qui convertit la lumière en énergie chimique. Elle se déroule dans les chloroplastes des cellules végétales. À l'intérieur de ces organites, l'énergie lumineuse est captée par des antennes chlorophylliennes, connues sous le nom de complexe de récolte de lumière (*Light harvesting complex* ou LHC), constituées de protéines et de pigments, chlorophylles et caroténoïdes. Bien que les chloroplastes possèdent leur propre génome, la plupart des gènes ont été transférés dans le noyau, ce qui implique la présence d'une machinerie efficace d'import et d'assemblage des protéines dans cet organite. Le fonctionnement de l'appareil photosynthétique est également finement régulé, notamment pour éviter les dommages qui pourraient être causés par un excès d'énergie lumineuse.

L'objectif de cette thèse a été d'étudier les processus de synthèse et d'assemblage des antennes photosynthétiques et les réponses de photoprotection et d'acclimatation devant des changements de régime lumineux, dans la perspective plus lointaine d'en comprendre les interactions. Dans cette étude nous avons par exemple recueilli quelques observations relatives à la synchronisation des deux voies de biosynthèse, de la chlorophylle et des protéines LHC, au sein du chloroplaste. La compréhension de cette synchronisation sera essentielle pour comprendre comment les organismes s'adaptent aux variations naturelles de l'intensité lumineuse.

Nous avons utilisé la micro-algue eucaryote *Chlamydomonas reinhardtii* comme modèle biologique pour ses caractéristiques génétiques exceptionnelles. L'analyse de mutants a, par exemple, démontré l'importance des protéines telles que cpSRP43 et ALB3.1 dans la biogénèse des antennes photosynthétiques, tout en suggérant une voie alternative. Une analyse génétique a précisément identifié des réarrangements génomiques inattendus dans une souche mutante de *Chlamydomonas* couramment utilisée pour les études d'acclimatation aux changements environnementaux de *Chlamydomonas*. Enfin nous avons mis à jour l'importance d'un nouveau contexte génétique -qui reste à disséquer- qui spécifie les propriétés variables du principal mécanisme de photoprotection chez cette micro-algue.





# Chapitre 1 - Introduction générale

La photosynthèse oxygénique est un processus essentiel qui convertit la lumière, le dioxyde de carbone et l'eau en énergie chimique et en matière organique, ce qui constitue la base de la structure et des réserves énergétiques de tous les êtres vivants. Ce processus métabolique fondamental se produit chez les plantes, les algues et les cyanobactéries.

À l'origine développée par des procaryotes, les cyanobactéries, il y a plus de 2.5 milliards d'années, la photosynthèse oxygénique a été transmise aux eucaryotes par l'intermédiaire d'une endosymbiose, un événement survenu il y a environ 1.5 milliards d'années. Les endosymbiontes cyanobactériens ont évolué pour donner naissance aux organites que nous connaissons aujourd'hui sous le nom de chloroplastes.

Les événements photochimiques initiaux de la photosynthèse ont lieu au sein des membranes des thylakoïdes, vésicules aplaties empilées à l'intérieur du chloroplaste, et ces réactions sont médiées par les photosystèmes II (PSII) et I (PSI). Le PSII et le PSI sont des complexes supramoléculaires à multiples sous-unités composés d'un centre réactionnel et d'un système antenne périphérique. Les antennes photosynthétiques, également appelées complexes antennaires, permettent de capturer l'énergie solaire, jouant ainsi un rôle essentiel dans la photosynthèse. Ces complexes antennaires sont constitués de nombreuses protéines membranaires liant de l'ordre de 200 chlorophylles par centre réactionnel ainsi que d'autres pigments, des caroténoïdes, en nombre variable suivant les conditions de culture. Ensemble, ces complexes permettent ainsi de collecter efficacement les photons lumineux et de transférer cette énergie vers les centres réactionnels, améliorant ainsi l'efficacité globale de la photosynthèse.

Au cours de l'évolution et de la diversification de la photosynthèse oxygénique, ces organismes photosynthétiques ont développé divers mécanismes pour détecter et réagir à la lumière de manière différente. Ces mécanismes visent à augmenter la capture de la lumière pour la photosynthèse ou à se protéger contre les dommages oxydatifs résultant d'une exposition excessive à la lumière.

## 1. Le chloroplaste

La photosynthèse a lieu dans le chloroplaste, un organite intracellulaire présent dans le cytoplasme des cellules végétales. Il est présent en nombre variable, de quelques dizaines à

quelques centaines pour certaines espèces chez les végétaux supérieurs (exemple d'*Arabidopsis thaliana*), alors que *Chlamydomonas reinhardtii*, ne possède qu'un unique chloroplaste qui occupe entre 50 et 75% du volume cellulaire. Le chloroplaste possède son propre matériel génétique, le génome chloroplastique contient, entre 120 à 135 gènes dans la lignée verte (Daniell et al, 2016; Lopez-Juez, 2007; Ravi et al, 2007), jusqu'à 252 gènes chez les algues rouges (J et al, 2016; Ng et al, 2017) et entre 170 et 180 pour les algues brunes (Liu & Pang, 2016; Starko et al, 2021).

### 1.1. Origine

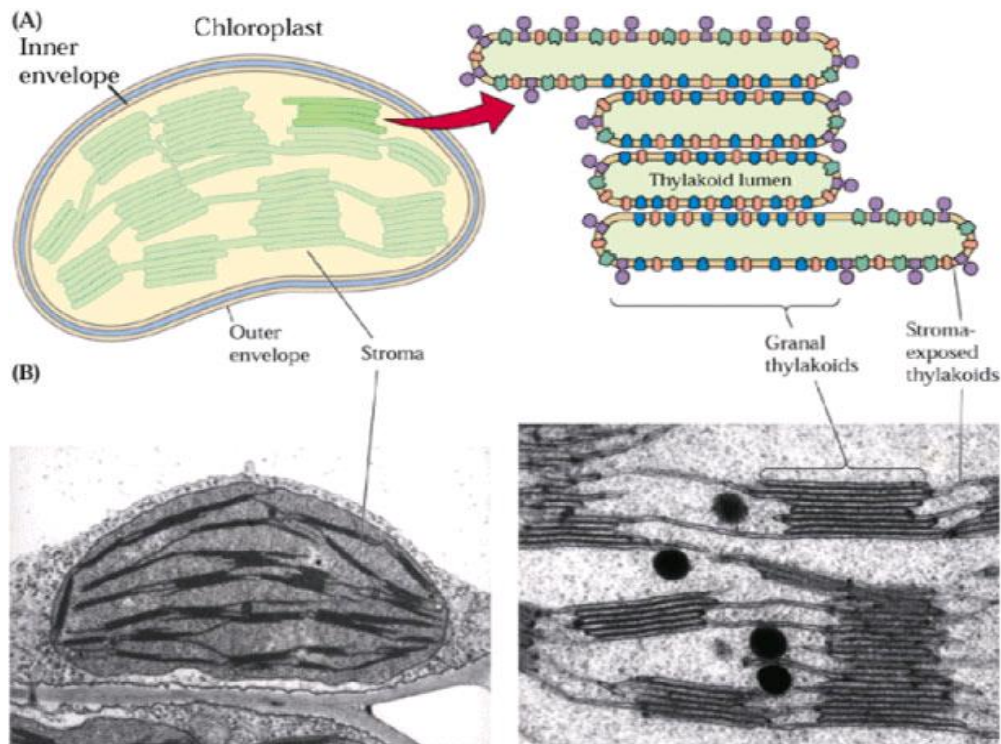
Les analyses phylogénétiques ont montré que tous les chloroplastes ont une origine unique : une endosymbiose primaire entre une bactérie photosynthétique proche des actuelles cyanobactéries et une cellule eucaryote hétérotrophe (Dyall et al, 2004). Selon une étude récente, *Gloeomargarita lithophora* serait la cyanobactérie actuelle ayant le lien le plus étroit avec l'ancêtre des chloroplastes (Ponce-Toledo et al, 2017). L'enveloppe du chloroplaste et les thylakoïdes seraient d'origine bactérienne (Stoebe & Maier, 2002).

### 1.2. Structure

Le chloroplaste est composé d'une double membrane externe (Stengel et al, 2007) et possède un système de membranes internes très structurées en forme de saccules, appelées thylakoïdes. La microscopie électronique permet de localiser ces saccules dans des zones empilées ou granaires, ou encore dans des zones peu denses ou agranaires. Le chloroplaste est donc constitué de trois compartiments solubles : l'espace inter membranaire entre les deux enveloppes, le stroma, et le lumen délimité par la membrane des thylakoïdes (*Figure 1*).

Les membranes externe et interne sont constituées d'environ 60% de lipides pour 40% de protéines. Les protéines des membranes externes sont essentiellement des protéines transporteurs assurant les échanges entre le stroma et le cytosol.

C'est au niveau de la membrane des thylakoïdes que se trouvent les complexes protéiques multimériques qui assurent la conversion de l'énergie lumineuse en gradient électrochimique : les complexes photosystème II (PSII) et photosystème I (PSI) associés aux antennes collectrices d'énergie (*light harvesting complex*, ou LHC), ainsi que le complexe cytochrome *b<sub>6</sub>f* et la synthétase chloroplastique utilisent ce gradient électrochimique pour la production d'ATP.



**Figure 1 : Schéma et structure du chloroplaste (d'une plante supérieure)**

(A) Schéma d'un chloroplaste montrant les différents compartiments de l'organite.  
 (B) Photographies de microscopie électronique révélant l'ultrastructure du chloroplaste. (Malkin & Niyogi, 2000)

### 1.3. Conséquences de la nature endosymbiotique du chloroplaste

#### 1.3.1. Évolution du génome chloroplastique depuis les événements d'endosymbiose

##### a) Réduction de la taille du génome

Nous avons vu que le génome du chloroplaste contient de 120 à 135 gènes alors que jusqu'à 3000 protéines ont été identifiées dans les chloroplastes (Jarvis & López-Juez, 2013). De plus, le génome actuel des cyanobactéries comporte environ 3000 gènes. Il y a donc eu une réduction de la taille du génome lors de la transition de l'état d'endosymbiote autonome vers l'état d'organite (Dyall et al, 2004).

Trois mécanismes sont proposés pour expliquer cette réduction du génome : les pertes de gènes, les substitutions de gènes et les transferts de gènes.

1. Certains gènes ont probablement été perdus lors de la transition endosymbiote - organite parce que l'état endosymbiote les rendait inutiles, tels, par exemple, les gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi bactérienne (McFadden, 1999).

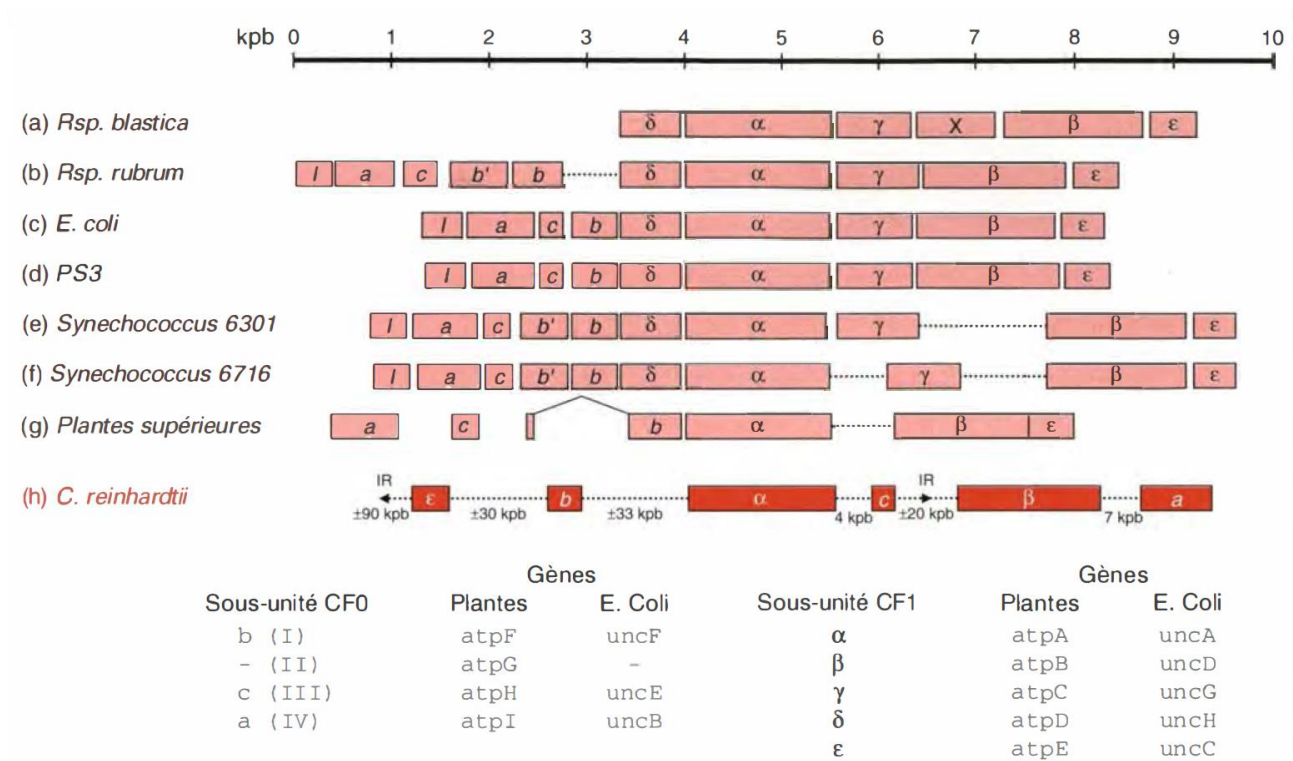
2. D'autres ont été perdus du génome de l'organite car une protéine codée par un gène nucléaire préexistant, adressée à l'organite, s'est substituée au produit du gène de l'organite (Ravi et al, 2007).

3. Enfin, de nombreux gènes ont été transférés du génome de l'organite vers le génome nucléaire (Ravi et al, 2007). Une étude de phylogénie montre qu'environ 18% de gènes nucléaires d'*Arabidopsis* dérivent du génome de l'ancêtre des cyanobactéries (Martin et al, 2002).

Le transfert massif de gènes vers le noyau implique la présence d'une machinerie efficace d'import des protéines dans l'organite ; pour être fonctionnels, les gènes transférés ont dû acquérir des éléments d'expression, notamment une séquence d'adressage à l'organite (Dyall et al, 2004; Gould et al, 2008; Ravi et al, 2007; Ziehe et al, 2018). Dans le cas des chloroplastes issus d'endosymbiose secondaire, la machinerie d'import doit permettre le franchissement de 4 membranes (Gould et al, 2008).

#### *b) Organisation du génome chloroplastique*

La disposition des gènes le long du chromosome circulaire du chloroplaste indique une différence majeure par rapport à l'organisation génique des procaryotes. Les gènes codant les sous-unités d'un même complexe protéique multimérique sont très dispersés, qu'il s'agisse des gènes *rpo* codant les sous-unités de l'ARN polymérase ou encore des familles *psa*, *psb*, *pet* ou *atp* de la photosynthèse. Cette disposition diffère complètement avec l'organisation bactérienne en opéron, qui permet une transcription et une traduction couplées des gènes impliqués dans une même fonction (*Figure 2*).



**Figure 2 : Perte progressive de l'opéron de l'ATP synthétase au cours de l'évolution dans le chloroplaste d'eucaryotes photosynthétiques.**

Les sous-unités non représentées dans le cas des plantes supérieures ou de *Chlamydomonas reinhardtii* sont localisées dans le génome nucléaire (Wollman & Girard-bascou, 1994).

### c) Pourquoi le génome est-il conservé au sein du chloroplaste ?

Plusieurs théories ont été avancées pour expliquer la préservation d'un génome au sein du chloroplaste (Barbrook et al, 2006; Woodson & Chory, 2008) :

1. Certaines protéines codées par le génome du chloroplaste sont très hydrophobes ce qui empêcherait leur importation efficace (Popot & de Vitry, 1990).

2. D'autres pourraient être toxiques dans le cytosol (Daley & Whelan, 2005).

3. La divergence du code génétique entre le génome nucléaire et le génome du chloroplaste pourrait avoir établi une barrière aux transferts de gènes du chloroplaste vers le noyau (de Grey, 2005).

4. Certains gènes seraient maintenus dans le chloroplaste pour permettre une régulation rapide de leur expression en réponse aux signaux provenant de la chaîne de transfert des électrons, notamment les signaux redox (Allen, 2003).

5. Pour certaines sous-unités des complexes de la chaîne photosynthétique, il pourrait être nécessaire d'assurer une coordination entre la traduction et l'assemblage au sein du

complexe, ce qui justifierait la localisation du gène dans l'organite (Choquet & Vallon, 2000; Zerges, 2002).

Cependant, il semble qu'aucune de ces hypothèses, prise individuellement, ne soit suffisante pour expliquer la conservation des génomes dans les organites.

### 1.3.2. *Maintien d'un génome au sein du chloroplaste : conséquences et enjeux*

La présence d'un génome implique le maintien dans l'organite d'une machinerie de réplication et d'une machinerie d'expression (transcription, maturation des transcrits, traduction). La grande majorité des facteurs protéiques impliqués dans la réplication et l'expression des génomes des organites sont codés par le génome nucléaire. Les ARNt sont, quant à eux, soit codés par le génome de l'organite soit importés du cytoplasme. En revanche, les ARN ribosomiques sont toujours codés dans le génome chloroplastique, tout comme une grande majorité des sous-unités de l'ARN polymérase de type bactérien, ainsi que des sous-unités qui constituent l'appareil photosynthétique : la grande sous-unité de la RuBisCO (*rbcL*) et de nombreuses sous-unités de la chaîne de transfert d'électrons de la membrane thylakoïde (PSI, PSII, cytochrome *b<sub>6</sub>f* et ATP synthétase).

Le transfert de gènes évoqué ici a eu pour conséquence que beaucoup de protéines oligomériques du chloroplaste, qu'il s'agisse des ribosomes ou des protéines de la photosynthèse, ont une origine génétique mixte : dans chacun des complexes protéiques impliqués dans le transfert d'électrons photosynthétique et dans l'ATP synthétase, certaines sous-unités sont codées par le génome nucléaire, synthétisées dans le cytosol et importées dans l'organite tandis que d'autres protéines sont codées par le génome de l'organite où elles sont synthétisées. Il doit donc y avoir une coordination de l'expression du génome nucléaire et du génome chloroplastique pour permettre un bon fonctionnement de l'organite (Woodson & Chory, 2008).

### 1.3.3. *Importation et acheminement des protéines dans le chloroplaste*

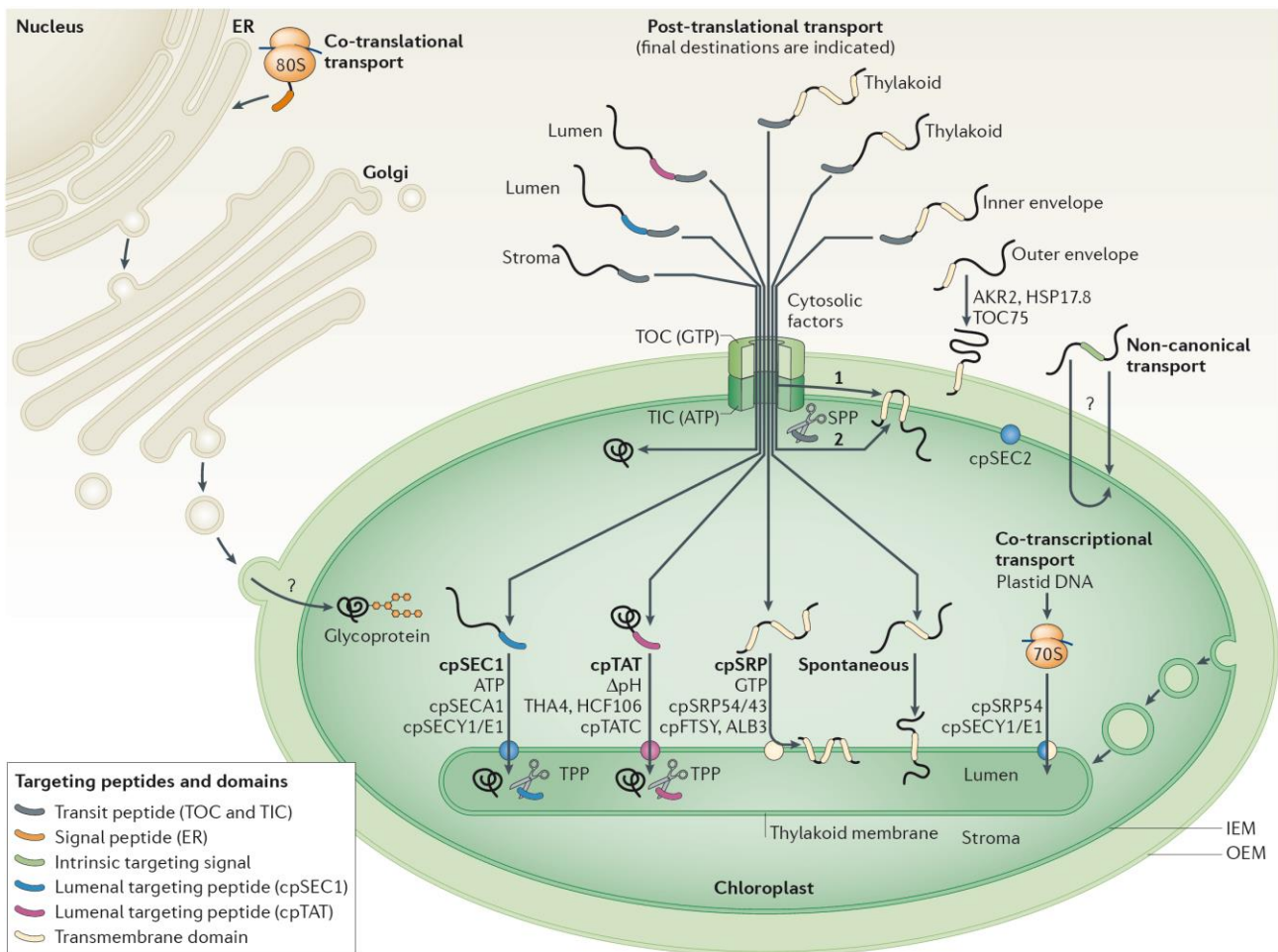
Les protéines chloroplastiques qui sont codées par le noyau sont synthétisées dans le cytosol puis doivent atteindre le chloroplaste pour enfin parvenir à leur destination finale (*Figure 3*). Il existe six destinations possibles pour ces protéines : les trois différentes membranes (les deux membranes de l'enveloppe et la membrane des thylakoïdes) et les trois compartiments solubles (l'espace inter-membranaire de l'enveloppe, le stroma et le lumen) (Jarvis & López-Juez, 2013; Lopez-Juez, 2007).

La plupart des protéines d'origine nucléaire présentes dans le chloroplaste sont synthétisées dans le cytosol sous une forme « précurseur », elles possèdent une séquence d'adressage en N-terminal composée de 20 à 150 acides aminés (Gould et al, 2008). Seules quelques protéines destinées à la membrane externe de l'enveloppe ne portent pas cette séquence. Ces séquences sont reconnues par deux complexes protéiques au niveau de l'enveloppe du chloroplaste, le complexe TOC (*translocon of the outer envelope of chloroplasts*) et TIC (*translocon of the inner envelope of chloroplasts*). Ces deux complexes permettent ensuite aux protéines chloroplastiques de traverser l'enveloppe pour se retrouver dans le stroma, où la séquence d'adressage est clivée (Jarvis & Robinson, 2004; Leister, 2003; Stengel et al, 2007; Ziehe et al, 2018).

Dans le stroma, les protéines importées qui sont solubles, sont prises en charge par des chaperones pour acquérir leur conformation finale, tandis que pour les autres protéines, quatre voies distinctes ont été identifiées pour leur transfert du stroma aux thylakoïdes. Ces quatre voies sont étroitement apparentées aux voies de translocation analogues dans les bactéries dont elles dérivent. Les protéines luménales traversent la membrane des thylakoïdes soit par la voie Tat (*twin-arginine translocation*) soit par la voie Sec (*secretory*), qui dépend d'une protéine apparentée à la SecA bactérienne. Des séquences d'adressages distinctes, situées en N-terminale, dirigent les protéines vers l'une ou l'autre voie. Après translocation, ces séquences sont clivées dans le lumen. Enfin, la plupart des protéines membranaires s'insèrent dans la membrane des thylakoïdes par la voie SRP (*signal recognition particle*) (voir *Chapitre 2*) alors que d'autres s'insèrent « spontanément » sans avoir recours à de quelconques cofacteurs (Jarvis & López-Juez, 2013).

Bien que les protéines codées par le génome chloroplastique ne participent que peu à la diversité du protéome chloroplastique (seulement 1/30) elles sont cependant importantes pour la photosynthèse et représentent la moitié en masse des protéines présentes dans le chloroplaste.





**Figure 3 : Vue d'ensemble du transport des protéines chloroplastiques d'origine nucléaire et leur adressage vers les différents sous compartiments du chloroplaste**

La plupart des protéines nucléaires pénètrent dans le chloroplaste après leur synthèse grâce au complexe TOC-TIC. Dès leur arrivée, leurs peptides de transit sont éliminés. Les protéines ciblées vers la membrane interne peuvent suivre deux voies : l'arrêt-transfert (1) ou la post-importation (2). Pour les thylakoïdes, il existe quatre voies possibles : deux voies conduisent au lumen des thylakoïdes (cpSEC1 et cpTAT) et deux voies conduisent à la membrane des thylakoïdes elles-mêmes (cpSRP et la voie spontanée). Les protéines de la membrane externe n'ont généralement pas de peptides de transit et sont ciblées par des signaux internes. Les lipides, et peut-être des protéines, sont apportés aux thylakoïdes par des vésicules dérivées de la membrane interne (Jarvis & López-Juez, 2013).

## 1.4. Fonctions

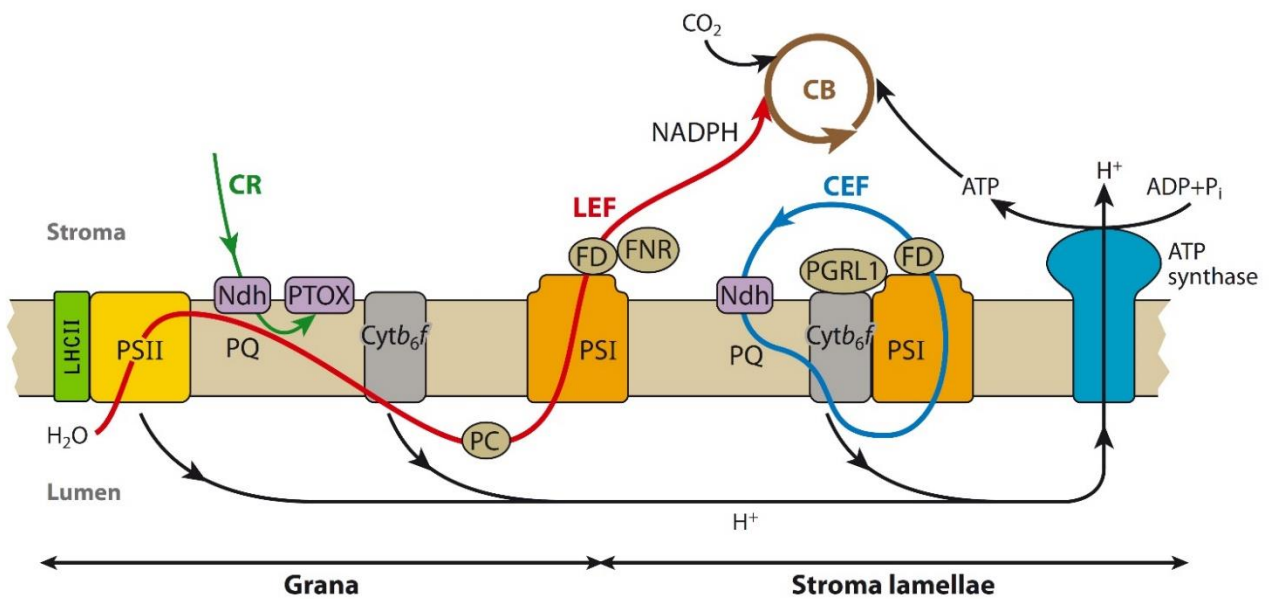
### 1.4.1. La fonction majeure du chloroplaste : la photosynthèse

La fonction majeure du chloroplaste consiste donc à effectuer les réactions de la photosynthèse, conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique, sous forme de pouvoir réducteur NADPH et d'ATP, avec production de dioxygène (Figure 4). Cette énergie chimique est utilisée pour fixer le carbone prélevé dans le CO<sub>2</sub> atmosphérique et former des molécules organiques au cours du cycle de Benson-Calvin. L'excès de produits de la photosynthèse est stocké dans le chloroplaste sous forme d'amidon (Gould et al, 2008). Les différentes étapes de la conversion de l'énergie lumineuse se déroulent dans les thylakoïdes

tandis que la synthèse de glucides se déroule dans le stroma du chloroplaste (Duy et al, 2007; Leister, 2003).

L'absorption d'un photon au niveau des antennes collectrices entraîne l'excitation des molécules de chlorophylle. Cette excitation est transmise de proche en proche et au hasard jusqu'aux chlorophylles des centres réactionnels. Le transfert d'un exciton au donneur d'électrons primaire du photosystème II (PSII), noté  $P_{680}$ , entraîne une séparation de charge, dans la plupart des cas. Cependant l'état excité  $P_{680}^*$  peut également se désactiver en réémettant l'énergie sous forme de fluorescence ou de chaleur. Au cours de la séparation de charge, le donneur primaire est oxydé et un électron est transféré à un accepteur dans le centre réactionnel. Le donneur primaire est ensuite réduit par un électron prélevé chez des donneurs secondaires qui, suivant un mécanisme à quatre états, conduira à l'oxydation de l'eau. Ce phénomène fondamental appelé photolyse de l'eau, contribue à la mise en place du gradient électrochimique de protons et libère de l'oxygène. L'électron généré par la séparation de charge est transféré à un transporteur liposoluble, la plastoquinone (PQ) au niveau du site  $Q_B$  du PSII qui, doublement réduite et doublement protonée en plastoquinol ( $PQH_2$ ) après deux séparations de charges dans le PSII, est libérée du site  $Q_B$  et diffuse librement dans la membrane. Le transfert d'électrons se poursuit par l'oxydation du  $PQH_2$  au niveau du complexe cytochrome  $b_6f$ , qui contribue majoritairement à la construction du gradient électrochimique de protons. Le complexe cytochrome  $b_6f$  peut transférer des électrons à un transporteur hydrosoluble, la plastocyanine (PC) ce qui permettra de re-réduire le donneur primaire du centre réactionnel du PSI. En effet, parallèlement à la séparation de charge dans le PSII, la capture d'un photon au niveau du donneur primaire du PSI, induit aussi une séparation de charge. D'un côté  $P_{700}^+$  est réduit par la plastocyanine tandis que l'électron libéré est utilisé pour réduire la ferrédoxine (Fd). La ferrédoxine/NADP réductase (FNR) catalyse la réduction du  $NADP^+$  en NADPH par la ferrédoxine. Le gradient de protons généré par ce **transfert linéaire des électrons** (LEF pour *linear electron flow*), le long de la chaîne photosynthétique, est utilisé pour la synthèse d'ATP par l'ATP synthétase. Le pouvoir réducteur, sous forme de NADPH, et l'ATP sont ensuite utilisés dans le cycle de Calvin-Benson (CB). Ce cycle fait intervenir un grand nombre d'enzymes et consiste en la fixation du  $CO_2$  sur le ribulose 1,5-biphosphate qui donne lieu à la synthèse de deux molécules de 3-phosphoglycérate par la RuBisCO (ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase, EC 4.1.1.39). Le glycéraldéhyde 3-phosphate synthétisé plus en aval dans le cycle sera utilisé pour la synthèse de glucose.

Il existe une autre voie de transfert d'électrons impliquant la réinjection des électrons provenant du côté accepteur du PSI (NADPH) dans la chaîne photosynthétique. Ces électrons sont réintroduits soit dans le pool de plastoquinone (Alric et al, 2010; Johnson, 2011; Shikanai, 2007) soit directement au niveau du cytochrome  $b_6f$  (Nawrocki et al, 2019). Cette voie de transfert contribue à la construction d'un gradient électrochimique, favorisant ainsi la production d'ATP, sans toutefois générer une nouvelle production nette de NADPH. Ce processus est connu sous le nom **flux d'électrons cyclique** (CEF pour *cyclic electron flow*) autour du PSI (Arnon et al, 1954).



**Figure 4 : Représentation schématique de la chaîne photosynthétique**

Les différents transferts des électrons sont représentés dans la chaîne photosynthétique. En rouge, le transfert linéaire des électrons (LEF pour *linear electron flow*), tandis qu'en bleu nous avons le transfert cyclique des électrons (CEF pour *cyclic electron flow*). Le flux des protons est également indiqué en noir. LHC : light harvesting complex ; PSII : photosystème II ;  $b_6f$  : complexe cytochrome  $b_6f$  ; PSI : photosystème I ; PQ : plastoquinone ; PC : plastocyanine ; FD : ferrédoxine ; FNR : ferrédoxine/NADP réductase ; CB : cycle de Calvin-Benson PGRL1 Ndh (Rochaix, 2014).

La **chlororespiration** (CR) représente un autre moyen efficace d'accepter des électrons, et la ferrédoxine réduite joue un rôle central dans ce processus. Deux enzymes essentielles interviennent dans cette voie : le complexe de déshydrogénase NADH et l'oxydase terminale plastidiale, tous deux codés par le noyau (PTOX). L'enzyme PTOX catalyse la réaction où les électrons sont transférés de PQH<sub>2</sub> à l'oxygène moléculaire pour produire de l'eau (Krieger-Liszkay & Feilke, 2015).

#### 1.4.2. Autres fonctions essentielles

Les fonctions du chloroplaste ne sont pas restreintes à la photosynthèse. Le chloroplaste joue un rôle important dans la réduction des nitrates à la lumière, permettant de fournir des

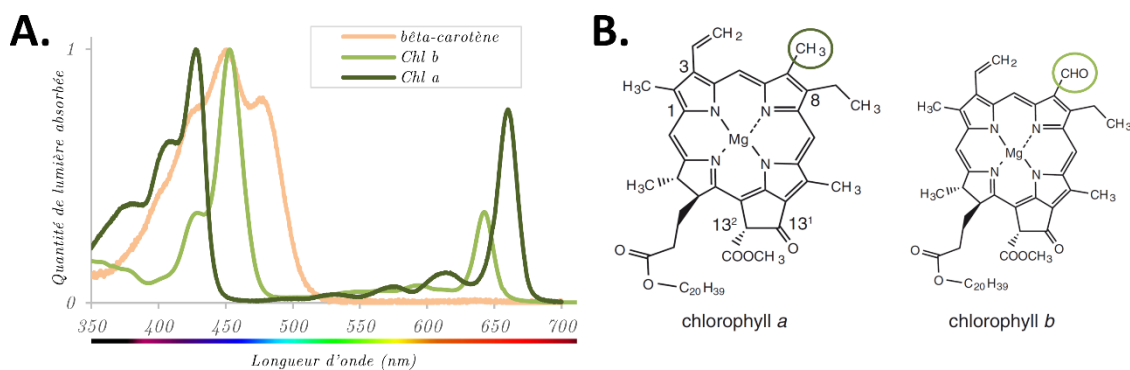
composés azotés réduits. Il participe également à l'amination réductrice conduisant à la synthèse d'acides aminés, à la synthèse de nucléotides, ainsi qu'à la biosynthèse de lipides et d'autres composés tels que les isoprénoïdes (caroténoïde et stérol) et les tétrapyrroles (hème et chlorophylle) (Duy et al, 2007). Et ce sont en particulier ces pigments, caroténoïde et chlorophylle, qui jouent un rôle clé dans la capture de la lumière et assurant ainsi la conversion de cette énergie en matière organique.

## 2. Les pigments photosynthétiques

Les chloroplastes contiennent deux principaux groupes de pigments photosynthétiques, les chlorophylles (Chl) et les caroténoïdes (Green & Durnford, 1996). Chacun de ces types de pigments absorbe la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques. La réunion des spectres d'absorption de ces pigments améliore l'efficacité de l'absorption de lumière (*Figure 5-A*), ce qui permet à l'appareil photosynthétique d'exploiter l'énergie lumineuse de façon optimale (Govindjee & Govindjee, 1974). Lorsqu'un pigment photosynthétique absorbe un photon, il passe rapidement d'un état fondamental à un état excité, possédant un plus haut niveau d'énergie.

### 2.1. Chlorophylles

Parmi les chlorophylles (Chl), on distingue deux types, Chl *a* et Chl *b*. Elles ont la particularité d'absorber la lumière bleue (de 350 à 500 nm) et la lumière rouge (de 600 à 700 nm) (voir *Figure 5-A*), tout en atténuant peu la lumière verte, ce qui donne leur couleur verte aux plantes. Ces deux chlorophylles partagent une structure commune (*Figure 5-B*) avec, une chaîne latérale, appelée « queue phytol » constituée de vingt atomes de carbone et un noyau tétrapyrrole, mais elles se différencient par la présence d'un groupement



**Figure 5 : Les principaux pigments photosynthétiques présents chez les végétaux**

(A) Spectres d'absorption des chlorophylles (Chl) *a* et *b* et également celui du  $\beta$ -carotène (source : PhotoChem : (Taniguchi et al, 2018)) et (B) structure moléculaire de la Chl *a* et la Chl *b*.

méthyle  $-CH_3$  (pour la Chl *a*) ou d'un groupe aldéhyde  $-CHO$  (pour la Chl *b*). La biosynthèse des chlorophylles sera abordée dans le *Chapitre 2 - Partie B - 1*).

Lorsqu'une molécule de chlorophylle absorbe de la lumière, elle passe de son état fondamental à son premier état excité dit « singulet » ( $^1Chl^*$ ). Cet état excité peut ensuite évoluer de trois manières possibles :

- 1) l'état excité revient à l'état fondamental en émettant un photon (fluorescence) ;
- 2) l'énergie reçue par la molécule de chlorophylle est transmise à une autre molécule de chlorophylle par transfert d'énergie jusqu'à l'excitation des paires spéciales de Chl des centres réactionnels PSII et PSI où l'énergie est utilisée dans la photosynthèse ; on parle alors d'extinction photochimique ;
- 3) l'état excité revient à l'état fondamental en émettant de l'énergie sous forme de chaleur, c'est ce qu'on nomme extinction non-photochimique (*non photochemical quenching* ou NPQ).

Cependant un excès d'énergie d'excitation peut également favoriser la conversion d'états excités singulet de la chlorophylle en état triplet ( $^3Chl^*$ ). La chlorophylle sous l'état triplet peut alors réagir avec le dioxygène ( $O_2$ ) qui est à l'état triplet dans son état fondamental, et former de l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), une espèce ultraréactive, toxique pour la cellule et pouvant dégrader lipides, acides nucléiques, pigments et protéines.

La mesure de la fluorescence de la Chl *a* devient un puissant outil pour mesurer l'absorption de la lumière et le fonctionnement de la photosynthèse, puisque son amplitude et toute cinétique de changement de cette amplitude renseignera sur l'activité des autres voies de dé-excitation de la chlorophylle, qu'il s'agisse du transfert d'électrons ou d'émission de chaleur.

## 2.2. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments accessoires, présents dans les antennes photosynthétiques et centre réactionnels. La plupart des caroténoïdes sont constitués de huit unités d'isoprène avec un squelette de 40 atomes de carbone. Leur structure générale consiste généralement en une chaîne polyène avec neuf doubles liaisons conjuguées et un groupe terminal aux deux extrémités de la chaîne polyène (Maoka, 2020). Ces composés se divisent en trois catégories principales : les carotènes acycliques (comme le lycopène), les carotènes

cycliques (comme l' $\alpha$ -carotène et le  $\beta$ -carotène), et les xanthophylles (comme la lutéine, la zéaxanthine).

Leur première fonction consiste à augmenter l'absorption de la lumière dans le domaine spectral bleu/bleu-vert, entre 400 et 560 nm (Ashenafi et al, 2023), comme par exemple le  $\beta$ -carotène en *Figure 5-A*, complétant ainsi l'absorption de la lumière par les chlorophylles. Mais ils jouent principalement un rôle dans la protection de l'appareil photosynthétique contre les dommages photo-oxydatifs en neutralisant les espèces réactives à l'oxygène (ROS) et en particulier contre l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) produit par les chlorophylles à l'état triplet ( $^3Chl^*$ ) (Pinnola & Bassi, 2018).

### 3. Les photosystèmes et leurs antennes

Chez les plantes et les algues vertes, les photosystèmes sont constitués d'un centre réactionnel (CR) entouré d'un complexe antennaire (LHC). Les LHC absorbent la lumière et transfèrent l'énergie d'excitation vers les CR, où se produit la séparation de charges. Deux types de photosystèmes, PSI et PSII, se distinguent par la nature de leur CR : celui du PSI possède des centres à fer-soufre comme accepteurs terminaux (de type I), tandis que celui du PSII utilise des quinones (de type II). Au sein des membranes du thylakoïde du chloroplaste, les PSII sont principalement associés en ensemble dans les zones d'empilements granaires tandis que les PSI sont localisés dans les régions intergranaires.

Certaines sous-unités des PS sont codées par le génome chloroplastique et synthétisées dans le stroma, tandis que d'autres sous-unités sont codées par le génome nucléaire, synthétisées dans le cytosol puis importées dans le chloroplaste. Ainsi les gènes codant pour les sous-unités du PSI sont nommés *psa* lorsqu'ils sont codés par le génome chloroplastique et *PSA*, par le génome nucléaire ; et de la même façon dans le cas du PSII : *psb* ou *PSB*. En revanche, tous les gènes codant pour les protéines LHC (LHCI et LHCII), nommés *LHCA* et *LHCB*, se trouvent dans le génome nucléaire.

Les structures de la plupart des complexes d'antenne sont devenues disponibles ces dernières années (Huang et al, 2021; Pan et al, 2020; Wei et al, 2016), montrant que l'organisation des protéines et des pigments est hautement conservée parmi les LHC, avec cependant des différences dans les sites de liaison pour les Chl (Pan et al, 2020).

### 3.1. PSII – LHCII

Le PSII est un dimère sur le plan structural (*Figure 6-B*) mais chaque monomère fonctionne indépendamment de son voisin. Cette absence de corrélation structure/fonction reste un des éléments intrigants de la photosynthèse contemporaine.

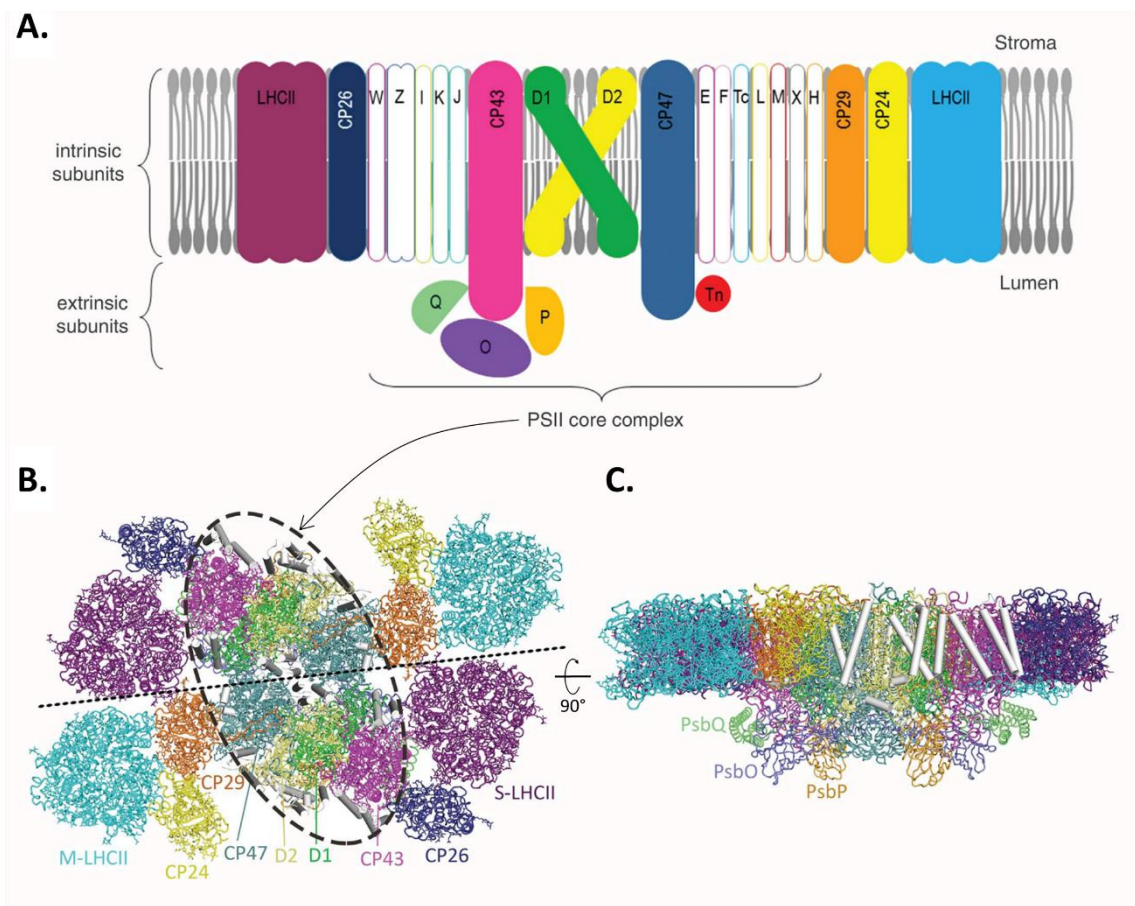
Le complexe central du PSII comprend au moins vingt sous-unités. Comme le montre la *Figure 6-A*, la plupart d'entre elles sont des protéines intrinsèques à la membrane. Au centre de chaque monomère se trouve le complexe RC hétérodimérique D1/D2 (PsbA/PsbD), qui lie tous les cofacteurs impliqués dans le transfert d'électrons. De chaque côté du monomère D1/D2 se trouvent les protéines des antennes internes, CP47 (PsbB) et CP43 (PsbC) et, étroitement lié au complexe central, le cytochrome  $b_{559}$  (hétérodimère composé des sous-unités  $\alpha$  (PsbE) et  $\beta$  (PsbF)). Les autres sous-unités mineures, dont la plupart consistent en une seule hélice alpha transmembranaire, comprennent PsbH, PsbJ, PsbK, PsbL, PsbM, PSBR, PsbT, PSBW, PSBX, PSBZ et Ycf12 (Sheng et al, 2019). En plus des sous-unités intrinsèques à la membrane, il y a trois sous-unités extrinsèques situées du côté luminal, notamment les protéines du OEC (pour *Oxygen evolving complex*) -PSBO, PSBP, PSBQ- et PSBTn (Chen et al, 2019).

Les LHCII, sous forme trimérique et associés au PSII, sont classés en trois catégories : S (*strongly* pour fortement associés), M (*moderately* pour modérément associés) et L (*loosely* pour faiblement liés), en fonction de leur emplacement dans le supercomplexe PSII-LHCII et de leurs affinités avec le centre (Boekema et al, 1999). Les apoprotéines de LHCB sont constitués de 210 à 260 acides aminés (Jansson, 1999) et sont associés avec un nombre compris entre 10 et 14 chlorophylles (5 à 10 Chl *a* et 4 à 6 Chl *b*) ainsi que de 2 à 4 caroténoïdes.

Chez les plantes supérieures, le système d'antenne périphérique du PSII est composé de six types de protéines LHC (LHCB1-6) codées par les gènes LHCB1-6 (Jansson et al, 1992). LHCB1-3 forment des hétérotrimères et constituent le LHCII. LHCB4-6, connus respectivement sous les noms de CP29, CP26 et CP24, sont présents sous forme monomère et sont situés entre le LHCII et le complexe central (Sheng et al, 2019). La structure d'un supercomplexe (exemple du pois - *Pisum sativum*) du PSII (C2S2M2) est montrée dans la *Figure 6-B* (Su et al, 2017). Le complexe est un dimère du noyau du PSII et contient deux exemplaires de CP29, CP26 et CP24. Le trimère LHCII fortement lié au PSII (S-LHCII) est composé de LHCB1 et LHCB2. Le M-LHCII est associé au cœur via CP29 et se compose de

LHCB1 et LHCB3 (Caffarri et al, 2009). Alors que CP26 et CP24 se trouvent à la périphérie du supercomplexe, CP29 est situé entre le trimère M et le complexe central du PSII.

Chez les algues vertes, un plus grand nombre de sous-unités LHC sont associées au PSII (Elrad & Grossman, 2004; Natali & Croce, 2015). Le trimer LHCII majeur chez *Chlamydomonas reinhardtii*, est codé par 9 gènes (*LHCBM1-9*) et a été divisé en 4 groupes en fonction de leur homologie de séquence : type I (LHCBM3, LHCBM4, LHCBM6, LHCBM8 et LHCBM9), type II (LHCBM5), type III (LHCBM2 et LHCBM7) et type IV (LHCBM1) (Natali & Croce, 2015). En revanche, seules deux sous-unités d'antenne mineures, CP26 et CP29, sont présentes et le gène codant CP24 est absent du génome de cette algue (Merchant et al, 2007). Chaque monomère de PSII est entouré de trois trimères LHC et des deux sous-unités d'antenne mineures (Tokutsu et al, 2012).



**Figure 6 : Structure et organisation du complexe LHCII-PSII (chez les plantes)**

(A) Schéma simplifié montrant la composition globale en sous-unités du supercomplexe LHCII-PSII chez les plantes (un seul monomère est représenté ; la membrane lipidique est indiquée en gris). (B) Vue du supercomplexe depuis le côté stromal. Deux monomères PSII-LHCII sont représentés et séparés par la ligne en pointillés noirs, le centre réactionnel et leur cœur d'antenne, dimérique, sont encerclés en pointillés noirs. Les codes couleur sont cohérents avec ceux de (A). (C) Vue latérale du supercomplexe LHCII-PSII. Adapté de (Su et al, 2017).

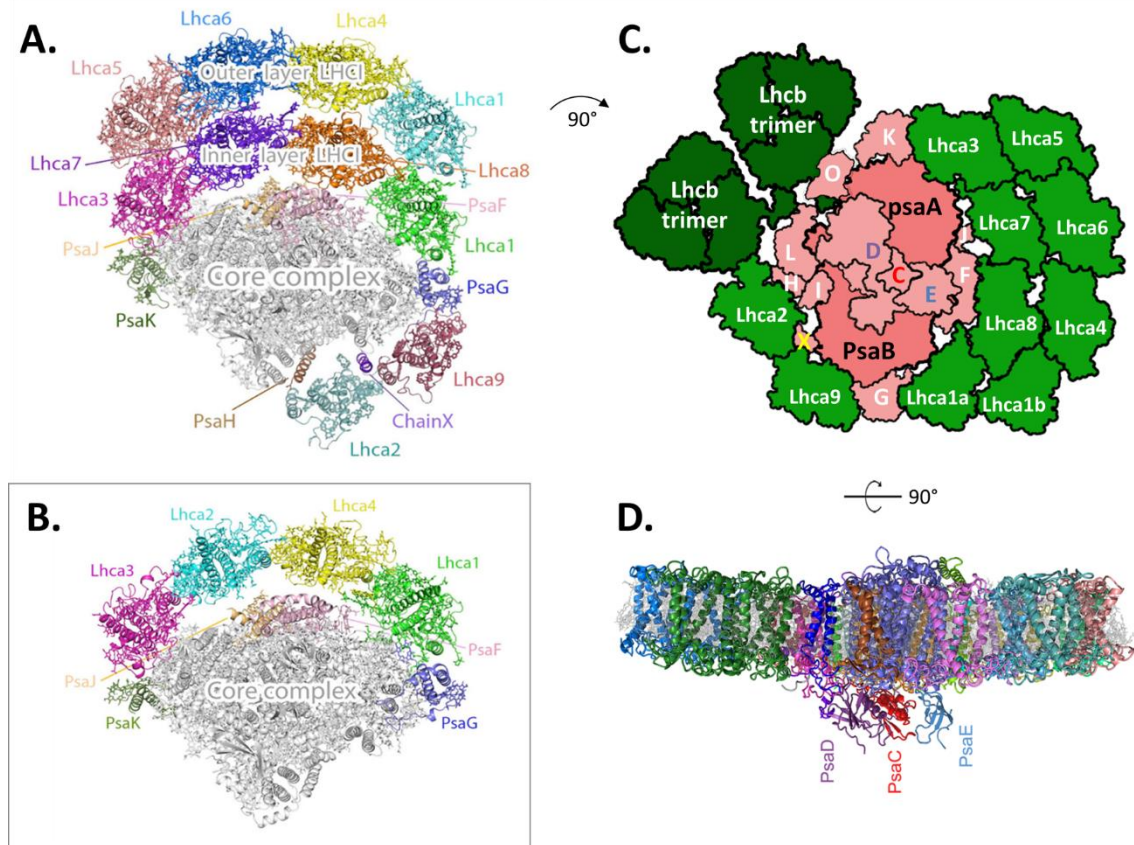


### 3.2. PSI – LHCI

Les composants principaux du complexe central du PSI sont les deux protéines homologues PsaA et PsaB, codées par les gènes chloroplastiques *psaA* et *psaB*. Ces protéines accueillent à la fois le RC et la plupart des pigments antennaires, liant ensemble un total de 85-86 molécules de Chl *a* et 13-16 molécules de  $\beta$ -carotène (Jordan et al, 2001; Mazor et al, 2015; Su et al, 2019). Les autres sous-unités intrinsèques à la membrane du PSI, présentes chez les plantes et les algues sont PSAF, PSAG, PSAH, PSAL, PsaJ, PASK, PASL et PSAO (Ben-Shem et al, 2003; Jordan et al, 2001). De plus, trois sous-unités extrinsèques (PsaC, PSAD, PSAE) sont présentes du côté stromal. La structure des complexes centraux du PSI est bien conservée chez tous les organismes photosynthétiques, à l'exception de la présence ou de l'absence de certaines sous-unités périphériques telles que PSAG, PSAH, PsaM, PSAN, PsaX (par exemple, PSAG et PSAH sont spécifiques aux eucaryotes et sont impliqués dans la liaison avec les polypeptides des LHC).

Le complexe PSI-LHCI des plantes supérieures contient quatre protéines LHCI (LHCA1-4) qui sont liées au PSI du côté PSAF/PsaJ dans l'ordre suivant : LHCA1, LHCA4, LHCA2 et LHCA3, du côté PSAG vers le côté PSAK (*Figure 7-B*). Le tétramère hétérogène LHCI est composé de deux hétérodimères fonctionnels, LHCA1-LHCA4 et LHCA2-LHCA3 (Wientjes & Croce, 2011). Ce complexe contient 156 molécules de Chl et 35 caroténoïdes (Mazor et al, 2015; Qin et al, 2015).

Chez *Chlamydomonas*, neuf gènes *LHCA* (*LHCA1-9*) sont exprimés à des niveaux stoechiométriques (Mozzo et al, 2010). La structure révèle que le complexe central du PSI est associé à dix LHCI (Ozawa et al, 2018). Contrairement à la seule couche d'antennes du PSI des plantes, huit protéines LHCA sont organisées en deux couches du côté PSAF/PsaJ. Chaque couche contient quatre protéines LHCA disposées en forme de croissant, formant les ceintures internes et externes de LHCI (*Figure 7-A*). La ceinture externe est composée de LHCA5-LHCA6-LHCA4-LHCA1, tandis que la ceinture interne est composée de LHCA3-LHCA7-LHCA8-LHCA1. Le supercomplexe PSI-LHCI contient deux protéines LHCA supplémentaires, LHCA2 et LHCA9, directement connectées au noyau du PSI du côté de PSAL, mais elles sont liées plus faiblement et peuvent être perdues plus facilement (Takahashi et al, 2004).



### Figure 7 : Structure du complexe LHCI-PSI

Structure globale du supercomplexe LHCI-PSI chez (A) *Chlamydomonas reinhardtii* (micro-algue) et (B) *Pisum sativum* (pois) (Pan et al, 2020) ; vues depuis le côté stromal.

Structure du supercomplexe LHCI-PSI-LHCII à l'état 2 chez *C. reinhardtii* (C) dessin réalisé à partir des données PDB (6IJO et 7DZ7) et (D) vue latérale du supercomplexe (Huang et al, 2021).

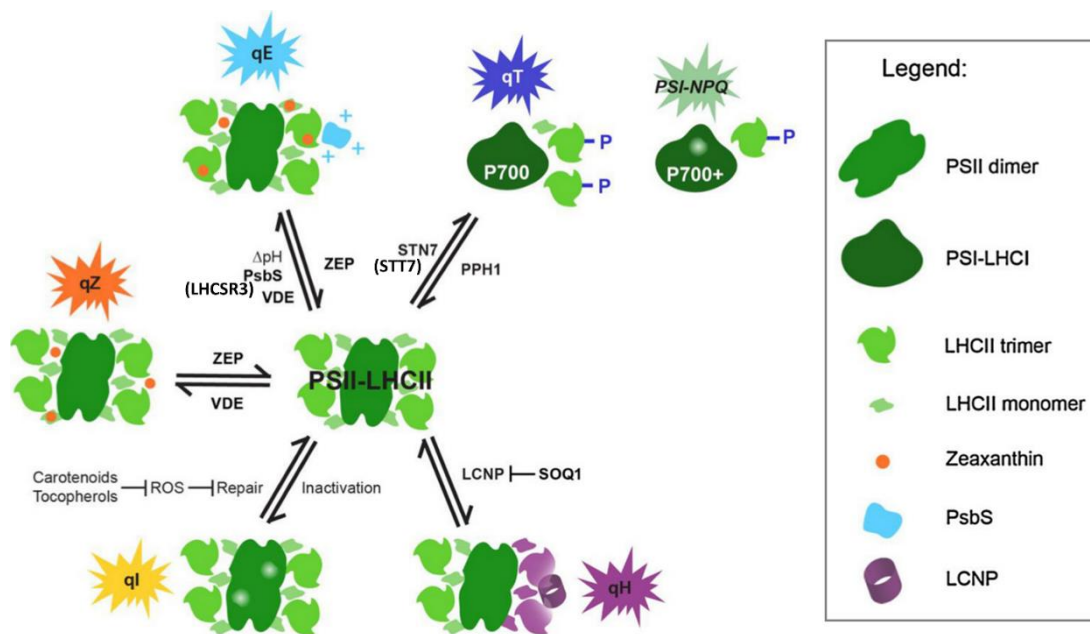
Une caractéristique intéressante des supercomplexes PSI-LHCI chez *Chlamydomonas* est qu'ils peuvent être isolés à partir de cellules se trouvant soit à l'État 1, soit à l'État 2 (lorsqu'une fraction des protéines LHCII mobiles est associée au PSI, comme expliqué au *paragraphe suivant*) permettant ainsi de déterminer la position de fixation des LHCII sur le supercomplexe PSI-LHCI (*Figure 7-C & D* ; (Huang et al, 2021)).

## 4. Régulation de la photosynthèse & Acclimatation

Les organismes photosynthétiques s'adaptent aux variations de lumière en ajustant le fonctionnement de leurs complexes photosynthétiques (ou leur processus de photosynthèse) pour optimiser l'absorption de la lumière tout en évitant les dommages causés par une surcharge de photons absorbés (par une production de ROS). De plus, les organismes motiles, tels que *Chlamydomonas* qui possède deux flagelles, ont également la capacité de se réorienter afin d'optimiser leur environnement lumineux. Ce phénomène est appelé la

phototaxie. En réponse à une lumière excessive, ces organismes développeront une phototaxie négative en s'éloignant de la source de lumière (Wakabayashi et al, 2011).

Dans des conditions d'illumination normales, nous avons vu que l'énergie lumineuse est absorbée par l'antenne photosynthétique et conduit à la formation de chlorophylles excitées dans un état singulet  $^1\text{Chl}^*$  (voir *paragraphe 2.1* de ce chapitre). L'exciton est alors transféré et utilisé pour promouvoir la photochimie au niveau des centres réactionnels et conduire au transfert électronique le long de la chaîne photosynthétique. Lorsque l'absorption de photons dépasse la capacité de prise en charge par le processus photosynthétique, des mécanismes de photoprotection sont activés. Cet ensemble de mécanismes va surtout permettre de convertir et de dissiper l'excès d'énergie lumineuse sous forme de chaleur et cela va se traduire par une diminution (ou extinction) de fluorescence chlorophyllienne non photochimique (NPQ pour *non-photochemical quenching*). Ce quenching est considéré comme non photochimique, par opposition à la séparation de charge qui est un quenching photochimique.



**Figure 8 : Les différents mécanismes du quenching non photochimique (NPQ)**

**qE** :  $\Delta\text{pH}$ , gradient de pH formé à la suite des réactions lumineuses, +, résidus protonés qui activent PSBS (ou LHCSR3) ; (qE et **qZ**) : violaxanthine dé-époxydase (VDE) et zeaxanthine époxydase (ZEP) ; **qT** : -P, phosphorylation régulée par la kinase STN7 (ou STT7) et la phosphatase PPH1, **PSI-NPQ** : inactivation du PSI au niveau du centre FeS ; **qI** : l'inactivation de PSII se produit au niveau de la sous-unité D1 ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; **qH** : lipoprotéine plastidiale (LCNP). Adapté de (Malnoë, 2018)

Plusieurs processus contribuent au NPQ (*Figure 8*) et se différencient par les acteurs moléculaires impliqués ainsi que par la cinétique de relaxation de la fluorescence (Baker 2008) :

1. une réponse photoprotectrice à court terme permettant la dissipation de l'énergie d'excitation en excès sous forme de chaleur (*quenching* énergétique, qE) qui est induite par une acidification du lumen. Ce mécanisme met en jeu un changement de composition pigmentaire, via le cycle des xanthophylles, et fait également intervenir des protéines homologues aux protéines LHC, LHCSR (*Light harvesting complex stress-related*) et PSBS (sous-unité S du PSII) ;

2. un deuxième type de NPQ (qZ) se déclenche en quelques minutes et dépend de la dé-époxydation de la violaxanthine en zéaxanthine. Cependant qZ se distingue de qE car il ne dépend pas nécessairement d'un pH élevé pour être actif une fois que la zéaxanthine s'est accumulée et liée aux protéines LHCII (Nilkens et al, 2010) ;

3. un mécanisme de régulation de l'absorption de l'énergie lumineuse qui apparaît plus lentement, connu sous le nom de «transitions d'état» (qT), qui repose sur la phosphorylation réversible des antennes collectrices d'énergie du PSII (LHCII), qui s'associent au PSII à l'état dé-phosphorylé (état 1) et au PSI à l'état phosphorylé (état 2) ;

4. un mécanisme de dégradation et réparation du PSII appelé photoinhibition (qI) ;

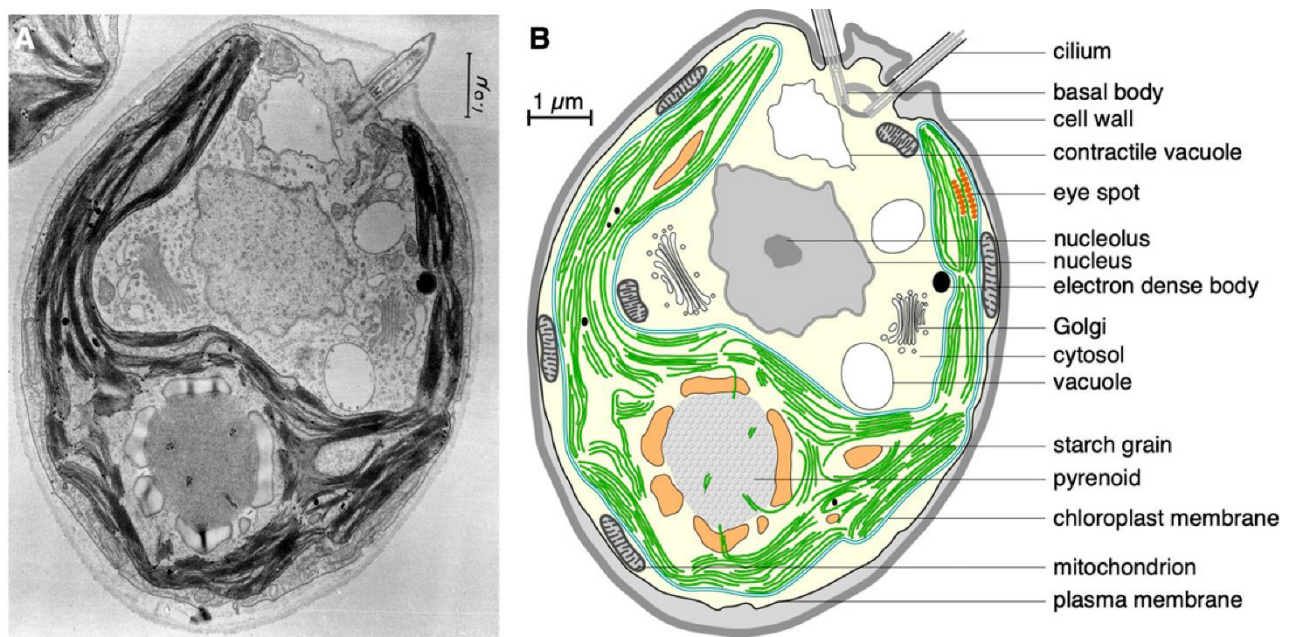
5. un mécanisme de dissipation supplémentaire (qH) récemment proposé (Malnoë et al, 2018) implique une diminution de fluorescence du complexe LHCII. Ce processus de photoprotection lent et réversible est induit par la lipoprotéine plastidiale (LCNP) et est régulé négativement par un inhibiteur, SOQ1 (*suppressor of quenching 1*) ;

6. enfin, lorsque les changements d'intensité lumineuse se prolongent, une acclimatation qui engage des changements de niveaux d'expression des antennes photosynthétiques se met en place.

Certains de ces mécanismes NPQ seront développés et traités dans le *Chapitre 3*.

## 5. *Chlamydomonas reinhardtii*

*Chlamydomonas reinhardtii* est une algue verte unicellulaire de l'ordre des Volvocales de 8 à 10 µm de diamètre. Elle possède une paroi, deux flagelles, un noyau, des mitochondries et un chloroplaste unique doté d'un pyrénoïde (*Figure 9*). Cet organisme vit naturellement dans les sols des régions humides où ses colonies ressemblent à de fins tapis verts. Lorsqu'elle se retrouve dans de l'eau douce, cette algue a la particularité de produire deux flagelles qui lui permettent de se déplacer rapidement sur une mince pellicule d'eau (Harris, 2009).



**Figure 9 : *Chlamydomonas reinhardtii***

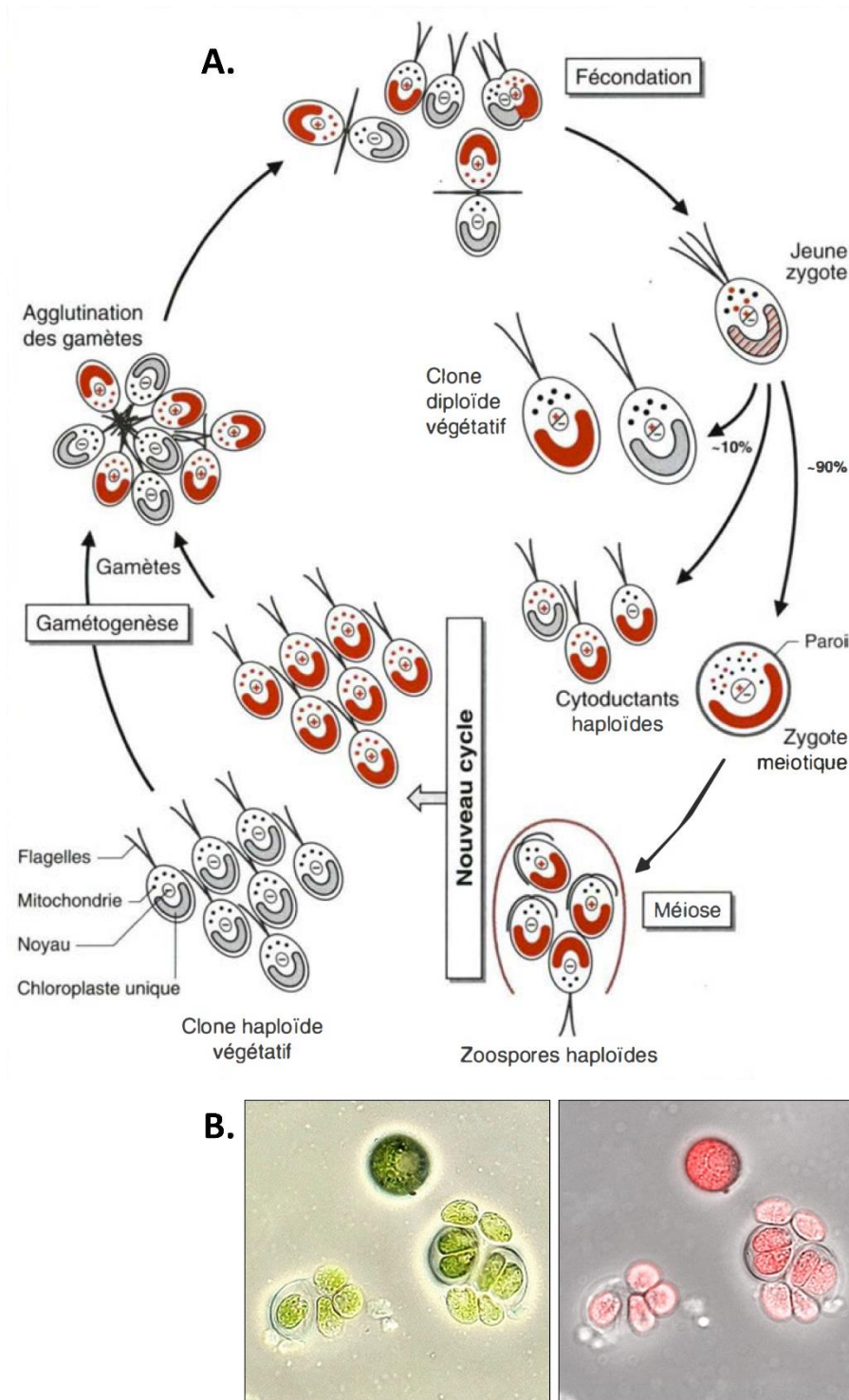
A. Micrographie électronique à transmission d'une cellule. Publiée initialement par (Ohad et al, 1967).

B. Dessin de la cellule de *C. reinhardtii* basé sur la photo en (A) (Salomé & Merchant, 2019).

Le laboratoire utilise depuis plusieurs décennies cette algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* pour étudier la photosynthèse. L'histoire de la recherche sur *C. reinhardtii* a débuté avec le phycologue Gilbert Morgan Smith en 1916, lorsqu'il a choisi cette micro-algue comme sujet d'étude. Par la suite, d'autres chercheurs, tels que Bill Eversole, Bill Ebersold, Ralph Lewin (qui concentrait déjà ses recherches sur *Chlamydomonas moewusii*, un parent éloigné de *C. reinhardtii*) et Ruth Sager, ont également étudié cette algue unicellulaire. Leurs travaux ont abordé divers aspects, tels que l'hérédité sexuelle (Ebersold, 1956; Eversole, 1956), l'ultrastructure du chloroplaste (Sager & Palade, 1957) ou encore la génétique non mendélienne (Sager, 1955), contribuant ainsi à une meilleure compréhension de la biologie et de la génétique de *C. reinhardtii*. Plus tard, Paul Levine, généticien, a été convaincu que *C. reinhardtii* était l'organisme idéal pour ses

recherches. Pendant un congé sabbatique à Paris en 1957, et plus précisément à l'Institut de Biologie Physico-Chimique dans le laboratoire de Boris Ephrussi, P. Levine a été encouragé par le généticien Georges Rizet à choisir d'explorer plutôt la photosynthèse que la recombinaison génétique chez *C. reinhardtii*, marquant ainsi le début de l'étude génétique approfondie de la photosynthèse. En observant que *C. reinhardtii* avait la capacité de se développer à l'obscurité en présence d'acétate, il a pu ainsi identifier et conserver des mutants photosynthétiques. Puis Pierre Bennoun, ancien chercheur de notre laboratoire à l'IBPC, a développé une méthode de détection rapide basée sur l'émission de fluorescence de la chlorophylle *a*, qui permettait d'identifier directement les cellules mutantes sur boîte de Pétri (Bennoun & Levine, 1967), contribuant ainsi à l'ajout de nouveaux mutants dans cette collection. Parmi ces mutants, certains sont encore des références et d'autres n'ont pas encore été entièrement caractérisés, n'ayant parfois pas délivré les mutations responsables de phénotypes parfois subtils (je pense en particulier à trois mutants de ces premières générations qui auraient pu faire l'objet de deux chapitres supplémentaires dans ce manuscrit). Cette méthode de détection rapide a depuis été améliorée et adaptée pour mesurer les variations de fluorescence, par exemple (Bennoun & Béal, 1997; Bennoun & Béal, 1998; Johnson et al, 2009), ce qui en fait un outil puissant et encore largement utilisé aujourd'hui.

Ainsi, cet organisme photosynthétique est un modèle de choix dans l'étude de la photosynthèse. Il se cultive et se manipule aisément en laboratoire et possède un seul et unique chloroplaste. Comme nous l'avons déjà évoqué, il est capable de croître en condition hétérotrophe si de l'acétate lui est fourni et dans ces conditions son appareil photosynthétique reste fonctionnel. Il est donc aisé d'isoler et d'étudier des souches mutantes profondément altérées dans leurs propriétés photosynthétiques. Cette phototrophie facultative en a fait un modèle incontournable pour l'étude des processus photosynthétiques et de biogenèse du chloroplaste.



**Figure 10 : Cycle de vie de *Chlamydomonas reinhardtii***

(A) Pendant la phase végétative, les cellules se divisent par mitose. En cas de carence en azote, cela induit la différenciation des gamètes, qui ensuite s'agglutinent et fusionnent par signes opposés. Dans un petit nombre de cas, le zygote ainsi formé donne naissance à des cellules végétaives diploïdes, mais dans la majorité des cas, le zygote subit la méiose et produit ainsi quatre cellules haploïdes (Wollman & Girard-bascou, 1994) (B) Observation au microscope optique et à fluorescence de zygotes en cours de division méiotique ou ayant déjà subies la méiose. À gauche, cliché en lumière transmise montrant la couleur naturelle de la chlorophylle contenue dans les unités cellulaires. À droite, combinaison de deux images : l'une obtenue en lumière transmise (en noir et blanc) et l'autre, la fluorescence de la chlorophylle.

Cette algue présente un cycle de vie haplobiontique, comprenant une reproduction sexuée non obligatoire (*Figure 10*). Généralement, sa propagation se réalise par multiplication végétative, c'est-à-dire par reproduction asexuée, avec un temps de génération de 8 heures à 25°C en présence de lumière (Harris, 2001). Les cellules végétatives sont sexuées, soit de signe + ou -, et sont haploïdes. En cas de carence en azote, les cellules végétatives se différencient en gamètes, chaque gamète ayant la capacité de fusionner avec un gamète de signe opposé. Dans la grande majorité des cas, cette fusion conduit à la formation d'un zygote, qui peut constituer une forme de résistance de l'organisme. Lorsque les conditions sont favorables, le zygote subit la méiose, et les quatre produits de la méiose retournent à une phase de vie végétative (Harris, 2001; Wollman & Girard-bascou, 1994).

À la fin du 20<sup>e</sup> siècle, la séquence de ses trois génomes est devenue disponible, le dernier à avoir été séquencé étant le génome nucléaire. Celui-ci comprend 17 chromosomes pour un total de 111 Mb et code environ 17 000 protéines (version 6, (Craig et al, 2023)). Une comparaison de son protéome à ceux d'*Arabidopsis thaliana* (une plante à fleurs) et de l'Homme a été réalisée. Parmi les protéines de *Chlamydomonas* qui ont pu être classées en familles, 35% sont communes à *Arabidopsis* et à l'Homme tandis que 27% sont partagées uniquement avec *Arabidopsis* et 10% avec l'Homme (Merchant et al, 2007).

La ségrégation de ses trois génomes se déroule selon différentes modalités (Harris, 2009). La transmission des génomes chloroplastique et mitochondrial se fait de manière uniparentale, avec une transmission par le parent de signe sexuel (*mt*, pour *mating type*) « plus » dans le cas du génome chloroplastique, et par le *mt* « moins » dans le cas de la mitochondrie. En revanche, le génome nucléaire, auquel appartiennent les gènes sexuels, se comporte selon les lois de l'hérédité de Mendel, après brassage génétique (*crossing-over*) des deux génomes parentaux.

Cet organisme est adaptable à toutes les techniques de microbiologie, du clonage d'une cellule unique au criblage de drogues sur une boîte de Pétri (Harris, 1989; Harris, 2001). Il peut être cultivé en milieu solide ou en milieu liquide et chaque cellule est exposée directement au milieu de culture, ce qui permet un import immédiat et homogène d'inhibiteurs ou de produits toxiques. De plus, il a un taux de croissance suffisamment rapide pour analyser des effets sur plusieurs générations. C'est un organisme phototrophe facultatif : cette algue peut être cultivée en conditions phototrophes (à la lumière sur milieu minimum), en conditions hétérotrophes (à l'obscurité sur un milieu contenant de l'acétate comme source de carbone réduit) ou en conditions mixotrophes (à la lumière et en présence d'acétate)



(Wollman & Girard-bascou, 1994). Son métabolisme permet ainsi l'obtention en quelques jours des quantités suffisantes de matériel biologique rendant les études sur cet organisme plus aisées que celles des plantes supérieures.

*Chlamydomonas* est donc un modèle de choix, notamment grâce à quelques particularités : des conditions de culture maîtrisées en milieu liquide ou solide, une taille à peine supérieure à celle d'une cellule de levure (en moyenne 10  $\mu\text{m}$  pour une cellule végétative), un temps de génération relativement court (8 heures). Une autre caractéristique est qu'il dispose de deux flagelles qui lui permettent de se mouvoir, et qui, associés avec son stigma, organe sensible à la lumière, orientent sa nage en fonction de celle-ci (phototactisme). Cela constitue un avantage pour cet organisme, bien que cela puisse ne pas être bénéfique pour son étude en laboratoire, comme nous aurons l'occasion de développer au cours de ce manuscrit.

## 6. Objectif de la thèse

L'objectif principal de cette thèse est d'explorer en profondeur la manière dont les processus de synthèse et d'assemblage des antennes photosynthétiques interagissent avec les mécanismes de photoprotection et d'acclimatation de l'organisme en réponse à des variations de l'intensité lumineuse. Cette étude se concentre sur l'utilisation de cette micro-algue, *Chlamydomonas reinhardtii*, comme modèle biologique.

Les antennes photosynthétiques sont des structures cruciales pour la photosynthèse, le processus par lequel les organismes convertissent la lumière en énergie chimique. Ces antennes sont composées de molécules telles que la chlorophylle (Chl) et les protéines de capture de la lumière (LHCP), qui jouent un rôle essentiel dans l'absorption de la lumière nécessaire à la photosynthèse.

L'une des questions centrales de cette étude, qui sera abordée dans le *Chapitre 2*, concerne l'importance de ces deux voies de biosynthèse, à savoir la synthèse de la chlorophylle et la production de protéines de capture de la lumière au sein du chloroplaste. Comment ces deux processus sont-ils synchronisés pour permettre une efficacité maximale de la photosynthèse ? Cette question est essentielle pour comprendre comment les organismes s'adaptent aux fluctuations naturelles de l'intensité lumineuse. L'analyse de mutants servira à examiner la formation des complexes d'antennes et leur régulation en fonction des conditions de lumière.

Nous nous intéresserons également (*Chapitre 3*) à la régulation de l'accumulation de ces complexes protéiques pour la capture de la lumière (LHC) en fonction des conditions lumineuses. Il est crucial de comprendre comment les organismes photosynthétiques ajustent ces complexes en réponse aux variations de la lumière pour maximiser leur efficacité photosynthétique tout en évitant les dommages causés par une exposition excessive à la lumière.



# Chapitre 2 - Biogenèse des antennes photosynthétiques

Les travaux présentés dans ce chapitre ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de Yuichiro Takahashi (Okayama, Japon) et se présentent en 2 parties. La première partie a fait l'objet de 2 articles et concernant la Partie B, un article est en cours de rédaction.

Partie A. Importation des protéines LHC dans le chloroplaste & leur intégration dans les membranes des thylakoïdes

## Article 1 :

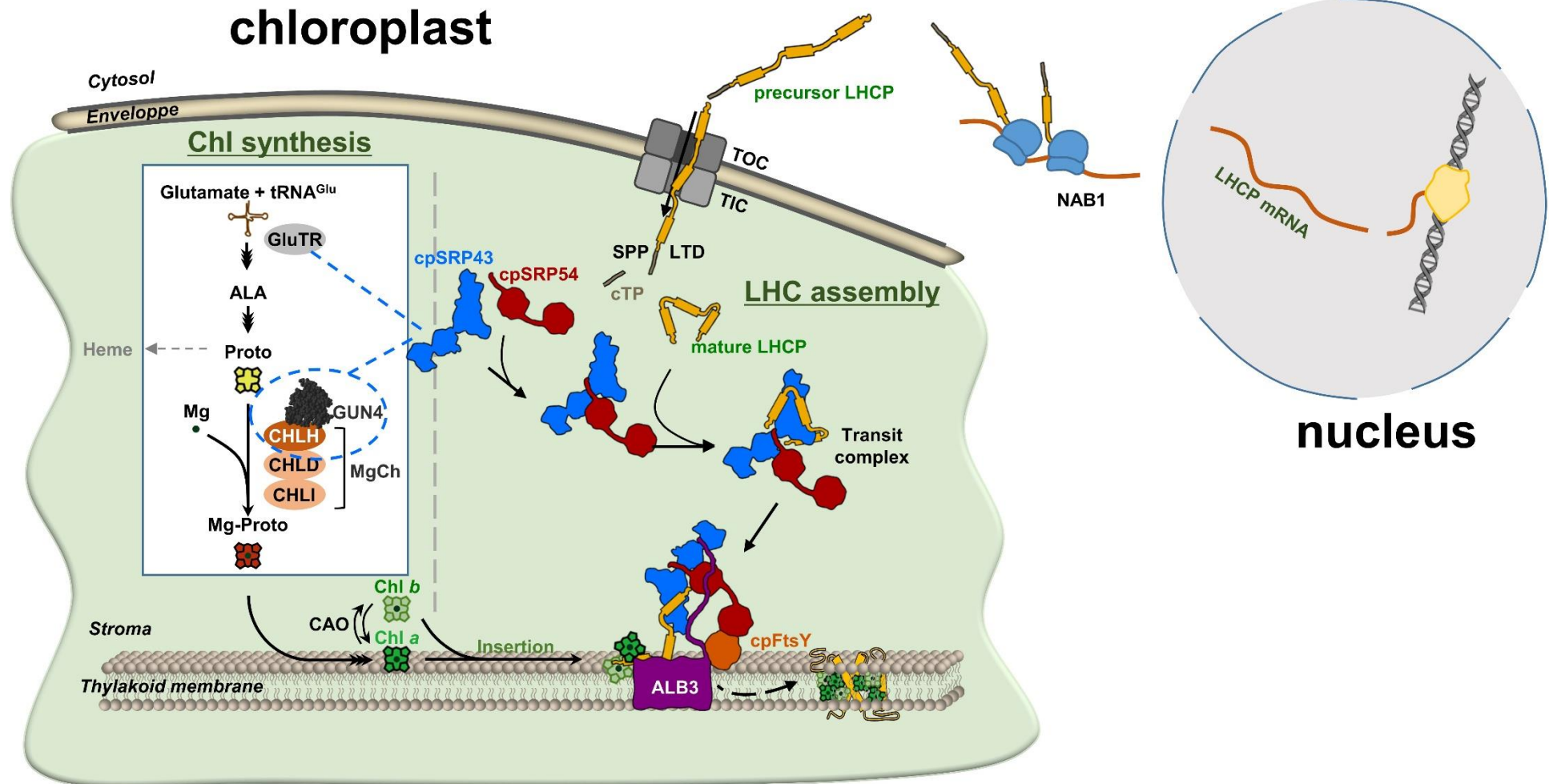
Bujaldon S, Kodama N, Rathod M K, Tourasse N, Ozawa S-I, Sellés J, Vallon O, Takahashi Y, Wollman F-A (2020) **The BF4 and p71 antenna mutants from *Chlamydomonas reinhardtii***. *Biochim Biophys Acta*, 1861(4):148085  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.148085>

## Article 2 :

Rathod M K, Sreedhar N, Ozawa S-I, Kuroda H, Kodama N, Bujaldon S, Wollman F-A, Takahashi Y (2022) **Assembly Apparatus of Light-Harvesting Complexes; Identification of Alb3.1-cpSRP-LHCP Complexes in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii***. *Plant Cell Physiol*, 63(1):70-81  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcab146>

Ma contribution a été majeure dans l'article 1 et une participation moindre dans de second

Partie B. Biosynthèse et régulation des chlorophylles



**Figure 11 : Vue d'ensemble de la biogénèse des antennes photosynthétiques.**

Les **chlorophylles** (Chl) sont synthétisées dans le chloroplaste et proviennent de la protoporphyrine IX (proto). Cette porphyrine est produite par une série de réactions enzymatiques (commune à la voie de biosynthèse des hèmes) dont la première fait intervenir la glutamyl-ARNt reductase (GluTR) avec le glutamate et l'ARNt plastidial particulier (tRNA<sup>Glu</sup>) comme substrats. L'insertion du Mg dans Proto est assurée par la magnésium chélatase (MgCh), constituée de CHLD, CHLI et CHLH, dont l'activité est stimulée par GUN4. Une dernière série de réactions enzymatiques permet la formation des molécules de Chl à partir de la Mg-Proto, dont la Chl *a* oxygénase (CAO) qui assure la conversion de la Chl *a* en Chl *b*. Les **protéines LHC**, codées par le génome nucléaire, sont synthétisées dans le cytosol, sous le contrôle de NAB1 (qui est un répresseur traductionnel spécifique aux LHCBM). Ces précurseurs LHCP sont ensuite importés dans le chloroplaste via le complexe TOC-TIC au niveau des membranes externe et interne de l'enveloppe. Après l'importation dans le stroma, le peptide de transit (cTP) est clivé par une peptidase (SPP) puis les LHCP sont acheminées, avec l'aide de LTD, vers le complexe cpSRP. Le complexe de transit, composé de cpSRP43, cpSRP54 et LHCP, traverse le stroma pour se fixer à la membrane des thylakoïdes par interaction avec 2 autres protéines, cpFtsY et ALB3. Les LHC et les Chl sont finalement assemblés et insérés dans la membrane des thylakoïdes. *stromal processing peptidase* (SPP) ; *chloroplastic transit peptide* (cTP) ; *nucleic acid binding 1* (NAB1) ; *LHCP translocation defect* (LTD). On notera le rôle central de cpSRP43 par sa double activité dans la biogénèse des antennes : acheminement des LHC aux membranes des thylakoïdes et protection des protéines de la voie de biosynthèse des tétrapyrroles. Schéma adapté de (Ji et al, 2021) et (Ziehe et al, 2018).

# Introduction

La synthèse et l'assemblage des antennes photosynthétiques sont des processus extrêmement complexes. En effet, les chloroplastes résultent de la capture d'un procaryote, proche des cyanobactéries actuelles, par une cellule eucaryote hétérotrophe qui acquit ainsi la phototrophie. Cette endosymbiose a entraîné une réduction massive du génome de l'endosymbionte dont une grande partie des gènes ont été soit transférés au génome nucléaire de l'hôte, soit perdus. Malgré cela, le chloroplaste conserve une capacité d'expression génétique grâce à la persistance d'un génome réduit exprimant certains des gènes impliqués dans la transcription et la traduction et à l'importation de protéines complémentaires exprimées à partir de gènes nucléaires. Cependant, de récentes analyses révèlent une grande différence entre le nombre de gènes chloroplastiques (environ 100-150) et le nombre total de protéines présentes dans le chloroplaste (environ 3000) (Jarvis & López-Juez, 2013). La majorité des protéines requises pour la photosynthèse est codée dans le noyau, puis traduite dans le cytosol avant d'être importée dans le chloroplaste. Ce processus a lui aussi nécessité le développement d'une machinerie efficace d'importation et d'assemblage des protéines dans le chloroplaste (Dyall et al, 2004; Wollman et al, 1999). Ainsi, *Chlamydomonas* contient plusieurs complexes d'antennes périphériques, tous codés par le génome nucléaire qui doivent être importés dans le chloroplaste après l'étape traductionnelle qui se déroule dans le cytosol (Dall'Osto et al, 2015).

Toutes les protéines LHC (*Light Harvesting Complex* ou Complexe collecteur de la lumière) sont donc synthétisées dans le cytosol sous une forme précurseur (*Figure 11*) et possèdent une séquence d'adressage en N-terminal composée de 20 à 150 acides aminés (Gould et al, 2008). Certaines protéines LHC sont soumises à une régulation de leur traduction sous le contrôle de NAB1 (*nucleic acid binding 1*) (Berger et al, 2014; Blifernez-Klassen et al, 2021; Mussnug et al, 2005). Les séquences d'adressage sont reconnues au niveau de l'enveloppe du chloroplaste par deux complexes hétéro-oligomériques associés, TOC (*translocon of the outer envelope of chloroplasts*) et TIC (*translocon of the inner envelope of chloroplasts*). Ces deux complexes, assistés de la protéine LTD (*LHCP translocation defect*) (Jeong et al, 2018), permettent aux protéines LHC de traverser l'enveloppe pour se retrouver dans le stroma, où la séquence d'adressage est clivée par une peptidase de maturation (SPP pour *stromal processing peptidase*). On sait que la plupart

des protéines membranaires chloroplastiques s'insèrent dans la membrane des thylakoïdes par la voie SRP (*signal recognition particle*) alors que d'autres s'insèreraient « spontanément » sans avoir recours à de quelconques cofacteurs. Les protéines LHC matures sont adressées à la membrane des thylakoïdes par cette voie SRP. Les LHC vont se lier au complexe SRP, constitué des protéines cpSRP43 et cpSRP54, via le domaine L18 de la protéine cpSRP43 (DeLille et al, 2000; Tu et al, 2000). Cet ensemble forme ainsi un complexe de transit soluble qui va migrer vers les membranes des thylakoïdes et se fixer au récepteur SRP, cpFTSY, et à une translocase, ALB3.

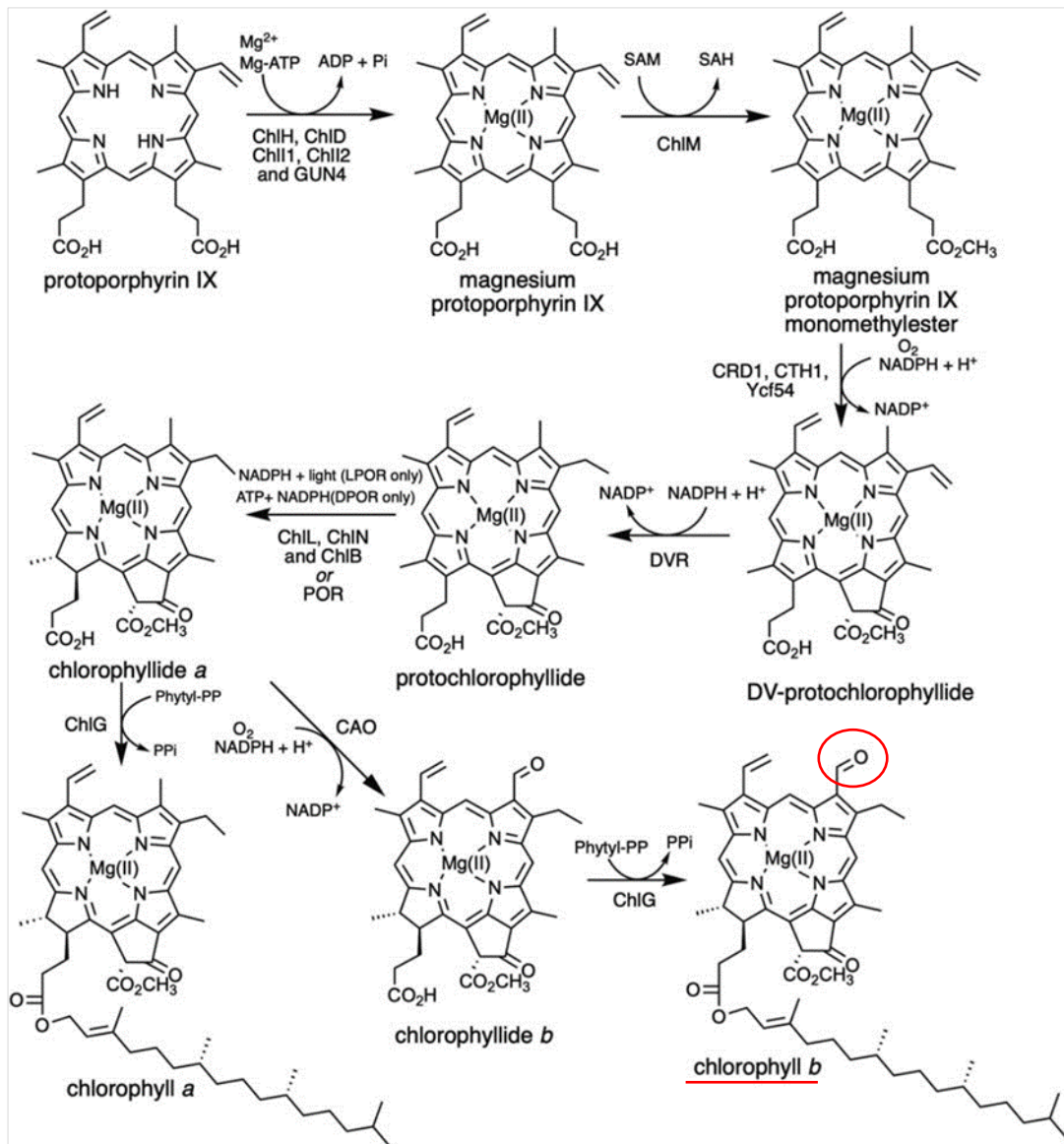
L'assemblage des complexes antennaires requiert également une synchronisation entre la biosynthèse des chlorophylles et celle des protéines LHC. En effet, si la disponibilité de molécules de chlorophylle est indispensable pour la stabilité et l'intégration des protéines LHC dans les thylakoïdes, leur accumulation, sous forme libre, favoriserait l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS pour *reactive oxygen species*) à la lumière. C'est aussi le cas pour les composés intermédiaires de leur voie de biosynthèse (exemple de la protoporphyrine IX). Ces ROS provoquent des dommages cellulaires irréversibles. Pour contrer ces dommages, de nombreux mécanismes de régulation sont mis en place. C'est le cas, par exemple, de la protéine cpSRP43 qui, en plus de son activité principale dédiée à l'acheminement des LHCP (*Light Harvesting Complex Protein* ou protéine du complexe collecteur de la lumière), va aussi permettre l'optimisation de la biosynthèse de la Chl. En protégeant les protéines impliquées dans la voie de biosynthèse des tétrapyrroles contre l'agrégation, notamment lorsque la température environnementale est élevée, cpSRP43 va maintenir la stabilité de ces protéines et permettre ainsi de maintenir le flux métabolique de la biosynthèse de Chl dans des conditions non favorables (Ji et al, 2021).

La biosynthèse des chlorophylles se déroule dans le chloroplaste via la branche magnésium (Mg) de la biosynthèse des tétrapyrroles. La première partie de la voie de biosynthèse de la chlorophylle (*Figure 11*) est commune avec celle des hèmes, allant du glutamate, avec le concours de la glutamyl-ARNt réductase (Glu-TR), jusqu'à la protoporphyrine IX, qui est ensuite distribuée entre les branches Mg et Fe pour la production de Chl (*Figure 12*) et d'hème, respectivement. Ainsi, la première enzyme engagée dans la branche Mg est la magnésium-chélatase (Mg-Ch). Cette enzyme est un complexe hétérotrimérique composé de trois protéines (CHLI, CHLD et CHLH) qui catalyse l'insertion de Mg<sup>2+</sup> dans la protoporphyrine IX, ce qui entraîne la formation de Mg-protoporphyrine IX (Brzezowski et al, 2014). L'inactivation de la Mg-Ch due à une mutation de CHLH a été

caractérisée chez le mutant d'*A. thaliana*, *gun5* (*genomes uncoupled 5*). Elle entraîne une dérégulation de l'expression du gène *LHCB2* (Mochizuki et al, 2001). Une autre protéine, GUN4 (*genomes uncoupled 4*) est aussi impliquée dans cette même voie, qui stimule la biosynthèse de la chlorophylle en augmentant l'activité de la Mg-Ch. Chez les eucaryotes, GUN4 participe également à la signalisation entre le chloroplaste et le noyau, bien que le mécanisme ne soit pas clair (Tarahi Tabrizi et al, 2015). Puis une dernière série de réactions enzymatique conduit à la formation de la chlorophylle *a* (Chl *a*). Parmi les enzymes impliquées, la protochlorophyllide oxydo-réductase (POR) joue un rôle important chez *Chlamydomonas*. En effet, cet organisme possède 2 types de POR : *i*) LPOR, qui est codée par un gène nucléaire, *POR1*, et est lumière-dépendante (également NADH-dépendante) et *ii*) DPOR, qui est lumière-indépendante et codée par trois gènes du génome chloroplastique (*chlN*, *chlL*, *chlB*) (Choquet et al, 1992; Li et al, 1993). Ainsi, la présence de ces 2 POR permet à *Chlamydomonas* de synthétiser de la Chl, même à l'obscurité. Enfin, la dernière partie de cette voie de biosynthèse est la conversion de la Chl *a* en Chl *b* par la chlorophylle *a* oxygénase (CAO). La Chl *b* se différencie de la Chl *a* par la présence d'un groupe formyle à la place d'un groupe méthyle en position 7 II (*Figure 12* et voir *Chapitre 1 - 2.1*) et n'est présente que dans les complexes antennaires périphériques, contrairement à la Chl *a* que l'on retrouve aussi dans les centres réactionnels et leur cœur d'antenne. Cependant, nous avons démontré que la perte spécifique de Chl *b* chez *Chlamydomonas*, par l'inactivation de CAO, ne perturbe pas l'accumulation des polypeptides LHCI et LHCII tant que la biosynthèse de la Chl *a* reste intacte (Bujaldon et al, 2017). Néanmoins on observe une altération de la fonction de l'antenne du photosystème II. Et lorsque *Chlamydomonas* est cultivé en faible lumière, l'accumulation de LHCI et la taille de l'antenne fonctionnelle du photosystème I augmentent chez le mutant de Chl *b* par rapport au type sauvage (Bujaldon et al, 2017).

La dernière étape de la biogénèse des antennes photosynthétique correspond à l'assemblage des protéines LHC avec ses molécules de Chl, ainsi que de caroténoïdes, qui sont insérées dans les membranes des thylakoïdes, un processus dont l'étude n'est encore que très partielle (Dall'Osto et al, 2015; Ziehe et al, 2018).



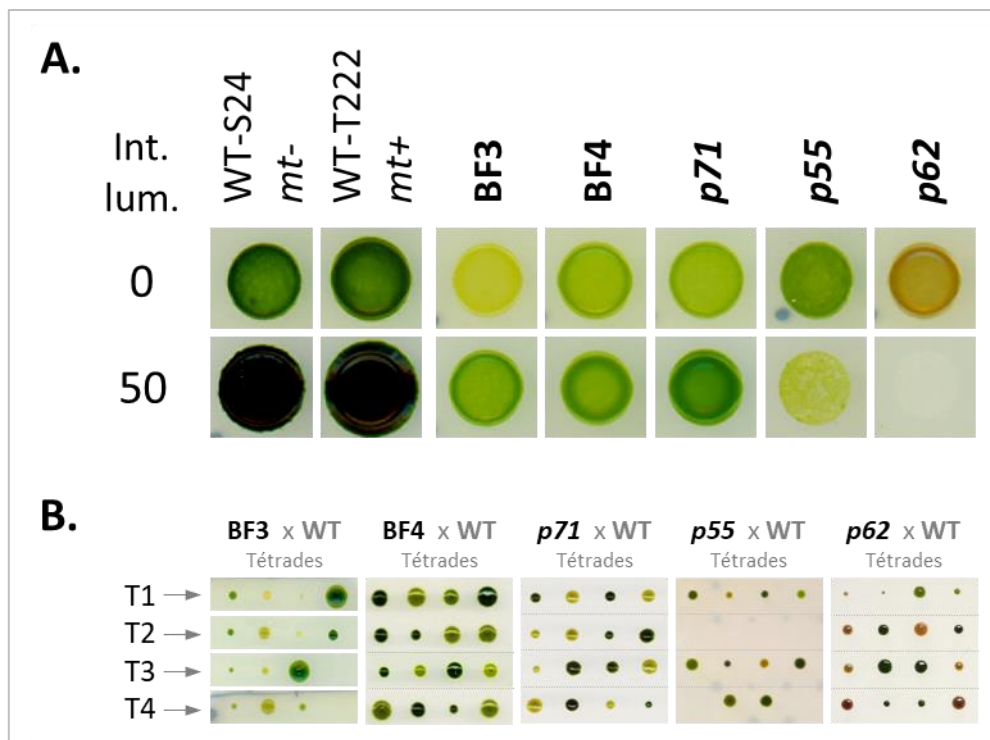


**Figure 12 : Conversion de la protoporphyrine (PPIX) en Chl a et Chl b - branche magnésium de la biosynthèse des tétrapyrroles**

La différence entre Chl a et Chl b est indiquée en rouge : la Chl a présente un groupe méthyle, remplacé par un groupe formyle dans la Chl b. (Chlamy Sourcebook, 3<sup>ème</sup> édition).

On peut se demander comment ces deux voies de biosynthèse (Chl et LHCP) sont coordonnées et comment l'accumulation de ces complexes LHC est régulée en fonction des conditions lumineuses.

Pour étudier ces questions, nous avons réuni plusieurs mutants présentant un défaut de pigmentation (*Figure 13*). Sachant que les complexes antennaires lient la Chl *a* et la Chl *b* (et les xanthophylles) alors que les centres réactionnels et leur cœur d'antenne ne lient que la Chl *a* (et le  $\beta$ -carotène), une diminution dans la teneur en Chl *b* par rapport à celle en Chl *a* dans ces mutants indique un défaut dans la biogénèse des apoprotéines de leurs antennes collectrices. Mais l'absence d'un changement de leur rapport Chl *a*/Chl *b* avec néanmoins une diminution de la production totale en chlorophylle, suggère une désorganisation de leurs antennes photocollectrices. Ces mutants permettront d'étudier la formation des complexes d'antennes et leurs régulations fonctionnelles, en relation avec les conditions d'éclairement.



**Figure 13 : Ressources génétique pour l'étude de la biogénèse des antennes photosynthétiques.**

Phénotype de croissance et pigmentation de (A) différentes souches de *Chlamydomonas reinhardtii* après 5 jours de culture sur milieu TAP sous différentes intensités lumineuses (Int. Lum.) : obscurité (0) ou 50  $\mu\text{mol photons.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $\mu\text{E}$ ) (LED) et (B) tétrades (T1 à T4), issues d'un croisement de chaque mutant avec une souche sauvage, après 2 semaines de croissance à l'obscurité. WT-T222 et WT-S24 : souches sauvages (WT pour *wild-type*) ; BF3, BF4, *p71*, *p55* et *p62* : souches mutantes ayant un défaut de pigmentation et de croissance.



## **Partie A. Importation des protéines LHC dans le chloroplaste & Intégration et assemblage des LHC dans les membranes des thylakoïdes**

### **1. Importation des protéines LHC dans le chloroplaste**

#### **1.1. Préambule**

Une première caractérisation physiologique a été réalisée sur deux mutants (BF4 et *p71*) : ces mutants sont vert pâle (*Figure 13-A*), contenant seulement 15% de chlorophylles par cellule en comparaison à une souche sauvage. Cette faible quantité en chlorophylle entraîne alors une faible émission de fluorescence. Ces mutants restent cependant photosynthétiques, ce qui suggère que malgré un défaut de ces protéines spécifiques, l'appareil de transfert d'électrons reste fonctionnel.

Une analyse génétique approfondie a été réalisée sur ces mutants. Dans un premier temps par étude phénotypique des descendants après croisement avec une souche sauvage, ce qui nous a permis de conclure que les mutations associées étaient nucléaires (*Figure 13-B*). Puis les gènes concernés ont été identifiés par séquençage. L'un des mutants présente une insertion dans le gène *cpSRP43* et l'autre, une mutation dans *ALB3.1*. Ces deux gènes sont impliqués dans la voie d'importation des LHC dans le chloroplaste. Nous avons ensuite étudié les différentes protéines-antennes dans ces mutants, et cela dans différentes conditions lumineuses.

#### **1.2. Article 1**

« The BF4 and *p71* antenna mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. »





Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Bioenergetics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbabio](http://www.elsevier.com/locate/bbabio)

## The BF4 and *p71* antenna mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*<sup>☆</sup>

Sandrine Bujaldon<sup>a</sup>, Natsumi Kodama<sup>b</sup>, Mithun Kumar Rathod<sup>b</sup>, Nicolas Tourasse<sup>a</sup>,  
Shin-Ichiro Ozawa<sup>b</sup>, Julien Sellés<sup>a</sup>, Olivier Vallon<sup>a</sup>, Yuichiro Takahashi<sup>b,\*</sup>,  
Francis-André Wollman<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR7141 CNRS-Sorbonne Université, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris 75005, France

<sup>b</sup> Research Institute for Interdisciplinary Science, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Chlamydomonas  
Photosynthesis  
Antenna  
Light harvesting complex  
cpSRP  
ALB3

### ABSTRACT

Two pale green mutants of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, which have been used over the years in many photosynthesis studies, the BF4 and *p71* mutants, were characterized and their mutated gene identified in the nuclear genome. The BF4 mutant is defective in the insertase Alb3.1 whereas *p71* is defective in cpSRP43. The two mutants showed strikingly similar deficiencies in most of the peripheral antenna proteins associated with either photosystem I or photosystem 2. As a result the two photosystems have a reduced antenna size with photosystem 2 being the most affected. Still up to 20% of the antenna proteins remain in these strains, with the heterodimer Lhca5/Lhca6 showing a lower sensitivity to these mutations. We discuss these phenotypes in light of those of other allelic mutants that have been described in the literature and suggest that even though the cpSRP route serves as the main biogenesis pathway for antenna proteins, there should be an escape pathway which remains to be genetically identified.

### 1. Introduction

The peripheral antenna proteins, hereafter referred to as Light-Harvesting Chlorophyll Protein (LHCP), accommodate chlorophyll *a* (Chl *a*) and chlorophyll *b* (Chl *b*) molecules which increase the light-harvesting capacity of each photosystem in green algae and vascular plants. They are encoded in the nucleus by two multigenic families, the *lhca* (for PSI) and *lhcb* (for PSII) genes. In the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*, the *Lhca* proteins associated with the PSI core complex are encoded by nine genes. One copy of *Lhca2–9* and two copies of *Lhca1* are bound to the PSI core [1,2]. The major *Lhcb* proteins are encoded by nine genes (Type I: *LhcbM3/4/6/8*; Type II: *LhcbM5*; Type III: *LhcbM2/7*; Type IV: *LhcbM1*) while minor *Lhcb* proteins (*CP26* and *CP29*) are coded for by the *Lhcb4* and *Lhcb5* genes, respectively. These LHCP proteins mainly transfer light energy to PSII core complexes, although some of these can migrate to the PSI membrane domains where they transfer their light excitation to the PSI cores upon a regulation process known as the State Transition process [3]. Besides these constitutive antenna polypeptides, there are two antenna-related proteins in *C. reinhardtii*, the *LhcsR* proteins (light-harvesting complex stress-related), which participate in photoprotection, by dissipating as heat the excess light energy absorbed by the antenna

proteins [4]: *LhcsR1* which is constitutively expressed and *LhcsR3*, encoded by the 2 *LhcsR3.1/3.2* genes, which is expressed under high-light.

The LHCP mRNAs are translated in the cytosol into pre-apoproteins which are translocated through the chloroplast envelope by the TOC/TIC translocon before being processed to their mature form and inserted, as holoproteins folded with their pigment complement, in the thylakoid membranes. Several biogenesis factors are required for completion of the LHCP journey from the nucleocytoplasm to the thylakoid membranes (for reviews see [5,6]). In *Chlamydomonas*, LHCP translation is controlled by the NAB1 protein, which is a repressor under redox control [7]. The release of pre-apoLHCP proteins from the translocon requires the LTD protein [8], which has a bias towards the PSI antenna apoproteins [9]. LTD hands them to the SRP complex comprised of two subunits cpSRP43 and cpSRP54. The LHCP-SRP complex is then targeted across the stroma to the thylakoid membranes where it docks to cpFtsY, the cpSRP complex receptor [6]. While cpFtsY interacts with cpSRP54 via their homologous GTPase domains, cpSRP43 and Alb3 interact directly via their C-terminal domains. Alb3 inserts the apoproteins into the membrane bilayer, concomitant with Chl association. It is of note that Alb3 interacts with the SecYE translocon, even though the latter is not responsible for LHCP integration.

<sup>☆</sup> This article is part of a Special Issue entitled Light harvesting, edited by Dr. Roberta Croce.

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [taka@cc.okayama-u.ac.jp](mailto:taka@cc.okayama-u.ac.jp) (Y. Takahashi), [wollman@ibpc.fr](mailto:wollman@ibpc.fr) (F.-A. Wollman).

<https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2019.148085>

Received 7 June 2019; Received in revised form 28 August 2019; Accepted 11 September 2019

Available online 28 October 2019

0005-2728/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

The existence of an alternative - SRP-independent - biogenesis pathway has been discussed several times [10,11], in light of the observation that a double mutant from Arabidopsis, fully lacking cpSRP54 and cpSRP43, still accumulates peripheral antenna proteins in mature leaves [12]. It could rely on an apo- to holo-LHCP protein conversion occurring at the inner envelop membrane which, by membrane budding, would generate vesicle trafficking towards the thylakoids where the LHC proteins would insert by membrane fusion with these vesicles [13].

*Chlamydomonas* has been extensively used for in vivo spectroscopic studies of photosynthesis owing to its small size and amenability to genetic studies. Time-resolved absorption changes however are hampered by chlorophyll absorption in the blue and red region of the spectrum. Two mutants, BF4 and *p71*, which showed a marked decrease in chlorophyll content, proved useful for such spectroscopic studies due to their deficiency in peripheral antenna proteins [14–16]. In addition, the BF4 mutant has been instrumental in the original isolation of highly active PSII core preparations [17,18] and in the identification of antenna proteins in freeze-fractured thylakoid membranes [19]. Since neither of these two mutants had been characterized so far at the genetic level, we set out to identify the mutations responsible for their decreased antenna content. We provide a detailed characterization of the mutant phenotypes in comparison with antenna mutants from *C. reinhardtii* previously characterized by other groups.

## 2. Material and methods

### 2.1. Strains and growth conditions

Wild type and mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii* were grown mixotrophically at 25 °C in Tris-acetate-phosphate (TAP) medium, pH 7.2 [20] on a rotary shaker (150 rpm) under continuous light (5 or 50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), unless otherwise indicated. Before being further characterized, the BF4 [19,21], *p71* [22], *ac29-3* [23] mutants were backcrossed to our 137c-derived reference strains, either WT.T222 mating type (mt) + or WTS24 mt-, resp. CC-5101 and CC-5100 at the *Chlamydomonas* Resource Center, <https://www.chlamycollection.org/>, which also provided *tlc3*, CC-4473 [24].

### 2.2. Chlorophyll content

Chlorophyll concentrations were determined following extraction of the pigments in methanol [25].

### 2.3. Analysis of polypeptides

For protein analysis of thylakoid membrane, cells were centrifuged at 2000  $\times g$  for 5 min and resuspended in 5 mL of 5 mM HEPES/KOH pH 7.5 containing 10 mM EDTA and 0.3 M sucrose and broken in a French pressure cell at 27.56 MPa (4000 lb./in<sup>2</sup>). Thylakoid membranes were recovered using a flotation procedure adapted from [26]. In brief, the broken cell suspension was placed on top of a 4 mL 1.8 M sucrose cushion containing 5 mM HEPES/KOH pH 7.5 and 10 mM EDTA, and spun in a swinging bucket rotor at 160,000  $\times g$  for 1 h. Thylakoid membranes were collected at the interface between the two layers. They were then resuspended in 10 mL of 5 mM HEPES/KOH pH 7.5 containing 10 mM EDTA and centrifuged at 17,500  $\times g$  for 30 min. Protease inhibitors were added in all solutions just before the experiment (Phenylmethylsulfone fluoride; 200  $\mu\text{M}$ , Benzamidine; 1 mM, 6-aminocaproic acid; 5 mM) and all steps were carried out at 4 °C.

The thylakoid membranes or total cellular proteins were solubilized in the presence of 2% SDS and 0.1 M dithiothreitol (DTT) at 100 °C for 90 s and then separated by high-molarity Tris SDS-PAGE without urea [27] or with 8 M urea [28]. The separated polypeptides were electroblotted onto a nitrocellulose filter. Immunodetection was performed using antibodies against PSI, PSII, LHC subunits, LhcSR [29] and

phosphothreonine (Cell Signaling Technology). Signals were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) and detected with an LAS-4000 mini luminescent image analyzer (FujiFilm, Japan). We used antibodies against nine LHCI (LHCA1–9) [1,30] and against six LHCI (LHCII Types I–IV, CP26, and CP29) [31].

### 2.4. Isolation of chlorophyll proteins complexes

The thylakoid membranes (0.4 mg Chl  $\text{mL}^{-1}$ ) were solubilized with 1% (w/v)  $\beta$ -DDM, and centrifuged to remove insolubilized materials. The resulting extracts were separated by sucrose density gradient ultracentrifugation and the gradient was fractionated from the bottom as described previously [32].

### 2.5. Fluorescence measurements

Fluorescence induction kinetics were performed at room temperature using a DeepGreen Fluorometer (JBeamBio) and a home-built fluorescence CCD camera recorder [33]. Maximum efficiency of photosystem II,  $F_v/F_m$  ( $F_v = F_m - F_0$ ), was determined using dark-adapted cells. Maximum fluorescence ( $F_m$ ) was measured either after a saturating pulse, or upon continuous illumination in the presence of 10  $\mu\text{M}$  3-(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea (DCMU).

For state transition experiments, cells were placed in oxidizing conditions to achieve state 1, either by an incubation for 20 min under vigorous stirring in the dark or upon illumination in the presence of the PSII inhibitor DCMU (10  $\mu\text{M}$ ). State 2 was achieved in reducing conditions, by placing the cells in anoxia. To this end, glucose (20 mM) and glucose oxidase (2 mg/mL) were added to cultures in the dark for 20 min. Fluorescence induction kinetics were monitored after addition of 10 mM DCMU on a DeepGreen Fluorometer (JBeamBio).

77 K fluorescence emission spectra were measured with an in house built setup. Samples were immersed in liquid nitrogen and excited with a LED source (LS-450, Ocean Optics - blue LED, 450 nm). The emission spectra were recorded using a CCD spectrophotometer (QE6500, Ocean Optics).

### 2.6. Genomic DNA preparation, whole-genome sequencing, and data analysis

DNA from wild-type strain, *p71* and BF4 mutant strains was extracted with the DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol, starting from 100 mL of stationary culture. DNA from strain BF4-F35 was sequenced at the Tufts University core facility using the Illumina TrueSeq nano DNA method (2  $\times$  100 nt) on a HiSeq 2500 instrument. Reads were mapped onto the reference genome (Phytozome V5.5) and analyzed using SVMerge 1.1.r32 [34] and inGAP-sv 2.8.1 [35] to identify mutations. The candidate genes in the MT locus were examined using the IGV 2.0 viewer [36]. To localize the *p71* mutation, strain *p71.A4+* was crossed with the highly polymorphic strain S1-D2 (CC-2290) and 120 *p71* progeny (scored on their low fluorescence phenotype), selected from independent tetrads, were pooled and grown for DNA preparation and Illumina sequencing (GATC, Germany, 2  $\times$  125 nt). SHOREmap [37] was used to plot the proportion of S1-D2 polymorphisms along the chromosomes. A region lacking S1-D2-derived polymorphisms was identified on chromosome 4 and examined for mutations.

### 2.7. Complementation/transformation of *C. reinhardtii*

The *Alb3.1* gene was amplified from wild-type *Chlamydomonas* genomic DNA. Primers used for amplification of the genomic sequence annealed to regions 760 bp upstream of the *ALB3.1* transcription start site (5'- GCGCCGAACCGTATCTGGGA -3') and 450 bp downstream of the 3' UTR (5'- GATGCTCCGGTCGGGAAGCAC -3').

The *SRP43* coding sequence (CDS) was amplified by RT-PCR from

wild-type *Chlamydomonas* total RNA with primers used in [24].

For complementation, mutant cells were grown in TAP medium at  $20 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  to early exponential phase ( $1 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ), collected by centrifugation at room temperature at 4000 rpm for 7 min, and the cell pellet was re-suspended in TAP medium containing 40 mM sucrose (ToS) to a final cell concentration of  $1 \times 10^8$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . For each mutant, the PCR product ( $\sim 500$  ng) plus 40  $\mu\text{g}$  salmon sperm DNA and 160 ng of the *AphVIII* gene, was incubated with corresponding mutant cells at  $16^\circ\text{C}$  for 20 min. The cells were electroporated at 1 kV, 10  $\mu\text{F}$  capacitance, then incubated at  $16^\circ\text{C}$ . After 30 min of incubation, cells were diluted in 5 mL of ToS medium. The electroporated cultures were incubated overnight under dim light ( $5 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) with gentle agitation, then spread on solid minimum medium containing 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  paromomycin and 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ampicillin and placed under light ( $100 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). After two weeks of growth, only transformants harboring the introduced gene (*Alb3.1*) or CDS (*SRP43*) were dark green and high fluorescence.

### 2.8. Spectroscopic studies

Cells were harvested during exponential growth ( $2 \times 10^6$  cells/mL) and were resuspended at a concentration of  $1 \times 10^7$  cells/mL in minimum medium. The cell suspension was then vigorously stirred in a 50 mL Erlenmeyer flask for 20 min in the dark at 350 rpm.

Electrochromic shift (ECS) spectra were measured with a spectrometer built in house based on two Optical Parametric Oscillators (OPO). 10% (w/v) Ficoll was added in order to prevent cell sedimentation during the measurements. Cells were injected in two horizontal closed cuvettes with an optical path of 2.5 mm. Actinic flashes (700 nm) were provided by the first OPO pumped by a Nd:YAG laser (532 nm, 10 ns). Absorption changes due to saturating flashes were then sampled at selected wavelength and at discrete times with nanosecond flashes provided by the second OPO pumped by a Nd:YAG laser (355 nm, 10 ns). More details about the setup can be found in [38].

Determination of the PSII/PSI ratio and PSI antenna size was performed with a Joliot-Type Spectrophotometer (JTS-10, Bio-Logic, Grenoble, France). Saturating flashes were provided by a dye laser (640 nm) pumped by a second harmonic of an Nd:Yag laser (Minilite II, Continuum). The continuous light beam was provided by LEDs. Detecting flashes of ECS signals were at 520 nm and 546 nm using interference filters (10 nm full width at half-maximum). PSI + PSII and PSI charge separations were calculated from changes in the amplitude of the fast phase (100  $\mu\text{s}$ ) of the ECS signal (measured as the 520 nm minus 546 nm absorbance changes) upon excitation with a saturating laser flash in the presence or absence of the PSII inhibitors, DCMU (20  $\mu\text{M}$ ) and hydroxylamine (HA) (1 mM). PSII contribution was calculated from the difference in ECS amplitude at 100  $\mu\text{s}$  between the two conditions. PSI antenna size was measured from the slope of the saturation curve for PSI charge separation, using an OD attenuation of the laser flash fired at 640 nm.

### 3. Results

*Chlamydomonas* mutants with decreased chlorophyll content per cell are easily identified by their pale green phenotype associated with a low fluorescence yield (Fig. 1A and Table 1). Most of these mutants fall in either of two categories, peripheral antenna mutants or chlorophyll biosynthesis mutants, the latter most often displaying a light-dependent phenotype. Mutants of chlorophyll biosynthesis may also be photosensitive because of the accumulation of chlorophyll biosynthesis intermediates. The BF4 and *p71* mutants rather belonged to the first category since they were not photosensitive and their pale green phenotype was observed in darkness as well as under dim or moderate light for growth, independent of the mixotrophic or photoautotrophic light growth condition (Fig. 1B).

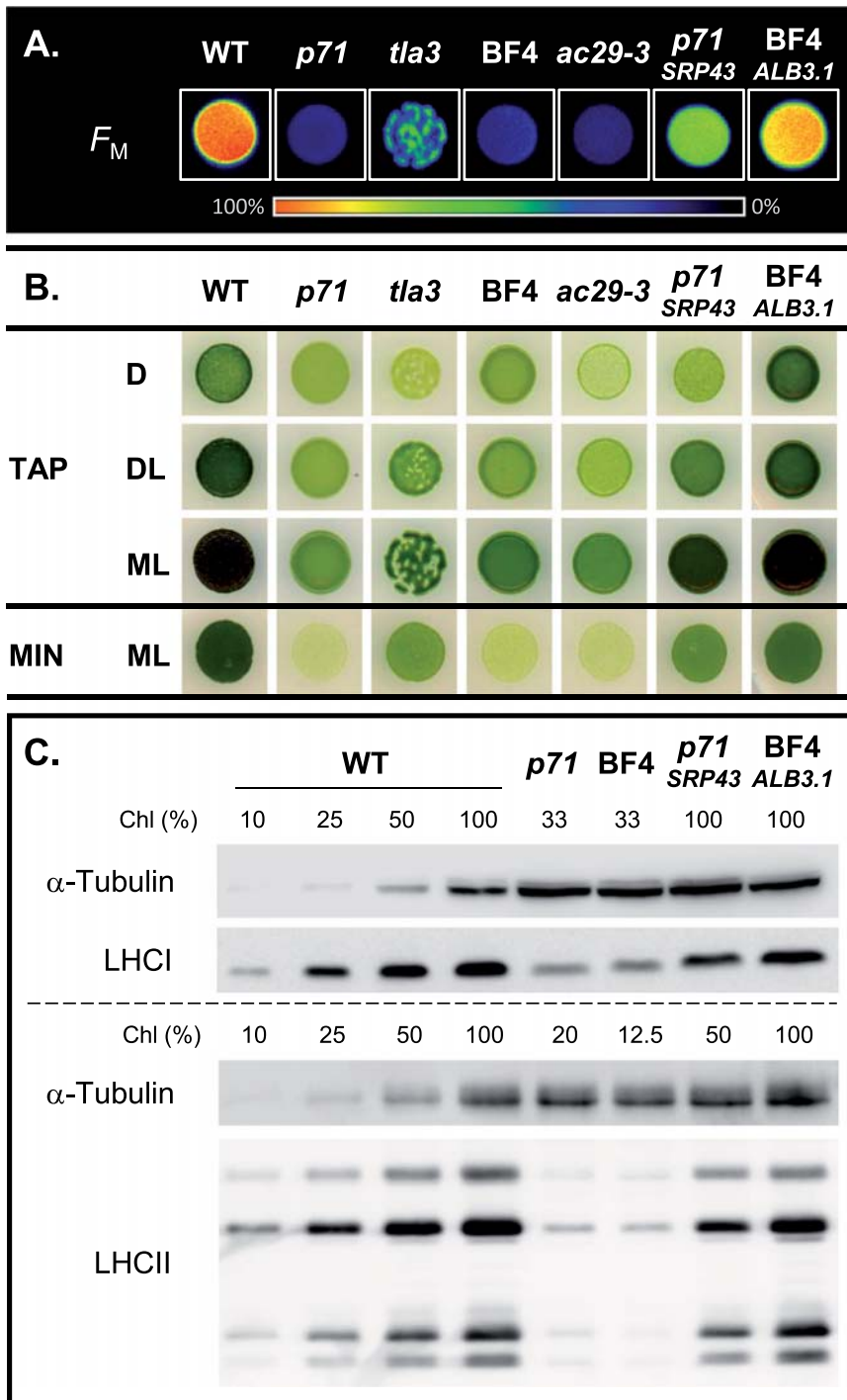
The BF4 mutant was originally isolated after UV mutagenesis by Bennoun [19] and shown to be deficient in most of the LHCP proteins [21]. Mutant *p71*, isolated after 5-fluorodeoxyuridin mutagenesis, was screened by Girard-Bascou as a low LHCP-containing mutant in order to provide the appropriate genetic background for in vivo spectroscopic studies of *Chlamydomonas* [22]. Table 1 shows that the two mutants displayed a much higher Chl *a/b* ratio - close to 8 - than that in the wild type - about 3 - and about a three to four time lower content in chlorophyll per cell. Whole cell preparations had a decreased content in LHCI and LHCI proteins (Fig. 1C).

Since neither of these mutants had been further characterized at the gene level, we undertook a molecular identification of their genetic lesion (see Material and methods for details). We previously had noticed in crosses between BF4 to other strains that its mutation was genetically linked to the mt + locus (see Sup Fig. 1 for typical tetrads). We thus searched the mt region in the BF4 genome, for possible changes in the sequence of candidate genes. We found a G > A substitution that destroys the 5' splice site of intron 4 within the *Alb3.1* gene (Cre06.g251900), 95 kb away from the *FUS1* gene of the mt+ locus (Sup Fig. 2). The predicted retention of the intron replaces the last 176 residues of the ALB3.1 protein, which are highly conserved, by an unrelated 76 amino acid sequence, presumably leading to an inactive protein. To identify the mutation in *p71*, we crossed it to the S1-D2 strain whose genome is profuse in polymorphisms with respect to that of our laboratory strains [39]. The *p71* progeny showed no S1-D2 polymorphism towards the end of chromosome 4. We found that a TOC1 transposon was inserted between introns 6 and 7 of the *SRP43* gene (Cre04.g231026) in the *p71* mutant (Sup Fig. 2). To assess that these mutational events were actually responsible for a low antenna phenotype, we respectively transformed the BF4 and *p71* mutants with a PCR-amplified genomic sequence of *Alb3.1* and a cDNA for the coding sequence of *SRP43* (see Material and methods for details). The complemented strains indeed showed restoration of a dark green phenotype and a higher fluorescence yield similar to that in the wild type (Fig. 1A & B). In addition the chlorophyll content per cell and Chl *a/b* ratio were restored to their wild-type levels (Table 1) and the LHCP proteins also were restored to a wild-type level (Fig. 1C).

The BF4 mutant should then be allelic to another previously identified *Alb3.1* mutant, *ac29-3* [23], while *p71* should be allelic to another previously identified *cpSRP43* mutant, *ta3* [24]. Indeed, the BF4 and *ac29-3* mutants have similar characteristics (Fig. 1, Table 1 and Sup Fig. 3). The *p71* mutant displays phenotypic properties resembling those of *ta3*, as originally described, but is markedly different from the *ta3* strain recovered from the *Chlamydomonas* stock center (<https://www.chlamycollection.org/>) which has a much milder pigment-deficient phenotype (Fig. 2 and Table 1). It is likely that the latter strain bears additional mutation(s), responsible for reversion of the original *ta3* phenotype.

Table 1 shows that the  $F_v/F_m$  ratio was about twice as low in the *Alb3.1* and *SRP43* mutants as in the wild type. This is indicative of a change in content and/or organization of the PSII chlorophyll-binding proteins in the mutants. We thus further investigated the functional changes in photosynthesis resulting from the altered LHCP biogenesis pathway in the BF4 and *p71* mutants. In order to estimate changes in PSII antenna size in the mutants, we measured the half time of the fluorescence rise in presence of DCMU, an inhibitor of electron transfer beyond PSII, under continuous illumination of dark-adapted algae. Since only one charge separation is elicited in such condition,  $1/t_{1/2}$  is a proxy of the relative PSII antenna size [40]. The two mutants displayed a dramatic decrease in PSII antenna size, down to only 13% of the wild type (Fig. 2A). To provide an estimation of the PSI antenna size, we used the ECS measurement of a PSI charge separation in absence of PSII contribution, once it is inhibited by a preillumination in presence of HA and DCMU (see Material and methods section). Since the two mutants are deficient in peripheral antennae which contribute Chl *b* and carotenoid probes to ECS [41,42], we first established their ECS spectrum,





**Fig. 1.** Phenotypes of the LHCP mutants. (A) Maximal Fluorescence ( $F_M$ ) of wild type (WT), *srp43* mutants (*p71* and *tla3*), *alb3.1* mutants (BF4 and *ac29-3*) and the rescued mutants (*p71-SRP43* and BF4-*ALB3.1*) grown onto solid TAP medium under moderate light (the color bar represents the fluorescence level) and (B) growth patterns. Cultures were spotted on TAP or minimum medium (MIN) after 6 days under different light conditions, darkness (D), dim light (DL;  $5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), moderate light (ML;  $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). (C) Immunoblots of whole-cell protein extracts (100% corresponding to  $20 \mu\text{g}$  of chlorophyll) of wild type (WT), light-harvesting complex mutants (*p71* and BF4) and the complemented mutants grown in moderate light ( $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), probed with specific antibodies for LHCPs and tubulin as a loading control (proteins were separated by SDS-PAGE 12%).

as shown on Fig. 2B. When measured 100 ms after a saturating actinic flash, we observed a blue shift of the spectrum of the mutants, in the 500–540 nm region, likely due to their decreased content in Chl *b* as we reported earlier [30]. Using the 520–546 difference, which eliminates the other spectral contributions from *cyt b<sub>6</sub>f* and plastocyanin in this spectral region, we measured the PSI antenna size in the mutants relative to that in the wild type as the change in slope of the saturation curve for the PSI-driven ECS signal produced by a laser flash of varying intensity. In *p71* and BF4 the PSI antenna size was respectively 55% and 64% that in the wild type (Fig. 2A). Using the same single turnover laser

flash of saturating light intensity, we compared the ECS signal 100  $\mu\text{s}$  after the flash when both PSI and PSII are active versus the ECS signal when PSII was inhibited by HA and DCMU. The resulting PSII/PSI ratio was similar to that in the wild type for the *p71* mutant but was smaller, 80%, in the BF4 mutant. The latter decrease points to a possible contribution of the Alb3.1 insertase to PSII biogenesis, as previously proposed [23]. We therefore probed the PSII and PSI protein contents in the thylakoid membranes of the two mutants (Table 1 and Fig. 3A). We observed the same polypeptide profile in the two mutants: at the chlorophyll loading used, their amount in PSII proteins relative to *cyt b<sub>6</sub>f*

**Table 1**  
Chlorophyll and fluorescence parameters of wild type (WT), *srp43* and *alb3.1* mutants and *p71-SRP43* and BF4-*ALB3.1* complemented mutants.

Parameter	WT	<i>srp43</i> mutants		<i>alb3.1</i> mutants		Complemented strains		
		<i>p71</i>	<i>tla3</i>	BF4	<i>ac29-3</i>	<i>p71-SRP43</i>	BF4- <i>ALB3.1</i>	
[Chl] ( $\mu\text{g}/10^6$ cell)	DL	1.3 $\pm$ 0.3	0.24 $\pm$ 0.07	–	0.28 $\pm$ 0.05	–	1.1 $\pm$ 0.1	1.01 $\pm$ 0.04
	ML	2.1 $\pm$ 0.3	0.35 $\pm$ 0.02	0.96 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.06	0.8 $\pm$ 0.04	1.0 $\pm$ 0.1
Chl <i>a</i> /Chl <i>b</i>	DL	2.9 $\pm$ 0.2	8.2 $\pm$ 0.2	–	8.4 $\pm$ 0.8	–	3.2 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.1
	ML	3.1 $\pm$ 0.1	6.9 $\pm$ 0.4	6.2 $\pm$ 0.1	9 $\pm$ 2	12.7 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.1
$F_M$ /cell	DL	100%	8% $\pm$ 3	–	8.1% $\pm$ 0.5	–	71% $\pm$ 2	79% $\pm$ 3
	ML	100%	6.9% $\pm$ 0.3	33.1% $\pm$ 0.4	5% $\pm$ 1	7.5% $\pm$ 0.2	58% $\pm$ 2	62% $\pm$ 5
$F_V/F_M$	DL	0.75 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.02	–	0.35 $\pm$ 0.06	–	0.70 $\pm$ 0.01	0.68 $\pm$ 0.04
	ML	0.74 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.03	0.52 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.02	0.74 $\pm$ 0.01	0.64 $\pm$ 0.06

Chlorophyll concentrations were determined according to [25]. Percentage was determined by comparison of the mutant with the wild type cells grown under the same light condition. Values represent means  $\pm$  SD ( $n = 3-7$ ). DL, dim light ( $5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); ML, moderate light ( $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

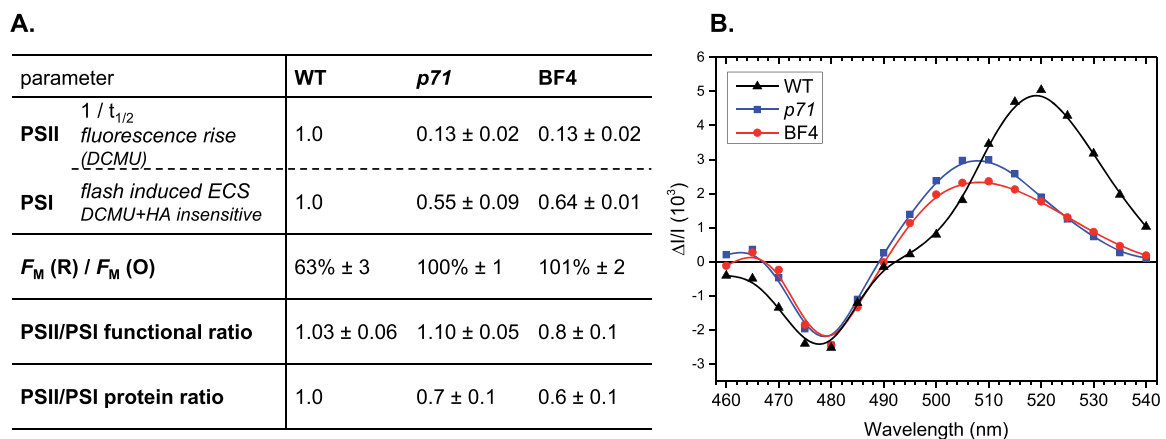
was similar to that in the wild type, whereas PSI proteins appeared more abundant. This is consistent with the lower PSII to PSI protein ratio shown in Fig. 2A. It is of note that the BF4 allelic mutant *ac29-3* also showed this PSII deficiency relative to PSI to an even larger extent than BF4 (Sup Fig. 3). As previously reported [21], the D2 doublet, which arises from the presence of a phosphorylated form of the psbD gene product [43], was absent in these two LHCP mutants (Fig. 3A).

We then assessed the ability of the mutants to undergo state transitions, a reorganization of the light harvesting antenna which involves the lateral redistribution of phosphorylated antenna proteins between PSII and PSI. The maximal fluorescence  $F_M$  reflects the proportion of antenna proteins associated with PSII in either oxidizing (state 1) or reducing (state 2) conditions. In the wild type (Fig. 2A), LHCP movement towards PSI in reducing conditions resulted in a  $\sim 40\%$  decrease of  $F_M$  as compared to its level in oxidizing conditions. This process was fully abolished in both the BF4 and *p71* mutants, which argues for a loss of mobile antenna in these two strains. Still phosphorylated forms of Lhcb proteins could be detected in the mutants with an antibody against phosphothreonine, when they were placed in state 2 conditions (Fig. 3B). The protein phosphorylation patterns were identical in the two mutants but displayed significant changes with respect to that in the wild type. On the one hand a new phosphoprotein, labeled X in Fig. 3B, was detected in position of LhcbM1-Type IV, which lacks the regular target threonine at its N-terminus and is not phosphorylated in the wild type [44]. On the other hand, phosphorylation of D2 was

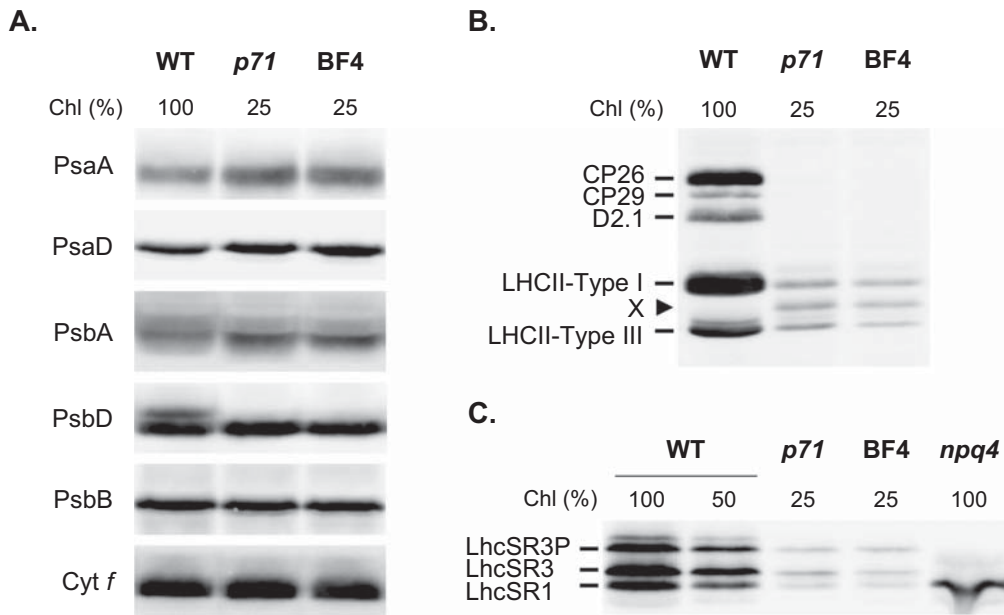
lacking, consistent with the D2 antibody labeling pattern on Fig. 3A, and phosphorylation of CP26 and CP29 remained below detection. Thus the lack of state transitions in the mutant cannot not be ascribed to a loss in their ability to undergo antenna protein phosphorylation but rather to the low amount or absence of some of these phosphoproteins.

We then looked at the ability of the two mutants to express the LhcSR1 and LhcSR3 proteins involved in photoprotection. In *Chlamydomonas* LhcSR3 displays both a phosphorylated and an unphosphorylated form, but the expression of the two LhcSR3 forms together with LhcSR1, requires the cells to be placed in phototrophic conditions under high light ( $500 \mu\text{E}$ ) for several hours [29]. Fig. 3C shows that the two mutants when placed in these experimental conditions, retained the same LhcSR expression profile as the wild type but displayed a lower level of these proteins, about 20%, similar to the level of the other Lhc proteins in these mutants (see below).

We next probed the chlorophyll organization between the two photosystems in the mutants by recording their 77 K fluorescence emission spectra (Fig. 4). A wild-type spectrum shows two major peaks at 685 nm and 712–720 nm that respectively correspond to fluorescence emission from the PSII and PSI cores [45]. The amplitude of the PSII and PSI emission peaks is in part determined by the number of chlorophyll that transfer their light excitation to the fluorescence emitters. Here the cells were placed in state 1 conditions [44], a physiological situation where the mobile LHCP antenna is retained with PSII. At 77 K, PSII also contributes a 695 nm peak, the amplitude of which depends on the



**Fig. 2.** Functional Photosystem II and Photosystem I relative antenna size, state transition, PSII/PSI ratio and electrochromic shift spectra of the wild type (WT) and the LHCP mutants (*p71* and BF4) of *C. reinhardtii* grown photoautotrophically under moderate light ( $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). (A) Photosystem II and Photosystem I relative antenna size, fluorescence quenching between state 1 and state 2 (R, reducing conditions analogous to state 2; O, oxidizing conditions analogous to state 1) and ratio PSII/PSI as measured by ECS (functional ratio) or by densitometric scanning of immunoblots (protein ratio with respect to wild type set as 1). PSII antenna size has been estimated from fluorescence rise kinetics to  $F_M$  ( $1/t_{1/2}$ ) in the presence of DCMU ( $10^{-5}$  M) and PSI antenna size, estimated spectroscopically from the light-saturation curves of the ECS changes at (520–546) nm in the presence of PSII inhibitors (DCMU and hydroxylamine). (B) Electrochromic shift (ECS) spectra. The absorption change was measured 100 ms after the actinic flash hitting 100% of centers. All values represent means  $\pm$  SD ( $n = 3-7$ ).



**Fig. 3.** Protein accumulation and phosphorylation in thylakoids from LHCP mutants. Immunoblots of thylakoid membranes (100% corresponding to 20  $\mu\text{g}$  of chlorophyll) from wild-type control (WT), *p71* and BF4 mutants grown in TAP under moderate light (50  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) (A), and then placed in anoxia (reducing conditions to achieve state 2) (B) or exposed to high light (500  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) in minimum medium for 4 h (C). Proteins were fractionated by electrophoresis on an 8 M urea 12–18% polyacrylamide gradient gel and probed with the antibodies as indicated: (A) PsaA/PsaD (subunits of Photosystem I); D1/D2 (PsbA/PsbD subunit of Photosystem II); CP47 (PsbB subunit of Photosystem II) and Cyt *f* (cytochrome *f*), (B) phosphothreonine (the identity of the phosphorylated proteins is indicated on the left), (C) LhcSR (LhcSR1, LhcSR3 and phosphorylated LhcSR3); (*npq4*; mutant lacking LhcSR3).

coalescence between the long wavelength edge of the major PSII peak and the short wavelength edge of the PSI emission peak. This is readily observed in the four panels of Fig. 4, where the wild-type and mutant spectra were normalized at 685 nm. The two mutant spectra had similar features with an unchanged PSII emission peak at 685 nm, a slight enrichment in short wavelength emission in the 670 nm region and a red shift in PSI emission, now peaking at 716 nm instead of 712 nm. Whereas the former change suggests an enhanced contribution from some poorly connected LHCII whose emission peaks at 682 nm [44], the latter change is likely to result from the loss of most LHCI antenna whose emission peaks at 707 nm, thus allowing a better resolution of the 716 nm emission of the PSI cores [45]. The *p71* spectrum showed a large enhancement of the PSI emission peak relative to that of PSII, which is consistent with the higher number of core antenna chlorophyll in PSI than in PSII. A somewhat similar change of more limited amplitude was observed in the BF4 mutant. All changes in the 77 K fluorescence emission of the mutants, were reversed in the complemented strains, which regained almost wild-type characteristics.

To get a better insight into the changes in content of the various LHCP proteins which contribute to the complex organization of the PSI (LHCI) and PSII (LHCII) peripheral antennae, we performed immunoblotting experiments using a complete set of antibodies raised against each of the *lhca* and *lhcb* gene products (for the specificity of the antibodies against Lhca1–9, see supplemental data in [30]). When loading whole cell protein extracts at the same chlorophyll concentration, as shown on Fig. 5, the two mutants displayed an expected higher amount of PSI and PSII than in the wild type (Fig. 5A) due to the drop in the peripheral antennae content. Indeed most LHCI and LHCII proteins in the mutants stood well below their amount in the wild type (Fig. 5B, C, D).

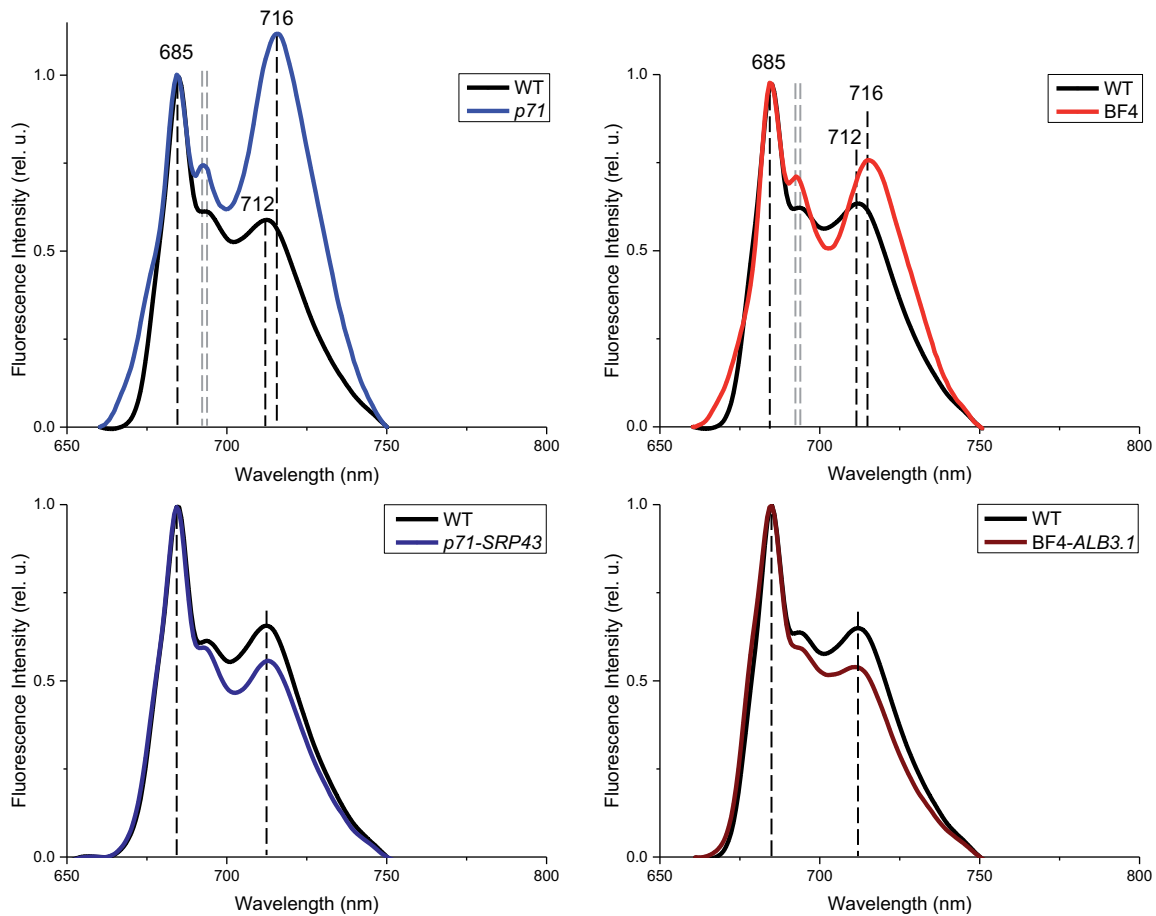
These results are consistent with the marked decrease in the antenna size of PSI and PSII in the mutants, but they also show that the LHCI and LHCII proteins are not completely absent in the mutants (except Lhca4). Since LHCI proteins assemble with the PSI core to form the PSI-LHCI supercomplex while most LHCII proteins are loosely bound to the PSII

core to form PSII-LHCII supercomplex, we attempted to estimate the amount of each LHCI and LHCII proteins on a per PSI or PSII basis. We thus performed another series of immunoblotting experiments where the two mutant strains and the wild type solubilized in SDS were loaded at similar PSI or PSII content (Fig. 6A and B). It is of note that the amount of three PSI core subunits, PsaG, PsaK, and PsaN, were somewhat decreased in the mutants (especially BF4). Because of their interfacial position within the PSI-LHCI supercomplex [1], their binding to the rest of the PSI cores may be loosened in the absence of the peripheral antenna complement. As expected, the amount of each LHCI proteins was significantly decreased ( $\leq 25\%$  of wild-type levels) in the mutants. However we noted some significant differences between the various PSI antenna proteins, with a better preservation of Lhca5 and Lhca6 than the other Lhca proteins. These immunoblots also revealed that the LHCII proteins were similarly decreased at  $\leq 25\%$  of wild-type levels. It is of note that no major differences were observed at the antenna protein level between the two mutants, despite their distinct mutations targeting different steps in the antenna biogenesis pathway.

We subsequently separated chlorophyll-protein complexes from the thylakoid extracts solubilized with  $\beta$ -DDM by sucrose density gradient ultracentrifugation as shown in Fig. 7. Three major green bands were separated from WT extracts: A1 contained LHCII, A2 mostly PSII core, and A3 the PSI-LHCI supercomplex plus some PSII supercomplex. In contrast, the yellow A1 and very faint A3 occasionally observed in *p71* and BF4 contained only trace amounts of LHCII and PSI-LHCI proteins, respectively. A2 contained both PSI and PSII core proteins with little if any peripheral antenna proteins. This indicates that PSI and PSII cores in the mutants did not form stable supercomplexes with the remaining peripheral antennae proteins.

#### 4. Discussion

The present molecular genetic analysis of the BF4 and *p71* mutants from *C. reinhardtii* showed that they were allelic to other biogenesis mutants, defective for the Alb3.1 insertase [23] and cpSRP43 [24],



**Fig. 4.** Low-temperature (77 K) fluorescence emission spectra of cells in state 1 of wild type (WT), light-harvesting complex mutants (*p71* and BF4) and the complemented mutants grown in moderate light ( $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). All fluorescence emission spectra are normalized on PSII emission at 685 nm.

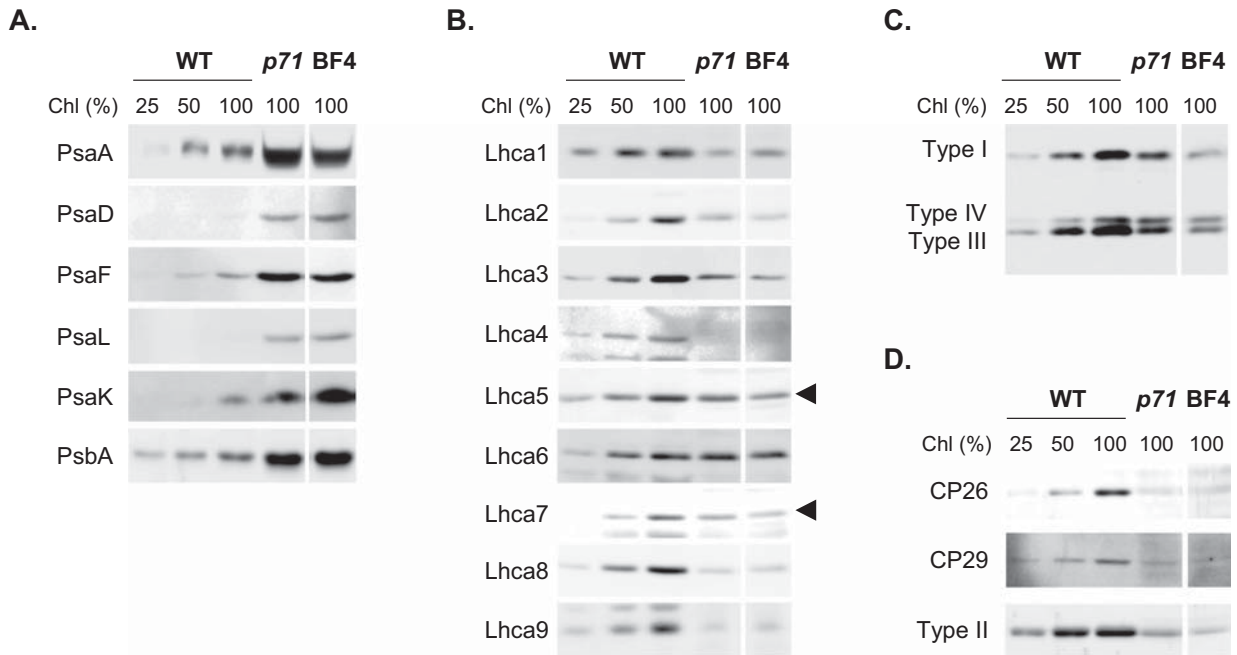
further supporting the contribution of the major cpSRP route for LHCP insertion in the thylakoid membranes.

Both BF4 and *p71* accumulated Chls at only 15–20% of wild-type level, and immunoblotting of their LHCPs revealed that these mutants indeed showed severely reduced LHCI and LHCII protein levels. Since the LHCPs are the major chlorophyll binding proteins in the thylakoid membranes and bind both Chl *a* and Chl *b* whereas the reaction centers bind only Chl *a*, the low chlorophyll content and high Chl *a/b* ratio in these mutants is readily explained by their decreased amount in peripheral antenna proteins. The drastic drop by about 85% in functional PSII antenna size in these mutants is consistent with a quasi-absence of peripheral antenna connected to the PSII cores. Indeed the latter house 35 Chl, which represents 15% of the PSII antenna in a wild type placed in State 1 (reviewed in [3]). The decrease in PSI antenna size in the mutants is less extensive, as predicted from the larger number of chlorophyll, 94 molecules, housed within the PSI cores, compared to the 129 chlorophyll housed in their peripheral antenna [2]. The larger decrease in PSII antenna size than in PSI antenna size in the two mutants readily explains their higher PSI 77 K fluorescence emission peak relative to that of PSII. However the decrease in PSII functional antenna size is larger than expected from the 25% remaining LHCII proteins in the mutants. This may explain why the mutants showed a marked drop in  $F_v/F_m$  and an enrichment in the short wavelength side of the PSII emission peak at 77 K. The two latter observations indeed suggest that there are LHCII proteins which do not bind to PSII cores in the mutants. They would then contribute to basal fluorescence ( $F_0$ ) at room temperature and emit fluorescence at shorter wavelength than PSII reaction

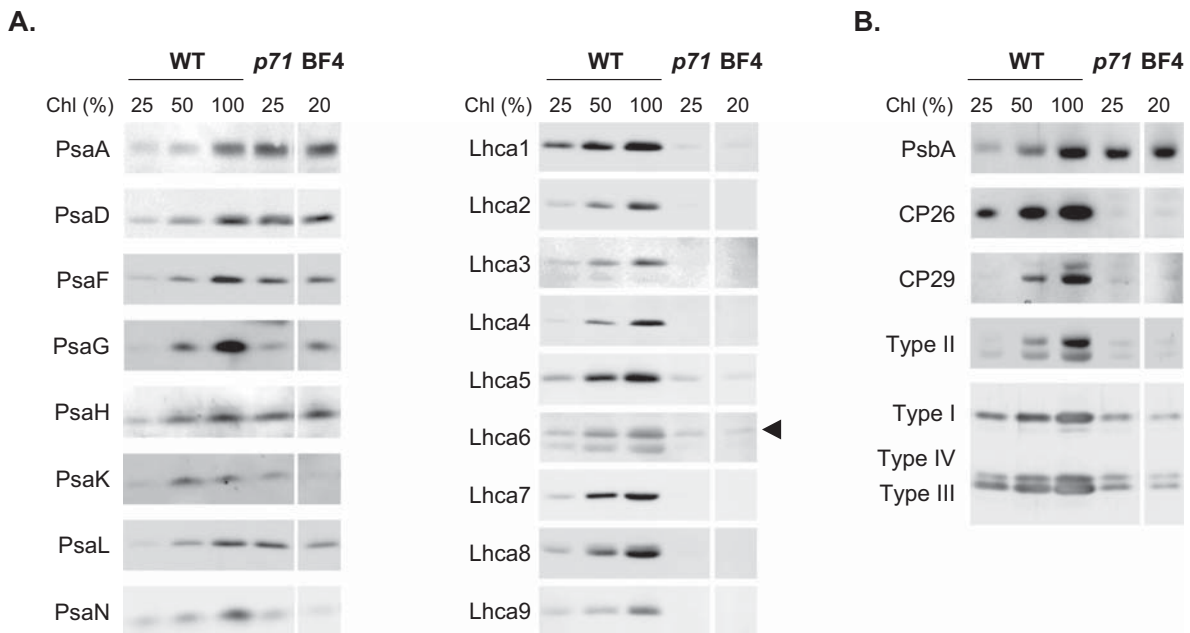
center at 77 K. The position of LHCII trimers within the PSII super-complex shows that CP29 and CP26 control the interaction between LHCII/PSII cores [46,47]. Their quasi-absence in the mutants should then prevent the association of the remaining LHCII with the cores. Based on the number of Chl in the core PSI and LHCI, a complete loss of the latter should lead to a remaining PSI antenna size of 44% that of the wild type. However, the functional antenna size that in the mutants was about ~60%. The difference may be due to the remaining LHCI, but also to the association of a fraction of the remaining LHCII.

Consistent with the lack of interaction between the PSII cores and the ~25% LHCII remaining in the mutants was their complete loss of ability to perform state transitions, despite detection of phospho-LHCII in state 2 conditions. However the complete loss in antenna reorganization between unbound-LHCII and PSI upon LHC phosphorylation may result from the quasi-absence of CP29 and CP26 in the mutant as well as of the phospho-X extra band, possibly LhcbM1-Type IV, which may hamper antenna association with PSI. It is of note that the polypeptide patterns of the BF4 and *p71* mutant thylakoid membranes also lacked the upper PsbD band (D2.1) detected in the wild type which appears post-translationally and is due to phosphorylation of D2 at Thr2 [48]. This suggest that the kinase targeting D2 requires antenna proteins to recognize its substrate possibly through a phosphotransferase process between LHCII and D2 [49].

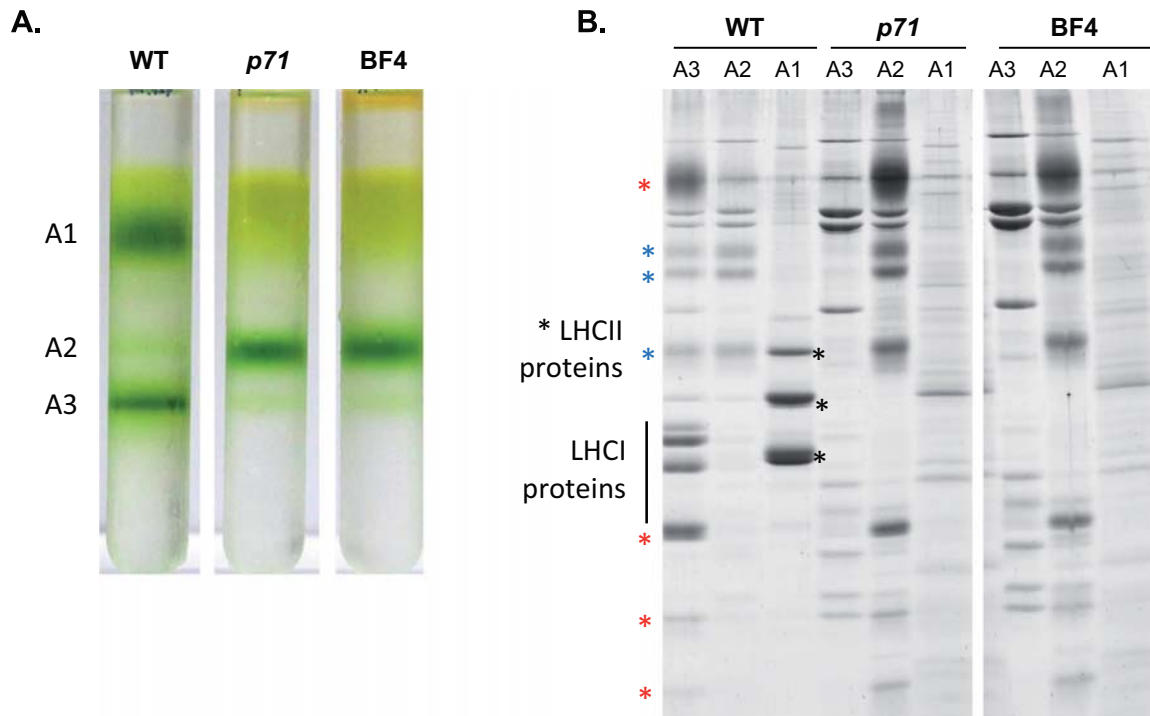
It is of note that the amounts of each LHCP protein - nine LHCI and six LHCII proteins - in the two mutants, is close to 25% of the wild-type content on a per-Chl basis. This suggests that the assembly of peripheral antenna proteins was not completely blocked and might occur, albeit at



**Fig. 5.** Accumulations of PSI, PSII, LHCI, and LHCII proteins in *p71*, BF4 and wild type, on a chlorophyll basis. WT (wild type), *p71* and BF4 cells were grown in TAP medium, and resuspended in buffer (50 mM Tris HCl pH 8.0, 20% (w/v) glycerol, 1 mM EDTA-NaOH pH 8.0). Cells at 0.1 (C) or 0.2 μg (A, B, and D) Chls were solubilized with 2% (w/v) SDS and 0.1 M DTT at 100 °C for 1 min, and protein extracts were separated by SDS-PAGE, electroblotted onto a nitrocellulose filter, probed with specific antibodies, and visualized by enhanced chemiluminescence. The filter was hybridized with antibodies against (A) PSI and PSII proteins (PsaA, PsaD, PsaF, PsaL, PsaK and PsaB), (B) LHCI proteins (Lhca1–9), (C) LHCII proteins (Type I, III, and IV) (D) LHCII proteins (CP26, CP29, and LHCII Type II). The arrowheads indicate the signals representing the actual antigen.



**Fig. 6.** Accumulations of LHCI and LHCII proteins in *p71*, BF4 and wild type, on a reaction center basis. Cells were grown in TAP medium and resuspended in buffer (50 mM Tris HCl pH 8.0, 20% (w/v) glycerol, 1 mM EDTA-NaOH pH 8.0). Cells were solubilized with 2% (w/v) SDS and 0.1 M DTT at 100 °C for 1 min, and protein extracts were separated by SDS-PAGE, electroblotted onto a nitrocellulose filter, probed with specific antibodies, and visualized by enhanced chemiluminescence. WT, wild type. The arrowhead indicates Lhca6. (A) Accumulation of PSI subunits and LHCI proteins on a PsaA basis. The nitrocellulose filter was hybridized with antibodies against PSI subunits (PsaA, PsaD, PsaF, PsaG, PsaH, PsaK, PsaL, and PsaN), LHCI (Lhca1–9). Relative loaded Chl amounts (%) are indicated on the top of lanes. (B) Accumulation of LHCII proteins on a PsaA basis. The nitrocellulose filter was hybridized with antibodies against PSII (PsbA) and LHCII (CP26, CP29, LHCII Types I–IV). Relative loaded Chl amounts (%) are indicated on the top of lanes.



**Fig. 7.** Separation of PSI, PSII, and LHCII complexes. (A) Thylakoid membranes of WT (wild type), *p71* and BF4 cells were solubilized with 0.8%  $\beta$ -DDM and the extracts were separated by sucrose density gradient ultracentrifugation. A1, A2, and A3 represent LHCII, PSII core, and PSI-LHCI supercomplexes. (B) Polypeptides of A1, A2, and A3 were separated by SDS-PAGE and stained by Coomassie Brilliant Blue. Black asterisks: LHCII proteins, red asterisks: PSI proteins, and blue asterisks: PSII proteins.

a lower rate, through an alternative route, possibly based on vesicle trafficking [13]. In addition this drop was less severe for Lhca5–6 than for Lhca1-2-3-4-7-8-9, indicating that the absence of Alb3.1 and cpSRP43 did not similarly impair the accumulation of each LHCI protein. In an attempt to rationalize this cpSRP-independent accumulation of LHCPs we investigated their sequence properties in the L18 domain which has been shown to be critical for using the cpSRP biogenesis route [50–52]. The primary sequence of all LHCPs contains two DPLG motifs for lutein binding [53]. It is the second motif, embedded within the L18 domain, VDPLYGGSFDPGLGLADD, located between helix C and helix B, which has been implicated in the interaction with cpSRP proteins. The canonical L18 domain could be identified in all LHCPs from *Chlamydomonas* albeit with a different degree of conservation (Sup Fig. 4). The whole L18 domain was more conserved among Lhcb than Lhca proteins. The L18 domain in Lhcb4 (CP29) was the most divergent within the PSII peripheral antenna proteins whereas Lhca1 was the closest to Lhcb proteins, with Lhca2 and Lhca9 being the most divergent. A fully preserved DLPG motif was found in all LhcbM proteins whether of Type I, II III or IV, in Lhcb5 (CP26), LhcSR proteins and in Lhca1 and Lhca8. This motif bore one substitution in Lhcb4 (CP29) as well as in all other Lhca except for Lhca3 and Lhca6 which displayed three substitutions in this motif, keeping only L and P respectively (Sup Fig. 4). Lhca6 accumulation was less sensitive than other Lhca proteins to the present mutations in the SRP-dependent pathway, but that of Lhca3 was as compromised as that of other Lhca proteins. Among all sequence divergence/conservation in the L18 domain and DPLG motif, only its absence in Lhca6 was consistent with a lower dependence on the SRP-biogenesis pathway. Lhca5 and Lhca6 form a hetero-dimer in the PSI supercomplex [2]. Since Lhca5 which keeps a bona fide DPLG motif accumulated as did Lhca6, we hypothesized that it is stabilized by its hetero-dimerization with Lhca6, incorporated in the membrane through an SRP-independent pathway. However, we are bound to conclude that the above sequence comparison did not allow us to draw

a non-ambiguous correlation between the DPLG motif in the L18 domain and a possible escape from the cpSRP biogenesis pathway.

We next looked whether the supramolecular organization of the PSI-LHCI supercomplex [1,2] could provide some structural basis for a better accumulation of Lhca5 and Lhca6 in the BF4 and *p71* mutants. Contrarily to what one could expect, these two subunits stand at the periphery of the protein complex, bound onto Lhca3 and Lhca7, with no direct interaction with the PSI cores. Still, the PSI antenna size in the mutants being larger (55% and 64%) than expected if only the PSI cores remained (44%), it is likely that the Lhca5/6 oligomer associates with the PSI cores and contributes a peripheral PSI antenna in the mutants. This PSI-LHCI association however should be much looser in the mutants as compared with that in the wild type since the relative stoichiometry of the Lhca subunits is deeply modified due to the excess content in Lhca5 and Lhca6. Indeed, it hardly resisted detergent solubilization and sucrose gradient centrifugation, as shown by the migration of most of the PSI complexes away from the A3 position in the wild type to the A2 position in the mutants, where stand the PSI cores without their peripheral antenna complement. Consistent with the lack of LHCII/PSII core interactions in the BF4 and *p71* mutants that we discussed above, PSII-LHCII supercomplexes also were absent in the mutants upon sucrose gradient centrifugation of solubilized thylakoids, a situation similar to what had been reported for the *ta3* and *ac29-3* mutants [24,54].

A comparison with the main phenotypic traits of *ac29-3* and *ta3* mutants which are allelic to BF4 and *p71* [23,24] points to several noticeable differences. The PSII antenna size in *ta3* was much larger than what we observed in *p71*, 42% versus 15% whereas the PSI antenna size was reduced to about the same extent (50%) in the two mutants. It had been argued previously that Alb3.1 contributes to the biogenesis of PSII, leading to a marked deficiency in PSII in the *ac29-3* mutant [23]. The BF4 mutant also showed a somewhat diminished content in PSII relative to PSI but its amplitude of about 20% was rather

limited as compared to the previous report for *ac29-3* -from 50% to 90% depending on the growth conditions. Indeed when grown in similar light conditions, we observed a larger PSII deficiency in *ac29-3* (Sup Fig. 3). The contrast between previous reports and the present study thus may be due to differences in genetic background between the mutant strains.

We observed a similar decrease in the PSII/PSI protein content in the *p71* mutant as in BF4 which, however, was not accompanied by a decrease in their functional ratio. This intriguing feature of *p71* suggests that a small fraction of PSI assembled in this mutant, < 20%, would not undergo a stable charge separation, which is the functional event we measured by ECS. That some peripheral membrane subunits of PSI may require cpSRP43 for efficient assembly in a functional PSI protein complex remains to be investigated.

The previous and present studies concur in showing that Alb3.1 and cpSRP43 primarily contribute to the biogenesis of the peripheral antenna proteins. Still, about 25% of antenna proteins in these two mutants show that the biogenesis process is not knocked out in either of these two strains. The point mutation at an exon/intron junction in the BF4 mutant, could result in a leaky phenotype allowing a limited expression of Alb3.1 and thereof the expression of low amounts of LHCP proteins. However, the residual antenna proteins detected in BF4 accumulate at the same level as in mutant *ac29-3* which carries a 3 kb deletion in the *Alb3.1* gene. In addition the *p71* mutant, which carries a transposon insertion between introns 6 and 7 in the *cpSRP43* gene, also accumulates LHCP proteins to the same extent as in the Alb3-1 mutants. Last but not least, the Arabidopsis double mutant lacking the whole cpSRP complex, still accumulates antenna proteins in mature leaves [12]. These observations consistently argue for the existence of a cpSRP-independent route of low efficiency for the biogenesis of LHCP proteins. This pathway has escaped any genetic identification upon to now. Further genetic analysis of secondary mutations affecting Chl accumulation in the mutants of the SRP route may lead to interesting developments in this direction.

#### Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

This work was supported by the 'Initiative d'Excellence' program from the French State (Grant 'DYNAMO', ANR-11-LABX-0011-01) and by JSPS KAKENHI Grant Number 16H06554. We thank Alberta Pinnola for providing the antibodies to LhcSR proteins.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.148085>.

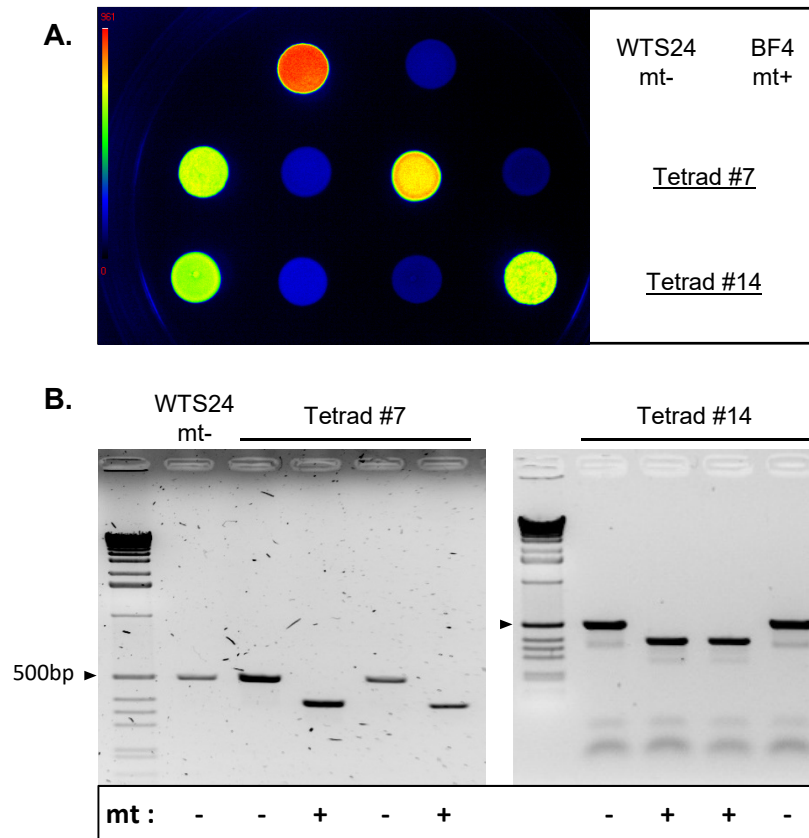
#### References

- S.-I. Ozawa, T. Bald, T. Onishi, H. Xue, T. Matsumura, R. Kubo, H. Takahashi, M. Hippler, Y. Takahashi, Configuration of ten light-harvesting chlorophyll *a/b* complex I subunits in *Chlamydomonas reinhardtii* photosystem I, *Plant Physiol.* 178 (2018) 583–595.
- M. Suga, S.-I. Ozawa, K. Yoshida-Motomura, F. Akita, N. Miyazaki, Y. Takahashi, Structure of the green algal photosystem I supercomplex with a decameric light-harvesting complex I, *Nat. Plants* 5 (2019) 626–636.
- W.J. Nawrocki, S. Santabarbara, L. Mosebach, F.-A. Wollman, F. Rappaport, State transitions redistribute rather than dissipate energy between the two photosystems in *Chlamydomonas*, *Nat. Plants* 2 (2016) 16031.
- L. Wobbe, R. Bassi, O. Kruse, Multi-level light capture control in plants and green algae, *Trends Plant Sci.* 21 (2016) 55–68.
- L. Dall'Osto, M. Bressan, R. Bassi, Biogenesis of light harvesting proteins, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1847 (2015) 861–871.
- D. Ziehe, B. Dünschede, D. Schünemann, Molecular mechanism of SRP-dependent light-harvesting protein transport to the thylakoid membrane in plants, *Photosynth. Res.* 138 (3) (2018) 303–313.
- J.H. Musssnug, L. Wobbe, I. Elles, C. Claus, M. Hamilton, A. Fink, U. Kahmann, A. Kapazoglou, C.W. Mullineaux, M. Hippler, J. Nickelsen, P.J. Nixon, O. Kruse, NAB1 is an RNA binding protein involved in the light-regulated differential expression of the light-harvesting antenna of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell* 17 (2005) 3409–3421.
- M. Ouyang, X. Li, J. Ma, W. Chi, J. Xiao, M. Zou, F. Chen, C. Lu, L. Zhang, LTD is a protein required for sorting light-harvesting chlorophyll-binding proteins to the chloroplast SRP pathway, *Nat. Commun.* 2 (2011) 277.
- J. Jeong, K. Baek, J. Yu, H. Kirst, N. Betterle, W. Shin, S. Bae, A. Melis, E. Jin, Deletion of the chloroplast LTD protein impedes LHCI import and PSI-LHCI assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Exp. Bot.* 69 (2018) 1147–1158.
- C.V. Richter, T. Bals, D. Schünemann, Component interactions, regulation and mechanisms of chloroplast signal recognition particle-dependent protein transport, *Eur. J. Cell Biol.* 89 (2010) 965–973.
- H. Kirst, A. Melis, The chloroplast signal recognition particle (CpSRP) pathway as a tool to minimize chlorophyll antenna size and maximize photosynthetic productivity, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 66–72.
- P. Amin, D.A.C. Sy, M.L. Pilgrim, D.H. Parry, L. Nussaume, N.E. Hoffman, Arabidopsis mutants lacking the 43- and 54-kilodalton subunits of the chloroplast signal recognition particle have distinct phenotypes, *Plant Physiol.* 121 (1999) 61–70.
- J.K. Hooper, L.L. Eggink, M. Chen, Chlorophylls, ligands and assembly of light-harvesting complexes in chloroplasts, *Photosynth. Res.* 94 (2007) 387–400.
- G. Finazzi, F. Rappaport, A. Furia, M. Fleischmann, J.D. Rochaix, F. Zito, G. Forti, Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*, *EMBO Rep.* 3 (2002) 280–285.
- Y. Li, A. van der Est, M.G. Lucas, V.M. Ramesh, F. Gu, A. Petrenko, S. Lin, A.N. Webber, F. Rappaport, K. Redding, Directing electron transfer within Photosystem I by breaking H-bonds in the cofactor branches, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 2144–2149.
- S. Santabarbara, B. Bullock, F. Rappaport, K.E. Redding, Controlling electron transfer between the two cofactor chains of photosystem I by the redox state of one of their components, *Biophys. J.* 108 (2015) 1537–1547.
- C. de Vitry, F.-A. Wollman, P. Deleplaire, Function of the polypeptides of the photosystem II reaction center in *Chlamydomonas reinhardtii*. Localization of the primary reactants, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 767 (1984) 415–422.
- C. de Vitry, C. Carles, B.A. Diner, Quantitation of plastoquinone-9 in photosystem II reaction center particles: chemical identification of the primary quinone, electron acceptor Q<sub>A</sub>, *FEBS Lett.* 196 (1986) 203–206.
- J. Olive, F.-A. Wollman, P. Bennoun, M. Recouvreur, Ultrastructure of thylakoid membranes in *C. reinhardtii*: evidence for variations in the partition coefficient of the light-harvesting complex-containing particles upon membrane fracture, *Arch. Biochem. Biophys.* 208 (1981) 456–467.
- E.H. Harris, *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use*, Academic Press, 2009.
- C. de Vitry, F.-A. Wollman, Changes in phosphorylation of thylakoid membrane proteins in light-harvesting complex mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 933 (1988) 444–449.
- Y. Li, M.-G. Lucas, T. Konovalova, B. Abbott, F. MacMillan, A. Petrenko, V. Sivakumar, R. Wang, G. Hastings, F. Gu, J. van Tol, L.-C. Brunel, R. Timkovich, F. Rappaport, K. Redding, Mutation of the putative hydrogen-bond donor to P700 of photosystem I, *Biochemistry* 43 (2004) 12634–12647.
- S. Bellafiore, P. Ferris, H. Naver, V. Göhre, J.-D. Rochaix, Loss of Albino3 leads to the specific depletion of the light-harvesting system, *Plant Cell* 14 (2002) 2303–2314.
- H. Kirst, J.G. Garcia-Cerdan, A. Zurbriggen, T. Ruehle, A. Melis, Truncated photosystem chlorophyll antenna size in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* upon deletion of the *TLA3-CpSRP43* gene, *Plant Physiol.* 160 (2012) 2251–2260.
- R.J. Porra, W.A. Thompson, P.E. Kriedemann, Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 975 (1989) 384–394.
- N.H. Chua, P. Bennoun, Thylakoid membrane polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*: wild-type and mutant strains deficient in photosystem II reaction center, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72 (1975) 2175–2179.
- S.P. Fling, D.S. Gregerson, Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea, *Anal. Biochem.* 155 (1986) 83–88.
- R.G. Piccioni, N.-H. Chua, P. Bennoun, A nuclear mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* defective in photosynthetic photophosphorylation, *Eur. J. Biochem.* 117 (1981) 93–102.
- G. Bonente, M. Ballottari, T.B. Truong, T. Morosinotto, T.K. Ahn, G.R. Fleming, K.K. Niyogi, R. Bassi, Analysis of LhcSR3, a protein essential for feedback de-excitation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *PLoS Biol.* 9 (1) (2011) e1000577.

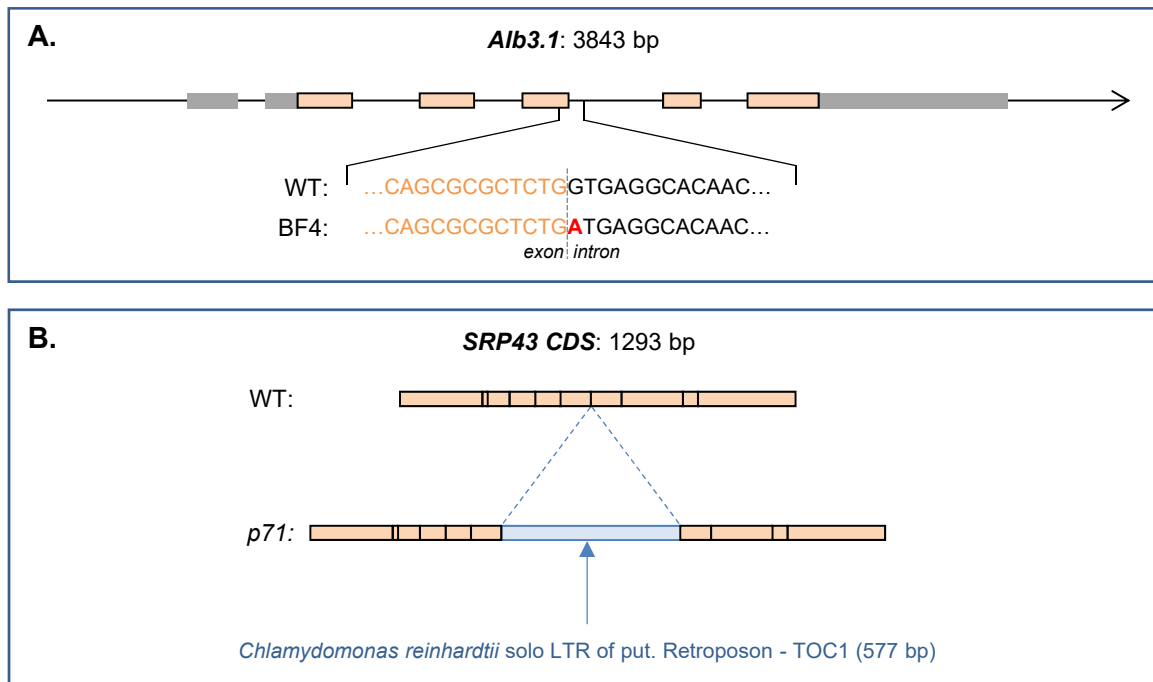
- [30] S. Bujaldon, N. Kodama, F. Rappaport, R. Subramanyam, C. de Vitry, Y. Takahashi, F.-A. Wollman, Functional accumulation of antenna proteins in chlorophyll *b*-less mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Mol. Plant* 10 (2017) 115–130.
- [31] H. Takahashi, A. Okamuro, J. Minagawa, Y. Takahashi, Biochemical characterization of photosystem I-associated light-harvesting complexes I and II isolated from state 2 cells of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell Physiol.* 55 (2014) 1437–1449.
- [32] I. Sugimoto, Y. Takahashi, Evidence that the PsbK polypeptide is associated with the photosystem II core antenna complex CP43, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 45004–45010.
- [33] X. Johnson, G. Vandystadt, S. Bujaldon, F.-A. Wollman, R. Dubois, P. Roussel, J. Alric, D. Béal, A new setup for in vivo fluorescence imaging of photosynthetic activity, *Photosynth. Res.* 102 (2009) 85–93.
- [34] K. Wong, T.M. Keane, J. Stalker, D.J. Adams, Enhanced structural variant and breakpoint detection using SVMerge by integration of multiple detection methods and local assembly, *Genome Biol.* 11 (2010) R128.
- [35] J. Qi, F. Zhao, inGAP-sv: a novel scheme to identify and visualize structural variation from paired end mapping data, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) W567–W575.
- [36] H. Thorvaldsdóttir, J.T. Robinson, J.P. Mesirov, Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration, *Brief. Bioinform.* 14 (2012) 178–192.
- [37] K. Schneeberger, S. Ossowski, C. Lanz, T. Juul, A.H. Petersen, K.L. Nielsen, J.-E. Jørgensen, D. Weigel, S.U. Andersen, SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing, *Nat. Methods* 6 (2009) 550.
- [38] D. Béal, F. Rappaport, P. Joliot, A new high-sensitivity 10-ns time-resolution spectrophotometric technique adapted to in vivo analysis of the photosynthetic apparatus, *Rev. Sci. Instrum.* 70 (1999) 202–207.
- [39] C.H. Gross, L.P. Ranum, P.A. Lefebvre, Extensive restriction fragment length polymorphisms in a new isolate of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Curr. Genet.* 13 (1988) 503–508.
- [40] F.-A. Wollman, J. Olive, P. Bennoun, M. Recouvreur, Organization of the photosystem II centers and their associated antennae in the thylakoid membranes: a comparative ultrastructural, biochemical, and biophysical study of *Chlamydomonas* wild type and mutants lacking in photosystem II reaction centers, *J. Cell Biol.* 87 (1980) 728–735.
- [41] S. Schmidt, R. Reich, H.T. Witt, Electrochromism of chlorophylls and carotenoids in multilayers and in chloroplasts, *Naturwissenschaften* 58 (1971) 414.
- [42] H.T. Witt, Energy conversion in the functional membrane of photosynthesis. Analysis by light pulse and electric pulse methods, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Bioenerg.* 505 (1979) 355–427.
- [43] P. Delepelaire, F.-A. Wollman, Correlations between fluorescence and phosphorylation changes in thylakoid membranes of *Chlamydomonas reinhardtii* in vivo: a kinetic analysis, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 809 (1985) 277–283.
- [44] F.-A. Wollman, P. Delepelaire, Correlation between changes in light energy distribution and changes in thylakoid membrane polypeptide phosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Cell Biol.* 98 (1984) 1–7.
- [45] F.-A. Wollman, P. Bennoun, A new chlorophyll-protein complex related to photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 680 (1982) 352–360.
- [46] X. Su, J. Ma, X. Wei, P. Cao, D. Zhu, W. Chang, Z. Liu, X. Zhang, M. Li, Structure and assembly mechanism of plant C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub>-type PSII-LHCII supercomplex, *Science* 357 (2017) 815–820.
- [47] B. Drop, M. Webber-Birungi, S.K.N. Yadav, A. Filipowicz-Szymanska, F. Fusetti, E.J. Boekema, R. Croce, Light-harvesting complex II (LHCII) and its supramolecular organization in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1837 (2014) 63–72.
- [48] S.V. Bergner, M. Scholz, K. Trompelt, J. Barth, P. Gäbelein, J. Steinbeck, H. Xue, S. Clowez, G. Fucile, M. Goldschmidt-Clermont, C. Fufezan, M. Hippler, STATE TRANSITION7-dependent phosphorylation is modulated by changing environmental conditions, and its absence triggers remodeling of photosynthetic protein complexes, *Plant Physiol.* 168 (2015) 615–634.
- [49] F.-A. Wollman, C. Lemaire, Phosphorylation processes interacting in vivo in the thylakoid membranes from *C. reinhardtii*, in: D. Hall, G. Grassi (Eds.), *Photocatalytic Production of Energy Rich Compounds*, Elsevier, Amsterdam, 1988, pp. 210–214.
- [50] J. DeLille, E.C. Peterson, T. Johnson, M. Moore, A. Kight, R. Henry, A novel precursor recognition element facilitates posttranslational binding to the signal recognition particle in chloroplasts, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000) 1926–1931.
- [51] C.J. Tu, E.C. Peterson, R. Henry, N.E. Hoffman, The L18 domain of light-harvesting chlorophyll proteins binds to chloroplast signal recognition particle 43, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 13187–13190.
- [52] K.F. Stengel, I. Holdermann, P. Cain, C. Robinson, K. Wild, I. Sinning, Structural basis for specific substrate recognition by the chloroplast signal recognition particle protein cpSRP43, *Science* 321 (2008) 253–256.
- [53] T. Barros, W. Kühlbrandt, Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting Complex II, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1787 (2009) 753–772.
- [54] F. Ossenbühl, V. Göhre, J. Meurer, A. Krieger-Liszka, J.-D. Rochaix, L.A. Eichacker, Efficient assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* requires Alb3.1p, a homolog of Arabidopsis ALBINO3, *Plant Cell* 16 (2004) 1790–1800.



Supplementary material



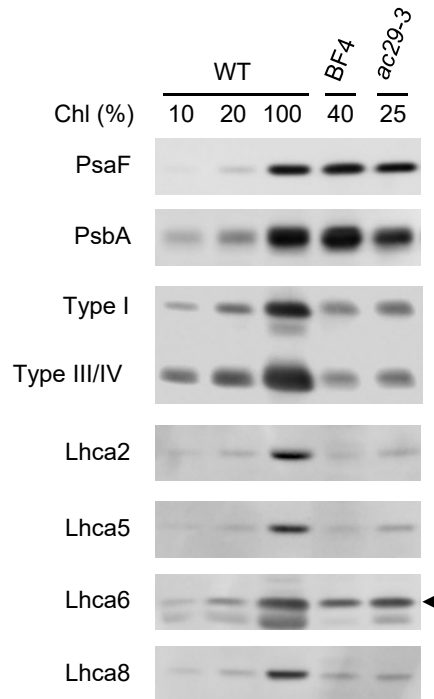
**Supplementary Figure 1:** Fluorescence ( $F_M$ ) image (A) and PCR mating type test (B) of 2 typical tetrads from a cross between WTS24, mt- and BF4, mt+. Note that the BF4 progeny which are blue spots in (A) are mt+ in (B).



**Supplementary Figure 2:**

(A) Genomic sequence of the *Alb3.1* gene in WT and BF4

(B) The *SRP43* coding sequence (CDS) in WT and *p71*



**Supplementary Figure 3: Comparative analysis of antenna protein content in BF4 and ac29-3 mutants.**

WT (wild type), BF4, and ac29-3 cells were grown in TAP medium and cells were suspended in buffer (50 mM Tris HCl pH 8.0, 20% (w/v) glycerol, 1 mM EDTA-NaOH pH 8.0). Cells were solubilized with 2% (w/v) SDS and 0.1 M DTT at 100°C for 1 min. Cell proteins were separated by SDS-PAGE on a PSI basis, electroblotted onto a nitrocellulose filter, probed with specific antibodies, and visualized by enhanced chemiluminescence. The arrowheads indicate the signals representing the actual proteins. The filter was hybridized with antibodies against PsaF, PsbA, LHCII Type I, III, and IV, Lhca2, Lhca5, Lhca6, and Lhca8. Relative loaded amount of chlorophylls (%) are indicated on the top of blots.

*Chlamydomonas reinhardtii* - L18\_domain

<b>L18</b>		<b>V</b> DPLYPGGS- <b>FDPLGL</b> LADD	18
Lhca1		GGVV <b>Y</b> PGGA- <b>FDPLG</b> FAKD	18
Lhca2		GETGFLSFAP <b>FDPM</b> GMKSE	19
Lhca3		GDAAY <b>Y</b> GGP- <b>FN</b> LFNLGK	18
Lhca4		NE <b>Y</b> PGGI- <b>FD</b> FGWSKG	18
Lhca5		PEM <b>Y</b> PGGI- <b>FD</b> FGFSKG	18
Lhca6		HEV <b>Y</b> PGGV- <b>F</b> APFIPGDL	18
Lhca7		LENG <b>Y</b> GGRF <b>FDPM</b> GLSRG	19
Lhca8		SEL <b>Y</b> GGP- <b>FDPLGL</b> SKE	18
<b>Lhca9</b>		<b>G</b> TSGFINS <b>F</b> <b>FD</b> PAGMNSP	19
Lhcb4	CP29	EKR <b>C</b> YPGGV- <b>FDPL</b> KLASE	18
Lhcb5	CP26	LD <b>P</b> LYPGGP- <b>FDPLGL</b> LADD	18
LhcbM3	Type I	LD <b>P</b> LYPGES- <b>FDPLGL</b> LADD	18
LhcbM4	Type I	LD <b>P</b> LYPGES- <b>FDPLGL</b> LADD	18
LhcbM6	Type I	LD <b>P</b> LYPGES- <b>FDPLGL</b> LADD	18
LhcbM8	Type I	LD <b>P</b> LYPGES- <b>FDPLGL</b> LADD	18
LhcbM9	Type I	LD <b>P</b> LYPGES- <b>FDPLGL</b> LADD	18
LhcbM5	Type II	LD <b>K</b> LHPGGQ <b>F</b> <b>FDPLGL</b> AED	19
LhcbM2	Type III	LD <b>P</b> LHPGGA- <b>FDPLGL</b> LADD	18
LhcbM7	Type III	LD <b>P</b> LHPGGA- <b>FDPLGL</b> LADD	18
LhcbM1	Type IV	LD <b>K</b> LYPGGS- <b>FDPLGL</b> LADD	18
LhcSR1		K <b>D</b> D <b>Y</b> EP <b>G</b> DL <b>G</b> <b>FDPLGL</b> KPT	19
<b>LhcSR3</b>		<b>K</b> <b>D</b> D <b>Y</b> EP <b>G</b> DL <b>G</b> <b>FDPLGL</b> KPT	19

**Supplementary Figure 4:** Sequence alignment of L18 domain between LHCP proteins from *Chlamydomonas reinhardtii*. Conserved L18 domain is highlighted in blue and the DPLG motif in red.



### 1.3. Résumé de l'article 1

Nous avons caractérisé et identifié le gène muté dans deux mutants vert pâle, BF4 et *p71*, qui ont été utilisés au fil des ans dans de nombreuses études de l'organisation des membranes des thylakoïdes et également des processus photosynthétiques.

Ces 2 mutants accumulent des chlorophylles à seulement 15-20% du niveau du type sauvage avec un rapport Chl *a*/Chl *b* beaucoup plus élevé, ce qui suggérait un défaut dans leurs complexes antennaires. Nous avons identifié les gènes concernés par séquençage : *p71* présente une insertion d'un transposon dans le gène *cpSRP43* (Cre04.g231026) et BF4, une mutation ponctuelle dans *ALB3.1* (Cre06.g251900). Ces deux gènes nucléaires sont impliqués dans la voie d'importation des LHC dans le chloroplaste, l'un dans la voie SRP qui semblerait être restreint aux LHC et l'autre dans la translocation membranaire qui n'est, quant à elle, pas spécifique aux LHC mais aussi aux photosystèmes (Bellafiore et al, 2002; Ossenbühl et al, 2004). Afin de s'assurer que c'était bien ces gènes mutés qui étaient responsables de ce phénotype, j'ai complémenté ces mutants par une version sauvage des gènes impliqués soit leur séquence génomique dans le cas de BF4 (amplifiée par PCR), soit en utilisant la séquence codante pour *p71*. Les mutants ainsi complémentés ont restauré le phénotype sauvage. Des mutants alléliques (*tlc3-srp43* et *ac29.3-alb3.1*) déjà caractérisés (Bellafiore et al, 2002; Kirst et al, 2012a) ont été associés à cette étude.

Ces mutants restent cependant photosynthétiques ce qui suggère que malgré un défaut dans l'insertion dans le thylakoïde des protéines de la photosynthèse, celles-ci sont présentes, et pour ce qui concerne les protéines antennes, elles sont en faible proportion et sont assemblées dans le chloroplaste. Une analyse biochimique de l'accumulation des différentes protéines-antennes (LHCA et LHCB) a effectivement révélée que ces mutants présentaient des niveaux de protéines LHCI et LHCII sévèrement réduits (environ 25% par rapport au sauvage) avec cependant une hétérogénéité dans leur accumulation : résistance de l'oligomère LHCA5-6 et la quasi absence de LHCA4, CP29 (LHCB4) et CP26 (LHCB5). Ces résultats expliquent aussi l'augmentation du rapport Chl *a*/Chl *b* observée dans les mutants (les protéines LHC sont porteurs à la fois des Chl *a* et Chl *b* tandis que les centres réactionnels et leur cœur d'antenne ne lient que des Chl *a*). De plus, l'étude de l'organisation supramoléculaire de ces complexes photosynthétiques n'a pas permis de mettre en évidence la formation d'un supercomplexe LHCII-PSII, certainement dû à l'absence des protéines CP29 et CP26 – protéines qui contrôlent l'interaction entre les LHCII et le PSII (Cazzaniga et al, 2020; Drop et al, 2014).

Nous avons ensuite étudié plus en détail les changements fonctionnels de la photosynthèse résultant de la modification de la voie principale de biogénèse des LHCP chez ces mutants. Des mesures de spectroscopie d'absorption et de fluorescence ont montré que les deux photosystèmes ont une taille d'antenne réduite chez ces mutants, celle du PSII étant la plus affectée (une réduction de 87% par rapport au sauvage). Ces mesures spectroscopiques ont aussi mis en évidence un rapport PSII/PSI qui était différent entre les mutants, BF4 présentait une légère déficience en centres PSII, attribuable à la mutation de *ALB3.1* qui interviendrait aussi dans la biogénèse du PSII (Bellafiore et al, 2002). Au vu de ces résultats, nous avons analysé certains des mécanismes de photoprotection qui impliquent une réorganisation de ces LHCP :

*i) les transitions d'état* : ce mécanisme fait intervenir le transfert réversible d'une fraction de l'antenne du PSII au PSI qui se traduit par une diminution de l'émission de fluorescence. Lors d'une transition de l'état 1 à l'état 2, une partie des LHCII sont phosphorylées puis migrent vers le PSI. Nous n'avons pas observé de transitions d'état chez les mutants alors qu'une partie de leurs LHCII était phosphorylée à l'état 2.

Il semblerait que la phosphorylation de l'ensemble des LHCP impliquées dans ce mécanisme, mais aussi dans des quantités suffisantes, soit requise pour observer la transition d'état ou bien que les LHCII présents chez ces mutants sont directement associées au PSI. En effet, plusieurs de nos observations sont compatibles avec cette hypothèse : une taille d'antenne du PSII plus réduite que celle du PSI, et une absence de supercomplexes LHCII-PSII. Afin de renforcer cette hypothèse, il serait intéressant de comparer le niveau de phosphorylation des LHCP dans ces mutants lorsqu'ils sont placés dans les conditions favorisant l'état 1 (où normalement l'ensemble des LHCII sont liés au PSII et non phosphorylés), face à des conditions de l'état 2 ;

*ii) l'expression des protéines LHCSR* : ces protéines sont impliquées dans le *quenching* énergétique en interagissant directement avec le supercomplexe LHCII-PSII. Leur induction, et en particulier celle de LHCSR3, s'effectue par un traitement forte lumière de quelques heures. Dans les mutants, malgré l'absence du supercomplexe LHCII-PSII, les protéines LHCSR sont exprimées, à un niveau très réduit mais équivalent à celui de leurs LHCP en comparaison avec le sauvage.

De nombreuses études ont montré que LHCSR3 a un rôle de quencher du centre PSII en interagissant avec le supercomplexe LHCII-PSII (voir *Chapitre 3*), qui est absent dans les mutants. Néanmoins, il a été récemment démontré que ce quencher était aussi capable

d'interagir avec les LHCI<sub>II</sub> liés au PSI (Girolomoni et al, 2019). Par conséquent, dans ces mutants, il est possible que la protéine LHCSR3, qui est exprimée en réponse à des conditions de stress, puisse interagir soit directement avec centre réactionnel PSII, soit avec les LHCI<sub>II</sub> présents qui, selon l'hypothèse précédente, sont liés au PSI, assurant ainsi la protection du PSI en cas d'exposition intense à la lumière

#### **1.4. Conclusion**

Ces observations ont montré que cpSRP43 et ALB3.1 sont des acteurs importants dans la biogénèse des protéines des antennes photosynthétiques. Cependant ces mutants ont encore 25% des LHCP assemblées dans le chloroplaste, ce qui indique que la biogénèse des LHC n'est pas complètement bloquée et, à ce stade, on peut s'interroger sur l'existence d'une voie alternative à la voie SRP (voir la discussion au *paragraphe 3*).

Connaissant ainsi les rôles majeurs de ces deux protéines dans la biogénèse des antennes photosynthétiques et donc dans le processus de photosynthèse, il serait intéressant de connaître plus en détail les interactions avec d'autres acteurs impliqués dans ces mécanismes. L'objectif serait de déterminer les mécanismes moléculaires spécifiques dans lesquels ces protéines sont impliquées.





## 2. Intégration et assemblage des LHC dans les membranes des thylakoïdes

### 2.1. Préface

L'intégration et le processus d'assemblage des protéines LHC ont également été étudiés au niveau moléculaire. Pour comprendre le mécanisme moléculaire par lequel ALB3.1 interviendrait dans l'assemblage des LHC, le mutant BF4-*alb3.1* précédemment caractérisé, a été complémenté avec l'ADNc de *ALB3.1* afin d'exprimer la protéine ALB3.1 sous sa version sauvage ou bien fusionnée à une ou trois étiquettes (*tags*) de l'hémagglutinine de la grippe humaine (HA) à son extrémité C-terminale. Cette fusion HA vise à permettre de déterminer des interactions entre ALB3.1 avec d'autres acteurs impliqués dans l'insertion des protéines membranaires du thylakoïde.

### 2.2. Article 2

« Assembly Apparatus of Light-Harvesting Complexes; Identification of Alb3.1-cpSRP-LHCP Complexes in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. »



# Assembly Apparatus of Light-Harvesting Complexes: Identification of Alb3.1–cpSRP–LHCP Complexes in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Mithun Kumar Rathod<sup>1,†</sup>, Sreedhar Nellaepalli<sup>2,†</sup>, Shin-Ichiro Ozawa<sup>3</sup>, Hiroshi Kuroda<sup>2</sup>, Natsumi Kodama<sup>2</sup>, Sandrine Bujaldon<sup>4</sup>, Francis-André Wollman<sup>4</sup> and Yuichiro Takahashi<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Okayama, 700-8530 Japan

<sup>2</sup>Research Institute for Interdisciplinary Science, Okayama University, Okayama, 700-8530 Japan

<sup>3</sup>Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, Kurashiki, 710-0046 Japan

<sup>4</sup>Institut de Biologie Physico-Chimique, UMR7141 CNRS-Sorbonne Université, Paris 75005, France

<sup>†</sup>Equal contribution.

\*Corresponding author: E-mail, [taka@cc.okayama-u.ac.jp](mailto:taka@cc.okayama-u.ac.jp)

(Received 19 June 2021; Accepted 30 September 2021)

The unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, contains many light-harvesting complexes (LHCs) associating chlorophylls *a/b* and carotenoids; the major LHCII (types I, II, III and IV) and minor light-harvesting complexes, CP26 and CP29, for photosystem II, as well as nine LHCI (LHCA1–9), for photosystem I. A pale green mutant BF4 exhibited impaired accumulation of LHCs due to deficiency in the *Alb3.1* gene, which encodes the insertase involved in insertion, folding and assembly of LHC proteins in the thylakoid membranes. To elucidate the molecular mechanism by which ALB3.1 assists LHC assembly, we complemented BF4 to express ALB3.1 fused with no, single or triple Human influenza hemagglutinin (HA) tag at its C-terminus (cAlb3.1, cAlb3.1-HA or cAlb3.1-3HA). The resulting complemented strains accumulated most LHC proteins comparable to wild-type (WT) levels. The affinity purification of Alb3.1-HA and Alb3.1-3HA preparations showed that ALB3.1 interacts with cpSRP43 and cpSRP54 proteins of the chloroplast signal recognition particle (cpSRP) and several LHC proteins; two major LHCII proteins (types I and III), two minor LHCII proteins (CP26 and CP29) and eight LHCI proteins (LHCA1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 and 9). Pulse-chase labeling experiments revealed that the newly synthesized major LHCII proteins were transiently bound to the Alb3.1 complex. We propose that Alb3.1 interacts with cpSRP43 and cpSRP54 to form an assembly apparatus for most LHCs in the thylakoid membranes. Interestingly, photosystem I (PSI) proteins were also detected in the Alb3.1 preparations, suggesting that the integration of LHCI to a PSI core complex to form a PSI–LHCI subcomplex occurs before assembled LHCI dissociate from the Alb3.1–cpSRP complex.

**Keywords:** Affinity purification • ALB3.1 • *Chlamydomonas reinhardtii* • Light-harvesting complex • Photosystem • Thylakoid membranes

## Introduction

Capture of light energy by photosynthetic pigments is the initial step of photosynthesis reactions. In plants and green algae, there are two types of light-harvesting apparatus: core and peripheral antenna complexes. The core antenna complexes associate with photosystem I (PSI) and photosystem II (PSII) core complexes that are mainly composed of intrinsic proteins encoded by chloroplast genes. The peripheral antenna complexes consist of light-harvesting chlorophyll-binding proteins (LHCPs), which bind chlorophyll *a* (Chl *a*), chlorophyll *b* (Chl *b*) and carotenoid molecules. The LHCPs are encoded by two multi-genic gene families in the nucleus and form light-harvesting complexes (LHCs) in the thylakoid membranes. The *lhca* genes encode LHCI proteins that associate with the PSI core complex to form a PSI–LHCI supercomplex (Ben-Shem et al. 2003, Ozawa et al. 2018), whereas the *lhcb* genes code for LHCII proteins that mainly bind to the PSII core complex to form a PSII–LHCII supercomplex (Sheng et al. 2021). Excitation energy trapped by LHCs is transferred to the core antenna complexes and is finally used for photochemical reactions in PSI and PSII reaction centers (RCs).

LHCPs are integral proteins with three transmembrane helices (TM1–3) and are the most abundant proteins in the thylakoid membranes. LHCPs are translated in the cytosol as precursor proteins with an N-terminal chloroplast transit peptide (TP) and are translocated to and integrated into the thylakoid membranes (Richter et al. 2010, Dall'Osto et al. 2015, Ziehe et al. 2017, 2018). The TP is used to direct the precursor proteins into the chloroplast by translocating across the envelope membranes via the translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts (TOC) and translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts (TIC) complexes translocon. Upon translocation, the TP is cleaved off by a stromal processing peptidase and the resulting mature proteins form a transit complex

with the chloroplast signal recognition particle (cpSRP). The translocation of LHCPs from the TIC/TOC translocon to cpSRP is mediated by the LHCP translocation defect (LTD) protein (Ouyang *et al.* 2011, Jeong *et al.* 2018). The formation of the cpSRP–LHCP complex allows the hydrophobic LHCPs to remain soluble in the stroma and prevents their aggregation.

In vascular plants, the cpSRP consists of a heterodimer of cpSRP43 and cpSRP54. The cpSRP54 is an ortholog of the cytosolic and prokaryotic SRP54 (Dunschede *et al.* 2015). Although SRP54 contains a conserved RNA, cpSRP54 lacks the RNA and instead recruited cpSRP43 (Ziehe *et al.* 2017). In vitro assay using synthetic peptides suggested that cpSRP43 binds LHCPs through the L18 region located between the two TM helices, TM2 and TM3, of LHCPs, whereas no significant interaction between cpSRP54 and LHCPs is observed (DeLille *et al.* 2000, Tu *et al.* 2000, Stengel *et al.* 2008). In Arabidopsis, cpSRP43 is sufficient for forming a soluble cpSRP43–LHCP complex in the stroma (Tu *et al.* 2000, Dunschede *et al.* 2015), while the integration of LHCPs into the thylakoid membranes requires cpSRP54, cpFtsY, Alb3 and guanosine triphosphate (GTP).

The cpSRP–LHCP complexes are directed to the thylakoid membranes via the cpSRP receptor cpFtsY peripherally bound to the thylakoid membranes. Both cpFtsY and cpSRP54 contains a GTP binding and hydrolysis domain (Ziehe *et al.* 2018). Finally, the LHCPs are inserted into the thylakoid membranes by Albino 3 (Alb3) (Sundberg *et al.* 1997). Alb3 is a chloroplast homolog of the mitochondrial Oxa1p and *Escherichia coli* YidC, which are essential for integrating membrane proteins in membranes. Alb3 has five putative TM helices and is present in the thylakoid membranes.

The green algae also contain LTD, cpSRP43, cpSRP54, CpFtsY and Alb3 (Ziehe *et al.* 2017). The green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is an excellent model organism for studying the assembly of the LHCs because all the *lhc* genes and LHCPs have been identified and a variety of LHC-deficient mutants is available. In particular, mutants deficient in LTD (Jeong *et al.* 2018), cpSRP43 (Kirst *et al.* 2012b, Bujaldon *et al.* 2020), cpSRP54 (Jeong *et al.* 2017) and cpFtsY (Kirst *et al.* 2012a) have been isolated and characterized. These mutants, except for the cpSRP54 mutant, are pale green and contain significantly reduced levels of LHCPs. The cpSRP54 mutant shows a milder pale green phenotype and accumulates more LHCPs than the other mutants, suggesting that the cpSRP54 is less important for the assembly of LHCs (Jeong *et al.* 2017). *C. reinhardtii* contains two Alb3 proteins, Alb3.1 and Alb3.2. Alb3.1 is required for the accumulation of LHCPs (Bellafore *et al.* 2002, Bujaldon *et al.* 2020), whereas Alb3.2 appears to have a wider role than Alb3.1 and is also required for the accumulation of PSI and PSII complexes and is essential for cell survival (Gohre *et al.* 2006). Alb3.1 and Alb3.2 are located in the thylakoid membranes and are associated with a large complex. In addition, coimmunoprecipitation experiments suggested that these two proteins interact directly or indirectly with each other (Gohre *et al.* 2006).

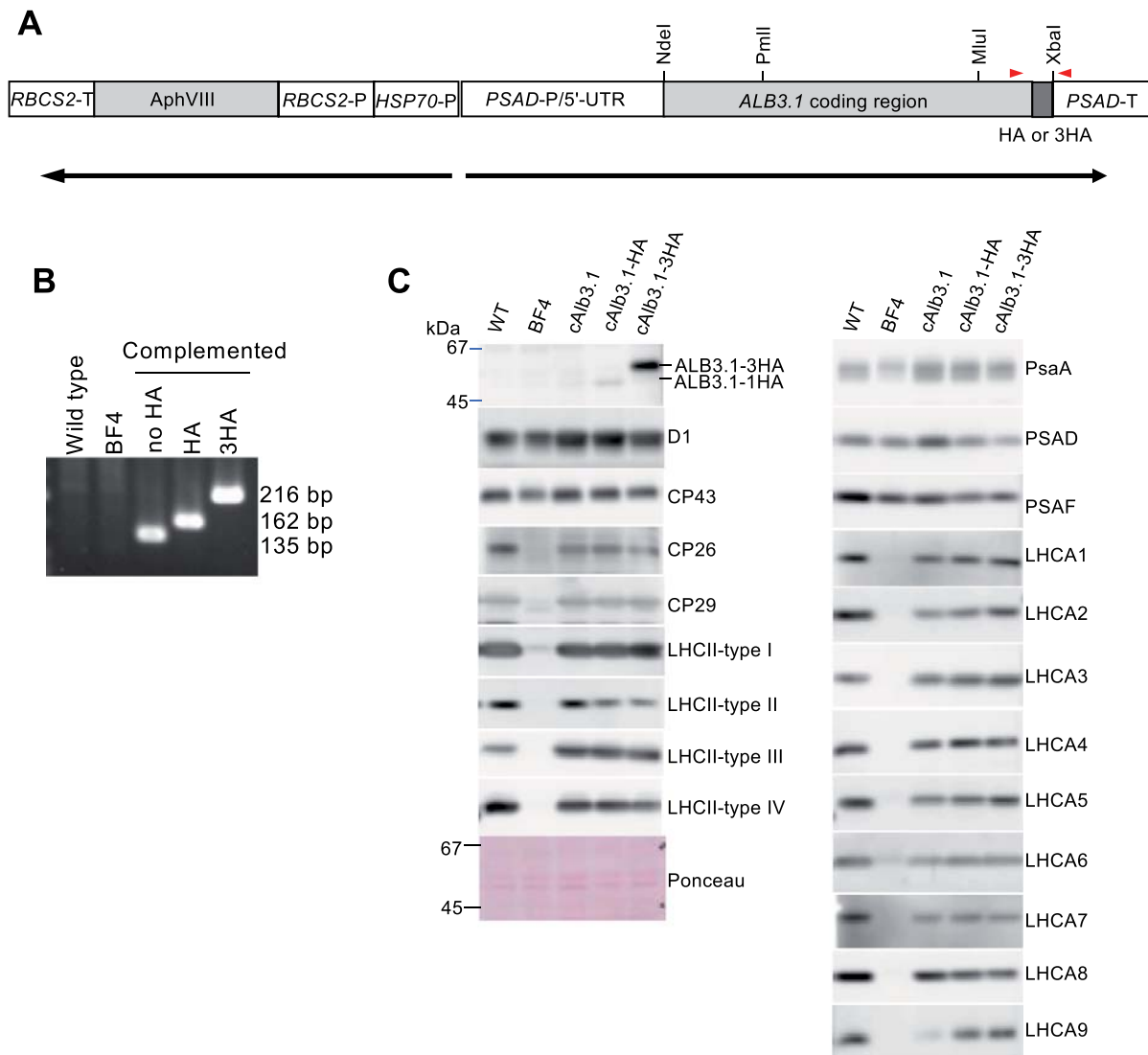
In a previous study, we reported that the pale green mutant BF4 is defective in the *ALB3.1* gene and accumulates the LHCPs

at <25% of WT levels and concluded that Alb3.1 is essential for proper LHCP assembly in the thylakoid membranes (Bujaldon *et al.* 2020). In the present study, we complemented BF4 with vectors that express Alb3.1, Alb3.1-HA (Alb3.1 fused with a single HA tag at the C-terminus) or Alb3.1–3HA (Alb3.1 fused with a triple HA tag at the C-terminus) and confirmed that these complemented strains accumulate LHCPs at nearly WT levels. To further elucidate how Alb3.1 assists the assembly of LHCs in the thylakoid membranes, we purified Alb3.1-HA and Alb3.1–3HA from the thylakoid membrane extracts by affinity spin column to identify interacting proteins. The purification and characterization of HA-tag fused Alb3.1 reveal an intimate interaction of cpSRP43, cpSRP54 and many LHCI and LHCII proteins with Alb3.1. We conclude that LHCs are assembled in the thylakoid membranes by the formation of a transient assembly apparatus of Alb3.1–cpSRP–LHCP complexes. We also suggest that the Alb3.1–cpSRP–LHCP complexes transiently associate an assembly intermediate of the PSI–LHCI supercomplex.

## Results

### Complementation of BF4 with Alb3.1 cDNA

The pale green BF4 mutant cells grow photoautotrophically but accumulate light-harvesting chlorophyll-binding proteins (LHCPs) at about 20% of the WT level (Bujaldon *et al.* 2020). This mutant is defective in the insertase Alb3.1. To address the molecular mechanism by which LHCs are assembled in the thylakoid membranes, we complemented the BF4 mutant with three different complementation vectors to express Alb3.1, Alb3.1-HA or Alb3.1–3HA from the *ALB3.1* cDNA driven by the *PSAD* promoter/terminator (Fig. 1A). After the introduction of one of these vectors into BF4 cells by electroporation as described in the 'Materials and Methods' section, putative transformants were selected on agar plates containing paromomycin as shown in Supplementary Figure. When transformed with the vector expressing Alb3.1–3HA, the color of the cells on agar plates is variable as shown in Supplementary Figure; some are as green as WT, some are pale green like BF4 and the others are intermediates. The clones as green as the WT were selected for further analysis. The total cellular DNA was isolated and used as a template to amplify the insertion of the transforming vector, and the resulting DNA fragments were analyzed by agarose gel electrophoresis (Fig. 1B). No band is detected in WT and BF4 as expected, whereas DNA fragments of 135 bp, 162 bp and 216 bp are amplified in the three complemented strains, cAlb3.1, cAlb3.1-HA and cAlb3.1–3HA, respectively, indicating that the introduction of the complementation vectors to the nuclear genome is successful. Since antibody against Alb3.1 is not available, Alb3.1-HA and Alb3.1–3HA were detected using anti-HA antibody. A weak signal of Alb3.1-HA is detected around 50 kDa in Alb3.1-HA cells, while a strong signal of a slightly larger size is detected in Alb3.1–3HA cells (Fig. 1C). The strong signal of Alb3.1–3HA may be ascribed to the fact that the anti-HA antibody reacted more



**Fig. 1** Complementation of BF4 cells. (A) Physical map of the transformation vector. ALB3.1 coding region amplified from the cDNA library is under the control of the promoter/*5'*-UTR and terminator of *Chlamydomonas* PSAD (PSAD-P/*5'*-UTR and PSAD-T, respectively). Coding regions of a single HA or a triple HA tag is inserted at the coding region of the C-terminus of ALB3.1. The vector carries a selectable paromomycin resistance gene (AphVIII) under the control of the HSP70 promoter (HSP70-P), RBCS2 promoter (RBCS2-P) and RBCS2 terminator (RBCS2-T). Restriction sites (*NdeI*, *PmlI*, *MluI* and *XbaI*) used for plasmid construction are also shown. Arrows indicate the orientation of the genes. Red arrowheads represent primers used for PCR. (B) Confirmation of the insertion of the HA tag coding region in the complemented strains by the chimeric ALB3.1 transgene without HA (no HA) or with a single or a triple HA (HA and 3-HA). WT and BF4 strains, which lack the chimeric ALB3.1 transgene, were used as negative controls. PCR was carried out as described in the 'Materials and Methods' section. Estimated sizes of the PCR products are shown. (C) Accumulation of PSI, LHCI and LHCII proteins in WT, BF4 and complemented BF4 (cAlb3.1, cAlb3.1-HA and cAlb3.1-3HA) cells. Total cell proteins (0.5  $\mu$ g Chl but 0.1  $\mu$ g Chl for BF4) were solubilized with 2% (w/v) SDS and 0.1 M DTT at 100°C for 1 min and protein extracts were separated by SDS-PAGE, electroblotted onto a nitrocellulose filter, probed with specific antibodies against HA tag, PSII proteins (D1 and CP43), LHCII proteins (CP26, CP29 and LHCII-types I–IV), PSI proteins (PsaA, PSAD and PSAF) and LHCI proteins (LHCA1–9).

intensively with the triple HA tag than with the single HA tag of Alb3.1-HA. Although the BF4 cells accumulate LHCI and LHCII proteins at significantly reduced levels, as reported previously (Bujaldon et al. 2020), the three complemented strains have restored the accumulation of LHCI and LHCII proteins;

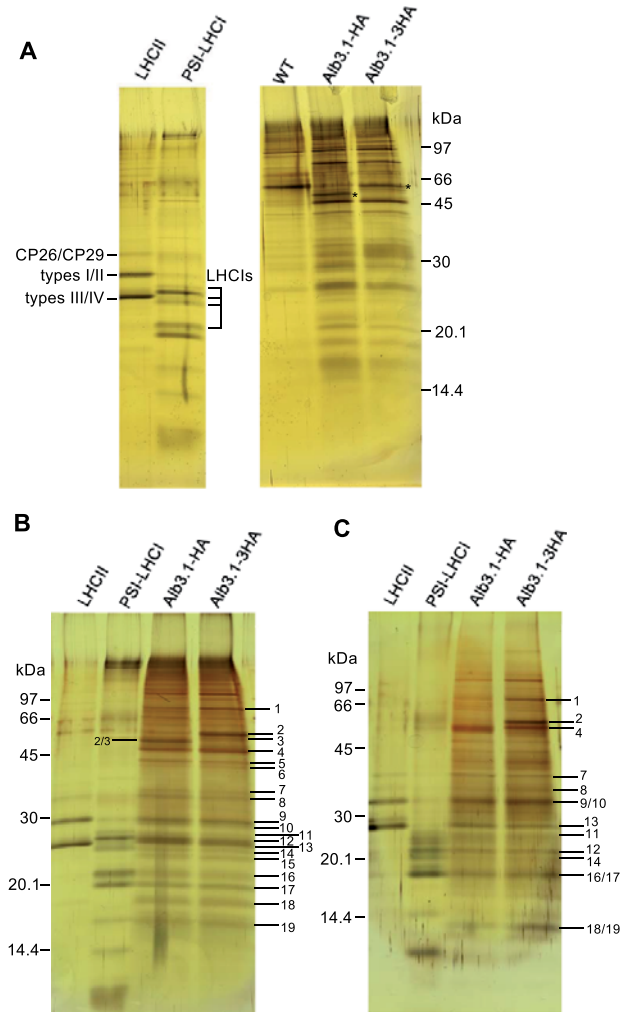
LHCI proteins accumulate to substantial levels but to slightly decreased levels compared with those in WT cells, while LHCII proteins to nearly WT levels (Fig. 1C). The similar amount of LHCI and LHCII proteins in the three complemented strains indicates that the fusion of the single or triple HA tag at the

C-terminus of Alb3.1 does not significantly affect its ability to contribute to the membrane insertion and accumulation of LHC proteins.

### Alb3.1 associates with cpSRP43 and cpSRP54

To identify proteins interacting with Alb3.1, HA-tagged Alb3.1 was used as bait, and proteins interacting with Alb3.1 were isolated by affinity spin columns. Since Alb3.1 is localized in the thylakoid membranes, we isolated the thylakoid membranes from cAlb3.1-HA and cAlb3.1-3HA strains, solubilized them with *n*-dodecyl- $\alpha$ -D-maltoside ( $\alpha$ -DDM), and applied the resulting extracts to affinity spin columns. As a negative control, the thylakoid extracts from WT cells were used. The purified preparations were incubated with sodium dodecyl sulfate (SDS) and dithiothreitol, and the solubilized polypeptides were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and stained with silver (Fig. 2A). The preparation from WT as a negative control shows several polypeptides in a high-molecular region (>60 kDa), which are non-specific contaminations. The strong band below the 66 kDa marker protein was identified as AtpA (the  $\alpha$ -subunit of chloroplast ATP synthase) by mass spectrometry analysis, the intensity of which differs from preparation to preparation. A more complex and quite similar polypeptide pattern was observed in the Alb3.1-HA and Alb3.1-3HA preparations. The most significant difference between the two Alb3.1 preparations was found in the 45–66 kDa region (marked with asterisks in Fig. 2A). To further characterize the Alb3.1 preparations, we performed large-scale purifications and separated their polypeptides by two different SDS-PAGE systems, a Tris–HCl resolving gel buffer system (Laemmli 1970) (Fig. 2B) and a urea–2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) Tris resolving gel buffer system (Kashino *et al.* 2001), which better separates LHCI polypeptides from LHCII polypeptides (Fig. 2C). The polypeptides of these preparations were also compared with the polypeptides of LHCII and PSI–LHCI preparations from WT cells, shown on the left side of Fig. 2A. The comparison of the polypeptides from LHCII and PSI–LHCI complexes with those from the Alb3.1 preparations suggests that the Alb3.1 preparations contain several LHCI and LHCII polypeptides.

Next, the separated polypeptides (bands 1–19) were digested with trypsin and were subjected to liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for sequence identification of their peptide profile. The band 2/3 in the Alb3.1-HA preparation and the band 2 in the Alb3.1-3HA preparation in Fig. 2B, which correspond to the bands marked by asterisk in Fig. 2A, contain Alb3.1-HA and Alb3.1-3HA, respectively, as well as AtpA (Table 1). The relative migration of the two Alb3.1 bands well corresponds to signals detected with anti-HA antibody as shown in Fig. 1C. The difference in size is ascribed to the number of HA tag fused at the C-terminus of Alb3.1. The band 3 of the Alb3.1-3HA preparation and the band 2/3 of the Alb3.1-HA preparation contain cpSRP54 (Fig. 2B and Table 1). Band 4 detected in both Alb3.1-HA and Alb3.1-3HA



**Fig. 2** Polypeptide profiles of the affinity purified Alb3.1 preparation. (A) Comparison of the polypeptides of affinity-purified preparations from WT, Alb3.1-HA and Alb3.1-3HA. The thylakoid membranes were solubilized with 1%  $\alpha$ -DDM, and Alb3.1 preparations were purified by affinity spin column as described in the ‘Materials and Methods’ section. The samples were solubilized with 2% (w/v) SDS and 0.1 M DTT at 80°C for 1 min and protein extracts were separated by SDS-PAGE and the gels were stained with silver. For further characterization of the polypeptides of the Alb3.1 preparations, the polypeptides were separated by two SDS-PAGE systems; (B) Laemmli system and (C) urea–MES–Tris system. The polypeptides of the preparations were also compared with the polypeptides of LHCII and PSI–LHCI preparations from WT cells. The polypeptides marked by numbers were subjected to trypsin digestion, and the resulting digests were analyzed by LC–MS/MS. The assignments of these polypeptides are summarized in Table 1.

preparations is assigned to cpSRP43. To confirm that cpSRP54 and cpSRP43 are exclusively present in Alb3.1 preparations, we analyzed the presence of Alb3.1, cpSRP54 and cpSRP43 in the negative control lane. Six gel slices from the region between 45 and 66 kDa marker proteins were cut and analyzed with

**Table 1** Identification of polypeptides in the Alb3.1-HA and Alb3.1–3HA preparations. The polypeptides of the Alb3.1-HA and Alb3.1–3HA were separated by SDS-PAGE and stained with silver as shown in Fig. 2 (panels B and C). The polypeptides in the gel (bands 1–20) were excised and digested with trypsin, and the resulting polypeptides were applied to LC–MS/MS. Assigned peptide sequences, position of the identified peptides in the protein sequence (position), and the score for assigned polypeptide sequence (Xcorr) are shown. Bold M represents methionine sulfoxide (monooxidized methionine)

Band	Transcript gene ID accession ID	Protein name	Assigned peptide sequence	Position	Xcorr
1	Not identified				
2	Cre06.g251900.t1.2	Alb3.1	QQVESAMAVQALKPR KLGGANVVMNELGPVTKPGSGR LGGANVVMNELGPVTKPGSGR NGVAAGEWSVWKPATVLTAAEAAK ARAEAEAEVER	84–98 280–301 281–301 303–326 327–337	4.49 4.54 3.72 4.87 4
	Q96550	AtpA	GMALNLQADHVGVVVFGNDSLHQGDLVYR EVAFAQFGSDLDAAATQYVLER	124–153 462–483	4.65 3.24
3	Cre11.g479750.t1.2	cpSRP54	VLEGVTPDVQFIK TVSNELIDLMGGGTGAK TVSNELIDLMGGGTGAK SAVRPSDTLLVVDAMTQGEAANLVR SFNEAVDISGAILTK ANSLQLQELVASAGK	129–141 142–158 142–158 274–298 299–313 509–522	3.48 5.13 4.38 4.74 4.81 4.16
4	Cre04.g231026.t1.1	cpSRP43	WKDGS DSTWEVAADLSEDLVR SALHFAAALGSAECTR EGYTPLHMAAGYMHPTSM AVLLEAGANPEIK LYDEV EPGNVLNCR NVSADVLEDYLAGLEYAVAEVLDVVQVR	88–108 147–162 177–207 249–262 289–317	3.81 4.4 3.85 4.14 5.35
5	P10898	PsbC	VITNPTTNAAVIFGYLVK LGANVASAQGPTGLGK SPTGEIIFGGETMR AAEYMT HAPLGLSLNSVGGVATEINAVNFVSPR	186–203 312–327 332–345 380–411	5.27 4.25 3.65 3.74
6	Cre07.g346050.t1.2	CRD1 Magnesium- protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase, chloroplastic, Copper response defect 1 protein	FYTTDFDEMEQLFSK ASSPEVAEMFLLMSR ASSPEVAEMFLLMSR ALSDFNLALDLGFLTK FIYATFLSEK FYESLGLNTR LVELSASSSPLAGLQK EKDVGSVDIAGSGASR DVGSVDIAGSGASR VGNLYYQPYSPQK SNNTIYNASAAGK EGQTVQADQPLTNNPNVGGFGQAETEIVLQNP AR GWLGGQGGAAADLDK KLFPSGLYDR NGTGPAGYSPGIGK HVADPFGYNLLTVLGAEE R LAMVSVLGF AVQSYVTGEGPYANWTK GSVEAIVQATPDEVSSEN R LAPYSEVFLAR QAPASSGIEFYGNR YRELELIHAR AGA QIFSEGGLDYLGNPSLVHAQNIVATLAVQVILMGLVEGYR AGA QIFSEGGLDYLGNPSLVHAQNIVATLAVQVILMGLVEGYR	68–82 157–171 157–171 183–198 209–219 302–311 354–369 388–403 390–403 128–141 197–209 249–282 38–51 58–68 185–198 267–285 241–266 102–120 121–132 31–45 86–95 125–167 125–167	4.46 4.09 3.54 3.68 6.16 3.91 3.62 4.93 3.65 5.02 3.62 3.99 6.35 4.5 3.13 3.66 5.73 4.89 5.99 3.14 3.42 3.58 4.13 5.28
7	P23577	PetA			
8	Cre16.g673650.t1.1	LHCB5 (CP26)			
	Cre17.g720250.t1.2	LHCB4 (CP29)			
9	Cre04.g232104.t1.1	LHCBM3 (Type I)			
10	Not identified				
11	Cre10.g452050.t1.2	LHCA4	WYQAELMNR YQDFVKPGSANQDPIFTNNK	95–105 165–184	3.02 4.64

(continued)



**Table 1** (Continued)

Band	Transcript gene ID accession ID	Protein name	Assigned peptide sequence	Position	Xcorr
12	Cre11.g467573.t1.1	LHCA3	SKDQLYVVGASQSSLAYLDGSLPGDFGFDPLGLLDPVNSGGFIEPK	41–85	5.48
	Cre06.g278213.t1.1	LHCA6	EVESPLGPLLAVEFFLMHWVEVR	103–127	3.71
			KPGSVDDQDPIFSQYK	134–148	2.64
13	Cre12.g548400.t1.2	LHCBM2 (Type III)	YRELELIHAR	78–87	3.58
			AGAQIFAEGGLNYLGNENLIHAQSIATLAFQVVVMGLAEAYR	117–159	4.57
			AGAQIFAEGGLNYLGNENLIHAQSIATLAFQVVVMGLAEAYR	117–159	5.22
			ANGGPLGEGLDPLHPGGAFDPLGLADDPDTFAELK	160–194	4.7
			LAMFSMFGFFVQAIVTGK	203–220	4.76
			GPIQNLDHHLANPTAVNAFAYATK	221–244	3.91
			YATGAGPVDNLAHLK	211–226	3.14
			YEDNFDVNNLVVIAQDTDKK	106–126	3.62
14	Cre06.g272650.t1.2	LHCA8	QAYSGETQSEGGFAPNR	148–164	4.83
			VSAASLLDVSTTTDKK	165–180	4.18
			HQLIGATVGSNDK	202–214	3.68
15	Cre12.g550850.t1.2	PSBP1	FTSEVIHGR	74–83	3.73
			GDAGGVVYPGGAFDPLGFAK	146–165	3.89
16	Cre07.g344950.t1.2	LHCA9	TQPIEGLTAHLADPFGK	181–197	2.96
			NITYYLTHLPETLGSA.[-]	198–213	2.52
			LKQYEADSAPAVALK	91–105	5.05
17	Cre09.g412100.t1.2	PSAF	QYEADSAPAVALK	93–105	3.15
			GTLLEKEENITVSPR	213–227	4.27
			KAEVVESTSGGLDPR	101–115	3.09
18	Cre12.g558900.t1.2	PETO	SVALPGALALTIGGFVAASK	116–135	4.12
			DSNNYAGYEATLK	151–163	3.62
19	Not identified				
20	Not identified				

LC–MS/MS. This region of the gel may possibly contain Alb3.1, cpSRP54 and cpSRP43, but no peptides of Alb3.1, cpSRP54 and cpSRP43 were detected except for the peptides of AtpA and AtpB, which were also detected in the Alb3.1 preparations (see **Table 1**). Thus, cpSRP54 and cpSRP43 are exclusively associated with Alb3.1. CpSRP54 and cpSRP43 form the cpSRP complex and are mainly present in the stroma as a soluble complex (Ziehe *et al.* 2018). However, the present finding reveals that part of cpSRP is associated with Alb3.1 and is thus bound to the thylakoid membranes. It is of note that the amount of cpSRP54 is much lower than that of cpSRP43 in the Alb3.1 preparations, based on the staining intensities on the gels. Although it has already been reported by *in vitro* experiments that cpSRP has an affinity with Alb3.1 (Lewis *et al.* 2010, Dunschede *et al.* 2011), the present study indicates that Alb3.1 and cpSRP interact in the thylakoid membranes strongly enough to resist the solubilization of the thylakoid membranes with  $\alpha$ -DDM.

It is of interest that magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase, which is involved in chlorophyll synthesis, is also detected in the band 6. However, the thylakoid membrane-associated SRP receptor, cpFtsY, and Ab3.2 are not detected in these experiments.

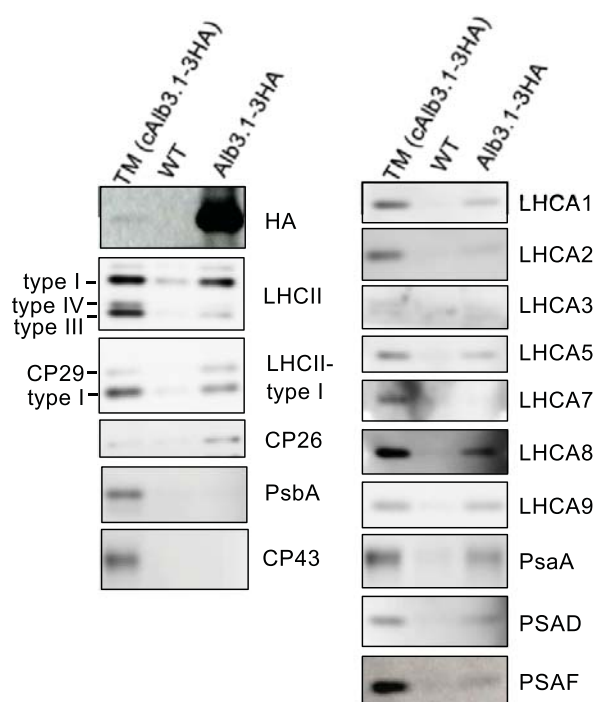
### Alb3.1 associates with LHCPs

The Alb3.1-HA and Alb3.1–3HA preparations contain several polypeptides, the relative electrophoretic migrations of which correspond to those of LHCI and LHCII polypeptides (**Fig. 2B, C**). LC–MS/MS analysis reveals that, apart from band

10, bands 8–16 contain peptides from LHC proteins (**Table 1**). Band 8 is assigned to minor LHCII, CP26 and CP29, which are not separated as discrete bands under the present electrophoresis conditions. Bands 9 and 13 are assigned to LHCII types I and III, respectively, but LHCII types II and IV were not detected. In addition, six LHCI proteins, LHCA4, LHCA3/LHCA6, LHCA8 and LHCA1/LHCA9 are assigned to bands 11, 12, 14 and 16, respectively. In addition to these LHCPs, some proteins localized in the thylakoid membranes are detected: PSAF of PSI (band 17), PsbC (CP43) and PSBP1 of PSII (bands 5 and 15), PetA (Cyt f) and PETO of Cyt  $b_6/f$  (bands 7 and 18) and AtpA of ATP synthase (band 2) (**Table 1**). It remains to be determined whether these are specifically associated with Alb3.1, but it is highly likely that AtpA is a nonspecific contamination because this protein is detected in the negative control sample as well.

### Immunological identification of proteins in the Alb3.1–3HA preparation

The polypeptides from the Alb3.1–3HA were also analyzed by immunoblotting. When probed with anti-HA antibody, a very strong signal is detected in the Alb3.1–3HA preparation, indicating that the Alb3.1–3HA is significantly enriched in the preparation, as expected (**Fig. 3**). The anti-LHCII antibody, which reacts with major LHCII proteins (LHCII types I–IV), detected the signals corresponding to LHCII types I and III but did not detect LHCII types II and IV, which is consistent with the results by LC–MS/MS analyses. Probing with an anti-LHCII type I antibody, which reacts with both LHCII type I and CP29, reveals



**Fig. 3** Identification of the interacting proteins with Alb3.1 by immunoblotting. The affinity purified preparations from WT and Alb3.1-3HA thylakoid extracts as well as the thylakoid membranes from cAlb3.1-3HA (TM) were solubilized with 2% (w/v) SDS and 0.1 M DTT at 80°C for 1 min and protein extracts were separated by SDS-PAGE, electroblotted onto a nitrocellulose filter and probed with specific antibodies raised against LHCI, LHCII, PSI and PSII proteins. Alb3.1-3HA was detected with the anti-HA antibody.

that these two proteins are present. In addition, the presence of CP26 is confirmed immunologically. Although faint bands of CP26 and LHCII type I were detected in the preparation from the WT thylakoid extracts, the intensity of the signals was significantly weaker than those of the corresponding signals in the Alb3.1 preparation. Thus, LC-MS/MS and immunoblot analyses confirmed the presence of LHCII proteins except for LHCII types I and IV in the Alb3.1-3HA preparation. Immunoblot analyses also detected several LHCI proteins: LHCA1, 2, 5, 8 and 9 but not LHCA7. Since the activity of the antibodies against LHCA3, LHCA4 and LHCA6 is rather weak, it proved difficult to confirm the presence of either of these three LHCI proteins, although LC-MS/MS detected peptides from their sequence (Table 1). We noted that the immunoblots revealed the presence of the three photosystem I (PSI) proteins, PsaA, PSAD and PSAF but not the presence of PSII proteins, PsbA (D1) and PsbC (CP43). It is unlikely that Alb3.1 is required for the insertion of PsaA, which has 11 TM helices, into the thylakoid membranes, because PsaA is encoded by the chloroplast *psaA* gene, and the PSI complex is properly assembled in BF4 mutant cells as we reported previously (Bujaldon et al. 2020) and as documented in Fig. 1. Although PSAD, which is peripherally located on the stromal

side of the PSI RC complex, and PSAF, which has one TM helix with which the most hydrophilic region located on the luminal side of the PSI RC complex, are encoded by nuclear genes, the BF4 mutant cells also accumulated these two proteins. Thus, we suspect that their interaction of the PSI proteins with Alb3.1 is indirect as will be discussed below.

### Alb3.1 transiently associates newly synthesized LHCII proteins

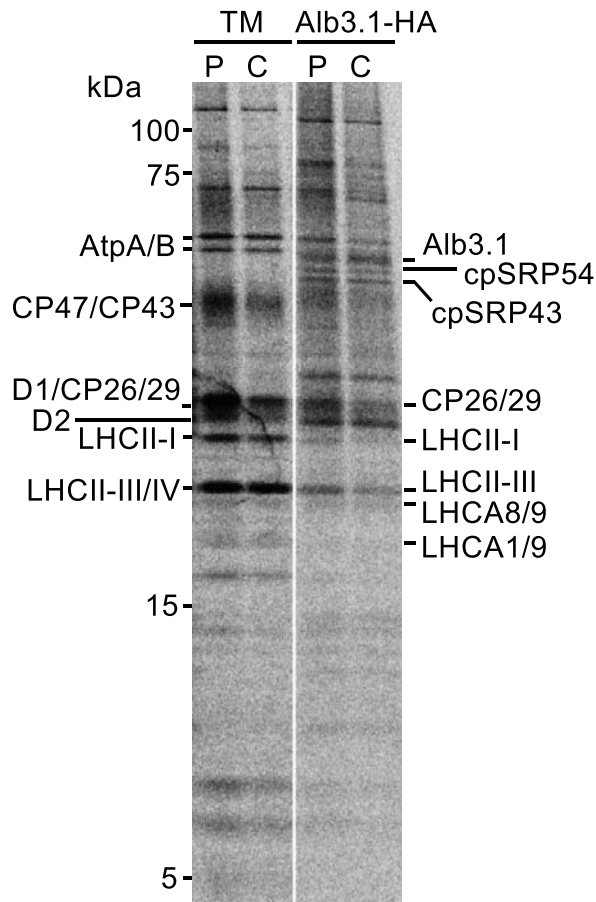
The cpSRP pathway suggests that the cpSRP-Alb3.1 complex transiently associates with newly synthesized LHCPs. To address this question, we isolated an Alb3.1 preparation from cells that were radiolabeled with <sup>35</sup>S. Fig. 4 shows the fluorography of the labeled polypeptides of the thylakoid membranes and the purified Alb3.1 preparation separated by a longer gel for a better resolution. The pulse-labeled polypeptides of the thylakoid membranes showed heavily labeled bands corresponding to PSII proteins (CP47/CP43 and D1/D2) and sharp bands of LHCII types I/II and III/V. CP26 and CP29 migrated in the same region as D1 under the present electrophoresis conditions. The labeling of LHCI proteins was much weaker, as expected from their much lower content in the thylakoid membranes when compared with LHCII proteins (Ozawa et al. 2010). During the 4-h chase period, the intensity of PSII proteins becomes weaker because they turnover rapidly, whereas the intensity of the signal of LHCPs remains almost constant.

Many pulse-labeled polypeptides were also detected in the Alb3.1 preparation. Pulse-labeled bands in the 45–60-kDa region appear to correspond to Alb3.1-HA, cpSRP54 and cpSRP43, and these signals are stable during the chase experiment. The sharp band due to AtpA is also detected above the Alb3.1-HA under the present electrophoresis conditions. In addition, we detected several labeled LHCII proteins: LHCII type I (LHCII-I) and type III (LHCII-III) as well as CP26/CP29. The intensity of these signals significantly decreases during chase experiments. We hardly detected any labeled LHCI proteins in line with their lower labeling in the thylakoid membranes. The decreased labeling of LHCII proteins upon 4-h chase experiments is consistent with the fact that the newly synthesized LHCII proteins transiently associate with the cpSRP-Alb3.1 complex, while they insert into the thylakoid membranes.

## Discussion

### Alb3.1 has a stable interaction with cpSRP

In vascular plants, cpSRP43 and cpSRP54 form a heterodimer complex, and the cpSRP binds LHC apoproteins in the stroma (Aldridge et al. 2009, Horn et al. 2015, Ziehe et al. 2018). The L18 motif located between the second and third TM helices of LHCP binds to the ankyrin repeats of cpSRP43 (Tu et al. 2000, Stengel et al. 2008, Horn et al. 2015). The C-terminal ARRKR motif of cpSRP54 binds to the C-terminal chromodomain 2



**Fig. 4** Transient association of LHCPs in the Alb3.1 preparation. Total cellular proteins from cAlb3.1-HA cells were labeled with  $5 \mu\text{Ci/ml}$   $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  for 20 min (P) and chased for 4 h (C). TM, thylakoid membranes; Alb3.1-HA, Alb3.1-HA preparation.

(CD2) of cpSRP43 (Richter *et al.* 2010, Horn *et al.* 2015). The cpSRP–LHC complex is transported as a stroma-soluble transient complex to the thylakoid membranes where LHC apoproteins are membrane-integrated with the assistance of Alb3. Thus, it is inferred that cpSRP is mainly present in the stroma and only transiently binds to Alb3 in the thylakoid membranes. The crystal structure of the cpSRP43–A3CT (Alb3 C-terminal tail) complex revealed that two positively charged motifs in the A3CT binds to the C-terminal chromodomain 3 (CD3) of cpSRP43 (Horn *et al.* 2015). In green algae, the twin arginine of the ARRKR motif is conserved in cpSRP54 but the alanine is replaced by valine, which has a bulkier side chain that may sterically prevent the interaction with cpSRP43 (Dunschede *et al.* 2015). Also, some critical amino acid residues in the CD2 domain are not conserved in cpSRP43, which may alter the cpSRP43–cpSRP54 interaction (Dunschede *et al.* 2015). Actually, yeast-two-hybrid, *in vitro* pulldown experiments and size-exclusion chromatography separation of total protein extracts from *Chlamydomonas* cells revealed that cpSRP54 and cpSRP43

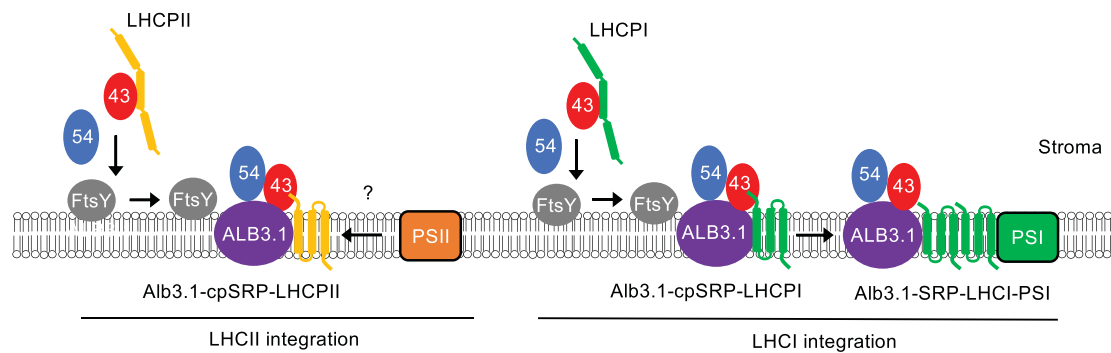
do not form a complex (Dunschede *et al.* 2015). However, we found in the present study that the purified Alb3.1 preparations contain both cpSRP43 and cpSRP54, although the amount of cpSRP54 appears lower than that of Alb3.1 and cpSRP43 (Fig. 2 and Table 1).

Thus, our finding indicates that at least part of cpSRP43 and cpSRP54 associates with Alb3.1 in the thylakoid membranes. It is inferred that the interaction between Alb3.1 and cpSRP43/cpSRP54 may be transient but that it is rather stable since it resisted solubilization with the detergent. The presence of both cpSRP43 and cpSRP54 in the Alb3.1 preparations suggests that either these two factors interact as a cpSRP in the Alb3.1 preparations or that they bind to Alb3.1 individually. The *Chlamydomonas* truncated light-harvesting antenna 4 mutant, which has a lesion of the *cpSRP54* gene, showed a pale green phenotype and a reduced accumulation of LHCPs (Jeong *et al.* 2017). However, it accumulated more LHCPs than the *tla3* and *p71* mutants deficient in cpSRP43 (Kirst *et al.* 2012b, Bujaldon *et al.* 2020), the *tla2* mutant deficient in cpFtsY (Kirst *et al.* 2012a) and the *ac29-3* and BF4 mutants deficient in Alb3.1 (Bellafiore *et al.* 2002, Bujaldon *et al.* 2020). These results argue for a more limited role of cpSRP54 in the accumulation of LHCPs as compared to that of the other biogenesis factors in *C. reinhardtii*. Our present finding that a smaller amount of cpSRP54 than of cpSRP43 is present in the Alb3.1 preparations further supports this view.

It was reported that the solubilized Alb3.1 is found in two complexes of 100–150 and 600–700 kDa (Bellafiore *et al.* 2002). The apparent molecular mass of the smaller complex may be a dimer of Alb3.1, but the large complex is much larger than what would be expected for Alb3.1–cpSRP. This observation suggests that the cpSRP43–Alb3.1 complex may associate with additional proteins. However, cpFtsY, the receptor protein of cpSRP, which is peripherally bound to the thylakoid membranes, is not detected in the Alb3.1 preparation. A reciprocal immunoprecipitation experiments suggested that Alb3.1 forms a complex with Alb3.2, which is the homolog of Alb3.1 and is also present in the thylakoid membranes (Gohre *et al.* 2006). However, we did not find Alb3.2 in the Alb3.1 preparations. Instead, we detected the magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase, which catalyzes the reaction to convert porphyrin to chlorine in the chlorophyll biosynthesis pathway. That the enzyme involved in chlorophyll biosynthesis is found together with antenna proteins in association with their biogenesis complex suggests that the folding of LHCPs upon insertion in the thylakoid membranes must be coupled with the integration of chlorophylls. However, it remains to be addressed whether this enzyme is functionally bound to Alb3.1 since other enzymes involved in the chlorophyll biosynthesis pathway were not detected in the Alb3.1 preparations.

### cpSRP–Alb3.1 acts as an assembly apparatus of LHCPs

LC–MS/MS and immunoblot analyses indicate that eight LHCI proteins (LHCA1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 and 9) and four LHCII proteins



**Fig. 5** A proposed model on the integration and assembly of green algal LHCs. Two stromal factors, cpSRP43 and cpSRP54, may form a heterodimer (cpSRP). The cpSRP43 mainly binds LHCI and LHCII apoproteins in the stroma to form a transient cpSRP–LHCP complex, which is subsequently directed to the chloroplast SRP receptor protein FtsY on the stromal surface of the thylakoid membranes. Then the cpSRP–LHCP complex translocates the LHCP to Alb3.1 insertase by forming a cpSRP–Alb3.1–LHCP complex. The Alb3.1 assists insertion and assembly of LHCs into the thylakoid membranes. The integrated LHCI polypeptides form an LHCI oligomer and associates with the PSI core complex (Alb3.1–LHCI–PSI). Finally, the PSI–LHCI subcomplex is detached from Alb3.1. It remains elusive if the Alb3.1–LHCII–PSII subcomplex is formed because PSII–LHCII is looser than PSI–LHCI.

(LHCII types I and III, CP26 and CP29) are present in the purified Alb3.1–3HA preparation. The hydrophobic apoproteins of LHCs must associate with the cpSRP complex to remain soluble in the stroma and are targeted to the receptor cpFtsY and the insertase Alb3.1 to be integrated into the thylakoid membranes. Pulse-chase labeling experiments show that the LHCII types I and III proteins and probably CP26/29 bound to Alb3.1 are newly synthesized polypeptides (Fig. 4). The limited pulse-labeled signals of most LHCI proteins contrast with the significant labeling of LHCII proteins. This reflects the huge difference in the abundance of these two types of antenna, LHCII being synthesized rather actively, whereas the synthesis of LHCI proteins is relatively slow (Ozawa et al. 2010). Although LHCA7 and LHCII types II and IV are not detected in the Alb3.1–3HA preparation, it is highly likely that they also interact with the Alb3.1–cpSRP complex because the accumulation of LHCA7 and LHCII types II and IV is reduced to similar levels as the other LHC proteins in BF4 mutant cells. These proteins may be dissociated from the complex during the solubilization and/or purification procedures but the reason why the interaction of these proteins with cpSRP–Alb3.1 would be looser remains to be investigated.

It has been reported that the conserved L18 domain of LHC proteins, which consists of 18 amino acid residues and contains the crucial DPLG motif, binds to cpSRP43 proteins (Tu et al. 2000, Horn et al. 2015). The L18 domain is well conserved even in LHCII types II and IV. Although the L18 domain is less conserved in most LHCI proteins than in LHCII proteins, those of LHCA2, LHCA8 and LHCA9 are well conserved among nine LHCI proteins (Bujaldon et al. 2020). This suggests that the affinity between LHC proteins and the Alb3.1–cpSRP complex is not determined primarily by the extent of the conservation of the amino acid sequence of the L18 domain. Other regions of the LHC proteins may also be involved in the stable interaction with the Alb3.1–cpSRP complex.

### Coupling between LHCI and PSI–LHCI assemblies

It is intriguing that PSI proteins (PsaA, PSAD and PSAF) were detected in the Alb3.1–3HA preparation, as shown in Fig. 3. This observation suggests that Alb3.1 is not only required for LHCI assembly but is also involved in the integration of LHCI complexes to a PSI core complex. It is also possible that Alb3.1 plays a role in a cotranslational insertion of the chloroplast-encoded PSI RC subunits (PsaA and PsaB) with 11 TM helices. Although the BF4 mutant accumulates PSI normally, there may be a redundant pathway assisted by Alb3.2 or other factors (Gohre et al. 2006). However, it remains to be addressed whether Alb3.1 and Alb3.2 is involved in the PSI RC assembly. Fig. 5 shows a working hypothesis of how Alb3.1 is engaged in assembling LHCI complexes and the PSI–LHCI supercomplex. LHCI proteins translocated onto the stromal surface of the thylakoid membranes by the cpSRP complex would insert into the thylakoid membranes via Alb3.1. It remains unclear whether 10 LHCI complexes bind to a PSI core one by one. Alternatively, LHCI oligomers are first assembled, and the resulting oligomers are integrated into a PSI core to form a PSI–LHCI subcomplex. It is of interest that a PSI-deficient mutant accumulates oligomeric LHCI complexes consisting of inner and outer tetramers (Takahashi et al. 2004), suggesting that the oligomerization of LHCI complexes proceeds before the association to a PSI core. The Alb3.1–cpSRP complex would subsequently detach after the assembly of the PSI–LHCI subcomplex is completed. The association of the Alb3.1–cpSRP–LHCP complex with the PSI core may correspond to the large Alb3.1 complex of 600–700 kDa that we discussed above (Bellafore et al. 2002).

In contrast, PSII proteins are not detected by immunoblotting, although PsbC (CP43) was detected by mass spectrometry (Fig. 3 and Table 1). This inconsistency may result from the fact that mass spectrometry is generally more sensitive than immunoblotting. It is known that a dimer of the PSII

core complex associates with LHCII trimers and monomers (CP26 and CP29) to form a PSII–LHCII supercomplex (Shen *et al.* 2019, Sheng *et al.* 2021), but this supercomplex is much more unstable than PSI–LHCI supercomplexes. Thus, it is possible that the interaction between Alb3.1–cpSRP–LHCPs and a PSII core might be dissociated during the solubilization and purification procedures. It is of interest that the assembly of one of the PSII RC proteins, D1, is retarded in the *Alb3.1* deletion mutant *ac29*, and that reciprocal coimmunoprecipitation experiments suggested a direct or indirect interaction between Alb3.1 and D1 (Ossenbühl *et al.* 2004). Thus, it remains to be addressed if a transient complex between a PSII core complex and Alb3.1–cpSRP–LHCP complex is also formed.

## Materials and Methods

### Strains and culture conditions

WT and mutant strains of *C. reinhardtii* were grown in tris-acetate phosphate (TAP) medium at 25°C under continuous light of 50 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> to the cell density of 2–5 × 10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>.

### Plasmid construction and nuclear transformation

The DNA sequence of the *Chlamydomonas ALB3.1* gene was retrieved at GenBank (accession number: AF492768). Part of the *ALB3.1* coding region was amplified by nested polymerase chain reaction (PCR) (primers 1 and 2 for the first PCR, and primers 3 and 4 for the second PCR) using the *Chlamydomonas* cDNA library. The resulting PCR product was purified with the illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire), digested with *NdeI* and *XbaI*, and cloned into an *NdeI/XbaI*-digested pSL18 vector to generate plasmid pNK1. The pSL18 vector carries the paromomycin-resistant cassette and promoter/5′-UTR/terminator of the *PSAD* gene to drive foreign gene expression. The N-terminal coding region of *ALB3.1* was amplified by PCR with primers 5 and 6 using the *Chlamydomonas* cDNA library, and the resulting DNA fragment was inserted into an *NdeI/PmlI*-digested pNK1 with the In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio Inc., Shiga) to generate pNK2. Annealed oligo DNAs from primers 7 and 8 were inserted into an *EcoRI/XbaI*-digested pUC18 vector to generate pSXY2002, which carries an HA tag coding region. Two sets of annealed oligo DNAs (primers 9 and 10 and primers 11 and 12) were simultaneously inserted into an *EcoRI/XbaI*-digested pUC18 vector to generate pSXY2004, which carries the triple HA tag coding region. The C-terminal coding region of *ALB3.1* was amplified by PCR using primers 13 and 14 and was then inserted into *BstZ17I*-digested pSXY2002 and pSXY2004 with the In-Fusion HD Cloning Kit to generate pMKR2 and pMKR3, respectively. Plasmids pMKR2 and pMKR3 were digested with *MluI* and *XbaI* and then cloned into an *MluI/XbaI*-digested pNK2 to generate pMKR4 and pMKR5, respectively. DNA segments amplified by PCR were confirmed by DNA sequencing.

Nuclear transformation was carried out by electroporation with an electroporator (Super Electroporator, NEPA21, typell, Nepagene, Japan) basically as previously described (Nellaepalli *et al.* 2018) except that 10 μg/ml paromomycin instead of hygromycin was used for the selection of the transformants. BF4 cells grown in TAP medium were harvested at 600 × g and resuspended in TAP-sucrose solution to the density of 1 × 10<sup>8</sup> cells ml<sup>-1</sup>. Plasmids pMKR4 and pMKR5 were digested by *ScaI* and introduced into BF4 cells. Insertion of the HA tag was confirmed by using PCR KOD FX Neo DNA polymerase (Toyobo, Tokyo) by using primers 15 and 16. The resulting PCR products were separated by 2.5% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and visualized with a GelDoc Go Imaging System (BIO-RAD, Hercules, CA).

Oligo DNAs used in the present study are listed below.

1: 5′-AAGTCTTGGGTGATGCCCTGCAC  
2: 5′-AACACGCAAACACACGCATGCGCTG  
3: 5′-GGCATATGTACGTGCTGGCCGACGCCTCG  
4: 5′-CCTCTAGAATCAAGCCGACGCACCGG  
5: 5′-CACAAACAAGCCCATATGTCGAGCTCCATGTGCTGGCG  
6: 5′-GTAGGAGTAGGGCAGCTGCAGCTTGTC  
7: 5′-AATTCGTATACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTAAT  
8: 5′-CTAGATTAGGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTATACG  
9: 5′-AATTCGTATACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTACCGA  
CGT  
10: 5′-GGGCACGTCGTAGGGGTAGGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGG  
TATACG  
11: 5′-GCCCGACTACGCCTACCCCTACGACGTGCCCGACTACGCCTAAT  
12: 5′-CTAGATTAGGCGTAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTAGGCGTAGTC  
13: 5′-GATTACGAATTCGTAGATCTACCTGAAGAAGCTGGGCGG  
14: 5′-CACGTCGTAGGGGTAAAGCCGACGCACCGGCCACCGC  
15: 5′-CAGCAAGGTGAACCGGCGCTGCAAGCGG  
16: 5′-TCTCCATGGTACAGGGGTCACGCTGCTG

### Thylakoid membrane repair and affinity purification

Cells grown to the density of 5 × 10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup> were collected by centrifugation (2,860 × g at 25°C for 5 min) and were resuspended in the buffer containing 25 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.3 M sucrose. Cells were broken by the French Pressure Cell at 170–190 psi, and the thylakoid membranes were purified by the floating method using stepwise sucrose gradients as previously described (Chua and Bennoun 1975). Thylakoid membranes (400 μg Chl ml<sup>-1</sup>) were solubilized with 1% α-DDM at 4°C for 10 min. The solubilized thylakoid extracts (500 μl) were incubated in a spin column followed by the addition of anti-HA beads (HA-tagged protein purification kit, MBL) for 1 h with constant end-over-end mixing. Nonadsorbed proteins to the HA beads in the column were removed by centrifugation (Nellaepalli *et al.* 2018). The columns were washed with the washing buffer (500 μl) 8–14 times. Alb3.1-HA and Alb3.1–3HA preparations were eluted two times with 20 μl elution buffer.

### Pulse-chase labeling of proteins

Precultures from the cAlb3.1–1-HA strain were grown to a cell density of 2–3 × 10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup> in 100 ml of the TAP medium containing reduced amounts of sulfur. The cells harvested by centrifugation were resuspended in TAP media containing no sulfur (25 μg Chl ml<sup>-1</sup>) and were starved for sulfur under the light of 50 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> for 2 h. Total cellular proteins were labeled with Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub> (5 μCi ml<sup>-1</sup>) (American Radiolabeled Chemicals) under the light of 50 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> at 25°C for 20 min. The labeled proteins were chased by the addition of cold 10 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 4 h. The radio-labeled cells were immediately subjected to thylakoid preparation as reported (Nellaepalli *et al.* 2018, 2021).

### SDS-PAGE and Immunoblotting

Polypeptides from total cellular proteins, thylakoid membranes and affinity purified samples were separated by SDS-PAGE (Laemmli 1970, Fling and Gregerson 1986, Kashino *et al.* 2001). The separated polypeptides were visualized by staining with a fluorescent dye Flamingo (Bio-Rad, USA). Nitrocellulose membranes were used for blotting and probed with several antibodies raised against HA, PSI, PSII, LHCI and LHCII polypeptides. Immunoblotting signals were detected by enhanced chemiluminescence with a luminescent image gel analyzer (LAS-4000 mini, Fuji film). An antibody against HA was purchased from Medical & Biological Laboratories, Tokyo, Japan. Antibodies against PSI and LHCI subunits were described previously (Ozawa *et al.* 2018) and antibodies against LHCII subunits (Bujaldon *et al.* 2020) were described previously.

Antibodies against CP43 and D1 are a kind gift from Jean-David Rochaix and Masahiko Ikeuchi, respectively.

## In-gel digestion and LC–MS/MS

In-gel tryptic digestion and following LC–MS/MS (LTQ, ThermoFisher Scientific, USA) were performed as described in Ozawa et al. (2009). The acquired mass spectral data were analyzed with the Proteome Discoverer ver. 2.1.1.21 (ThermoFisher Scientific, USA) against the protein database in ver. 5.5 Chlamydomonas genome of Joint Genome Institute for nuclear gene products and protein database in NC\_005353 of National Center for Biotechnology Information for chloroplast gene products, respectively. Post-translational modifications were considered with dynamic modification: N-terminal acetylation, oxidation of tryptophan and methionine and phosphorylation of serine, threonine and tyrosine. A false discovery rate of 0.01 was calculated by the Decoy database search and filtered for all analyses.

## Supplementary Data

Supplementary data are available at PCP online.

## Data Availability

The data underlying this article are available in the article and in its online supplementary material.

## Funding

JSPS KAKENHI (16H06554, 21H02510) to Y.T.

## Disclosures

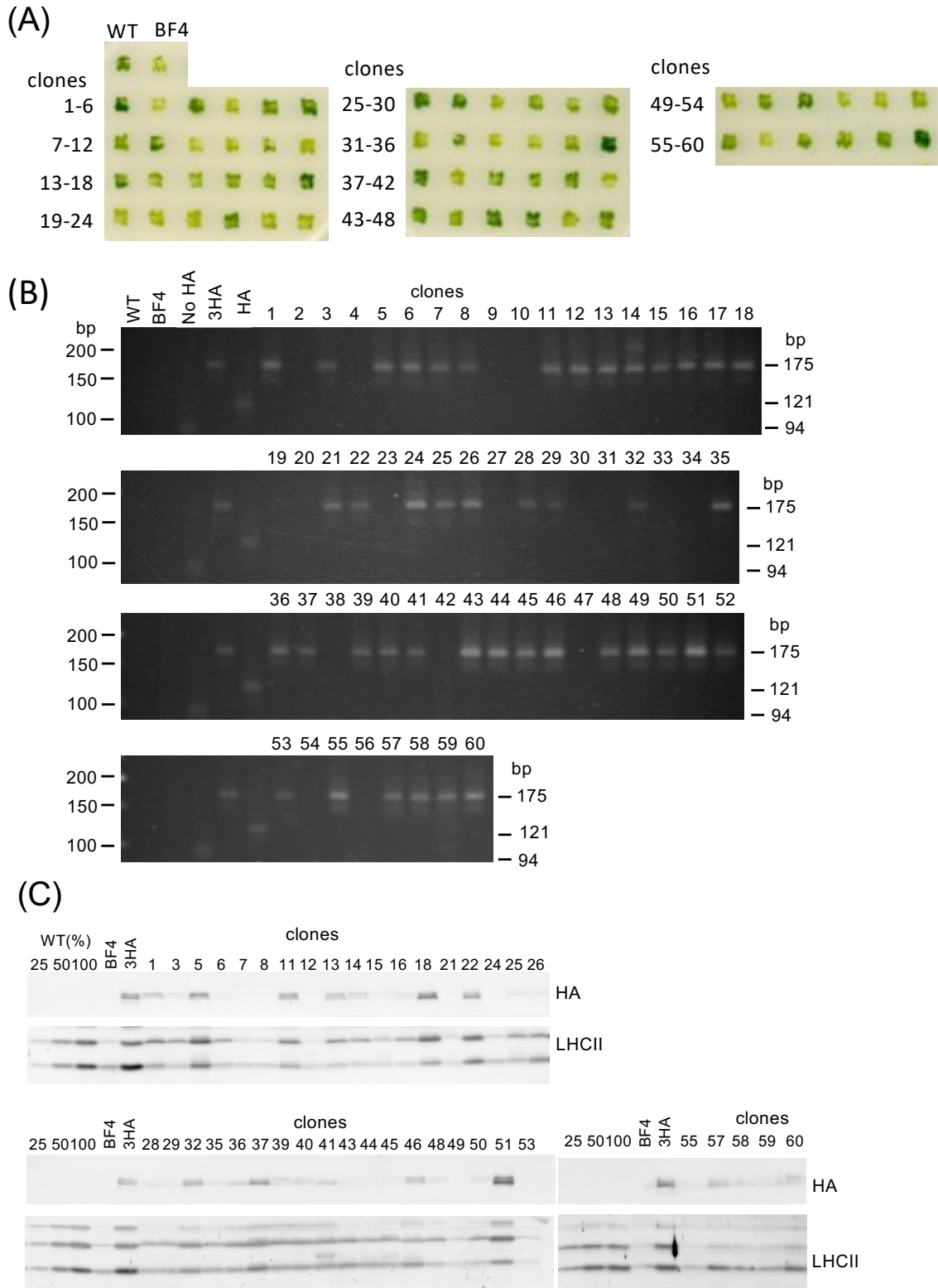
The authors have no conflicts of interest to declare.

## References

- Aldridge, C., Cain, P. and Robinson, C. (2009) Protein transport in organelles: protein transport into and across the thylakoid membrane. *FEBS J.* 276: 1177–1186.
- Bellafore, S., Ferris, P., Naver, H., Gohre, V. and Rochaix, J.-D. (2002) Loss of Albino3 leads to the specific depletion of the light-harvesting system. *Plant Cell* 14: 2303–2314.
- Ben-Shem, A., Frolow, F. and Nelson, N. (2003) Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* 426: 630–635.
- Bujaldon, S., Kodama, N., Rathod, M.K., Tourasse, N., Ozawa, S.-I., Selles, J., et al. (2020) The BF4 and p71 antenna mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1861: 148085.
- Chua, N.H. and Bennoun, P. (1975) Thylakoid membrane polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*: wild-type and mutant strains deficient in photosystem II reaction center. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72: 2175–2179.
- Dall'Osto, L., Bressan, M. and Bassi, R. (2015) Biogenesis of light harvesting proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1847: 861–871.
- DeLille, J., Peterson, E.C., Johnson, T., Moore, M., Kight, A. and Henry, R. (2000) A novel precursor recognition element facilitates posttranslational binding to the signal recognition particle in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 1926–1931.
- Dunschede, B., Bals, T., Funke, S. and Schunemann, D. (2011) Interaction studies between the chloroplast signal recognition particle subunit cpSRP43 and the full-length translocase Alb3 reveal a membrane-embedded binding region in Alb3 protein. *J. Biol. Chem.* 286: 35187–35195.
- Dunschede, B., Trager, C., Schroder, C.V., Ziehe, D., Walter, B., Funke, S., et al. (2015) Chloroplast SRP54 was recruited for posttranslational protein transport via complex formation with chloroplast SRP43 during land plant evolution. *J. Biol. Chem.* 290: 13104–13114.
- Fling, S.P. and Gregerson, D.S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* 155: 83–88.
- Gohre, V., Ossenbühl, F., Crevecoeur, M., Eichacker, L.A. and Rochaix, J.-D. (2006) One of two Alb3 proteins is essential for the assembly of the photosystems and for cell survival in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 18: 1454–1466.
- Horn, A., Hennig, J., Ahmed, Y.L., Stier, G., Wild, K., Sattler, M., et al. (2015) Structural basis for cpSRP43 chromodomain selectivity and dynamics in Alb3 insertase interaction. *Nat. Commun.* 6: 8875.
- Jeong, J., Baek, K., Kirst, H., Melis, A. and Jin, E. (2017) Loss of CpSRP54 function leads to a truncated light-harvesting antenna size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1858: 45–55.
- Jeong, J., Baek, K., Yu, J., Kirst, H., Betterle, N., Shin, W., et al. (2018) Deletion of the chloroplast LTD protein impedes LHCl import and PSI–LHCl assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Exp. Bot.* 69: 1147–1158.
- Kashino, Y., Koike, H. and Satoh, K. (2001) An improved sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis system for the analysis of membrane protein complexes. *Electrophoresis* 22: 1004–1007.
- Kirst, H., Garcia-Cerdan, J.G., Zurbriggen, A. and Melis, A. (2012a) Assembly of the light-harvesting chlorophyll antenna in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* requires expression of the TLA2-CpFTSY gene. *Plant Physiol.* 158: 930–945.
- Kirst, H., Garcia-Cerdan, J.G., Zurbriggen, A., Ruehle, T. and Melis, A. (2012b) Truncated photosystem chlorophyll antenna size in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* upon deletion of the TLA3-CpSRP43 gene. *Plant Physiol.* 160: 2251–2260.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lewis, N.E., Marty, N.J., Kathir, K.M., Rajalingam, D., Kight, A.D., Daily, A., et al. (2010) A dynamic cpSRP43-Albino3 interaction mediates translocase regulation of chloroplast signal recognition particle (cpSRP)-targeting components. *J. Biol. Chem.* 285: 34220–34230.
- Nellaepalli, S., Kim, R.G., Grossman, A.R. and Takahashi, Y. (2021) Interplay of four auxiliary factors is required for the assembly of photosystem I reaction center subcomplex. *Plant J.* 106: 1075–1086.
- Nellaepalli, S., Ozawa, S.-I., Kuroda, H. and Takahashi, Y. (2018) The photosystem I assembly apparatus consisting of Ycf3–Y3IP1 and Ycf4 modules. *Nat. Commun.* 9: 2439.
- Ossenbühl, F., Gohre, V., Meurer, J., Krieger-Liszky, A., Rochaix, J.-D. and Eichacker, L.A. (2004) Efficient assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* requires Alb3.1p, a homolog of Arabidopsis ALBINO3. *Plant Cell* 16: 1790–1800.
- Ouyang, M., Li, X., Ma, J., Chi, W., Xiao, J., Zou, M., et al. (2011) LTD is a protein required for sorting light-harvesting chlorophyll-binding proteins to the chloroplast SRP pathway. *Nat. Commun.* 2: 277.
- Ozawa, S., Nield, J., Terao, A., Stauber, E.J., Hippler, M., Koike, H., et al. (2009) Biochemical and structural studies of the large Ycf4-photosystem

- I assembly complex of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 21: 2424–2442.
- Ozawa, S., Onishi, T. and Takahashi, Y. (2010) Identification and characterization of an assembly intermediate subcomplex of photosystem I in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 285: 20072–20079.
- Ozawa, S.-I., Bald, T., Onishi, T., Xue, H., Matsumura, T., Kubo, R., et al. (2018) Configuration of ten light-harvesting chlorophyll a/b complex I subunits in *Chlamydomonas reinhardtii* photosystem I. *Plant Physiol.* 178: 583–595.
- Richter, C.V., Bals, T. and Schunemann, D. (2010) Component interactions, regulation and mechanisms of chloroplast signal recognition particle-dependent protein transport. *Eur. J. Cell Biol.* 89: 965–973.
- Shen, L., Huang, Z., Chang, S., Wang, W., Wang, J., Kuang, T., et al. (2019) Structure of a C2S2M2N2-type PSII-LHCII supercomplex from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116: 21246–21255.
- Sheng, X., Liu, Z., Kim, E. and Minagawa, J. (2021) Plant and algal PSII–LHCII supercomplexes: structure, evolution and energy transfer. *Plant Cell Physiol.* In press.
- Stengel, K.F., Holdermann, I., Cain, P., Robinson, C., Wild, K. and Sinning, I. (2008) Structural basis for specific substrate recognition by the chloroplast signal recognition particle protein cpSRP43. *Science* 321: 253–256.
- Sundberg, E., Slagter, J.G., Fridborg, I., Cleary, S.P., Robinson, C. and Coupland, G. (1997) ALBINO3, an Arabidopsis nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria. *Plant Cell* 9: 717–730.
- Takahashi, Y., Yasui, T., Stauber, E.J. and Hippler, M. (2004) Comparison of the subunit compositions of the PSI-LHCI supercomplex and the LHCI in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry* 43: 7816–7823.
- Tu, C.J., Peterson, E.C., Henry, R. and Hoffman, N.E. (2000) The L18 domain of light-harvesting chlorophyll proteins binds to chloroplast signal recognition particle 43. *J. Biol. Chem.* 275: 13187–13190.
- Ziehe, D., Dunschede, B. and Schunemann, D. (2017) From bacteria to chloroplasts: evolution of the chloroplast SRP system. *Biol. Chem.* 398: 653–661.
- Ziehe, D., Dunschede, B. and Schunemann, D. (2018) Molecular mechanism of SRP-dependent light-harvesting protein transport to the thylakoid membrane in plants. *Photosyn. Res.* 138: 303–313.

# Supplementary Figure



## Supplementary Figure

Screening of clones after transformation of BF4 cells with the complementation vector to express Alb3.1-3HA. Putative complemented clones were first selected on TAP agar plates containing 10  $\mu$ g/mL paromomycin. (A) The cells of 60 putative complemented clones as well as WT (dark green) and BF4 (pale green) cells were grown on TAP agar plates. (B) Agarose gel electrophoresis of DNA fragments amplified using primers #15 and #16 as described in Materials and Methods and Figure 1A. No DNA fragment was amplified from WT and BF4, fragments of 94, 121, and 175 kb were amplified from the complemented cells expressing Alb3.1, Alb3.1-HA, and Alb3.1-3HA. DNA fragment of 175 bp was amplified from the putative complemented clones (1, 3, 5-8, 11-18, 21-22, 24-26, 28-29, 32, 35-37, 39-41, 43-46, 48-52, 53, 55, 57-60). (C) Immunoblots of total cell proteins of the clones (1, 3, 5-8, 11-16, 18, 21-22, 24-26, 28-29, 32, 35-37, 39-41, 43-46, 48-51, 53, 55, 57-60) using antibodies against HA tag and LHCII polypeptides (types I-IV). The signal intensity of HA tag corresponds to the accumulation of Alb3.1-3HA.





### 2.3. Résumé de l'article 2

Après s'être assuré que les souches complémentées (BF4-*ALB3.1*, *ALB3.1:HA* et *ALB3.1:3HA*) accumulaient bien les protéines LHC à des niveaux comparables à ceux de la souche sauvage (le C-ter d'*ALB3.1* n'affecte pas significativement sa capacité à contribuer à l'insertion membranaire et à l'accumulation des protéines LHC), les préparations des membranes des thylakoïdes ont été purifiées par chromatographie d'affinité. À partir de ces préparations purifiées, les protéines qui interagissent alors avec *ALB3.1* ont été séparées sur gel dénaturant (SDS-PAGE). À partir de ces gels (ou bandes sur gel), l'identification de ces interactants a pu ensuite être réalisée par 2 techniques. La première est la technique des immuno-empreintes (*western blot*), qui permet la détection et l'identification des protéines spécifiques à l'aide d'anticorps dirigés contre ces protéines et la seconde est la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (*Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry* ou LC-MS/MS), les peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines vont être séparés par chromatographie liquide, en fonction de leur hydrophobicité, puis ionisés et dans un second temps, ces peptides vont être analysés par spectromètre de masse (mesure de la masse des peptides puis fragmentation) ce qui permet d'obtenir des éléments de leur séquence. Un contrôle négatif avec une préparation de BF4-*ALB3.1* (sans étiquette) a également été réalisé afin de s'assurer de la validité de cette méthode, permettant d'exclure les contaminants non-spécifiques présents dans toutes les préparations (exemple de *AtpA*).

Ainsi, à partir des préparations de membranes de thylakoïdes de *ALB3.1:HA*, nous avons pu identifier plusieurs protéines qui sont en interaction avec *ALB3.1* (*Tableau 1*). Parmi celles-ci, on retrouve les deux membres du complexe SRP chloroplastique, cpSRP43 et cpSRP54, de même que de nombreuses LHCP (LHCII et LHCI). La présence de ces protéines dans les préparations *ALB3.1:HA* confirme bien la formation d'un complexe d'assemblage cpSRP-*ALB3.1*-LHCP au niveau des membranes des thylakoïdes, et cela, pour la plupart des protéines LHC. Des protéines des centres PSI (*PsaA*, *PSAD* et *PSAF*) ont également été détectées dans les préparations *ALB3.1:HA* par cette méthode suggérant que ces complexes transitoires s'associeraient au complexe du centre PSI. On constate également la détection d'une enzyme impliquée dans la biosynthèse des chlorophylles, CRD1/*CHL27A* (Mg-protoporphyrin IX monométhyl ester (oxidative) cyclase). Cette observation est cohérente avec le fait que le repliement et l'intégration des LHCP dans les membranes nécessite la présence des chlorophylles. Elle suggère que les dernières étapes de synthèse de

chlorophylles doivent être régulées par la présentation à la membrane de l'apoprotéine au sein d'un supercomplexe enzymatique. Cette protéine CRD1 est localisée dans les membranes du thylakoïde (Moseley et al, 2002) et joue un rôle essentielle dans l'accumulation des protéines PSI et LHCI, ainsi qu'une partie des LHCII, en cas d'anoxie et en carence en cuivre (Moseley et al, 2000).

**Tableau 1 : Identification d'interactants à ALB3.1.**

À partir de préparations de membranes des thylakoïdes extraites des souches complémentées ALB3.1 étiquetées HA & 3HA, les protéines interagissant à ALB3.1 sont identifiées par deux techniques, soit par [spectrométrie de masse](#), soit par [immunoblotting](#) – (lorsqu'une identification a pu être révélée par les deux techniques, celle-ci est indiquée par un fond [rose](#))

« voie SRP »	PSII	LHCII	PSI	LHCI	Cyt <i>b<sub>6</sub>f</i>	Biosynthèse des Chl
ALB3.1 (-HA)	PSBP1 (OEE2)	LHCBM3 (Type I)	PsaA	LHCA1	PetA	CRD1
cpSRP54	PsbC (CP43)	LHCBM2 (Type III)	PSAD	LHCA2	PETO	
cpSRP43		LHCB4 (CP29)	PSAF	LHCA3		
		LHCB5 (CP26)		LHCA4		
				LHCA5		
				LHCA6		
				LHCA8		
				LHCA9		

## 2.4. Conclusion

Cette étude a montré que la protéine ALB3.1 contribue à l'insertion et à l'assemblage des LHCP dans les membranes des thylakoïdes par la formation d'un complexe ALB3.1-cpSRP-LHCP. Des expériences de pulse-chasse ont mis en évidence que les protéines LHC nouvellement synthétisées s'associent transitoirement au complexe cpSRP-ALB3.1 alors qu'elles s'insèrent dans les membranes des thylakoïdes. De plus, la présence de protéines constituant le centre PSI suggère que les complexes ALB3.1-cpSRP-LHCI s'associent à un intermédiaire d'assemblage du supercomplexe PSI-LHCI et cela se produit avant que les LHCI assemblées ne se dissocient du complexe ALB3.1-cpSRP.

La méthode employée, qui utilise de nombreuses étapes de solubilisation et de purification, n'a pas permis de détecter les protéines des centres PSII, D1 (PsbA) et D2 (PsbD), bien qu'une interaction entre D1 et ALB3.1 ait été précédemment démontrée (Göhre et al, 2006; Ossenbühl et al, 2004). Une autre absence notable concerne ALB3.2, homologue de ALB3.1, qui, ensemble, sont capables d'interagir au sein d'un même complexe,

comprenant notamment D1 (Göhre et al, 2006). Enfin, le récepteur membranaire du complexe SRP, cpFTSY, n'a pas pu être détecté.

En revanche, la détection d'une enzyme impliquée dans la synthèse des Chl suggère également que le repliement des protéines LHC lors de leur insertion dans les membranes des thylakoïdes doit être couplé à l'intégration de la chlorophylle. Cependant, on peut se demander quelle est la fonction particulière dans la biogénèse des LHC de cette seule enzyme parmi toutes les autres impliquées dans la voie de biosynthèse des chlorophylles.



### 3. Discussion et perspectives

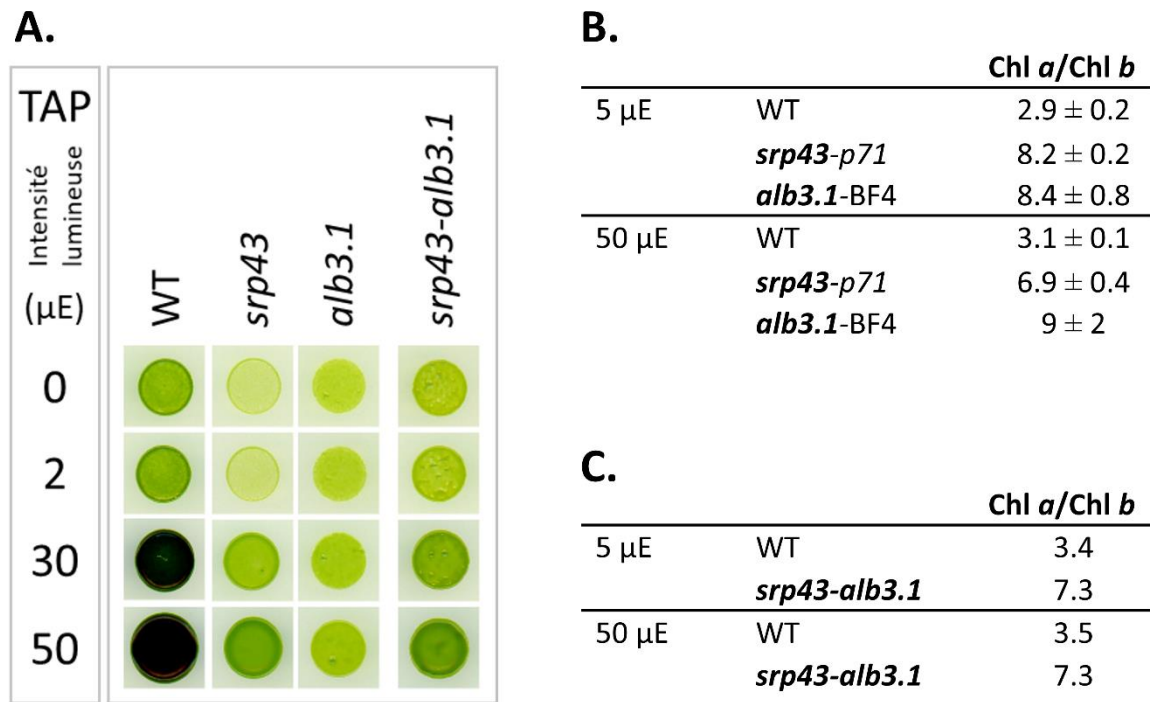
Ces deux études permettent de conclure que les protéines cpSRP43 et ALB3.1, avec la participation de cpSRP54, ont un rôle important dans l'importation des LHCP jusqu'aux membranes des thylakoïdes et que leur interaction sous forme d'un complexe ALB3.1-cpSRP-LHCP va permettre finalement l'intégration et l'assemblage des LHCP dans les membranes, probablement jusqu'aux supercomplexes PSI-LHCI (PSII-LHCII est encore à confirmer). De plus, l'altération de cpSRP43 ou de ALB3.1 autorise toujours le maintien d'une faible fraction des LHC dans les membranes suggérant l'existence d'une voie alternative à la voie SRP. On ne peut pas exclure l'hypothèse que ces deux mutations (une substitution ponctuelle et un transposon entre 2 exons) permettent néanmoins une faible expression des deux protéines. Cependant, ces observations sont en accord avec les résultats précédemment publiés (mutants *sla3-cpsrp43* (Kirst et al, 2012b) et *ac29-3-alb3.1* (Bellafiore et al, 2002)). Une étude chez *Arabidopsis* a également montrée qu'un double mutant cpSRP43-cpSRP54 (KO) accumulait toujours des niveaux significatifs de LHCB1, LHCB4, LHCB6 and LHCA2 (Hutin et al, 2002).

#### 3.1. D'autres mutants d'antenne

Pour répondre à l'interrogation sur la nature des deux mutations, nous avons croisé les deux mutants afin d'obtenir un double mutant *srp43-alb3.1*. En effet, un double mutant de ce type devrait aggraver le phénotype basse antenne, tandis que dans l'hypothèse d'une voie alternative, il devrait toujours autoriser ces 25% d'accumulation des antennes.

Après le croisement entre BF4 et *p71* et l'obtention de ce double mutant, nous n'avons pas observé une diminution significative de sa pigmentation, et donc de son contenu en chlorophylle, ni même une diminution de croissance (*Figure 14-A*). Son rapport Chl *a*/Chl *b* est inchangé en comparaison à ceux des simples mutants (*Figure 14-B et 14-C*).

Cette dernière observation sur le double mutant *srp43-alb3.1* renforce l'hypothèse d'une voie alternative d'importation des LHC dans le chloroplaste. Afin de confirmer son existence, il serait intéressant de compléter l'étude en incluant d'autres mutants préexistants qui présentent également un défaut au niveau de leurs antennes.



**Figure 14 : Phénotype d'un double mutant *srp43-alb3.1***

(A) Phénotype de croissance sur milieu TAP à différentes intensités lumineuses, (B) Rapports Chl *a*/Chl *b* des simples mutants *srp43* (*p71*) et *alb3.1* (BF4) (résultats extraits de l'article 1) et (C) d'un double mutant *srp43-alb3.1* par rapport au WT.

C'est par exemple le cas du mutant *as1* (Formighieri et al, 2013), qui comporte une insertion dans le gène *ARSA1* (*arsenic transporter*, Cre05.g245158 - *Chlamydomonas reinhardtii* v5.6 ; g5570 - v5.3). Ce gène code pour une protéine cytosolique qui est impliquée dans l'acheminement au chloroplaste d'une autre protéine, TOC34. Celle-ci appartient au complexe TOC qui, en association avec le complexe TIC, permet aux protéines LHC de traverser l'enveloppe du chloroplaste (voir *Introduction* de ce chapitre). Ce mutant contient seulement 8% de Chl (2 fois moins que BF4 et *p71*) avec une accumulation résiduelle des protéines LHC, suggérant comme dans le cas de notre étude l'existence d'une voie alternative. Est-ce qu'un double mutant *srp43-ars1* aurait encore des protéines des antennes ? Malheureusement ce mutant *as1* n'est plus disponible. Néanmoins, il existe actuellement 3 souches mutantes pour ce gène dans la collection de mutants d'insertion CLiP (*Chlamydomonas Library Project* – (Li et al, 2019)) mais l'insertion dans chacun de ces mutants est située dans le 3'UTR du gène ce qui pourrait ne pas avoir d'effet sur l'activité de la protéine. Le blocage, d'une part de l'insertion des LHCP dans le stroma et d'autre part leur transfert jusqu'aux membranes des thylakoïdes, serait cependant une condition très forte pour confirmer que les LHCP emprunteraient une autre voie sans avoir recours aux complexes TOC-TIC et SRP. Il faut envisager dans un avenir proche la reconstruction de ce

mutant *as1* pour poursuivre cette étude. Cependant, il convient de noter que le mécanisme TOC-TIC n'est pas exclusif aux LHC, mais concerne la majorité des protéines chloroplastiques qui sont codées par le noyau. Cela signifie qu'un dysfonctionnement de ces complexes TOC-TIC peut aussi impacter l'importation d'autres types de protéines, notamment : *i*) les composants de la machinerie de transcription et de traduction du chloroplaste, *ii*) des facteurs nucléaires contrôlant spécifiquement l'assemblage et la stabilité des complexes de la chaîne photosynthétique (Rochaix, 2011b; Wollman et al, 1999) et, *iii*) les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des chlorophylles.

### 3.2. Une autre voie avec d'autres partenaires ?

*Chlamydomonas* contient deux protéines ALB3, ALB3.1 et ALB3.2, qui sont homologues ayant une similarité de 54% dans leur séquence d'acides aminés (Bellafiore et al, 2002). Ces deux protéines sont localisées au niveau des membranes des thylakoïdes. Nous avons vu que ALB3.1 était requis dans l'insertion et l'accumulation des LHCP, tandis que ALB3.2 a un rôle bien distinct de son homologue puisqu'elle intervient principalement dans l'assemblage des centres réactionnels et de leurs antennes (Göhre et al, 2006). Il existe une interaction entre ces deux protéines (Göhre et al, 2006), même si nous n'avons pas encore identifié ou observé cette interaction dans les préparations de *ALB3.1:HA*. Cette interaction pourrait être spécifique à l'assemblage des centres PSII et PSI ou bien aux supercomplexes PS-LHC, après l'intégration complète des LHCP dans les membranes.

Une possibilité qui pourrait expliquer le maintien de ces 25% des LHC alors que leur voie spécifique d'importation et/ou d'insertion est bloquée serait que *i*) ALB3.2 permettrait, dans une moindre mesure, l'insertion et la prise en charge des LHC pour la formation de supercomplexe LHC-PS, ou bien *ii*) un ou des partenaires puissent se substituer aux protéines ALB3. Il a été montré qu'une réduction de l'accumulation de ALB3.2 entraînait une forte diminution des centres PSI et PSII ainsi que leurs antennes (Göhre et al, 2006). Dans cette même étude, les auteurs ont aussi observé une surproduction de la protéine VIPP1 (*vesicle-inducing protein in plastids*) qui présentait de fortes interactions avec ALB3.2. VIPP1 initialement décrite comme étant impliquée dans la formation de la membrane du thylakoïde par l'intermédiaire de vésicules membranaires, contribuerait ainsi à la biogenèse du thylakoïde et au maintien de la membrane (Liu et al, 2005). D'après une étude récente, il a été démontré que VIPP1 jouerait un rôle plus spécifique dans la biogenèse et l'assemblage des complexes photosynthétiques plutôt que dans le trafic membranaire (Theis et al, 2020). Il est intéressant de noter que VIPP1 est localisée à la fois dans l'enveloppe du chloroplaste,



le stroma et les membranes des thylakoïdes (Liu et al, 2005). Puisque l'absence de ALB3.1 comme de ALB3.2 entraînent la suraccumulation de VIPP1 (Göhre et al, 2006; Theis et al, 2020), on peut proposer que VIPP1 soit le candidat qui permet, avec -et dans une moindre mesure sans- ses partenaire ALB3.1 et ALB3.2, d'assurer l'insertion et l'assemblage des LHC avec les centres réactionnels dans les membranes des thylakoïdes.

## Partie B. Biosynthèse des chlorophylles et leur régulation

### 1. Introduction

Parmi les avantages dans l'utilisation de *Chlamydomonas reinhardtii* comme organisme modèle, notamment dans l'étude de l'appareil photosynthétique, c'est avant tout sa capacité de croître en condition hétérotrophe (en absence d'énergie lumineuse et par conséquent sans photosynthèse), sous la condition (indispensable) qu'on lui fournisse une source de carbone réduit (acétate). Et d'autre part, *Chlamydomonas* possède cette faculté de synthétiser les chlorophylles en absence de lumière grâce à l'activité de la DPOR (voir *Introduction* de ce chapitre). Ainsi, l'étude de la biosynthèse des chlorophylles et sa régulation sont possibles et facilitées par l'utilisation de mutants de *Chlamydomonas* altérés dans cette voie. En effet, même si la diminution ou l'absence de chlorophylles compromet le processus de photosynthèse, par l'incapacité d'absorber suffisamment d'énergie lumineuse ou bien de déclencher les réactions de transfert d'électrons le long de la chaîne photosynthétique, le maintien en vie de ce type de mutants reste possible dans des conditions de culture hétérotrophe. Cependant, outre le rôle important de ces molécules de chlorophylles dans le chloroplaste en présence de lumière, leur abondance, ou bien une anomalie dans leur voie de biosynthèse, pourrait entraîner de graves dommages à la cellule par la production de ROS à la lumière.

Nous avons donc utilisé deux mutants, *p55* et *p62*, obtenus par mutagenèse après traitement au 5-fluorodeoxyuridine, qui sont altérés dans la production de chlorophylle, altération caractérisée par une diminution de la pigmentation verte des cellules par rapport à une souche de référence (*Figure 13-A*).

## 2. Les caractéristiques de ces mutants

### 2.1. Moins de chlorophylle et une extrême photosensibilité

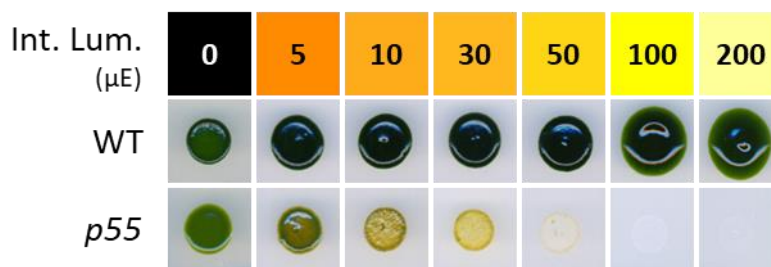
Un dosage de chlorophylle, réalisée par la méthode Porra (Porra et al, 1989), montre une quantité en Chl plus faible dans ces mutants (*Tableau 2*). Lorsqu'ils sont cultivés en faible lumière, à moins de 5  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ( $\mu\text{E}$ ), *p55* n'accumule que 65% de Chl par rapport au WT et moins de 7% pour *p62*. Cette différence avec la souche sauvage est d'autant plus marquée lorsque que l'intensité lumineuse de culture est augmentée. Bien que le WT augmente son contenu en chlorophylle à 20  $\mu\text{E}$ , les mutants, quant à eux, en accumulent encore moins, voir plus du tout dans le cas de *p62*. Cette observation met en évidence une autre particularité chez ces mutants : une forte photosensibilité. Effectivement, si leur contenu en Chl diminue, ce n'est pas forcément due à un défaut de synthèse, mais vraisemblablement à une croissance qui est inhibée jusqu'à entraîner la mort des cellules.

**Tableau 2 : Contenu en chlorophylle et rapport Chl a/Chl b des deux mutants étudiés, p55 et p62**

En comparaison avec une souche sauvage de référence (WT) – Dosage par la méthode Porra.

		<b>WT</b>	<b>p55</b>	<b>p62</b>
<b>[Chl]</b> ( $\mu\text{g}/10^6$ cell)	<b>5 <math>\mu\text{E}</math></b>	<b>1.2 <math>\pm</math> 0.3</b>	<b>0.8 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>0.08 <math>\pm</math> 0.1</b>
	20 $\mu\text{E}$	2.0 $\pm$ 0.3	0.3	0
<b>Chl a / Chl b</b>	<b>5 <math>\mu\text{E}</math></b>	<b>2.9 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>2.5 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>0.5</b>
	20 $\mu\text{E}$	3.1 $\pm$ 0.1	2.8	0

Cette observation est particulièrement visible lorsque le mutant *p55* est cultivé sous des intensités lumineuses croissantes, en comparaison avec une souche sauvage traitée dans les mêmes conditions (*Figure 13-A et Figure 15*) : plus il y a de lumière, plus la densité cellulaire diminue. Une autre spécificité est visible, c'est le changement de pigmentation : les cellules sont vert clair à l'obscurité puis apparaissent légèrement brunâtres sous faible régime pour devenir blanches sous plus haute intensité (dans cette situation non seulement les cellules ne se divisent pas mais elles meurent). Il est remarquable de constater une nette différence entre ces 2 mutants dans ces observations. Le mutant *p62* présente une perturbation encore plus prononcée dans la synthèse des Chl (10 fois moins que *p55* à 5  $\mu\text{E}$ ) et se caractérise également par une pigmentation brunâtre persistante, même à l'obscurité, et sa survie est particulièrement compromise en présence de lumière (*Figure 13-A*).



**Figure 15 : Effet de l'intensité lumineuse sur la croissance cellulaire**

Cultures du mutant *p55* et d'une souche sauvage (WT) en condition hétérotrophe –à l'obscurité (0)-, ou en condition mixotrophe à différentes intensités lumineuses (Int. Lum.) (5, 10, 30, 50 100 et 200 μE ; lampe fluorescente). 5 μL de suspensions ajustées à  $4.10^6$  cellules/mL sont déposés sur milieu TAP puis incubés pendant 7 jours.

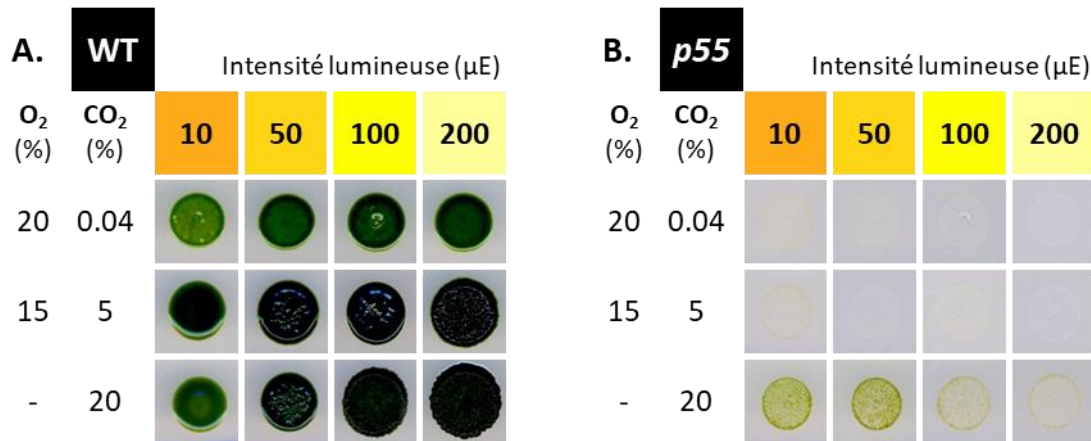
Ayant connaissance de ces particularités chez ces mutants, il nous semblait alors intéressant d'étudier leur croissance dans différentes conditions environnementales soit en variant l'intensité lumineuse et la longueur d'onde soit en changeant les concentrations d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>.

## 2.2. Spécificité de la photosensibilité

En tout état de cause, cette étude qui doit nous permettre de déterminer les facteurs environnementaux limitants/aggravants dans le processus de la photosynthèse a surtout été réalisée sur le mutant *p55*. Ce dernier, lorsqu'il est cultivé à l'obscurité et en présence d'une source de carbone réduit (acétate), présente un phénotype proche du type sauvage (croissance normale, avec cependant un léger défaut dans son contenu en chlorophylle) tandis que *p62*, dans ces conditions, est déjà presque dépourvu de chlorophylles (seulement 1%). Ce qui a pour conséquence une très faible accumulation des protéines porteuses de chlorophylle dans ce mutant. De plus, il est extrêmement photosensible, même à très faible régime lumineux. Ces observations sur *p62* rendent donc ce type d'étude très difficile à réaliser.

### 2.2.1. Effet de l'oxygène

Ainsi, lorsque *p55* est cultivé en condition photoautotrophique et en présence d'oxygène (air ambiant ou 15% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) (*Figure 16*), les cellules ne montrent aucune croissance. Cependant, dans des conditions d'anoxie / 20% de CO<sub>2</sub> et sous un régime lumineux faible ou modéré, nous avons pu observer une légère croissance.



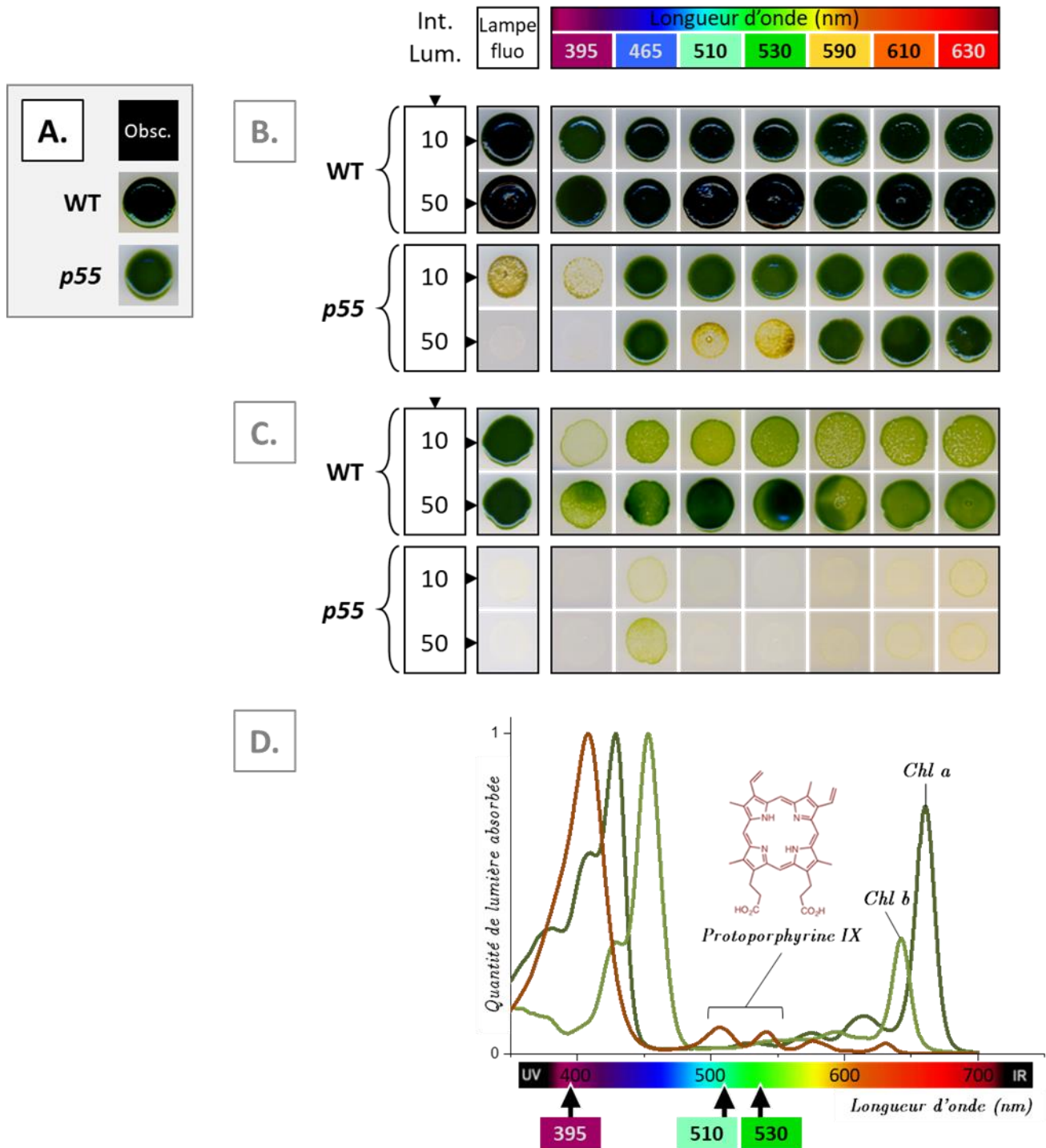
**Figure 16 : Effet de l'oxygène sur la croissance cellulaire en présence de lumière**  
Cultures du mutant *p55* et d'une souche sauvage en condition mixotrophe à différentes intensités lumineuses et sous différentes conditions atmosphériques. 5 μL de suspensions ajustées à 4.10<sup>6</sup> cellules/mL sont déposés sur milieu TAP puis incubés pendant 7 jours.

Ces observations confirment bien la production de ROS à un taux plus élevé dans le mutant *p55* ce qui entraîne des dommages sur l'appareil photosynthétique.

### 2.2.2. Effet de la longueur d'onde

Nous avons ensuite étudié cette photosensibilité de *p55* à différentes longueurs d'onde (*Figure 17-B et C*). Nous avons observé que, malgré une croissance cellulaire légèrement sensible à la lumière bleue (465 nm) et rouge (590-630 nm) -avec une sensibilité augmentée en absence d'apport en carbone réduit dans le milieu-, le mutant *p55* était extrêmement sensible aux UV (395 nm) et à la lumière verte (510 et 530 nm). Ce résultat suggère que la lumière absorbée par les Chl *a* et *b* n'est pas nocive (pics d'absorption dans le bleu et le rouge), mais probablement qu'un pigment ayant une absorption à 395, 510 et 530 nm provoque de graves dommages aux cellules.

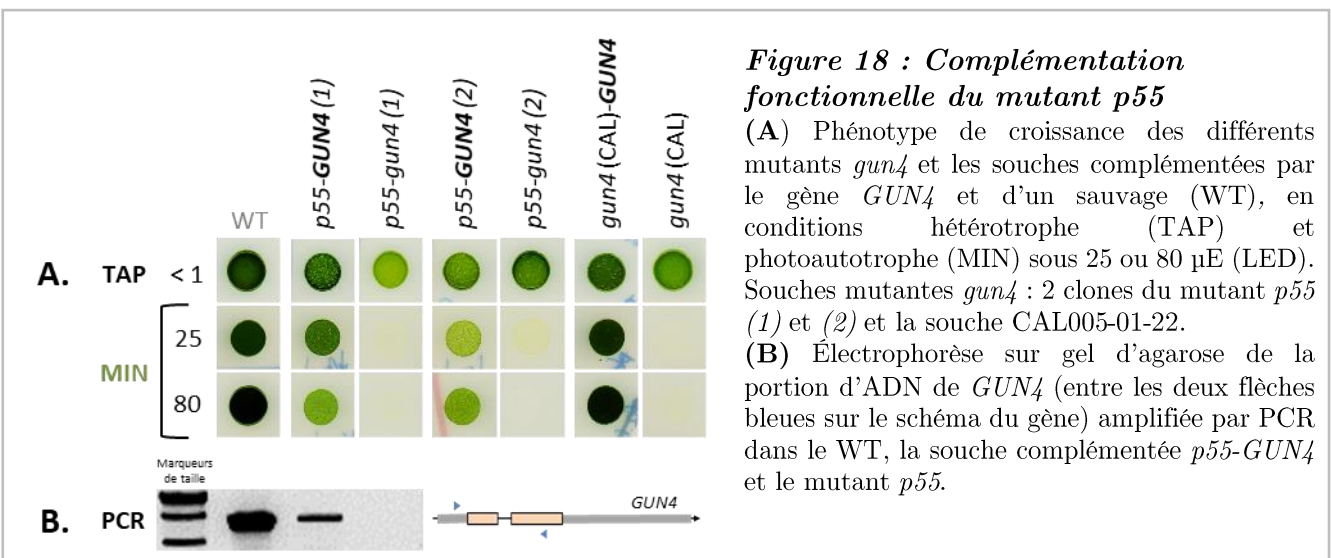
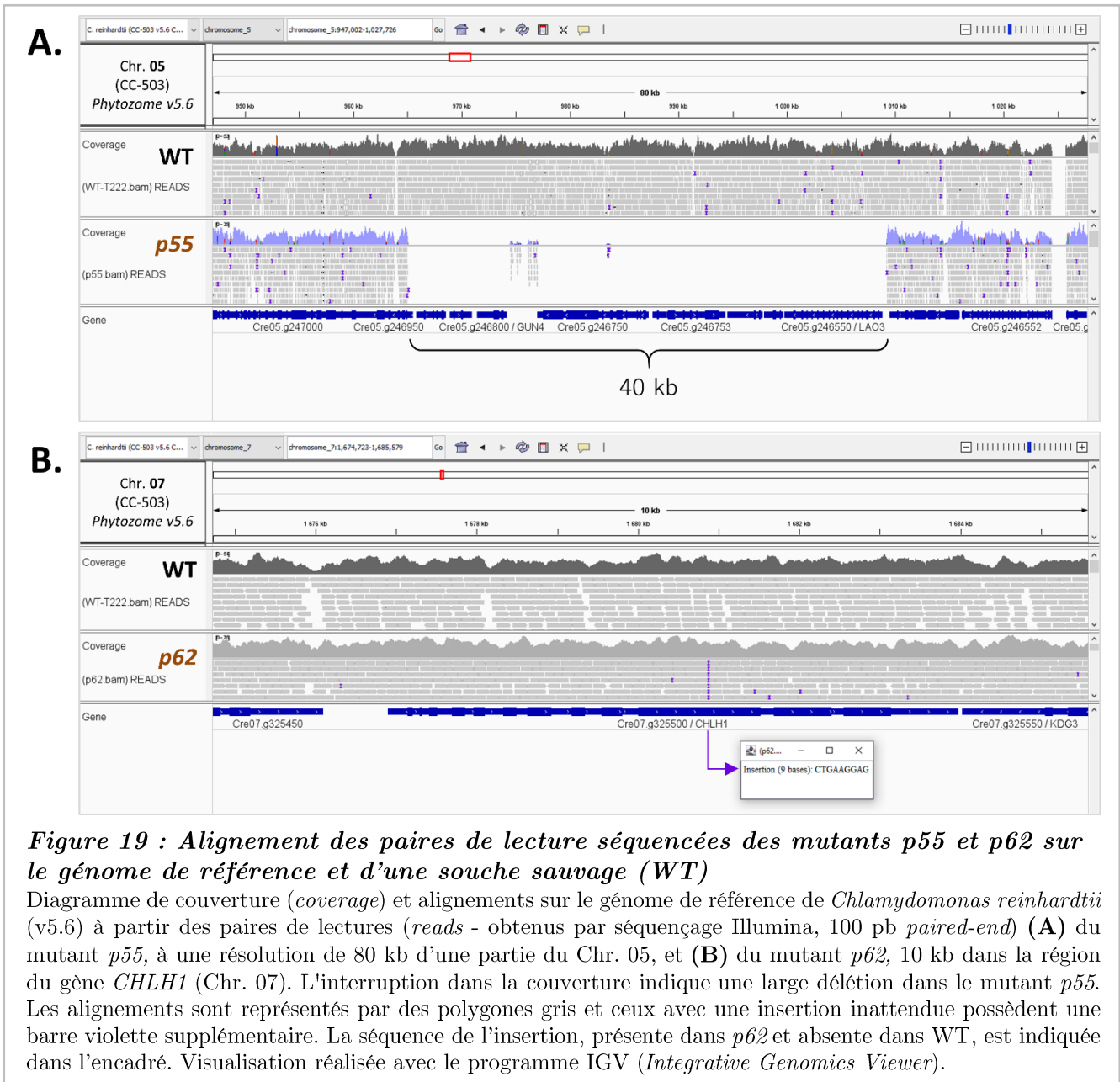
Comme il a été évoqué précédemment et selon son spectre d'action, la protoporphyrine IX est le pigment responsable, celui-ci présente effectivement des pics d'absorption autour de 410, 510 et 530 nm (*Figure 17-D*).



**Figure 17 : Effet de la longueur d'onde sur la croissance cellulaire**

Cultures du mutant *p55* et d'une souche sauvage (WT), (A) en condition hétérotrophe (à l'obscurité), (B) en condition mixotrophe et (C) en condition phototrophe ; les cultures en (B) et (C) sont réalisées à différentes longueurs d'ondes et d'intensités (LED). 5  $\mu$ L de suspensions ajustées à  $4.10^6$  cellules/mL sont déposés sur milieu TAP (A et B) ou MIN (C), puis incubés pendant 7 jours. Lampe fluo : Lampe fluorescente blanche.

(D) Spectres d'absorption de la Chl *a*, Chl *b* et protoporphyrine IX en lumière visible ; source : PhotoChem (Taniguchi et al, 2018).



Une comparaison de la composition en pigments a été réalisée en utilisant la technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les résultats (*ANNEXE 1*) ont montré que le mutant *p55* accumulait une grande quantité de protoporphyrine IX par rapport à une souche sauvage. De plus, la complémentation par une version sauvage du gène *GUN4* chez le mutant a permis de supprimer cette accumulation. Ainsi, la photosensibilité des cellules *p55* est exaltée en présence d'oxygène mais dépend également de la longueur d'onde de la lumière de croissance, due à l'accumulation de protoporphyrine IX.

### 2.3. Identification des mutations

Pour identifier les mutations causales dans ces souches, une analyse génétique préliminaire a été réalisée afin de déterminer leur origine génomique. En croisant ces mutants avec une souche sauvage puis en étudiant l'hérédité parentale en suivant la distribution du phénotype dans la descendance, nous avons pu conclure que ces deux mutations étaient nucléaires (*Figure 13-B*).

Ensuite, les génomes complets de ces mutants ont été séquencés et les gènes candidats impliqués ont été identifiés sur la base de séquençages comparatifs des génomes des mutants et d'une référence sauvage.

#### 2.3.1. Le mutant *p55*

L'alignement des paires de lecture (*reads*) de *p55* sur le génome de référence (*Chlamydomonas reinhardtii*, Phytozome - v5.6) révèle une délétion d'environ 40 kilobases du chromosome 05 (*Figure 19-A*). Cette délétion a entraîné la perte de 9 gènes (*Tableau 3*). Parmi ces gènes, on retrouve *GUN4* (Cre05.g246800) qui est connu pour être le régulateur de la magnésium-chélatase (Mg-Ch) (Brzezowski et al, 2014; Formighieri et al, 2013).

La complémentation fonctionnelle de la mutation dans le mutant *p55* a été réalisée avec succès. Après amplification de la séquence génomique du gène *GUN4* puis co-transformation par électroporation avec le gène *aphVIII* (gène de résistance à la paromomycine, utilisé comme moyen de pré-sélection), le phénotype sauvage (pigmentation vert foncé, capacité à croître en forte lumière) a pu être restauré chez le mutant *p55* complémenté (*Figure 18*)



**Tableau 3 : Liste des gènes perdus dans le mutant *p55***

Identifiant, nom et description des différents gènes absents dans *p55* (informations obtenus sur le portail du JGI, Phytozome, v5.6). La localisation a été déterminée par 2 programmes de prédiction, TargetP & Predalgo.

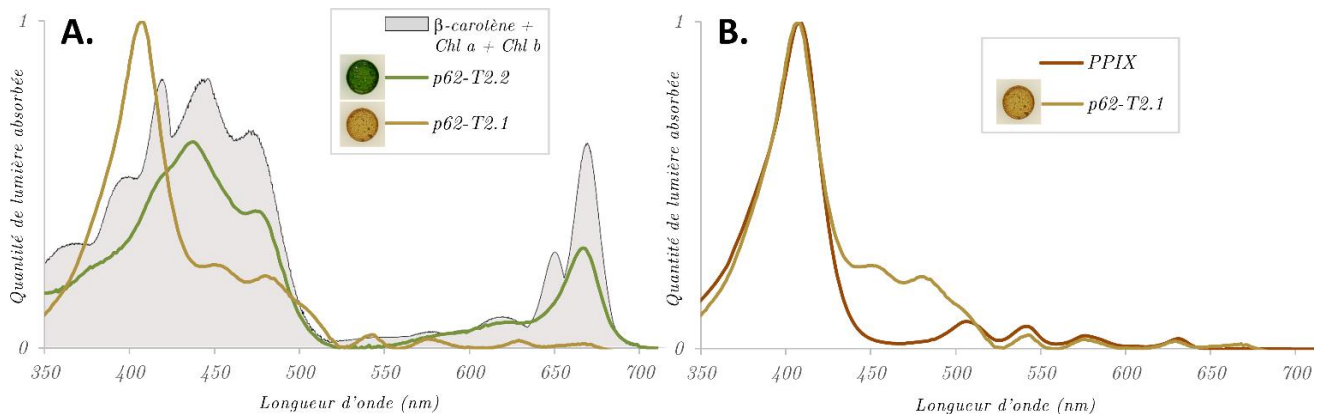
Identifiant du gène	GÈNE	Description - information	localisation (TargetP & Predalgo)
Cre05.g246900	?	Cupredoxin-like domain	M
Cre05.g246850	?		SP
Cre05.g246800	<b>GUN4</b>	<b>Tetrapyrrole-binding protein</b>	<b>C</b>
Cre05.g246750	?	In <i>Viridiplantae</i> = soluble starch synthase 3, chloroplast precursor	<b>C</b>
Cre05.g246752	?		O
Cre05.g246753	?		SP
Cre05.g246650	?	ZINC FINGER CCHC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 24	M
Cre05.g246600	?	Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain/regulation of transcription	M
Cre05.g246550	LAO3	L-amino-acid oxidase	O

C (Chloroplaste) ; M (Mitochondrie) ;  
SP (voie des vésicules sécrétoires, *Secretory Pathway*) ; O (Autre, *Other*)

**2.3.2. Le mutant *p62***

Concernant ce mutant, celui-ci présente une insertion de 9 nucléotides dans le gène *CHLH1* (Cre07.g325500 - v6.1) (*Figure 19-B*) qui code pour une des trois protéines qui constituent cette même enzyme (Mg-Ch) (Brzezowski et al, 2016). Cette insertion de 9 nucléotides se situe dans le 10<sup>ème</sup> exon et plus précisément au milieu (ou à la suite) de 2 répétitions de 9 nucléotides. L'insertion s'ajoute en réalité au nombre de répétitions puisque sa séquence nucléotidique est exactement la même que celle des répétitions. Nous avons observé que le phénotype de ce mutant est encore plus prononcé que celui de *p55* (pigmentation jaune-brun à l'obscurité et ne survivait pas en présence d'une lumière moyennement modérée - *Figure 13-A*). À la suite d'un croisement avec une souche sauvage, la descendance en tétrade présentait une ségrégation 2:2 de ce phénotype (*Figure 13-B*). Parmi ces descendants, nous avons comparé les spectres d'absorption entre deux clones, l'un présentant une pigmentation de type sauvage -vert- et l'autre au phénotype mutant -jaune/brun- (*Figure 20-A*). En comparant le spectre du clone vert à ceux des pigments majoritairement présents dans des cellules photosynthétiques (Chl *a*, Chl *b* et  $\beta$ -car), nous constatons que le spectre du clone vert correspond à ce que l'on attend, avec la présence des différents pics d'absorption de ces pigments. Sa composition pigmentaire est

conforme à celle d'un type sauvage. En revanche, le second clone ne présente pas les différents pics d'absorption correspondant aux chlorophylles, mais il montre une légère absorption dans la plage spectrale bleue/bleu-vert (entre 400 et 500 nm), qui correspond aux carotènes. Ce qui est particulièrement surprenant, c'est la présence d'une forte absorption avec un pic à 400 nm dans son spectre. De plus, on observe d'autres pics, plus petits aux longueurs d'onde de 545, 575 et 630 nm, qui correspondent parfaitement aux pics du spectre de la protoporphyrine IX, comme illustré dans la *Figure 20-B*.



**Figure 20 : Spectre d'absorption du mutant *p62***

(A) Des cellules de deux clones d'une tétrade (issue de *p62* x WT) au phénotype opposé et cultivées sur milieu TAP solide à l'obscurité, ont été placées directement entre deux lames en verre. L'acquisition de leur spectre d'absorption a été réalisée avec un spectrophotomètre (VARIAN CARY 50 Bio). La courbe grise représente la somme des spectres d'absorption des Chl *a*, Chl *b* et le β-carotène. (B) Le spectre du clone jaune-brun est comparé à celui de la protoporphyrine IX (PPIX).

La complémentation fonctionnelle a également été réalisée dans ce mutant mais aucun clone ayant un phénotype sauvage n'a été obtenu. Nous avons observé au cours de ces expériences de transformation, que la souche mutante évoluait. Une culture de *p62*, qui avait subi une transformation par électroporation avec uniquement l'ADN du gène *aphVIII*, montrait des colonies avec un phénotype sauvage dans des conditions qui devaient normalement être délétères pour ce mutant (forte lumière).

Afin de s'assurer que ce n'était pas la transformation elle-même qui rendait ce mutant susceptible à une réversion génétique (comme la perte des 9 nucléotides insérés dans le gène *CHLH1*), une étude génétique et phénotypique du mutant a été menée (*ANNEXE 2A et 2B*).

À la suite de cette étude génétique, nous avons conclu que le mutant *p62* présentait une instabilité de la mutation empêchant une complémentation fonctionnelle et ne pouvait être inclus dans la suite de ces travaux

Ces mutants sont alléliques à d'autres mutants déjà caractérisés chez *Chlamydomonas* : *chlh1* et *brs-1* (Chekounova et al, 2001; Wang et al, 1974) – qui présentent chacun une mutation ponctuelle (insertion) dans la partie codante du gène *CHLH1* (exon 9 et exon 10, respectivement) introduisant un codon stop prématuré – et *gun4* (CAL005-01-22) et *gun4-II* (Formighieri et al, 2012; Grovenstein et al, 2013) – mutants d'insertion dans le gène *GUN4*. Ces 4 mutants présentent des caractéristiques semblables à *p62* et *p55* : ils sont extrêmement photosensibles, ont moins de chlorophylles par rapport au type sauvage (50% pour *gun4* et moins de 1% pour les 2 autres) et accumulent de la protoporphyrine IX (jusqu'à 100 fois plus). Comme évoqué précédemment, l'accumulation de molécules de chlorophylle non liées et des formes intermédiaires de la chlorophylle produit des espèces réactives de l'oxygène (ROS) à la lumière et c'est notamment le cas de la protoporphyrine IX, substrat de la Mg-Ch. Concernant le mutant *gun4*, en particulier, il a été montré qu'il présentait des altérations dans la composition et l'accumulation des protéines photosynthétiques, et en particulier du PSI, en réponse aux conditions lumineuses (Formighieri et al, 2012).

### 3. Caractérisation des antennes dans le mutant *p55*, altéré dans la synthèse de chlorophylles

Nous avons donc également exploré les propriétés photosynthétiques fonctionnelles et biochimiques du mutant *p55-gun4* dans différentes conditions de lumière.

#### 3.1. Propriétés fonctionnelles des photosystèmes et des antennes

Des mesures d'émission de fluorescence ont été réalisées à partir de cultures en milieu TAP des mutants *p55* et *CAL-gun4*, ainsi que d'une souche sauvage (WT), en phase exponentielle ( $2-4 \cdot 10^6$  cell/mL), soit en très faible lumière ( $5 \mu\text{mol de photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  -  $\mu\text{E}$ ), soit sous une lumière d'intensité modérée ( $20 \mu\text{E}$ ). La taille d'antenne du PSII de ces souches a pu être estimée à partir de ces mesures (en présence d'un inhibiteur du PSII, le DCMU), en déterminant le  $t_{1/2}$  sur la montée de fluorescence jusqu'au  $F_M$ .

Des mesures de séparations de charge ont également été effectuées pour déterminer le rapport PSII/PSI dans ces souches, ainsi que la taille de leur antenne PSI. Ces mesures ont été réalisées à l'aide d'un Joliot-Type Spectrophotometer -JTS-10-, comme précédemment pour les mutants BF4 et *p71* – *Partie A* de ce chapitre. La taille de l'antenne est déterminée à partir de la pente de la courbe de saturation pour la séparation de charge PSI, en présence d'inhibiteurs du PSII (voir section « Méthodes » dans (Bujaldon et al, 2020)).

Ainsi, les résultats regroupés dans le *Tableau 4* indiquent que le mutant *p55* présente un rendement de fluorescence et une taille d'antenne PSII similaires à ceux du WT lorsqu'il est cultivé sous une lumière de très faible intensité (5  $\mu\text{E}$ ). Le rapport PSII/PSI est également inchangé, comme dans le cas du mutant *CAL-gun4* (CAL005-01-22). Et enfin, des mesures de transition d'états ont également été réalisées et quelle que soit la lumière de culture, la migration des LHCII mobiles (entre PSII et PSI, ou état 1 et état 2, voir *Chapitre 3 – Partie A-1.1.1*) est préservée. Cette transition d'état est également observable sur les spectres d'émission de fluorescence réalisés à froid (77 K) et à partir de suspensions du mutant *p55* (et de sa souche complétée *p55:GUN4*) placées à l'état 1 ou à l'état 2 (*Figure 21-A*). Sur ces spectres, le pic d'émission à 685 nm correspond à celui du PSII, et 712 nm à celui du PSI. Ainsi, en comparaison à l'état 1, on observe une augmentation de l'émission du PSI à l'état 2 (et par rapport à celui du PSII).

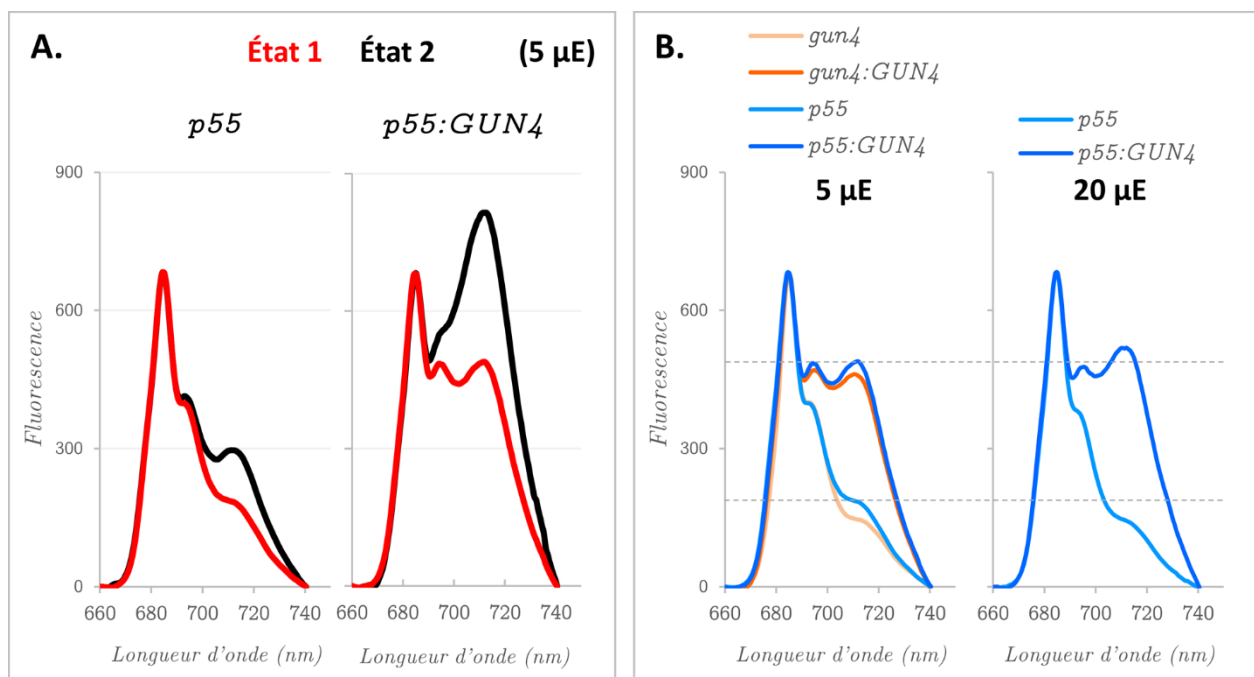
**Tableau 4 : Propriétés fonctionnelles des mutants *gun4***

La taille de l'antenne du PSII a été estimée à partir de la montée de fluorescence jusqu'au  $F_M$  ( $1/t_{1/2}$ ) en présence de DCMU ( $10^{-5}$  M), et la taille de l'antenne du PSI a été estimée spectroscopiquement à partir de des courbes de saturation à la lumière du signal ECS à (520–546) nm en présence d'inhibiteurs de PSII (DCMU et hydroxylamine). DL, faible luminosité (5  $\mu\text{E}$ ) ; ML, luminosité modérée (20–50  $\mu\text{E}$ ). R, conditions de réduction analogues à l'état 2 ; O, conditions d'oxydation analogues à l'état 1.

		WT	<i>p55-gun4</i>	<i>CAL-gun4</i>
<b><math>F_V / F_M</math></b>	<b>5 <math>\mu\text{E}</math></b>	<b>0.75 <math>\pm</math> 0.01</b>	<b>0.77 <math>\pm</math> 0.01</b>	<b>0.78</b>
	20 $\mu\text{E}$	0.74 $\pm$ 0.02	0.36	n/d
<b>relative PSII antenna size</b> Basée sur l'augmentation de fluorescence (DCMU)	<b>5 <math>\mu\text{E}</math></b>	<b>1</b>	<b>1.06 <math>\pm</math> 0.04</b>	n/d
	20 $\mu\text{E}$	1	0.80	
<b>State transitions</b> $F_M$ (R) / $F_M$ (O)	<b>5 <math>\mu\text{E}</math></b>	<b>0.56 <math>\pm</math> 0.08</b>	<b>0.62 <math>\pm</math> 0.04</b>	<b>0.49 <math>\pm</math> 0.08</b>
	20 $\mu\text{E}$	0.60	0.59	n/d
<b>relative PSI antenna size</b> Basée sur les courbes de saturation à la lumière du signal ECS	<b>5 <math>\mu\text{E}</math></b>	<b>1</b>	<b>0.61</b>	n/d
<b>PSII / PSI</b>	<b>5 <math>\mu\text{E}</math></b>	<b>0.90</b>	<b>0.92</b>	<b>0.89</b>

Cependant, précédemment nous avons observé (*Paragraphe 2.1*) que dans ces mêmes conditions de culture (5  $\mu\text{E}$ ) sa teneur en chlorophylle était réduite (environ 30%). Cette diminution pourrait être attribuée à une diminution en LHCI. En effet, dans ces conditions, *p55* présente une taille d'antenne PSI significativement plus faible (60%) par rapport au WT. Nous observons également une forte diminution du pic à 712 nm (PSI) sur les spectres d'émission de fluorescence des deux mutants *gun4* (*p55* et *CAL-gun4*) par rapport à leur souche complémentée (*Figure 21-B*).

Lorsque *p55* est cultivé sous une lumière d'intensité modérée (20  $\mu\text{E}$ ), et que sa teneur en chlorophylle est encore diminuée, la taille d'antenne PSII ne présente qu'une légère diminution, bien que le rapport  $F_V/F_M$  soit beaucoup plus bas chez ce mutant par rapport au WT. Dans ces conditions, l'ensemble des complexes photosystèmes semble être altéré.



**Figure 21 : spectres d'émission de fluorescence à basse température (77 K) des mutants *gun4***

À partir de cellules cultivées en milieu TAP sous une lumière blanche et d'intensité de 5  $\mu\text{E}$  ou 20  $\mu\text{E}$ . **(A)** Comparaison entre les spectres de cellules placées à l'état 1 et à l'état 2 (cultures à 5  $\mu\text{E}$ ), du mutant *p55* et de la souche complémentée (*GUN4*). **(B)** Comparaison entre les deux conditions de culture à 5  $\mu\text{E}$  et 20  $\mu\text{E}$ . Le mutant indiqué *gun4* correspond à *CAL-gun4*. Les spectres sont normalisés sur leur amplitude à 685 nm (fluorescence des centres PSII).

## 3.2. Accumulation des protéines PS et LHC

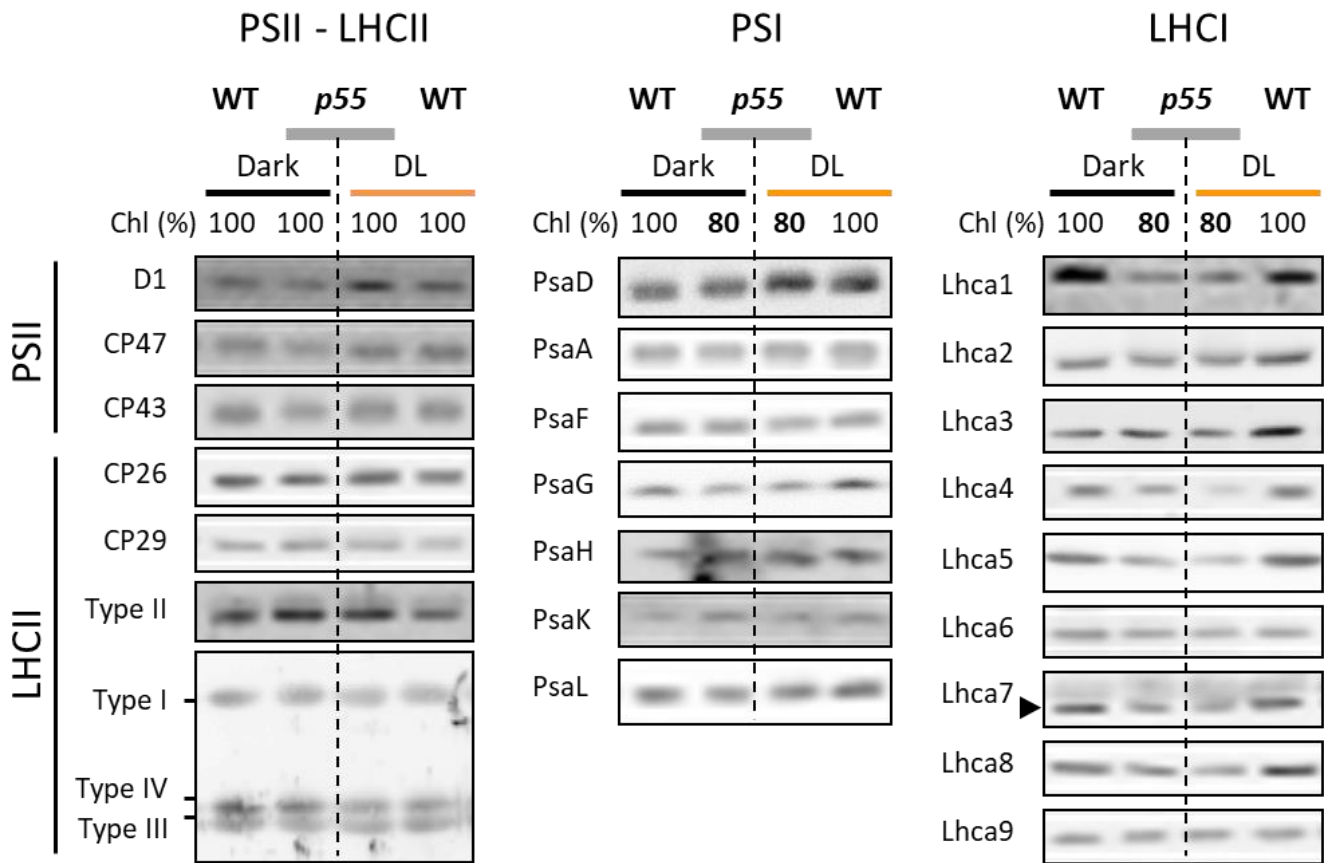
Nous avons ensuite examiné l'accumulation de plusieurs protéines dans ce mutant *p55*, en comparaison avec une souche sauvage, sous différentes conditions de culture.

### 3.2.1. Obscurité et faible lumière

Dans un premier temps, cette évaluation a été réalisée dans des conditions où l'effet délétère de la lumière est limité, en l'absence de lumière (obscurité) et à une très faible intensité lumineuse (5  $\mu$ E). À partir de membranes purifiées du thylakoïde de cellules cultivées dans ces deux conditions, l'accumulation des protéines des deux photosystèmes et des protéines antennes (LHC) a été étudiée en utilisant la méthode d'immuno-empreinte (utilisation d'anticorps spécifiques), après la séparation des protéines sur un gel dénaturant (SDS-PAGE).

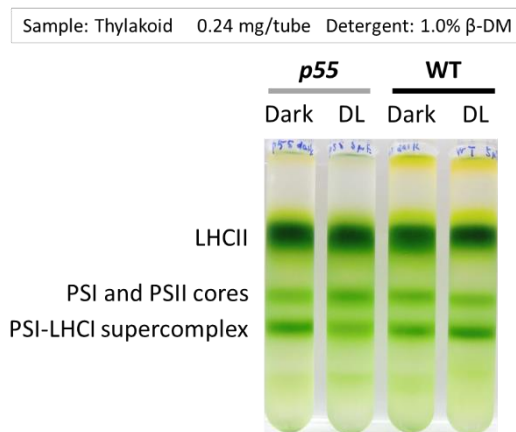
Les résultats (*Figure 22*) montrent que la souche de référence WT et le mutant *p55* accumulent des quantités similaires de protéines PSII, LHCII et PSI, sur la base de la chlorophylle, que ce soit en croissance à l'obscurité ou en lumière faible. En revanche, les cellules *p55* accumulent une quantité réduite de la plupart des protéines LHCI. En absence de lumière pendant la croissance, en comparaison avec le WT, *p55* montre une forte réduction de LHCA1, tandis que les protéines LHCA4, LHCA5, LHCA7 et LHCA8 sont légèrement réduits. En croissance en lumière faible, cette réduction des protéines LHCI est plus prononcée, notamment avec une perte supplémentaire de LHCA2 et LHCA3. Seules LHCA6 et LHCA9 restent inchangées dans les cellules *p55*.

Nous avons également observé la composition des supercomplexes PS-LHC, après solubilisation des membranes des thylakoïdes et ultra-centrifugation sur un gradient de saccharose (*Figure 23*). Dans le cas du mutant *p55*, on peut ainsi observer une forte diminution de la quantité de supercomplexes PSI-LHCI par rapport à celle des cœurs du PSI lorsque les cellules sont cultivées en faible lumière par rapport à l'obscurité, tandis que la souche sauvage montre une tendance opposée.



**Figure 22 : Accumulation des protéines au niveau des thylakoïdes du mutant *p55***

Immunoblots à partir de membranes des thylakoïdes (100% correspondant à 1 µg de chlorophylle) du mutant *p55* et d'un témoin de type sauvage (WT) cultivés en TAP à l'obscurité ou en faible lumière (5 µE). Les protéines ont été fractionnées par électrophorèse sur un gel de gradient de polyacrylamide 8M urée 12-18% et sondées avec les anticorps comme indiqués : D1 (PsbA sous-unité du Photosystème II) ; CP47/CP43, (PsbB/PsbC, sous-unités de l'antenne interne du Photosystème II) ; LHCII de Type I, II, III, and IV (LhcbM3/4/6/8; LhcbM5; LhcbM2/7; LhcbM1, protéines de l'antennes collectrice du photosystème II de type Majeur) ; CP26/CP29 (LHCB5/LHCB4, LHCII de type mineure) ; PSAD, PsaA, PSAF, PSAG, PSAH PSAK, PSAL (sous-unités du photosystème I) ; LHCA1-9 (protéines de l'antennes collectrice du photosystème I - LHCI). *Dark* : Obscurité, *DL* : 5 µE.



**Figure 23 : Séparation des complexes PSI, PSII et PSI-LHCI sur gradient de sucrose.**

À partir de cultures cellulaires à l'obscurité (*Dark*) ou sous une faible lumière (*DL* - 5 µE), les extraits de membranes du thylakoïde solubilisées en présence de détergent (n-dodecyl-β-D-maltoside, les protéines sont séparées par ultra-centrifugation (141,000 g) sur un gradient de sucrose (0.1 - 1.3 M).

### 3.2.2. Variation des protéines photosynthétiques lors de la transition de l'obscurité à une luminosité intense

La quantité de la plupart des protéines de la photosynthèse dans l'échantillon WT a légèrement augmenté au cours d'une exposition de 6 heures à une forte lumière, en raison de l'augmentation du nombre de cellules. En revanche, toutes les protéines de la photosynthèse, à l'exception de LHCII, ont été éliminées chez *p55* au cours de la même période d'exposition.

Cette expérience illustre la dégradation des protéines dans les membranes thylakoïdes, résultant de l'action des espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par la protoporphyrine IX.

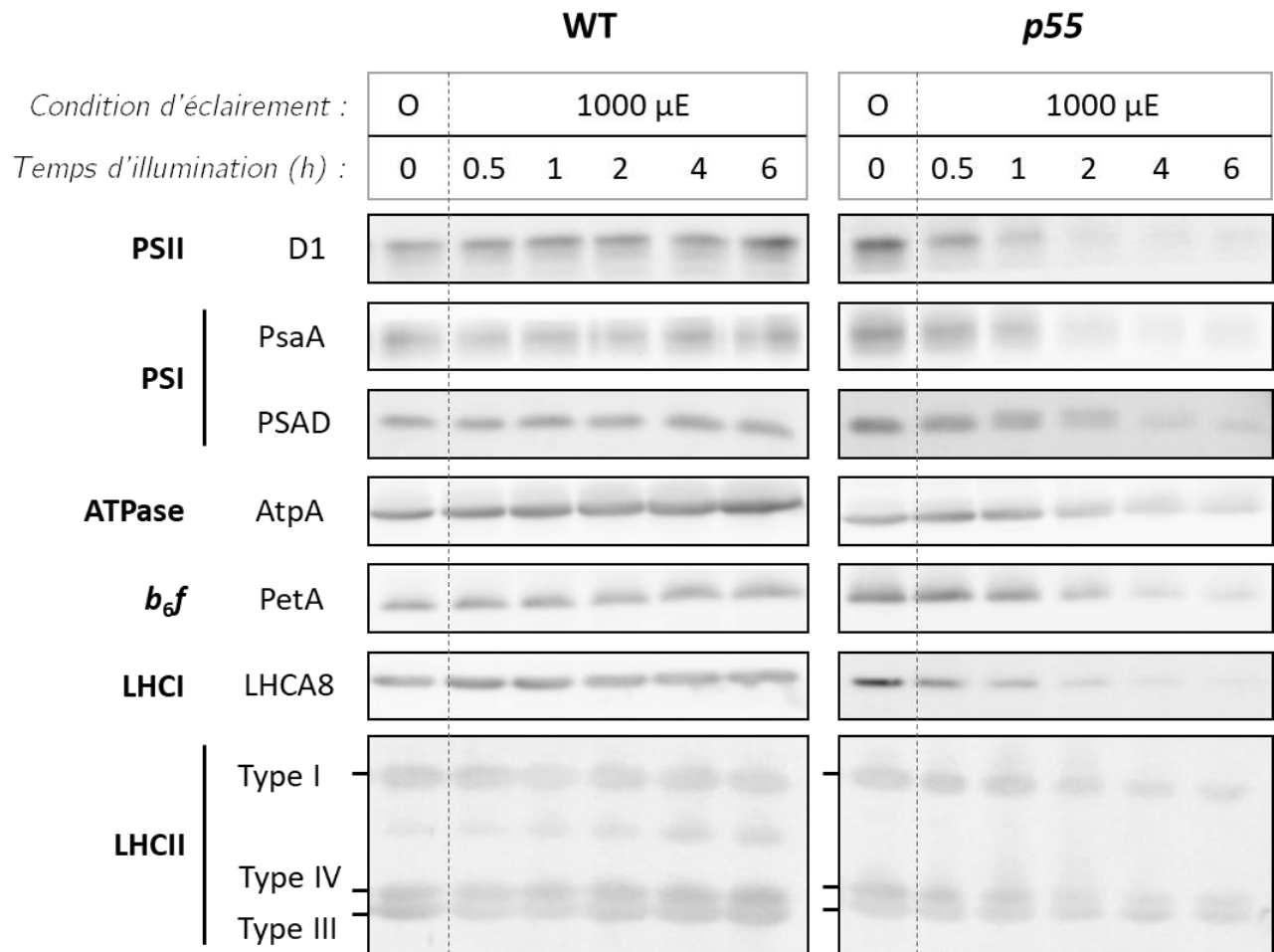


Figure 24 : Évolution de l'accumulation des protéines photosynthétiques au cours d'une exposition à une lumière intense (1000  $\mu$ E)



## 4. Conclusion

Nous avons identifié une nouvelle souche mutante (*p55*) dépourvue de la protéine GUN4, présentant des similitudes phénotypiques avec d'autres mutants *gun4* déjà caractérisés (Formighieri et al, 2012; Grovenstein et al, 2013).

Nous avons observé que, malgré une diminution de la synthèse de la chlorophylle, la stoechiométrie des protéines photosynthétiques PSII, LHCII et PSI dans le mutant *p55* ne présentait pas de changements significatifs. Ces observations ont également été vérifiées par des mesures fonctionnelles, en comparaison avec un WT, où seule l'antenne du PSI chez *p55* était réduite. Cela suggère une coordination étroite entre la synthèse et l'assemblage des composants de ces protéines porteuses de chlorophylle.

La diminution spécifique de l'antenne PSI en l'absence de GUN4 pourrait être associée à la perte de la régulation rétrograde plastidiale qui couple la synthèse de la chlorophylle à la transcription des gènes LHC (Formighieri et al, 2012). Cependant, cette régulation ne semble pas affecter l'accumulation des protéines LHCII.

Nos observations ont mis en évidence la capacité du mutant *p55* à se développer dans des conditions environnementales spécifiques. En particulier en l'absence d'oxygène ou en utilisant une région spécifique du spectre lumineux pour la culture. Dans ces conditions particulières, c'est-à-dire en l'absence de stress oxydatif et lorsque les régions spectrales ne sont pas absorbées par la protoporphyrine IX, ce mutant peut même croître à des niveaux d'intensités normalement délétères pour ces mutants *gun4*.

Ces observations mettent en lumière l'importance de la coordination entre la synthèse de la chlorophylle, l'assemblage des protéines photosynthétiques et la régulation rétrograde plastidiale dans la réponse du mutant *p55* aux conditions environnementales particulières, offrant ainsi de nouvelles perspectives pour la compréhension de ces mécanismes complexes.

## 5. Discussion et perspectives

Les études antérieures portant sur des mutants *gun4* chez les plantes supérieures ou *Chlamydomonas* et ses interactions avec la biosynthèse de la chlorophylle, et celle des complexes antennaires, mettent en évidence le rôle central de la protéine GUN4 dans ces processus (Brzezowski et al, 2014; Formighieri et al, 2012; Larkin et al, 2003; Peter & Grimm, 2009; Zhang et al, 2021). Chez *Chlamydomonas*, l'absence ou l'altération de GUN4 n'a pas pour conséquence une régulation réduite de la biosynthèse de la chlorophylle, en l'absence de lumière, mais au contraire, une augmentation des niveaux de transcrits (trois fois plus élevée que le WT) de tous les gènes impliqués dans cette voie (Brzezowski et al, 2014; Formighieri et al, 2012). Cependant GUN4 joue un rôle crucial dans l'accumulation de la sous-unité catalytique de Mg-Ch, CHLH1 (Davison et al, 2005; Larkin et al, 2003). En absence de lumière, un mutant *gun4* présente une accumulation de la protéine CHLH1 réduite, atteignant seulement la moitié des niveaux observés dans une souche sauvage. Lorsqu'il est cultivé sous une lumière modérée, d'intensité équivalente à 30  $\mu\text{E}$ , le mutant montre une chute d'accumulation significativement plus marquée (Zhang et al, 2021). Cette dernière constatation est en accord avec ce que nous avons observé lorsque les conditions de culture étaient favorables au mutant *p55*. En effet, en condition hétérotrophe et en présence de lumière bleue (465 nm) ou orange-rouge (>590 nm) d'une intensité modérée (50  $\mu\text{E}$ ), ce mutant a présenté une croissance équivalente à celle observée à l'obscurité (*Figure 17-A*). Il serait intéressant de déterminer le contenu en pigment (ainsi que les produits intermédiaires), les niveaux d'accumulation des différentes protéines PSII, PSI et LHC, lorsque *p55* est cultivé sous ces lumières bleue ou rouge et en comparaison à une culture à l'obscurité. Est-ce que ces lumières spécifiques, en absence de GUN4, permettent également l'assemblage de tous les complexes photosynthétiques ?

Cette interaction entre GUN4 et CHLH1 est essentielle pour la biosynthèse efficace de la chlorophylle, soulignant ainsi l'importance de la coordination des protéines impliquées dans cette voie métabolique. La réduction significative de l'accumulation de CHLH1 chez le mutant *gun4* sous une lumière modérée (Zhang et al, 2021) révèle l'impact de GUN4 sur la régulation de la biosynthèse de la chlorophylle dans des conditions variables. De plus, les protéines LHC sont également affectées par l'absence de GUN4, ce qui soulève des questions sur les mécanismes de régulation plus larges impliquant GUN4.

Les deux voies de biosynthèse des Chl et d'importation des apoprotéines LHC sont étroitement liées, et en particulier dans l'insertion et l'assemblage des complexes PS-LHC. En effet, nous avons détecté la présence d'une enzyme de la voie de biosynthèse de la chlorophylle liée à la translocase ALB3.1 (*Partie A - 2*). De plus, une récente étude a également montré que la protéine cpSRP43, une des protéines constituant le complexe SRP, qui, en plus de faciliter le transport des protéines LHC dans le chloroplaste, joue également un rôle de chaperonne pour GluTR, CHLH et GUN4. Son activité est renforcée en cas de choc thermique. Il a été suggéré que l'action de cpSRP43 garantit un approvisionnement suffisant en chlorophylle pour les protéines porteuses de chlorophylle, notamment les protéines LHC, lors de conditions environnementales changeantes (Ji et al, 2021).

Ainsi ces différentes observations soulèvent des questions fondamentales sur les mécanismes moléculaires complexes sous-jacents à l'interaction entre GUN4, CHLH1 et les protéines LHC. Comprendre ces mécanismes est essentiel pour une meilleure compréhension de la biosynthèse de la chlorophylle et des processus de capture de la lumière. De plus, elles peuvent avoir des implications pour la conception d'organismes photosynthétiques plus résistants et adaptatifs, capables de maintenir un métabolisme de la chlorophylle efficace dans des environnements changeants. Par exemple, une surexpression de GUN4 permet une augmentation de l'activité de la Mg-Ch entraînant une production en chlorophylle plus importante (Peter & Grimm, 2009).

# Chapitre 3 - Régulation de la capture de l'énergie lumineuse et de la photochimie

## Introduction

Dans le précédent chapitre, nous avons étudié la biogenèse des antennes photosynthétiques, en nous concentrant spécifiquement sur le mécanisme d'importation et d'assemblage des protéines antennaires avec les molécules de chlorophylle au sein des membranes des thylakoïdes. Nous avons également abordé le sujet de la photosensibilité cellulaire en cas de perturbation de la voie de biosynthèse des chlorophylles.

Ce nouveau chapitre se penchera plus particulièrement sur la régulation de la capture de l'énergie lumineuse lorsque celle-ci est en excès. Cette régulation est essentielle pour préserver le bon fonctionnement et l'intégrité de la cellule.

Dans la nature, les organismes photosynthétiques sont constamment confrontés à des variations en termes de qualité et de quantité de lumière, et ils doivent adapter le fonctionnement de leurs complexes photosynthétiques. Pour faire face à ces fluctuations lumineuses, les plantes et les algues ont donc développé divers mécanismes visant à trouver un équilibre entre l'optimisation de la capture de lumière aux faibles intensités et la réduction des effets néfastes lorsque la quantité de photons absorbés dépasse la capacité de prise en charge par le processus photosynthétique (Erickson et al, 2015; Wobbe et al, 2016).

### 1. Les principaux mécanismes d'acclimatation à la lumière

Nous avons précédemment évoqué les mécanismes de photoprotection lorsque les organismes photosynthétiques étaient exposés à des conditions lumineuses intenses (voir *Chapitre 1 - 4. Régulation de la photosynthèse & Acclimatation*). Ces processus, généralement associés au photosystème II (Horton et al, 1996), sont évalués par l'extinction non photochimique (NPQ, pour *non photochemical quenching*) de la fluorescence chlorophyllienne. Parmi ces mécanismes NPQ, nous allons plus particulièrement nous intéresser à deux d'entre eux : le quenching énergétique (qE) et les transitions d'état (qT).

Ces derniers interviennent au niveau des complexes d'antennes photosynthétiques LHCI. Nous verrons également que ces processus interagissent étroitement et que leur efficacité ainsi que les acteurs impliqués diffèrent selon les organismes photosynthétiques.

### 1.1. Le quenching énergétique (qE)

Le quenching énergie-dépendant, qE, constitue la composante prédominante du NPQ en se distinguant à la fois par l'importance de quantité d'énergie dissipée, ce qui assure une protection efficace contre les effets nocifs d'une intensité lumineuse excessive, et par sa rapidité d'induction, qui s'opère en quelques secondes à quelques minutes.

Ce processus se produit principalement au niveau des complexes antennaires du photosystème II (LHCII) (Horton et al, 1996). Lorsque l'absorption de la lumière dépasse la capacité de la photosynthèse, cela se traduit par une hausse du gradient de pH dans les thylakoïdes des chloroplastes (le lumen devenant plus acide et le stroma plus alcalin) (Gilmore et al, 1998). Cette acidification déclenche rapidement une régulation de la capture de photons par des modifications de pigments (activation du cycle des xanthophylles) et par des changements de conformation de certaines sous-unités du PSII, qui varient selon les organismes.

#### 1.1.1. Le cycle des Xanthophylles

Chez les plantes et les algues vertes, le cycle des xanthophylles fait référence à la conversion réversible, dépendante de la lumière, de la violaxanthine en ses formes dé-époxydées, l'anthéroxanthine et la zéaxanthine. Les réactions de dé-époxydation sont catalysées par la violaxanthine dé-époxydase (VDE), qui est soluble dans le lumen et active à un faible pH. La réaction inverse, lorsque le pH redevient neutre ou basique, la conversion de zéaxanthine à violaxanthine est catalysée par la zéaxanthine époxydase (ZEP) (Yamamoto, 1979). Sous une intensité lumineuse excessive, la chaîne photosynthétique transfère activement des protons dans le lumen, ce qui réduit le pH. La VDE est alors activée, augmentant la concentration en zéaxanthine, ce qui favorise la dissipation de l'énergie du photon sous forme de chaleur, préservant ainsi l'intégrité du PSII (Baker, 2008).

#### 1.1.2. Les protéines PSBS, LHCSR.

Les protéines impliquées dans le processus qE ont d'abord été identifiées chez *Arabidopsis thaliana*. La caractérisation d'un mutant, *npq4* -qui présentait un faible NPQ, tout en conservant des niveaux de xanthophylles normaux- a révélé que la protéine PSBS était essentielle dans le NPQ-qE (Li et al, 2000). Cette protéine est une sous-unité du PSII,

appartenant à la famille des LHC mais diffère en structure. PSBS comporte quatre hélices membranaires (contre 3 pour la plupart des LHC) et présente deux résidus glutamate situés dans la boucle luménale, jouant le rôle de senseur du pH et favorisant la dissipation de chaleur (Li et al, 2004a). Chez *Arabidopsis*, le gène codant pour la protéine PSBS est constamment actif et son expression augmente lors d'une exposition à une lumière intense (Li et al, 2004b; Yang et al, 2022).

Le gène *PSBS* est présent dans l'ensemble de la lignée verte (Bonente et al, 2008). Chez *Chlamydomonas*, deux gènes codant pour PSBS ont également été identifiés (*PSBS1* et *PSBS2*), (Merchant et al, 2007). Ces protéines homologues possèdent également les deux résidus glutamate coté luménal qui diffèrent uniquement par un acide aminé. Cependant, dans cette micro-algue, l'implication de PSBS dans le NPQ n'est pas encore complètement déterminée.

Chez *Chlamydomonas*, un mutant incapable de réaliser un NPQ-qE a également été identifié, nommé *npq4*, tout comme chez *Arabidopsis*. Cependant, la mutation responsable de ce défaut résulte de la délétion de deux gènes, *LHCSR3.1* et *LHCSR3.2*, qui codent pour la protéine LHCSR3 (pour *Light harvesting complex stress-related 3*) (Peers et al, 2009). De plus, la capacité de *Chlamydomonas* à effectuer un NPQ-qE nécessite une exposition préalable à une lumière intense, ce qui induit en même temps l'expression des protéines PSBS ainsi que d'une autre protéine, LHCSR1. Contrairement à PSBS, les protéines LHCSR sont des complexes pigments-protéines. Toutefois, la régulation de l'expression de ces protéines diffère. Des études chez *Chlamydomonas* ont montré que l'expression de LHCSR1 et de PSBS prédomine sous une exposition aux UV-B, tandis que l'expression de LHCSR3 est davantage induite sous des conditions de lumière blanche, bleue ou rouge de haute intensité (Allorent et al, 2016; Tilbrook et al, 2016).

## 1.2. Les transitions d'état (qT)

Nous avons vu que dans le processus de photosynthèse oxygénique, les deux centres réactionnels du PSII et du PSI sont connectés à leurs antennes et sont reliés en série à travers la chaîne de transport d'électrons. Cependant, les spectres d'absorption diffèrent entre le PSI et le PSII, entraînant un déséquilibre d'excitation. En effet, les complexes LHC ont une composition pigmentaire distincte. Les LHCI sont enrichi en Chl *a*, absorbant dans la région du rouge lointain, tandis que les LHCI sont enrichi en Chl *b* dont l'absorption maximale se situe à des longueurs d'onde plus courtes, dans la région de la lumière rouge autour de

650 nm. Malgré cela, l'efficacité globale du flux d'électrons n'est pas réduite grâce à un processus d'adaptation appelé les **transitions d'état** (Wollman, 2001).

Les transitions d'état ont été découvertes il y a environ 50 ans chez des organismes photosynthétiques unicellulaires (Bonaventura & Myers, 1969; Murata, 1969). Elles ont été décrites comme étant un mécanisme de régulation du transfert d'excitation entre les deux photosystèmes (Murata, 1970). Leurs expériences ont montré que l'exposition à une lumière principalement absorbée par le PSII (lumière 2 – 645 nm) entraînait en quelques minutes une redistribution de l'excès d'énergie d'excitation en faveur du PSI, qui est initialement limitant en vitesse mais qui devient plus efficace pour capturer l'énergie lumineuse (diminution de l'émission de fluorescence accompagnée d'une augmentation de la production en oxygène). À l'inverse, l'exposition à une lumière préférentiellement absorbée par le PSI (lumière 1 – 710 nm), rend le PSII plus sensible, entraînant une augmentation de l'émission de fluorescence. Les états résultant de l'exposition à la lumière 1 et à la lumière 2 sont appelés État 1 (ou *State 1*) et État 2 (ou *State 2*) respectivement. Il a été découvert plus tard que les organismes contenant des Chl *a/b* présentaient une hétérogénéité latérale dans la répartition des deux photosystèmes (Andersson & Anderson, 1980; Vallon et al, 1986). Situés le long des membranes des thylakoïdes, le PSI est présent dans les lamelles du stroma (régions non appressées), tandis que le PSII est enrichi dans les empilements de grana. Cela signifie que l'énergie d'excitation lumineuse doit être redistribuée sur plusieurs centaines de nanomètres dans les membranes du thylakoïde.

L'avancée suivante a été réalisée par Bennett et Allen au début des années 1980. Ils ont montré qu'il y a une réduction du pool de plastoquinone due à une surexcitation du PSII par rapport au PSI, et cela conduit à l'activation d'une protéine kinase spécifique. Cette kinase phosphoryle spécifiquement les protéines LHCII, qui sont par la suite déplacées latéralement dans la membrane des thylakoïdes et se connectent au PSI (Allen et al, 1981; Bennett, 1977). Cela a fourni le cadre du modèle actuel des transitions d'état (*Figure 25*) et a déclenché une recherche biochimique pour trouver la kinase. Cette recherche a surtout été menée sur deux organismes modèles : *Chlamydomonas reinhardtii* et *Arabidopsis thaliana*.

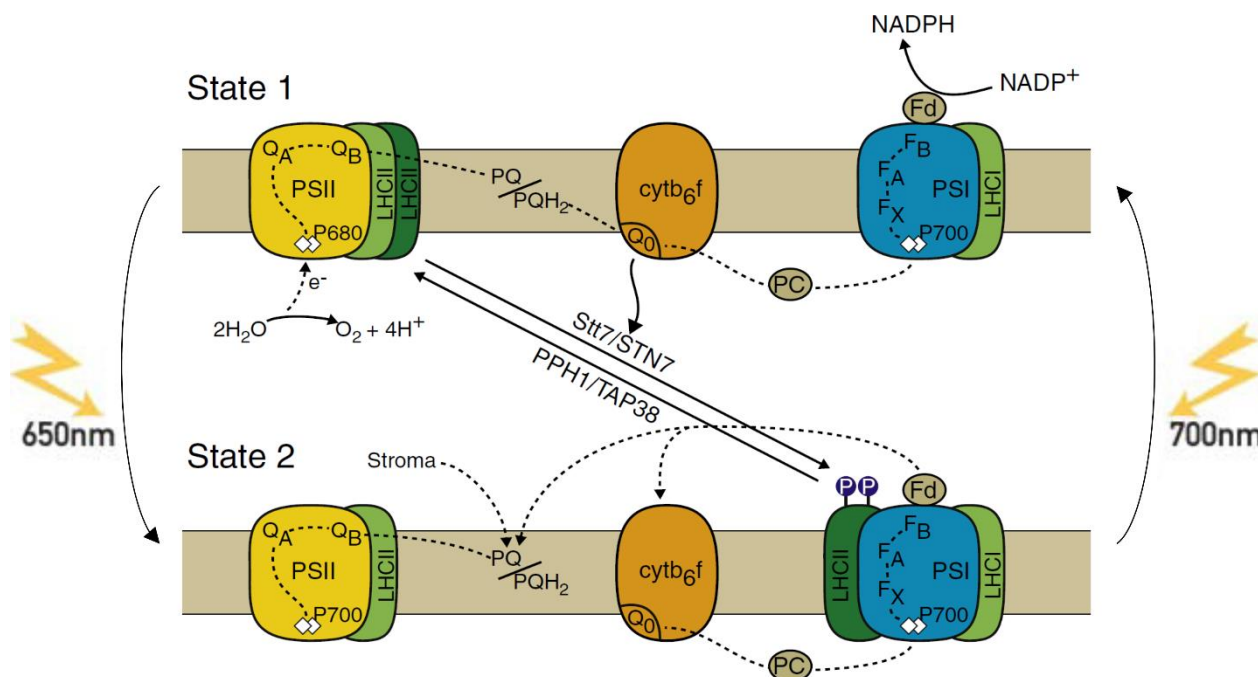
Une découverte majeure a montré que le complexe cytochrome *b<sub>6</sub>f* joue un rôle crucial dans les transitions d'état. Des mutants de *Chlamydomonas* dépourvus de ce complexe sont incapables de phosphoryler les LHCII et restent dans l'état 1 (Wollman & Lemaire, 1988). Une analyse approfondie a révélé que ce n'est pas l'état redox du pool de plastoquinone qui importe pour activer la kinase, mais une interaction avec la face stromale du complexe

cytochrome *b<sub>6</sub>f* accompagnée de l'ancrage de plastoquinol au site Q<sub>o</sub> du complexe cytochrome *b<sub>6</sub>f* (Dumas et al, 2017; Vener et al, 1995; Zito et al, 1999).

Par la suite, l'utilisation de la technique de mutagenèse insertionnelle a permis d'isoler des mutants de transition d'état chez *Chlamydomonas*, les mutants *stt*, pour *state transition* (Fleischmann et al, 1999) et également le mutant *stm1* (Kruse et al, 1999). Ces mutants ne montrent pas de phosphorylation des protéines LHCII en conditions réduites et restent bloqués à l'état 1. L'identification du gène muté dans le mutant *stt7* a montré que le gène *STT7* codait pour une kinase à sérine/thréonine chloroplastique (Depège et al, 2003), et sa caractérisation a mis en évidence son implication dans la phosphorylation des LHC. *Arabidopsis* possède une kinase à sérine/thréonine homologue à STT7, STN7, qui est également essentielle pour la phosphorylation des LHCII et la transition vers l'état 2 (Bellafiore et al, 2005). Au cours d'une transition état 1-état 2, jusqu'à 80% des LHCII sont mobiles lors des transitions d'état chez *Chlamydomonas* (Delosme et al, 1996), contre seulement 20 à 25% des LHCII chez les plantes supérieures (Allen, 1992).

Ce processus de transition état 1-état 2 est réversible, la transition état 2-état 1 repose sur l'action de phosphatases. Chez les plantes supérieures, la protéine PPH1/TAP38 (pour PROTEIN PHOSPHATASE1/ THYLAKOID ASSOCIATED PHOSPHATASE 38) est principalement responsable de la déphosphorylation des LHCII (Pribil et al, 2010; Shapiguzov et al, 2010). Chez *Chlamydomonas*, il existe également une protéine homologue à PPH1/TAP38, CrePPH1, et en association avec la protéine CrPBCP, ces deux phosphatases protéiques agissent ensemble pour contrecarrer STT7 en déphosphorylant les LHCII, favorisant ainsi la transition vers l'état 1 (Cariti et al, 2020).





**Figure 25 : Schéma des transitions d'état**

La transition de l'état 1 à l'état 2 se produit lorsque l'état redox du pool de plastoquinone (PQ) est réduit, par exemple, suite à une excitation préférentielle du PSII par rapport au PSI (lumière 2 – 650 nm). L'amarrage du plastoquinol (PQH<sub>2</sub>) sur le site Q<sub>o</sub> de Cytb<sub>6</sub> f entraîne l'activation de la protéine kinase STT7/STN7, qui permet de phosphoryler LHCII. Les LHCII phosphorylés se dissocient du PSII et migrent vers le PSI. Lors d'une excitation préférentielle de PSI par rapport à PSII, la kinase est inactivée et la phosphatase PPH1/TAP38 déphosphoryle LHCII, qui retourne à PSII. Schéma adapté de (Rochaix, 2011a).

Ainsi lorsque la capacité photochimique de l'appareil photosynthétique est saturée, les mécanismes de photoprotection sont activés afin de dissiper l'énergie lumineuse absorbée en excès. L'ensemble de ces composants, étant associé au PSII, peut être mesuré par une réduction de la fluorescence de la chlorophylle *a* (extinction de fluorescence chlorophyllienne non photochimique).

## 2. La mesure du NPQ

La capacité de NPQ est déterminée sur un échantillon en mesurant la variation de fluorescence au cours du temps et sous un éclairage modéré (dit actinique) (Ruban, 2016; Zaks et al, 2013). L'acquisition peut s'effectuer en utilisant un système d'imagerie de fluorescence de la chlorophylle (exemple du SpeedZen 200, JBeamBio). Le maximum de fluorescence ( $F_M$ ) est obtenu par des impulsions lumineuses (pulses) de forte intensité et de courte durée (<sec). Dans cette situation, l'extinction non-photochimique n'est pas amorcée si l'impulsion lumineuse est courte. Sur une feuille intacte et adaptée environ 30 min à l'obscurité (Figure 26), la fluorescence minimale ( $F_0$ ) est déterminée en présence de la lumière détectrice (lorsque l'immense majorité des centres PSII sont ouverts) puis, à la suite d'un pulse saturant (2700  $\mu$ E - 250 ms), lorsque tous les centres se ferment, produit une émission

maximale de fluorescence ( $F_M$ ). Lorsqu'une lumière modérée (220  $\mu\text{E}$ ) (actinique) est appliquée sur cette feuille (*Figure 26* - courbe rouge), les pulses saturants suivants produisent une fluorescence réémise plus faible, correspondant au rendement maximal de fluorescence sous éclairage ( $F_M'$ ), conséquence de la rapide saturation de la photosynthèse et de l'activation des processus de dissipation de la chaleur. Avant d'exposer cette feuille à cette lumière modérée, une première mesure sans cet éclairage continu, a été réalisée au préalable (représentée par la courbe grise) et on ne constate effectivement pas de variation du  $F_M$ . L'estimation du NPQ (global) est basée sur la différence entre  $F_M$  et  $F_M'$  et est calculée de la manière suivante :  $(F_M - F_M') / F_M'$ . À la coupure de la lumière, sur la courbe rouge, il est possible de suivre la récupération de l'émission de fluorescence, dont la cinétique permet de résoudre les contributions de chaque mécanisme d'extinction au processus d'extinction global. La composante dont la récupération à l'obscurité est la plus rapide (ici de quelques minutes) est généralement attribuée à qE, puis intervient le qT et enfin qI, qui nécessite des heures, voire des jours, pour récupérer (Walters & Horton, 1991).

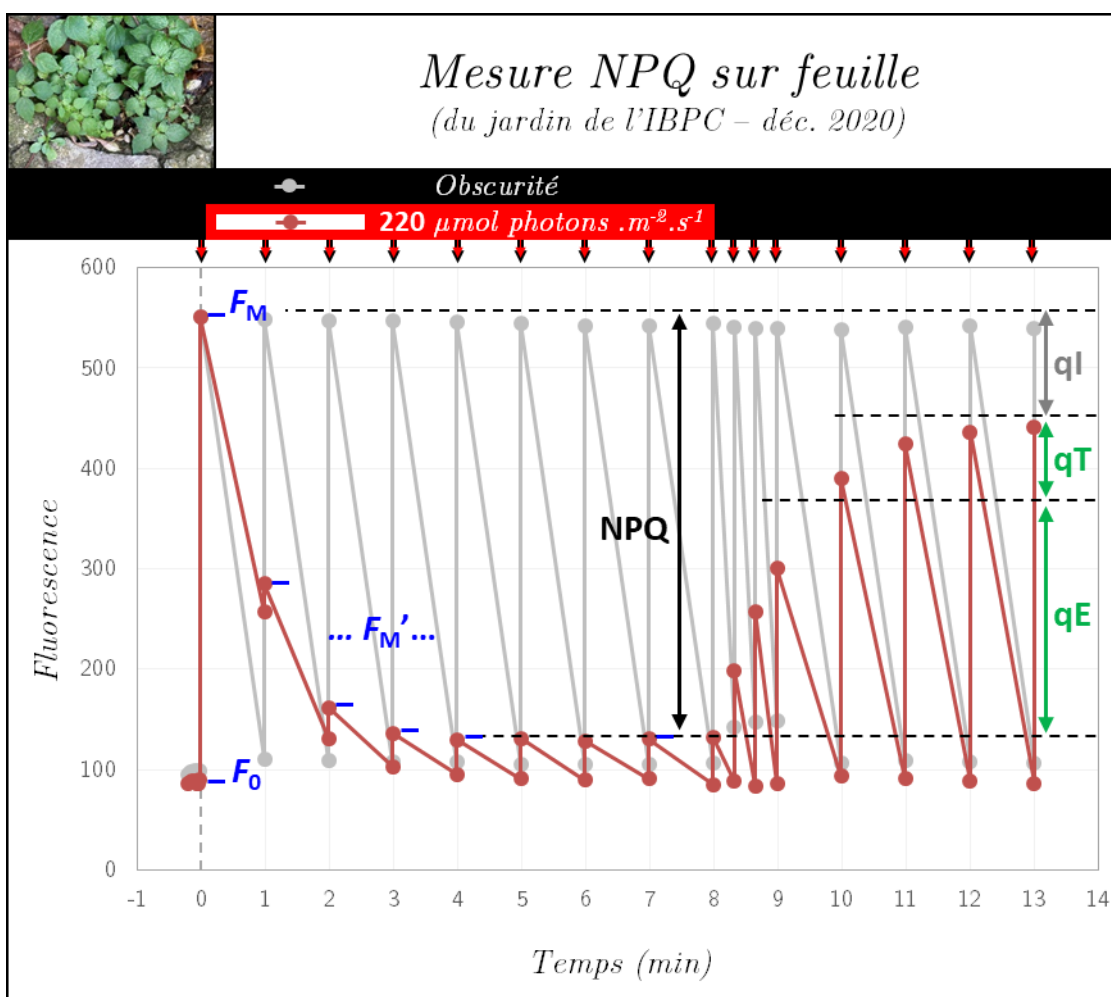
#### Mesure du NPQ chez *Chlamydomonas reinhardtii*

Lorsque cette séquence de mesure est appliquée sur une suspension de *Chlamydomonas*, cultivée sous une lumière modérée (environ 50  $\mu\text{E}$ ) et après une période d'adaptation à l'obscurité et sous agitation (pour être dans un état 1, voir *Partie A* de ce chapitre), la courbe de fluorescence obtenue permet à peine d'identifier une induction de NPQ-qE (*Figure 27-A*). Comme précédemment, l'application d'une lumière actinique doit normalement permettre l'observation de l'induction du NPQ suivie d'une relaxation à sa coupure. En *Figure 27*, la courbe rouge présente une légère diminution du  $F_M$ , avec une relaxation très faible, est observée. Cela est dû au fait que, chez *Chlamydomonas*, l'induction de la protéine LHCSR3, qui est majoritairement impliquée dans le quenching énergétique (voir *Paragraphe 1.1.2* de ce chapitre), nécessite une exposition préalable à une lumière intense (Peers et al, 2009). En revanche, l'observation d'une légère diminution du  $F_M$  peut être ici attribuée à une transition état 1-état 2. Avec ce système de mesure de l'émission de fluorescence qui autorise l'acquisition de plusieurs échantillons simultanément, les cellules sont placées dans un puits (peu profond et assez large pour permettre des échanges gazeux, mais sans agitation) qui ne semble pas permettre d'assurer une condition aérobie complète. Une première mesure sans cet éclairage continu (représentée par la courbe grise) montre déjà une diminution du  $F_M$  au cours du temps, qui peut être attribuée à la sédimentation des cellules et favoriser ainsi une anaérobiose pour une partie des cellules. Cette condition entraîne une transition

vers l'état 2. Et en présence de lumière, cette diminution est amplifiée, par l'induction du qT sous l'effet de la lumière intense mais probablement aussi par une phototaxie négative des cellules, celles-ci se retrouvent en majorité au fond du puits. Ces observations seront certainement à prendre en considération lors de la détermination du NPQ-qE chez *Chlamydomonas*.

Ainsi, un traitement forte lumière (FL) de la suspension cellulaire précédemment utilisée, permet d'observer une induction du NPQ-qE (*Figure 27-B*, courbe rouge). Comme précédemment montré (Allorent et al, 2016; Allorent et al, 2013), la courbe d'acquisition de la variation de fluorescence, sur des suspensions pré-traitées FL, présente cinq phases distinguables (notées I, II, III, IV et V, voir *Figure 27-B*) : pendant l'exposition à une lumière actinique (470  $\mu\text{E}$ ), on observe une rapide diminution de  $F_M$  due à qE (phase I), suivie d'une brève augmentation transitoire provoquée par une transition (par la composante qT) vers un état 1 (phase II). Une fois que cette transition d'état aurait atteint sa saturation, la composante qE reprend le dessus, entraînant une nouvelle diminution de  $F_M'$  (phase III). Pendant la période d'obscurité qui suit, on observe une rapide montée des pics de  $F_M'$ , correspondant à la relaxation rapide de qE (phase IV), suivie d'une nouvelle baisse de  $F_M'$  due à une transition qT plus lente vers l'état 2 (phase V).

Une contribution de la composante qT est ainsi observable dès l'ouverture de la lumière actinique, et cela malgré une adaptation préalable des cellules à l'obscurité avec une agitation vigoureuse (conditions favorisant une transition vers l'état 1). Cette observation d'une transition vers l'état 1 est encore plus nette en présence d'un inhibiteur du PSII (DCMU), la fluorescence maximale augmente lors du passage obscurité – lumière (courbe brune). L'estimation de la composante NPQ-qE est alors déterminée pendant la relaxation, après coupure de la lumière actinique (phase IV), où le qT ne semble pas entraver sa contribution. Il est à noter que cette relaxation est très rapide chez *Chlamydomonas* (dès les 10 premières secondes).



**Figure 26 :** Évolution de l'émission de fluorescence sur une feuille intacte en fonction du temps et des conditions d'éclairement.

Courbe rouge : mesure de fluorescence lors d'un passage de l'obscurité à une lumière modérée ( $220 \mu\text{E}$ ) pendant 8 min, puis retour à l'obscurité. La cinétique de récupération à l'obscurité permet d'identifier les trois principales composantes du NPQ. Courbe grise : acquisition en absence de la période d'éclairement de 8 min. Mesures réalisées à l'aide du système d'imagerie de fluorescence Speedzen 200 (JBeamBio). Le bandeau supérieur représente les périodes d'obscurité (noir), d'éclairement (rouge) et les pulses saturants (flèches rouge).

**Figure 27 :** Évolution de l'émission de fluorescence sur *Chlamydomonas reinhardtii* en fonction du temps et des conditions d'éclairement.

Les mesures ont été réalisées sur une souche sauvage de référence, notamment pour le NPQ (CC-124), cultivée en milieu TAP sous agitation (150 rpm) et sous une faible lumière ( $50 \mu\text{E}$ ). À partir d'une culture en phase exponentielle, les cellules sont récupérées par centrifugation, re-suspendues en milieu MIN à une concentration de  $2.10^7$  cellules/mL puis replacées sous agitation à  $50 \mu\text{E}$  pendant 30 min. Avant une mesure de fluorescence au SpeedZen, la culture est agitée vigoureusement (350 rpm) à l'obscurité pendant 15 min. Protocole d'après (Allorent et al, 2013). La séquence de mesure est similaire à celle utilisée en *Figure 26*, seule l'intensité de lumière appliquée pendant la mesure a changé ( $470 \mu\text{E}$ ).

(A) Acquisitions obtenues directement après la période d'adaptation à l'obscurité, avec (courbe rouge) ou sans (courbe grise) période de 8 min de forte lumière pendant la mesure. Une mesure avec éclaircissement a également été réalisée en présence d'un inhibiteur du PSII, le DCMU (courbe brune). (B) Un traitement forte lumière ( $500 \mu\text{E}$ ) a été pratiqué sur les cellules avant la période d'adaptation à l'obscurité. Le NPQ-qE est déterminé de la manière suivante (sur courbe rouge) :  $(F_{M'(D)} - F_{M'(L)}) / F_{M'(L)}$ .

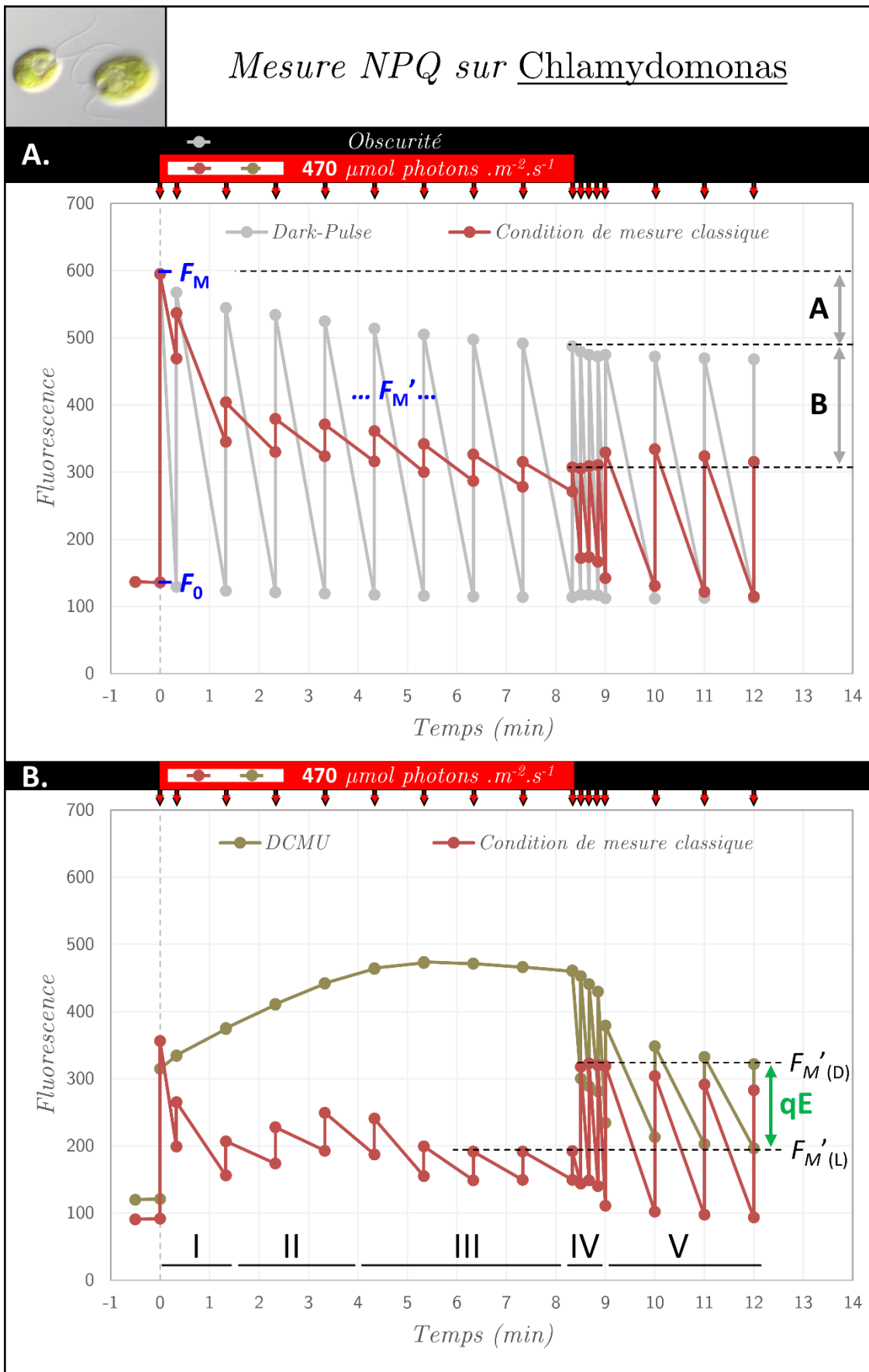


Figure 27 (légende, voir page précédente)

## Partie A. Une étude fonctionnelle et génétique des mutants de transitions d'état (*stt7*)

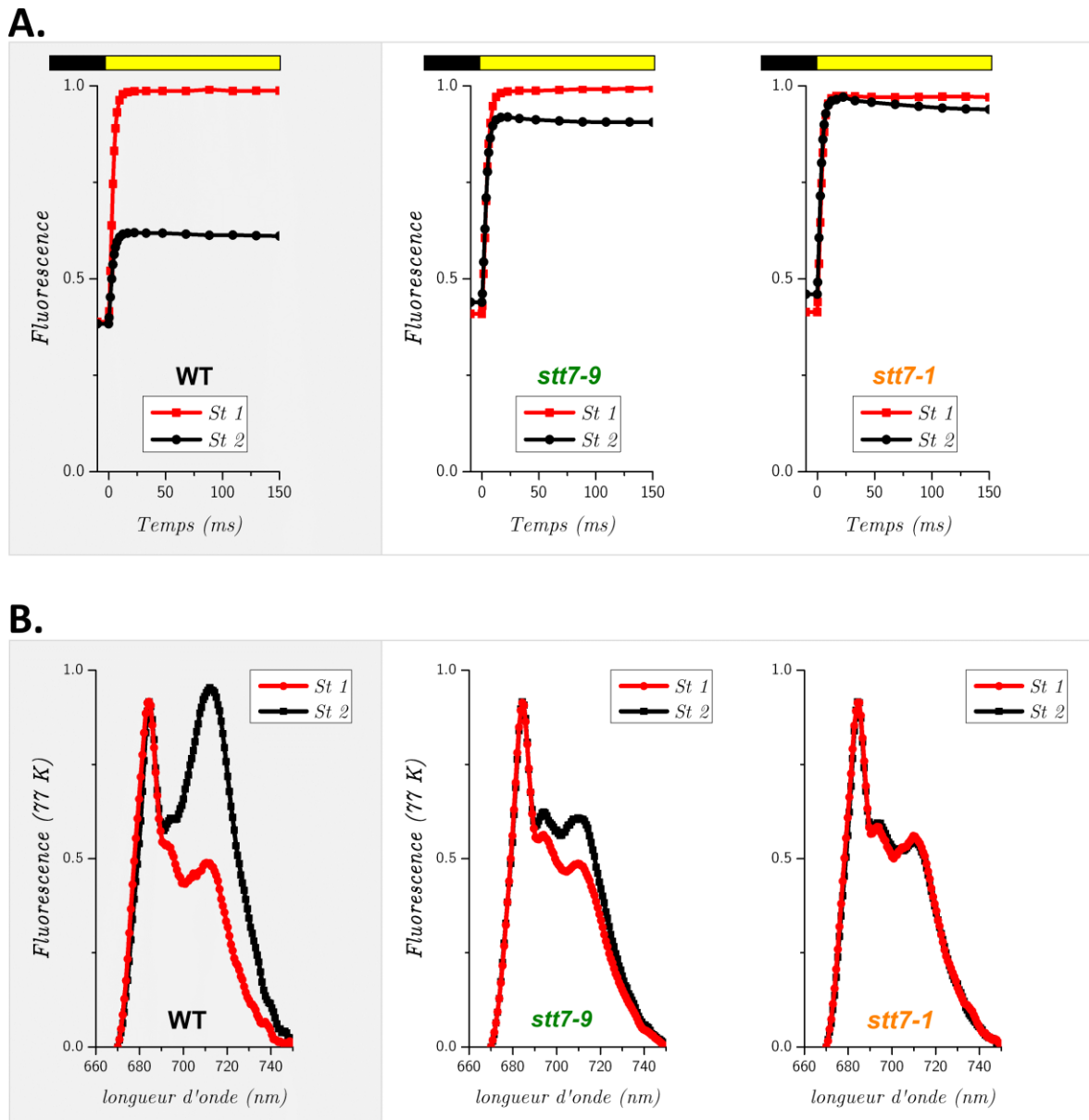
Des mutants de transitions d'état chez *Chlamydomonas reinhardtii* ont été disponibles dès la fin des années 90 (Fleischmann et al, 1999; Kruse et al, 1999) et ont depuis été largement utilisés par de nombreux laboratoires pour mieux caractériser ce mécanisme des transitions d'état (Lemeille et al, 2010; Lemeille et al, 2009; Madireddi et al, 2014) mais également d'autres phénomènes ou processus en l'absence de l'activité kinase de STT7 (Cardol et al, 2009; Dumas et al, 2017; Younas et al, 2023). Il existe en particulier deux mutants alléliques, *stt7-1* et *stt7-9*, qui ont été isolés au laboratoire de Jean-David Rochaix en Suisse et présents dans notre collection de mutants de photosynthèse à l'IBPC. Ces mutants sont issus d'une mutagénèse insertionnelle par transformation ce qui a conduit à inactiver, ou à modifier, l'expression du gène *STT7*. Ainsi, le premier mutant obtenu et caractérisé (Fleischmann et al, 1999), *stt7-1*, présente « un réarrangement de l'ADN » qui s'est produit au locus *STT7* (Depège et al, 2003) et *stt7-9* accumulerait « une protéine de fusion de 100 kD de STT7 et, probablement, de ARG7 » (Bergner et al, 2015). Néanmoins, ces mutants, sélectionnés sur leur incapacité à réaliser des transitions d'état, présentent quelques inconvénients qui seront traités au cours de cette *Partie A*.

### 1. Caractérisation phénotypique des mutants *stt7*

Dans cette partie, nous avons revisité ces mutants non pas pour remettre en cause tout ce qui a déjà été étudié et établi sur les transitions d'état chez *Chlamydomonas*, mais pour approfondir leur caractérisation fonctionnelle et génétique.

#### 1.1. Les mesures de transition d'état

Dans un premier temps, nous avons vérifié, chez ces mutants, leur aptitude, ou non, à réaliser des transitions d'état. Pour observer ce processus, nous avons utilisé les propriétés d'émission de fluorescence des chlorophylles. En effet, la fluorescence chlorophyllienne, émise à température ambiante, provient principalement des pigments associés au PSII. Comme le processus de transition d'état correspond à une redistribution latérale des protéines antennes transmembranaires entre le PSII et le PSI, la fluorescence maximale émise par un échantillon donné dépendra des conditions dans lesquelles il se trouve (état 1 ou un état 2).



**Figure 28 : Mesures des transitions d'état**

(A) émissions de fluorescence à température ambiante à partir de suspensions cellulaire traitées soit à l'état 1 soit à l'état 2, et (B) spectres d'émission de fluorescence à basse température (77 K). Les spectres sont normalisés sur leur amplitude à 685 nm (fluorescence des centres PSII). *St* : State ou état.

Les conditions expérimentales que nous avons utilisées qui conduisent au plus près de l'état 1 -où la plupart des protéines d'antenne LHCII sont connectées aux centres réactionnels du PSII- ou bien de l'état 2 -où une fraction significative (jusqu'à 80% (Delosme et al, 1996)) de ces LHCII est connectée aux centres PSI- sont les suivantes :

État 1 (St1 ou *State 1*) : une agitation vigoureuse est appliquée à l'échantillon, permettant ainsi d'oxyder le pool de plastoquinone (PQ), placé à l'obscurité, sans impliquer d'activité des photosystèmes. Dans ces conditions, le rendement maximum de fluorescence (obtenu par addition de DCMU dans l'échantillon juste avant la mesure) sera donc élevé.

État 2 (St2 ou *State 2*) : l'échantillon est placé à l'obscurité et en anaérobiose, condition obtenue par l'ajout dans le milieu d'une enzyme (glucose-oxydase) et de son substrat (glucose) dont la réaction enzymatique consomme de l'oxygène (Delepelaire & Wollman, 1985). Ces conditions vont ainsi favoriser une forte réduction du pool de PQ et ceci a pour conséquence une augmentation des protéines LHCII phosphorylées et connectées au PSI -ou une diminution des LHCII connectées au PSII. Le rendement maximal de fluorescence, dans ces conditions, sera donc diminué par rapport aux conditions à l'état 1.

Ainsi, des mesures de fluorescence maximale ( $F_M$ ) effectuées à partir d'une suspension d'une souche sauvage montrent bien cette différence entre ces deux traitements permettant d'atteindre l'état 1 ou l'état 2 (*Figure 28-A*). À partir de ces données expérimentales, il est possible de quantifier les transitions d'état (*Tableau 5*), qui correspond à une diminution de 60% du rendement maximum de fluorescence pour cette souche sauvage.

Ces mêmes mesures effectuées sur les mutants *stt7* confirment bien que ces mutants sont affectés dans les transitions d'état. C'est particulièrement vrai pour *stt7-1* qui est bloqué à l'état 1 quelles que soient les conditions expérimentales. Concernant *stt7-9*, celui-ci présente une diminution non négligeable du  $F_M$  à l'état 2 par rapport à l'état 1, soit une transition d'état de 10%.



**Tableau 5 : Quantification des mesures de transitions d'état**

Déterminée à partir des données présentées dans la *Figure 28*.

$F_M$  correspond à la fluorescence maximale (à température ambiante). F712 correspond au pic d'émission du PSI à 712 nm et F685 celui du PSII à 685 nm (à froid).

R, conditions réductrices, analogues à l'état 2 (St2) ; O, conditions oxydantes, analogues à l'état 1 (St1). (St pour State).

		WT	<i>stt7-9</i>	<i>stt7-1</i>
<b>A. à partir de l'émission de fluorescence à température ambiante</b>				
$\frac{F_M(O) - F_M(R)}{F_M(R)}$		<b>0.65</b>	<b>0.09</b>	<b>0.01</b>
<b>B. à partir des spectres d'émission de fluorescence à froid (77 K)</b>				
$F_{712} / F_{685}$	St1 (O)	0.53	0.53	0.61
	St2 (R)	1.04	0.66	0.60
$\frac{St2 - St1}{St1}$		<b>0.96</b>	<b>0.25</b>	<b>0.00</b>

Ces résultats obtenus à température ambiante nous renseignent principalement sur les changements de la taille d'antenne des centres PSII entre l'état 1 et l'état 2. L'observation d'un faible changement de rendement de fluorescence chez le mutant *stt7-9* ne permet cependant pas d'affirmer que cela corresponde bien à des transitions d'état. Pour en être certain, il faudrait vérifier qu'une diminution de la fluorescence spécifique du PSII s'accompagne d'une augmentation de celle du PSI. Cette observable peut être obtenue en réalisant des spectres d'émission de fluorescence sur les mêmes échantillons traités comme précédemment mais à basse température. Effectivement, dans ces conditions, à froid, le PSI émet de la fluorescence et cela permet également de séparer spectralement les contributions des deux photosystèmes, celle du PSII à plus faible longueur d'onde (avec un pic à 685 nm) et celle du PSI à plus grande longueur d'onde (pic à 712 nm). Le montage que nous utilisons présente cependant trop de variabilité entre deux mesures pour un même échantillon cellulaire, ne permettant pas de conclure si les variations de fluorescence spécifique des PS soient attribuables aux transitions d'état. Pour éviter ce type d'erreur, un standard interne pour la normalisation, exemple de la protéine fluorescente verte (GFP pour *Green fluorescent protein*), est ajouté aux suspensions (Girolomoni et al, 2019). Les mesures d'émission de fluorescence à froid sur les précédents échantillons n'ont pas été réalisées en présence d'un standard interne. Nous avons volontairement normalisé les spectres sur leur amplitude à

685 nm (correspondant au pic de fluorescence des centres PSII), en assumant que dans ces conditions de culture, d'incubation et de mesure, seul le mécanisme NPQ-qT est impliqué.

Ainsi, dans ces conditions, la souche de type sauvage montre une augmentation marquée de l'émission du PSI par rapport à celle du PSII lors d'une transition St1-St2 tandis que le mutant *stt7-1* ne présente aucun changement (*Figure 28-B*). En revanche, une augmentation de l'émission PSI, limitée mais significative, est observée avec le mutant *stt7-9*.

Ces deux mutants ne présentent donc pas tout à fait les mêmes caractéristiques concernant les transitions d'état. Le mutant *stt7-9* n'est pas complètement bloqué à l'état 1 comme *stt7-1*, alors qu'ils sont reportés être alléliques, c'est-à-dire que la mutation qui s'est produite par la transformation insertionnelle a eu lieu dans le même gène, *STT7*.

Ces caractéristiques phénotypiques sont cohérentes avec les précédentes caractérisations des mutations de ces deux mutants. Ils ont été isolés lors d'un criblage génétique de mutants d'insertion aléatoires obtenus par transformation d'une souche auxotrophe à l'arginine (*arg7*) avec un plasmide contenant le gène sauvage *ARG7* (Depège et al, 2003; Fleischmann et al, 1999). Le mutant *stt7-9* contient une insertion de *ARG7* au locus *STT7*, entraînant la production d'une protéine de fusion constituée de la partie N-terminale de *STT7* et de *ARG7*. Cette protéine de fusion, qui comporte le domaine catalytique de la kinase, conserve encore une activité kinase résiduelle (Bergner et al, 2015). L'allèle *stt7-1* présente un réarrangement génétique au locus *STT7*, sans liaison avec une insertion de *ARG7* (Depège et al, 2003), mais considéré comme mutant nul, bloqué à l'état 1 (Fleischmann et al, 1999).

## 1.2. Structure du gène *STT7*

Au vu de ces informations concernant les mutations qui se sont produites dans le gène *STT7*, notamment pour *stt7-1*, une caractérisation plus précise s'avérait nécessaire.

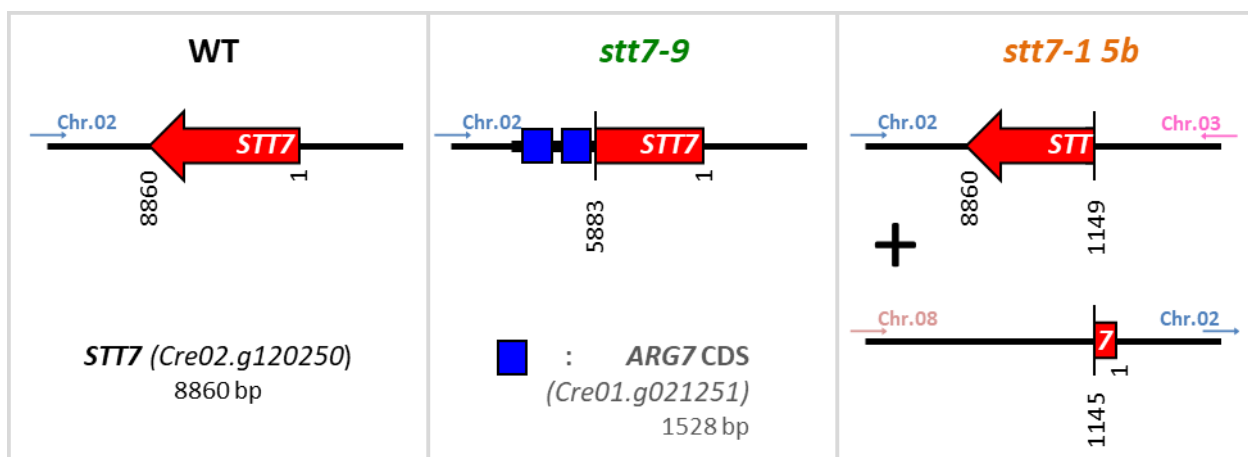
Une première tentative de séquençage du gène, fractionné ou complet, a été menée sur *stt7-1*. De nos jours, obtenir les informations sur la séquence nucléotidique d'un gène, muté ou non, est devenu beaucoup plus accessible et facile à réaliser grâce aux entreprises de séquençage (type Eurofins). La seule condition indispensable est de leur fournir un échantillon d'ADN d'une quantité suffisante. Cela peut être réalisé au laboratoire en amplifiant l'ADN du gène d'intérêt, ou une partie, grâce à la technique de réaction de polymérisation en chaîne (RPC ou PCR pour *polymerase chain reaction*). Cette

amplification peut être effectuée à partir d'une simple extraction d'ADN sur cellules entières et en utilisant des amorces spécifiques d'oligonucléotides.

L'amplification complète du gène *STT7* (exons + introns) du mutant *stt7-1* n'a pu être obtenue. Cependant, l'amplification des 15 exons présents dans ce gène a été réalisée avec succès en utilisant plusieurs couples d'oligonucléotides spécifiques. Seul l'intron 3 n'a pas permis son amplification dans le mutant *stt7-1*, ce qui indique la région où le réarrangement génétique a pu se produire mais sans information supplémentaire, comme le type de lésion génétique (délétion, insertion,...).

Cette méthode n'ayant pas autorisé l'obtention du gène *STT7* complet dans *stt7-1*, un séquençage par la technologie de longue lecture (*long read*) a été réalisé (in situ). À partir d'une préparation d'ADN, ces technologies permettent de fournir des longueurs de lectures (produites par des séquenceurs) d'une taille de 20 kpb en moyenne et favorisant ainsi la détection de variations structurales (telles que des insertions, duplications, translocations, etc...).

Les données de séquençages ainsi obtenues (sous forme de fichiers FASTQ) ont été converties au format FASTA. Puis, en s'appuyant sur la séquence nucléotidique du gène *STT7* d'un génome de référence (Phytozome *C. reinhardtii* v6.1), l'outil bioinformatique BLAST a permis de sélectionner les lectures qui contenaient la séquence, ou une partie, du gène *STT7* (V6). Ces lectures ont ensuite été assemblées à l'aide de l'outil Flye ce qui nous a permis de reconstituer le gène *STT7* dans une souche de type sauvage (WT-T222) et dans les deux mutants (*Figure 29*). La séquence de notre souche WT étant conforme à celle de la référence, nous avons pu déterminer plus en détail les mutations dans les deux mutants. Dans *stt7-9*, nous avons observé une insertion en tandem de la séquence codante du gène *ARG7* (1528 pb) située dans *STT7* (à partir du nucléotide 5883 en aval du codon d'initiation de *STT7* ou 2977 en amont du codon-stop). Cette insertion a entraîné une délétion d'une partie du gène, côté 3'. L'utilisation de l'outil bioinformatique BLAST (pour *Basic Local Alignment Search Tools*), pour la recherche de régions similaires à *STT7* dans l'ensemble des fragments d'ADN obtenus par séquençage (lectures), n'a pas mis en évidence la présence de cette portion d'ADN en 3' du gène. Dans *stt7-1*, le gène a été scindé en deux parties, *i*) la partie 5' du gène, d'une longueur de 1145 pb (jusqu'à la fin de l'exon 3) et *ii*) la partie 3', de 7712 pb. Cependant, ces deux fragments ont été réarrangés dans des environnements génomiques distincts (Chr.02, Chr.03 et Chr.08), voir *ANNEXE 5* pour plus de détails.

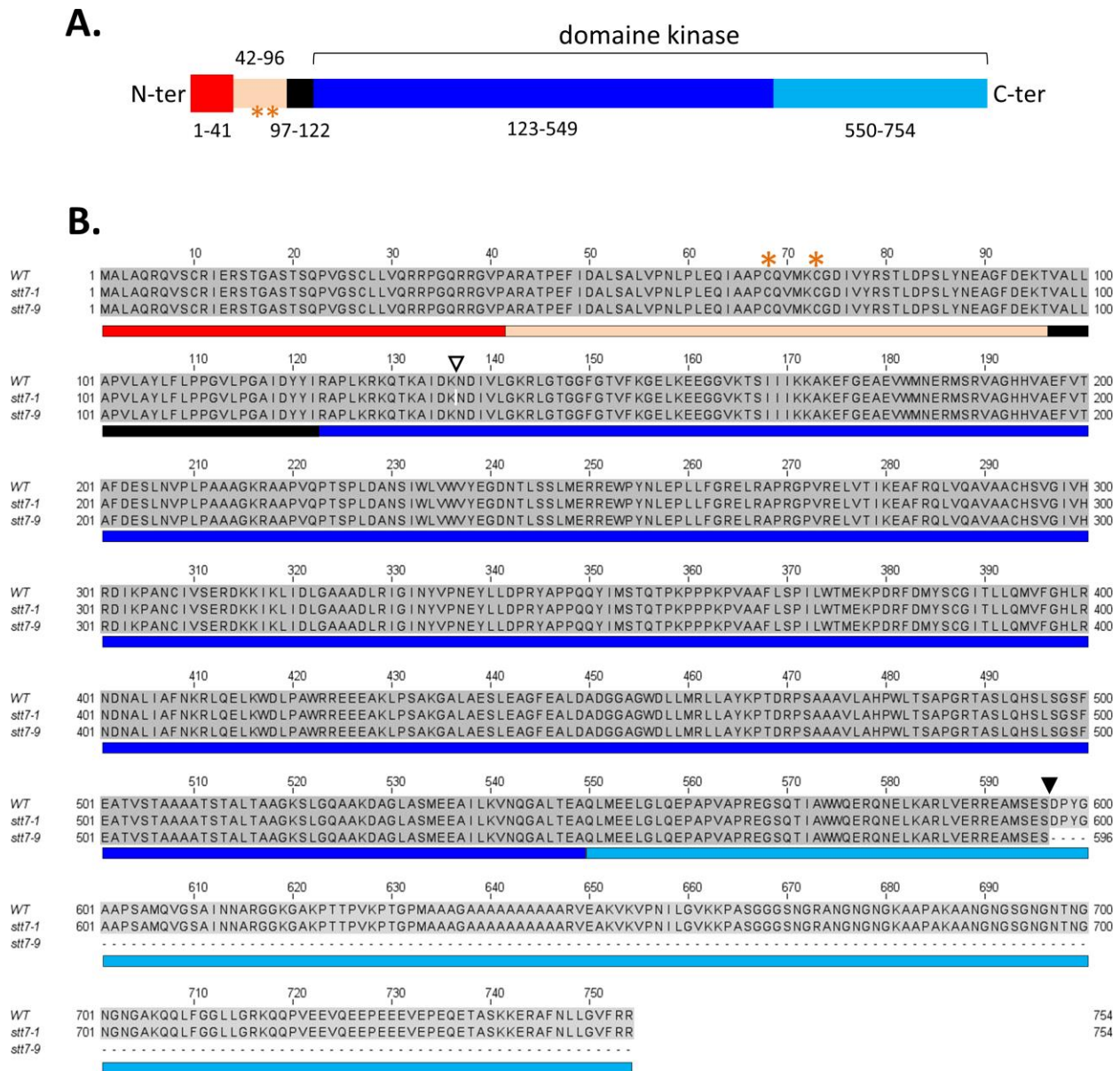


**Figure 29 : Schéma de la structure du gène *STT7* des différentes souches**

La version sauvage du gène *STT7* est représentée par une flèche rouge sur le chromosome (Chr.) 02 et d'une longueur correspondant à la séquence nucléotidique de 8860 paires de bases (pb) -numérotés de 1 à 8860 dans le sens 5'→3' (Phytozome, *C. reinhardtii* v6.1). Une séquence codante du gène *ARG7* (CDS ou *coding DNA sequence*) présente sur le Chr.02 du mutant *stt7-9* est représentée en bleu.

La nature des mutations ainsi identifiées dans ces deux mutants explique la différence phénotypique que nous avons observée, comme cela avait été précédemment décrit. En particulier, le mutant *stt7-9* est décrit dans la littérature comme présentant une fusion protéique avec préservation du site catalytique de la protéine *STT7* (Bergner et al, 2015).

Le mutant *stt7-9* est capable, dans une moindre mesure par rapport au sauvage, de réaliser des transitions d'état. Le séquençage a révélé une délétion de la partie 3' de la séquence nucléotidique du gène *STT7* qui, au niveau de la séquence peptidique de *STT7* (Figure 30), correspond à une délétion d'une grande portion de la partie C-terminale (à partir de l'acide aminé 597, soit 158 résidus). Cette extrémité C-terminale (C-ter) de *STT7* ne semble pas être essentielle à sa fonction (Singh et al, 2016). De plus, une complémentation fonctionnelle du gène muté par un cosmide dépourvu des 164 résidus C-ter de *STT7* permet de recouvrir l'activité kinase (Depège et al, 2003). Il semblerait alors que ce soit la formation de cette protéine de fusion *STT7:ARG7* qui déstabiliserait la fonction kinase en empêchant la reconnaissance de la majeure partie de ses protéines cible. Néanmoins, dans ce mutant, l'intégralité du domaine catalytique est conservée. Cette dernière observation pourrait expliquer l'activité résiduelle de la kinase malgré l'insertion de *ARG7*. C'est précisément ce qui a été décrit précédemment sur un autre mutant des transitions d'état, *stt7-2* (Depège et al, 2003). Les auteurs ont déterminés que celui-ci avait une insertion de *ARG7* (issue de la transformation) située dans la partie C-ter de la kinase et ont également constaté qu'il permettait une phosphorylation plus prononcée de certaines protéines de l'antenne PSII



**Figure 30 : Le polypeptide STT7 et alignement de sa séquence (peptidique) avec les versions mutées**

(A) Le polypeptide STT7 consiste en une séquence d'un peptide signal de 41 résidus à l'extrémité N-terminale (rouge) puis d'un domaine régulateur de 54 résidus (orange) dont Cys-68 et Cys-73 (marqués d'une étoile), d'un domaine hydrophobe de 25 résidus (noir) et le domaine de la kinase constituée du domaine catalytique, 426 résidus (bleu) et la partie C-terminale (C-ter), 204 résidus (bleu clair). Schéma adapté de (Singh et al, 2016). (B) Alignement des différentes séquences de STT7, séquences sauvage (WT) et mutées (*stt7-1* et *stt7-9*, dont leur mutation est signalée d'une flèche). Les différents domaines sont également reportés ici avec le même code couleur.

(LHCII de type I -p11- et LHCB5 -CP26-) par rapport au mutant *stt7-1*. Il est intéressant de souligner que ce mutant allélique, *stt7-2*, présente des similitudes troublantes avec le mutant *stt7-9*.

En revanche, *stt7-1*, d'après nos données de séquençage, présente une coupure du gène *STT7* dans la région correspondant à la partie catalytique de la kinase (*Figure 30*) tout en conservant l'intégralité de sa séquence codante mais dans un environnement génétique différent (qui sera détaillé au *Paragraphe 3*). Cette observation confirme que ce mutant ne peut effectuer de transition d'état (allèle nul).

Le mutant nul semble être le candidat idéal pour l'étude des transitions d'état. Néanmoins, une autre propriété indispensable pour faciliter l'étude du processus de la photosynthèse et de sa régulation chez *Chlamydomonas reinhardtii* va s'ajouter aux différences que nous venons de voir entre ces deux mutants alléliques.

### 1.3. La fonction de reproduction sexuée

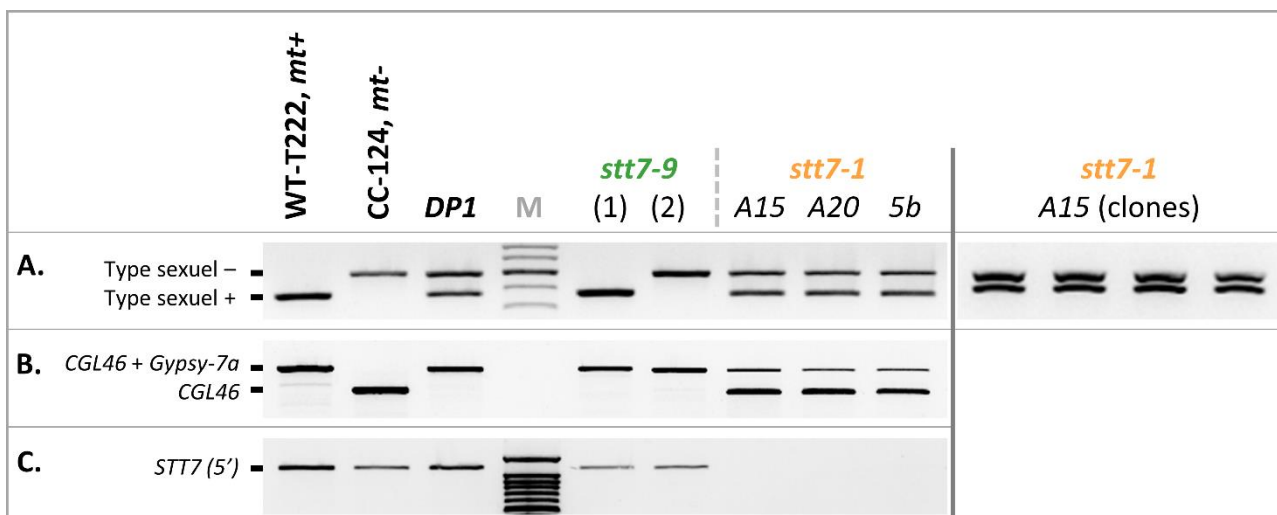
Comme nous avons pu le voir, l'étude d'une fonction est facilitée par l'obtention de mutants. L'extinction d'un gène va nous éclairer sur son rôle dans la cellule. Il est également intéressant de multiplier les mutations pour approfondir la compréhension d'un mécanisme ou bien pour placer la cellule dans un contexte particulier (une auxotrophie à l'arginine par exemple). Pour cette raison, la physiologie de *Chlamydomonas*, notamment sa reproduction sexuée, qui est non-obligatoire, en fait un avantage dans l'étude de la photosynthèse. Il est donc important, en général, qu'une souche mutante ait conservé la capacité de se croiser (en conditions contrôlées).

Toutefois, il a été signalé que l'allèle *stt7-1* était génétiquement stérile, soit dans la littérature (Fleischmann et al, 1999), soit par notre propre expérience de croisement au laboratoire. Ainsi, lorsque des croisements génétiques sont nécessaires, c'est l'allèle *stt7-9* qui est favorisé et considéré comme la référence du blocage des transitions d'état, ce qui n'est pas vraiment le cas au vu des précédentes observations.

En raison de la nécessité de disposer d'un mutant *stt7* qui soit à la fois complètement bloqué à l'état 1 et fertile, nous avons donc entrepris de croiser *stt7-1* avec une souche sauvage de signe sexuel complémentaire, même s'il était à priori particulièrement peu fertile. Pour cela, nous avons à disposition, dans notre collection de mutants de photosynthèse,

trois souches *stt7-1* nommées *5b*, *A15* et *A20* et dont le signe sexuel (*mating type* ou *mt*) était noté « moins ». Aucun de ces clones n'a, dans un premier temps, permis d'obtenir de zygotes, ou en quantité suffisante pour être visibles.

Après cette première tentative infructueuse, il était devenu évident qu'une vérification du signe sexuel pour chacun de ces souches était nécessaire. Au début des années 2000, il était encore classique de tester le signe sexuel par agglutination, en croisant une souche (de signe sexuel inconnu), d'une part avec un testeur *mt+* et d'autre part, un *mt-*, l'agglutination étant l'état avant fusion de deux cellules de signe sexuel complémentaire (Sager, 1955). C'est par cette méthode que le signe des *stt7-1* a été précédemment déterminé. Ce test permet également d'estimer la fertilité des cellules. À présent, l'utilisation de la technique PCR est plus répandue, car plus rapide, en amplifiant des fragments de gènes du locus sexuel *MT* (pour *mating type*, situé sur le Chr. 06), *MID* (*minus dominance*) spécifique du « moins » et *FUS1* (*fusion*) pour le « plus » (Werner & Mergenhagen, 1998). De cette manière et en ajoutant les deux couples d'oligonucléotides spécifiques à ces deux gènes pendant la réaction d'amplification, seul le fragment du gène présent au locus *MT* de la cellule sera amplifié (voir *Figure 31-A*).



**Figure 31 : Test de signe par PCR des différentes souches *stt7* et autres contrôles**

Électrophorèses sur gel d'agarose de portions d'ADN amplifiées par PCR avec des oligonucléotides spécifiques (A) du gène *MID* (correspondant au signe sexuel moins) et *FUS1* (plus), (B) du gène *CGL46* et d'une extrémité du transposon *Gypsy-7a* et (C) de la partie 5' du gène *STT7* (entre les exons 3 et 4).

Ces PCR ont été réalisées sur les mutants *stt7*, deux souches sauvages (WT) de type sexuel opposé et une souche diploïde (*DP1*, *mt+/mt-*). Quatre clones de la souche *stt7-1.A15* ont également été testés pour leur *mt* (à droite). M : marqueur de taille moléculaire.

Nous avons répété ces expériences et identifié les types sexuels par PCR (*Figure 31-A*), accompagné de quelques souches de références, deux WT de type sexuel opposé et un diploïde végétatif ( $mt+/mt-$ ) (Drapier et al, 2002), puis évalué les diverses caractéristiques de croisement sur l'ensemble des *stt7* ; deux *stt7-9* ont été associés (*Tableau 6-A*). Concernant les *stt7-9*, ceux-ci sont conformes à ce que nous espérions, deux souches des deux signes sexuel et se croisent parfaitement comme notre souche de référence. Alors que les *stt7-1*, qui se comportent comme des *mt-* au test d'agglutination, nous avons été très surpris de constater qu'ils présentaient les deux signes sexuels, ce qui correspond à ce que l'on attendrait d'une souche diploïde, telle que *DP1* qui est caractérisée pour posséder un jeu double de ses chromosomes, provenant de deux cellules haploïdes de signe opposé ( $mt+/mt-$ ). Ces deux résultats ne sont cependant pas incohérents, la seule présence du gène *MID* entraînera toujours un comportement d'un *mt-* (Ebersold, 1967; Galloway & Goodenough, 1985).

L'amplification par PCR d'un fragment à partir de l'exon 1 jusqu'à l'exon 4 (partie 5') du gène *STT7* a confirmé sa présence dans *stt7-9* mais pas dans *stt7-1* (*Figure 31-C*), suggérant un réarrangement important dans *stt7-1*.

À partir de ces observations, on peut s'interroger sur la ploïdie des *stt7-1*, sont-ils aneuploïdes, voir diploïdes ? Pour vérifier cela, nous avons également utilisé *CGL46* (Cre06.g278212) comme autre marqueur d'une éventuelle aneuploïdie sur le Chr.06, où se trouvent les loci *MT*. En effet, j'ai pu observer au cours d'une autre étude que parmi les souches de type sauvage utilisées dans les différents laboratoires, *CGL46* peut parfois héberger un transposon *gypsy*. Cette différence est illustrée en *Figure 31-B* par les produits PCR obtenus chez WT-T222, *mt+* de notre laboratoire (présence de *gypsy*) et chez le sauvage CC-124, *mt-* de la collection du *Chlamydomonas Resource Center* (absence de *gypsy*). Il est remarquable que les trois *stt7-1* se soient révélés hétérozygotes pour *CGL46*, contrairement aux *stt7-9* qui ne présentent que la forme avec *gypsy*. Notons que le diploïde *DP1*, qui a été généré dans le laboratoire à partir de souches mutantes *arg-2* (*arg7-8*) (Eversole, 1956) et *arg-7* (Gillham, 1965; Loppes & Matagne, 1972; Matagne, 1978) qui avaient le même fond génétique, n'a pas montré d'hétérozygotie à ce locus.



**Tableau 6 : Propriétés de croisement génétique des différentes souches mutantes *stt7* comparé à une souche de référence (WT-T222).**

(\*) Formation des zygotes : (0) pas de zygote ; (+) quelques zygotes ; (+++) régulier.

(\*\*) Produit méiotique : proportion de zygotes qui ont passé la méiose, déterminée sur un total de 40 zygotes, sauf pour le croisement DP1 x WT estimé sur 4 zygotes en raison d'une très faible fertilité de DP1.

(\*\*\*) Viabilité cellulaire : proportion de cellules qui ont formé colonies, déterminée sur un total de 25 zygotes disséqués, soit 100 cellules.

Souche	Agglutination		Signe sexuel	Formation de zygote (*)	Produit méiotique (**)	Viabilité (***)
	avec WT, <i>mt+</i>	avec WT, <i>mt-</i>				
<b>A. Croisements</b>						
WT-T222	-	+++	plus	+++	95%	75%
DP1	+/-	-	moins	+	(50%)	(0)
<i>stt7-9</i> (1)	-	+++	plus	+++	95%	75%
<i>stt7-9</i> (2)	+++	-	moins	+++	95%	75%
<i>stt7-1 5b</i>	++	-	moins	+	30%	2%
<i>stt7-1 A15</i>	+	-	moins	0	0	0
<i>stt7-1 A20</i>	+	-	moins	0	0	0
<b>B. Rétrocroisements</b>						
<i>stt7-1<sup>S</sup> #1</i>	++	-	moins	+++	80%	18%
<i>stt7-1<sup>S</sup> #a6</i>	-	++	plus	++	80%	15%

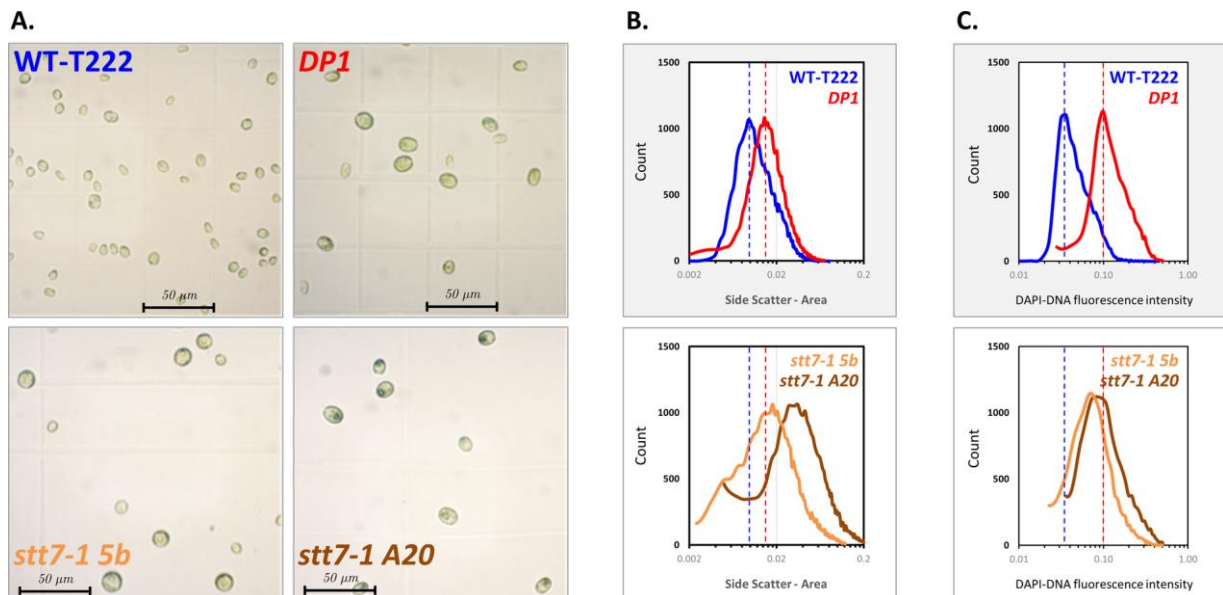
Parmi les différents *stt7-1*, seul le croisement avec la souche *5b* a permis l'obtention de zygotes qui, malgré un faible nombre, a engendré des descendants viables (2%) (Tableau 6-A). Ce faible taux de germination et de viabilité après la formation de zygote est aussi une caractéristique des souches diploïdes. Plus de 80% des cellules issues de zygotes matures provenant de croisements diploïdes x haploïdes ne donnent pas naissance à des colonies végétatives, conséquence d'un déséquilibre chromosomique dans ces cellules (Ebersold, 1967). Dans le cas de notre référence, seulement 4 zygotes ont pu être récupérés lors du croisement DP1 x WT, *mt+* et n'ont généré aucune descendance. Deux rétrocroisements successifs ont été réalisés à partir d'une des deux colonies végétatives issues du croisement *stt7-1.5b* x WT, *mt+*, et n'ont produit qu'un nombre limité de colonies végétatives (inférieur à 20%) (Tableau 6-B). Cependant, le second a donné une souche se comportant comme un *mt+*.

## 1.4. Taille cellulaire et contenu en ADN

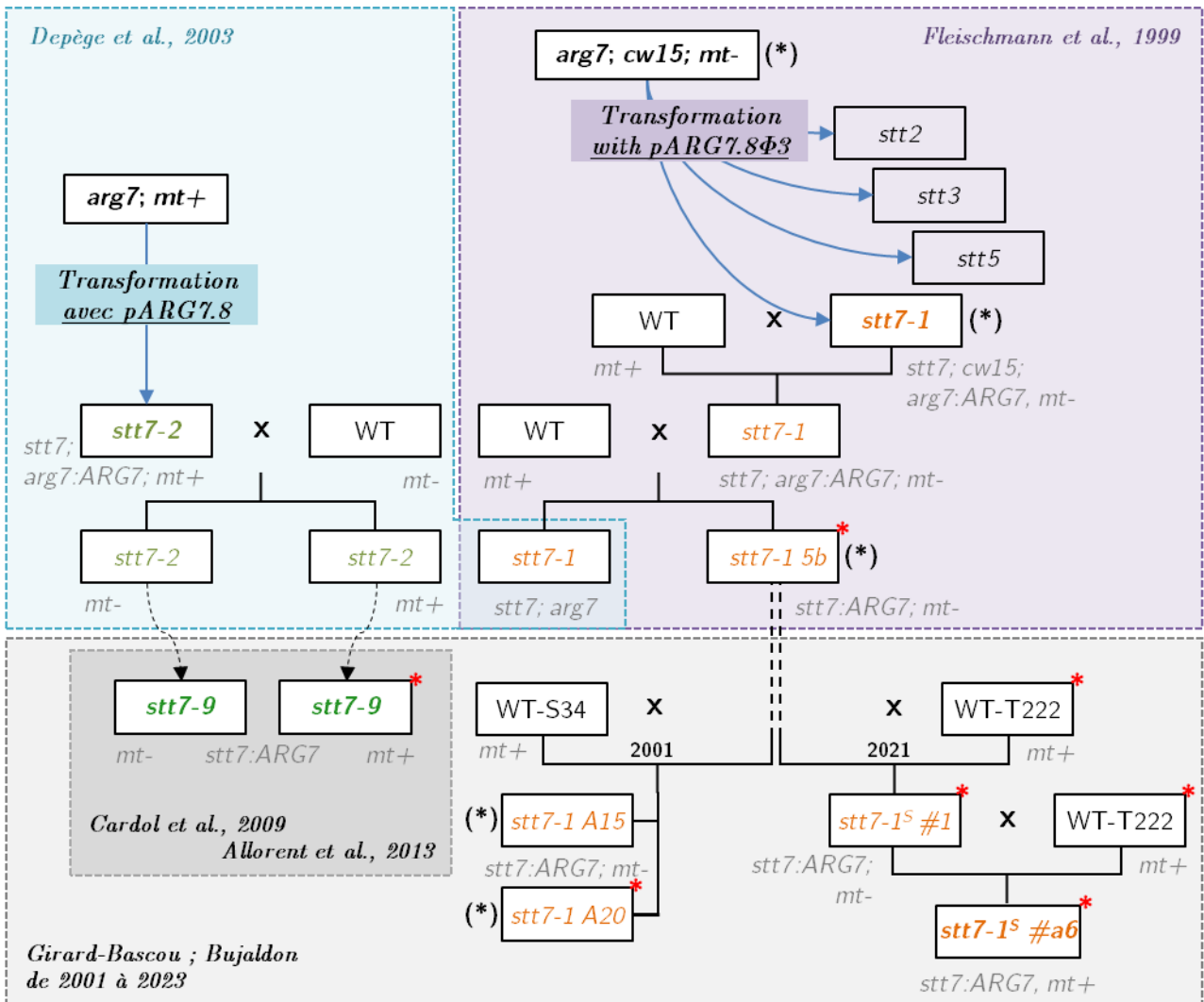
Nous savons qu'une cellule diploïde, chez *Chlamydomonas*, présente une masse et un volume plus important qu'une cellule haploïde, et son contenu en ADN est doublé (Ebersold, 1967). Pour vérifier ces différences, nous avons examiné les cellules *stt7* à l'aide de deux méthodes : un microscope optique (*Figure 32-A*) et un cytomètre en flux. Avec cette dernière méthode, nous avons réalisé ces analyses sur 15 000 cellules pour chaque souche, à la fois sans colorant (*Figure 32-B*) et avec ajout de DAPI, un fluorochrome qui se complexe sélectivement avec l'ADN double brin (*Figure 32-C*). Les mutants *stt7-1 5b* et *stt7-1 A20* ont été comparés à une souche sauvage haploïde (WT-T222) ainsi qu'un diploïde végétatif (*DP1*). Ces observations ont été réalisées à partir de cultures en phase exponentielle et non synchronisées (cultivées en lumière continue).

En moyenne, on peut noter que les mutants *stt7* présentent une taille comparable à celle de la souche diploïde de référence, voire même plus importante dans le cas du clone *A20*. On fait la même observation en ce qui concerne leur contenu en ADN, qui est similaire à celui du diploïde.

Ainsi, les clones *stt7-1*, qui montraient déjà des caractéristiques de diploïdes (*mt+* et *mt-* ; difficulté de croisement), semble se confirmer par ces nouvelles observations.



**Figure 32 : Caractéristiques de tailles cellulaire et nucléaire de deux mutants *stt7*** (A) clichés obtenus à partir d'un microscope optique, (B) distribution de la taille des cellules déterminée par le SSC (*Side Scatter*) des cellules obtenu à partir d'un cytomètre en flux (FACS) et (C) distribution de la taille du contenu en ADN déterminée par la fluorescence du DAPI.



(\*) : signalé comme étant difficile à croiser

\* : séquençage du génome complet (ONT)

Figure 33 : Généalogie des mutants *stt7*

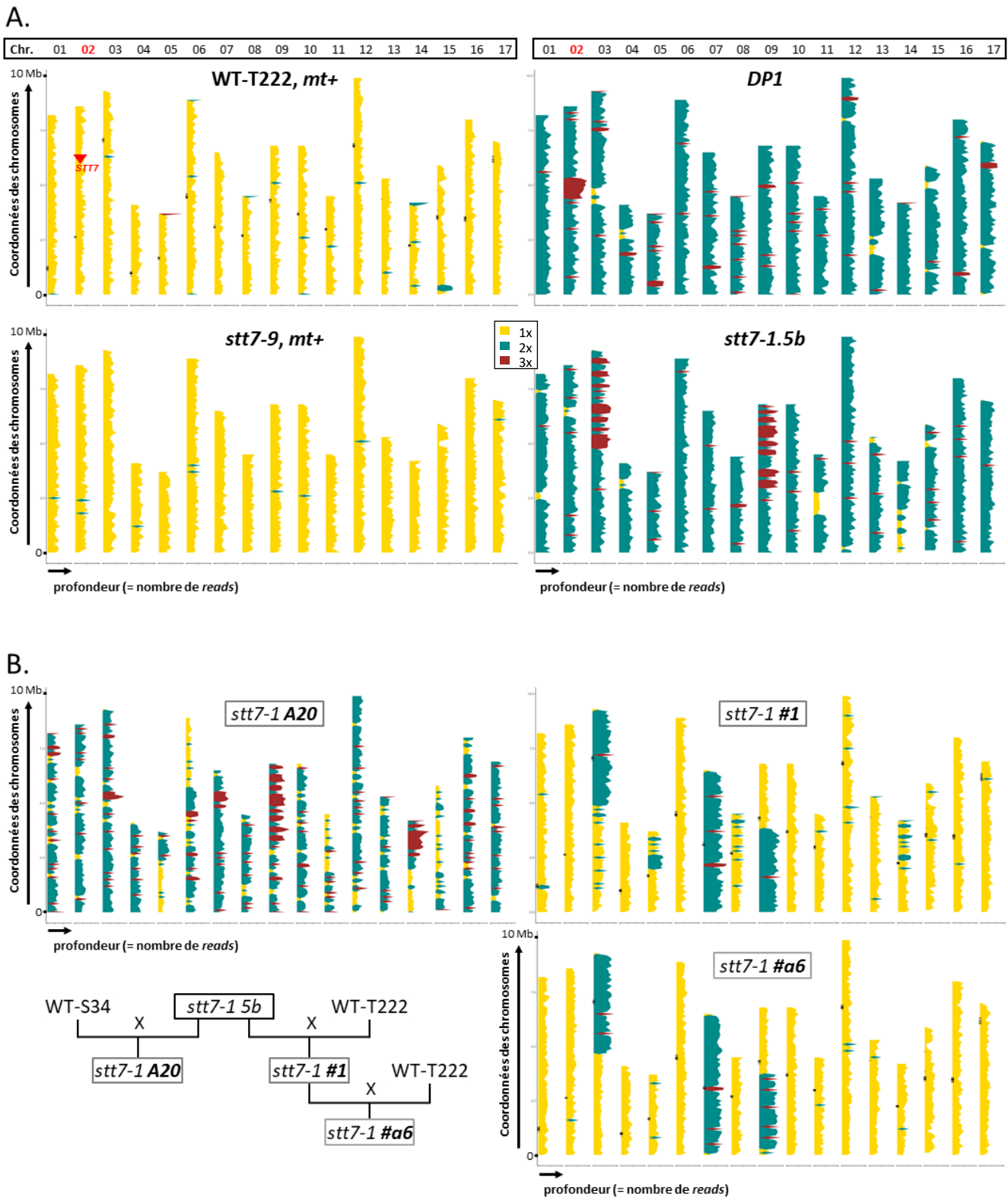
Cette caractérisation phénotypique a montré des différences dans ces mutants de transitions d'état : *stt7-9*, qui se prête parfaitement aux croisements génétiques mais présente encore une signature des transitions d'état limitée, tandis que *stt7-1*, utilisé à l'origine comme mutant nul pour la kinase, s'est avéré quasi stérile dans les croisements génétiques et présente des caractéristiques d'un diploïde (ou d'un aneuploïde).

## 2. Généalogie des souches *stt7*

Afin de mieux comprendre les caractéristiques génomiques inattendues du mutant *stt7-1*, nous avons tenté de reconstruire la généalogie des mutants *stt7* qui ont été disséminés dans les laboratoires depuis leur sélection originale dans la période 1999-2003 dans le laboratoire de J-D Rochaix. La *Figure 33* représente le modèle généalogique que nous proposons pour la production des mutants *stt7*, reconstruit sur la base des trois articles fondateurs (Cardol et al, 2009; Depège et al, 2003; Fleischmann et al, 1999) et d'observations reportées dans nos propres cahiers de laboratoire (J. Girard-Bascou et moi-même).

Deux mutagénèses indépendantes ont été réalisées. Chacune d'elles impliquait l'insertion aléatoire d'une cassette *ARG7* (assurant l'autotrophie pour l'arginine) dans des souches réceptrices auxotrophes (*arg7*). L'une de ces mutagénèses a été réalisée dans un contexte génétique sans paroi cellulaire (*cw15*) (CW pour *cell wall*), donnant le mutant *stt7-1*, tandis que l'autre présentait une paroi cellulaire intacte (pour *stt7-9*). Ces transformants ont ensuite été croisés pour replacer les mutations *stt7* dans un contexte génétique *ARG7,CW* (autotrophe à l'arginine et à paroi cellulaire intacte). Cette descendance a ensuite été rétrocroisée avec des souches de type sauvage utilisées à l'IBPC au cours de la période 2000-2009, lorsqu'elles ont été disséminées dans la communauté de *Chlamydomonas*, et de ces trois dernières années, période de cette thèse. Il est important de remarquer que dès le début de son utilisation, le *stt7-1* a montré des difficultés à produire une descendance dans les croisements (Fleischmann et al, 1999).

Nous notons également, d'après les différentes études (Bergner et al, 2015; Depège et al, 2003) et ce manuscrit, que les allèles « *stt7-2* » et « *stt7-9* », qui présentent tous deux une insertion *ARG7* dans la région 5', sont très similaires. Nous pensons qu'au cours du transfert des souches *stt7-2*, une erreur de retranscription du nom s'est glissée, entraînant un changement de numéro, le 2 serait devenu un 9.



**Figure 34 : Séquençage du génome complet de différentes souches *stt7***

Représentation graphique de la profondeur (nombre de lectures) du séquençage le long de chaque chromosome. **A.** Les deux souches *stt7-1 5b*, *mt+/mt-* et *stt7-9*, *mt+* comparées à une souche sauvage (WT-T222, *mt+*) et un diploïde (*DP1*, *mt+/mt-*). **B.** Comparaison des 3 souches *stt7-1* issues de rétrocroisements réalisés à l'IBPC, soit avec la souche de référence WTS34, *mt+*, soit WT-T222, *mt+*.

Niveau de ploïdie sur les diagrammes : haploïde (1n) en jaune ; diploïde (2n) en bleu ; triploïde (3n) en marron. La position des centromères est indiquée en noir à gauche de chaque chromosome (pour WT-T222, *stt7-1 #1* et *#a6*). Coordonnées du gène *STT7* : chromosome\_02:6 189 579..6 198 460 (reverse) indiqué par une flèche rouge sur le graphe de WT-T222.

### 3. Ce que révèle le séquençage (à lectures longues) du génome entier

Le gène *STT7* ne pouvant être amplifié dans les souches *stt7-1* (voir *paragraphe 1.2* et *Figure 31-C*), nous avons privilégié la technologie Nanopore à lectures longues. Cette nouvelle technologie permet de détecter les variations structurales, comme des délétions, insertions, translocations jusqu'à mettre en évidence une aneuploïdie.

Ainsi, nous avons séquençé 4 souches *stt7-1* (*5b*, *A20*, *#1* et *#a6*) et une souche *stt7-9*, *mt+*. Comme témoins, nous avons choisi la souche haploïde WT-T222, *mt+* et la souche diploïde *DP1* (Drapier et al, 2002). Après extraction de l'ADN (Chaux-Jukic et al, 2022), les bibliothèques ont été chargées sur des cellules (*flow cells*) placées dans un séquenceur MinION.

Pour évaluer la profondeur du séquençage globale dans nos données, nous avons d'abord, pour chaque souche, mis en correspondance les lectures (*reads*) avec le génome de référence (v6.1). Pour rappel, le génome nucléaire de *Chlamydomonas* a une longueur d'environ 111 Mb et il est constitué de 17 chromosomes dont la taille varie de 3,7 à 9,8 Mb. Nous avons pu nous apercevoir grâce à une représentation graphique que les chromosomes présentaient une profondeur de séquençage contrastée (*Figure 34-A et 33-B*). Plus précisément, et dans le cas de *stt7-1.5b* (*Figure 34-A*), par rapport à son niveau de ploïdie principal (en bleu), la profondeur a diminué d'un facteur deux dans certaines parties de chromosomes (en jaune) et a augmenté d'un facteur 1,5 dans d'autres (en marron). Comme ces régions présentaient un niveau de profondeur standard dans les souches de contrôle (WT : haploïdie, d'une profondeur homogène, en jaune et DP1 : diploïdie, d'une profondeur globalement homogène, en bleu), nous supposons que la souche *5b* est principalement diploïde, certaines régions chromosomiques étant haploïdes (par exemple, le bras gauche du chromosome 14) et d'autres triploïdes (par exemple, le bras droit du chromosome 9). Concernant le *stt7-9*, *mt+*, son séquençage permet de conclure qu'il est bien haploïde.

Nous avons également séquençé le génome complet d'autres souches *stt7-1* qui sont issues d'au moins un rétrocroisement de *stt7-1.5b*, *mt+/mt-* (*Figure 34-B*). La première, *A20*, obtenue au début des années 2000, apparaît encore très diploïde, même si quelques régions montrent de l'haploïdie. Puis les descendants *#1* et *#a6*, rétrocroisements 1 et 2 réalisés au cours de cette thèse, montrent tous les deux une forte proportion d'haploïdie, seules trois régions restant diploïdes, au sein des chromosomes 03, 07 et 09. Il est à noter

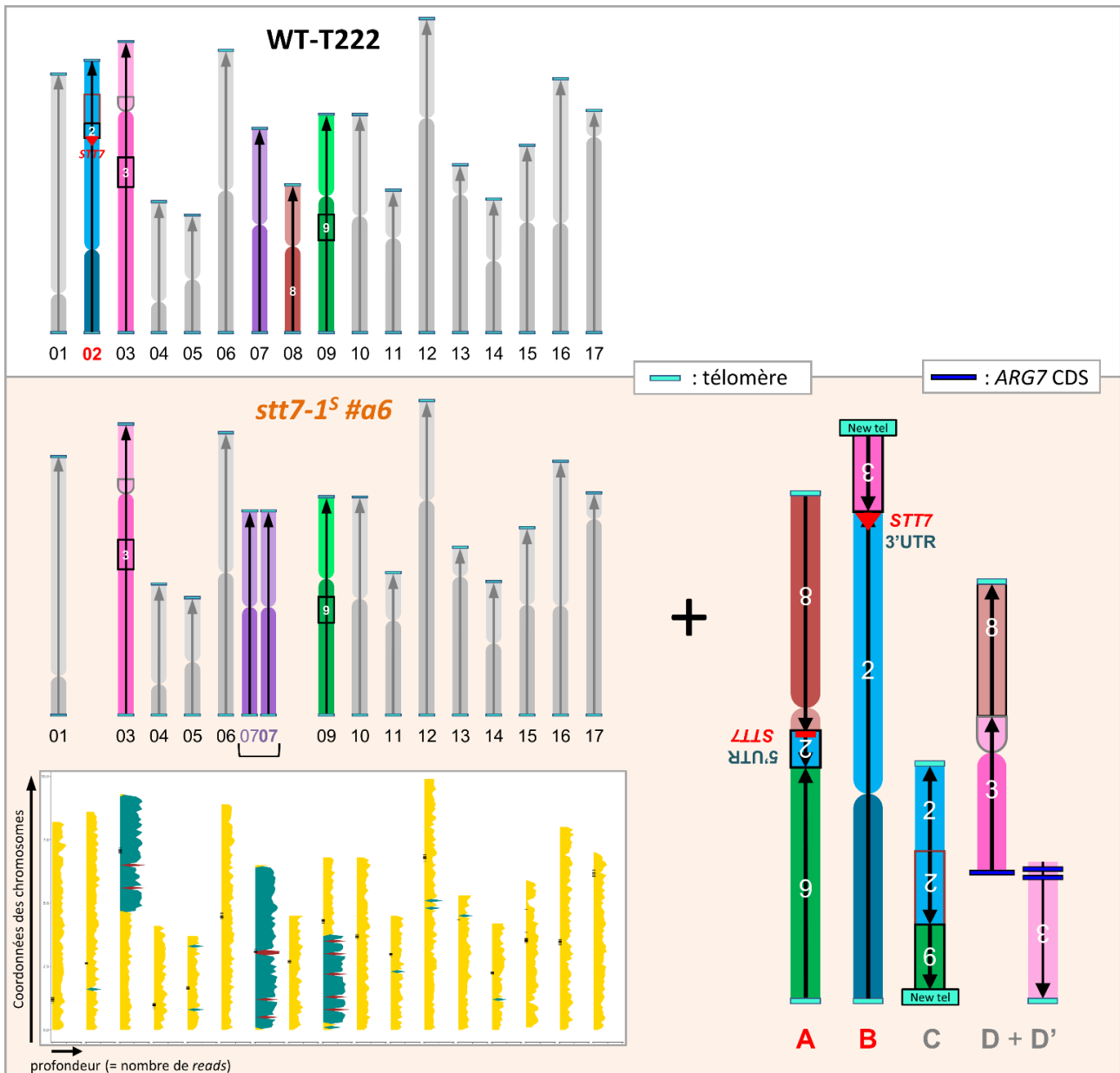


Figure 35 : Reconstruction chromosomique de la souche *stt7-1#a6*

qu'entre ces deux souches, l'une (*#a6*) étant un descendant de l'autre (*#1*), sont très similaires. Le second rétrocroisement n'a donc pas permis de « nettoyer » complètement le génome de cette aneuploïdie, ces régions au sein de ces trois chromosomes résistants à une haploïdisation.

Pour comprendre le maintien de ces régions, nous avons entrepris d'assembler de novo (c'est-à-dire sans référence) le génome nucléaire de *stt7-1 #a6*. Le principe est d'obtenir à partir des lectures issus du séquençage des séquences plus longues (appelées *contigs* ou *scaffolds*) avec l'objectif de parvenir à une séquence unique par chromosome. Ceci a été réalisé à l'aide d'outils informatiques, tels que Flye (<https://github.com/fenderglass/Flye>), Canu (Koren et al, 2017) comme assembleurs puis des outils de visualisation comme D-genies (Cabanettes & Klopp, 2018), qui est une application qui réalise l'alignement de génomes (en utilisant Minimap2, un programme d'alignement de séquences (Li, 2018)) et génère un graphique de ressemblance (*dotplot*) interactif. Un appui manuel était requis pour cet assemblage car les assembleurs gèrent difficilement l'aneuploïdie. En outre, certains chromosomes sont restés fragmentés en quelques longs contigs, en raison de la présence de grandes régions homologues et/ou répétitives, telles que certains centromères et quelques éléments transposables. Les diagrammes en pointillés (exemple en *ANNEXE 3*) ont montré que la plupart des chromosomes et des bras chromosomiques étaient colinéaires à ceux du WT et ont mis en évidence un nombre limité de réarrangements majeurs, notamment ceux impliquant le site de mutation de *stt7-1* sur le chromosome 2. En complément, nous avons utilisé des graphiques d'assemblage (exemple avec Bandage (Wick et al, 2015) en *ANNEXE 4*) pour déchiffrer ces réarrangements et ces régions aneuploïdes. Nos analyses suggèrent ainsi que les souches *stt7-1 #a6* (et *#1*) possèdent des copies normales (non réarrangées) de tous les chromosomes sauf 02, 08 et deux copies normales du Chr. 07 (*Figure 35*). Nous avons également observé d'autres réarrangements qui indiquent la présence de chromosomes recombinés :

- Le **Chr. A** est constitué de la partie distale du bras gauche du Chr. 9 (0 – 3.0 Mb), d'un fragment du Chr. 02 (6.1 - 6.6 Mb, en orientation inverse) qui contient la partie 5' du gène *STT7* (6.1 Mb) et du bras gauche du Chr. 08 (0 - 3.0 Mb, en orientation inverse).

- Le **Chr. B** est constitué du bras gauche du Chr. 02 et de la partie proximale du bras droit (0 – 6.1 Mb) jusqu'à la région 3' du gène *STT7* et un court fragment du bras droit du Chr. 03 (4.1 - 5.5 Mb, en orientation inverse). Un nouveau télomère a été identifié à la fin de ce fragment.



- Le **Chr. C** est constitué de la partie proximale du bras gauche du Chr. 09 (3.0 - 3.8 Mb), associé à une nouvelle séquence télomérique et de la partie distale du bras droit du Chr. 02 (6.6 - 8.6 Mb, avec inversion de la partie proximale)

- Le **Chr. D** est constitué de la partie distale du bras gauche du Chr. 08 (3.0 - 4.5 Mb), de la partie proximale du bras gauche et du bras droit du Chr. 03 (5.5 – 7.5 Mb), avec une insertion d'une séquence codante de *ARG7* (utilisée par la transformation insertionnelle initiale) à cette extrémité.

- Le **Chr. D'** constitué de la partie distale du bras droit du Chr. 03 (7.5 – 9.3 Mb) avec insertion à une extrémité de 2 séquences codantes de *ARG7*.

En ce qui concerne spécifiquement le Chr. 02, où l'on retrouve normalement sur le bras droit le gène *STT7* (position 6.189.579-6.198.460, brin négatif), celui-ci est impliqué dans trois réarrangements dans les souches *stt7-1*. Plus précisément, le gène *STT7* est interrompu à la position 1145 et fusionné au Chr. 08, tandis que sa partie en aval est fusionnée au Chr. 03. Ce réarrangement drastique est en accord avec la perte complète des transitions d'état observée chez les mutants *stt7-1*.

Cette proposition d'une nouvelle organisation génétique et chromosomique, qui s'est produite dans ce mutant, nécessiterait cependant de nouvelles données de séquençage dans le but d'augmenter la profondeur et ainsi gagner en précision. Par exemple, les deux chromosomes D et D' que nous proposons avec les données actuelles pourraient n'être qu'un seul chromosome. Ces deux possibles Chr. présentent chacun, à une de leurs extrémités, une séquence codante de *ARG7* provenant nécessairement du plasmide utilisée pendant la transformation nucléaire. Une insertion complexe aurait pu se produire que nos séquençages n'auraient pas permis d'observer la structure complète et par conséquent nous a conduit à observer une cassure du chromosome, sans possible reconstitution complète. De plus, l'absence de télomères (structures coiffant l'extrémité du double brin d'ADN des chromosomes) à ces extrémités, s'oppose à l'hypothèse d'une formation de deux chromosomes D distincts. Une meilleure compréhension des évènements ayant conduit à la diploïdie de la souche *stt7-1* aurait nécessité de disposer de la séquence des génomes des souches réceptrice et transformée originales, mais celles-ci ne sont hélas plus disponibles.

Ces réarrangements ont également entraîné d'autres mutations (*Tableau 7*), qui sont facilement identifiables au niveau des réarrangements qui se sont produits, dans les chromosomes 02 et 08, puisque ce sont les seuls dont une version complète et colinéaire à

celui de la référence n'a pu être identifiée. Il est important de noter que l'un des gènes touchés correspond à une protéine kinase à serine/thréonine, indiquée comme non spécifique car sa fonction précise est inconnue actuellement.

**Tableau 7 : Mutations supplémentaires occasionnées par le réarrangement chromosomique dans *stt7-1* – gènes scindés**

<i>Emplacement</i>	<i>Identifiant du gène</i>	<i>Nom du gène</i>	<i>Description</i>
chr_02:6 667 200	Cre09.g390100	(SMM34)	S-adenosyl-L-méthionine-dépendant méthyltransférase
chr_02:7 577 100	Cre09.g387023	-	Non-spécifique sérine/thréonine protéine kinase
chr_08:3 018 050	Cre08.g375050	FAP86	Flagellar Associated Protein 86

L'analyse génomique que j'ai effectuée ci-dessus permet de mesurer le risque d'attributions phénotypiques erronées à une mutation nulle au locus *STT7*, en raison d'autres modifications génétiques qui n'avaient pas été identifiées originellement et qui sont restées associées à la mutation nulle au locus *STT7* en raison de la quasi-stérilité de la souche *stt7-1*.

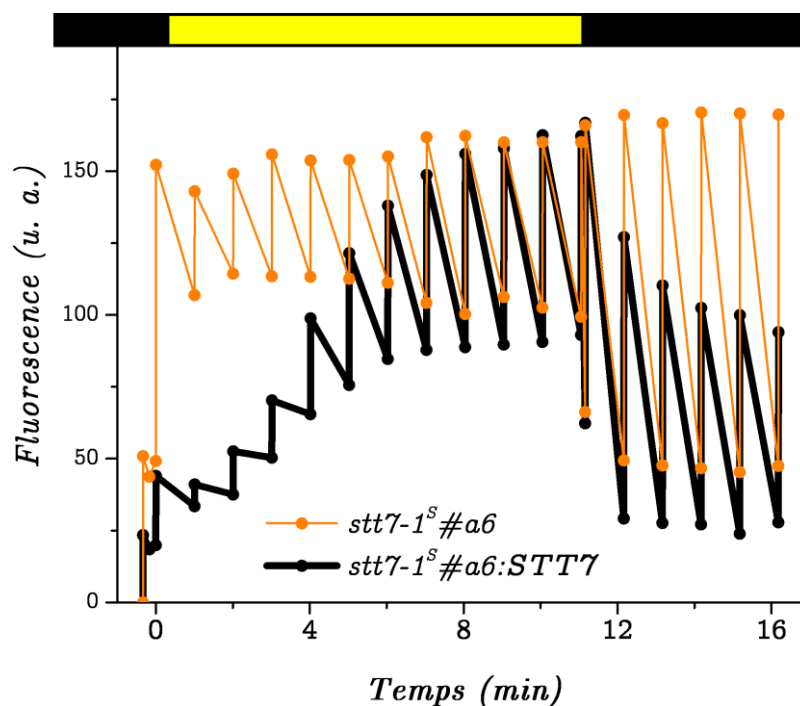
## 4. Nouvelles souches de référence

### 4.1. Souche de type sauvage

Puisque ces souches *stt7-1* sont encore utilisées par la communauté Chlamydomonas, nos travaux permettent de proposer une souche qui a récupéré une capacité de croisement génétique en réduisant considérablement son niveau de diploïdie (*stt7-1* #1 ou #a6). Cependant il nous semblait important de pouvoir fournir une souche de référence pour le phénotype sauvage des transitions d'état qui ait un contexte génétique le plus proche de celui du mutant obtenu par rétrocroisement, mais qui comporte encore les réarrangements génétiques locaux propres à la mutation nulle *stt7-1*.

Pour cela, nous avons réalisé une co-transformation fonctionnelle en insérant par électroporation dans le génome nucléaire de la souche *stt7-1* #a6, la version sauvage du gène *STT7* (8860 pb) et la cassette *aphVIII*, conférant la résistance à la paromomycine et permettant une pré-sélection des transformants. Le criblage des transformants ayant inséré et exprimant le gène *STT7*, s'est effectué par mesure de fluorescence. Après avoir placé ces transformants (sous forme de colonies sur milieu TAP additionné de paromomycine) à l'obscurité et en anaérobiose (en enrichissant l'air en CO<sub>2</sub> – système BD Difco™ *GasPak*™ EZ) pendant 1 heure (conditions favorisant l'état 2), une lumière est ensuite appliquée sur les cellules (condition qui active la photosynthèse, entraînant un retour vers l'état 1), puis

l'évolution de l'émission de fluorescence et la fluorescence maximale sont suivies et enregistrées toutes les minutes et cela pendant 10 minutes (*Figure 36*). Un transformant non complétement aura une émission de fluorescence élevée et invariable (caractéristique d'un mutant *stt7*, bloqué à l'état 1), tandis qu'un transformant complétement par *STT7*, présentera une augmentation de fluorescence après ouverture de la lumière puisque l'anaérobiose initiale l'a placé dans l'état 2 (voir plus haut) tandis que l'illumination le déplace vers l'état 1. Nous avons ainsi obtenu et sélectionné quatre transformants au phénotype sauvage pour les transitions d'état qui sont les souches de référence wt appropriée pour l'utilisation du mutant *stt7-1<sup>s</sup> #a6*.



**Figure 36 : Exemple de cinétique de fluorescence sur transformants**

Mesure de fluorescence effectuée sur colonies de deux transformants résistants à la paromomycine adaptés à l'obscurité et placés dans un environnement enrichi en CO<sub>2</sub> (état 2). L'un de ces transformants (tracé noir) montre une transition st2-st1 lors de la transition obscurité-lumière.

## 4.2. Autres mutants nuls *stt7*

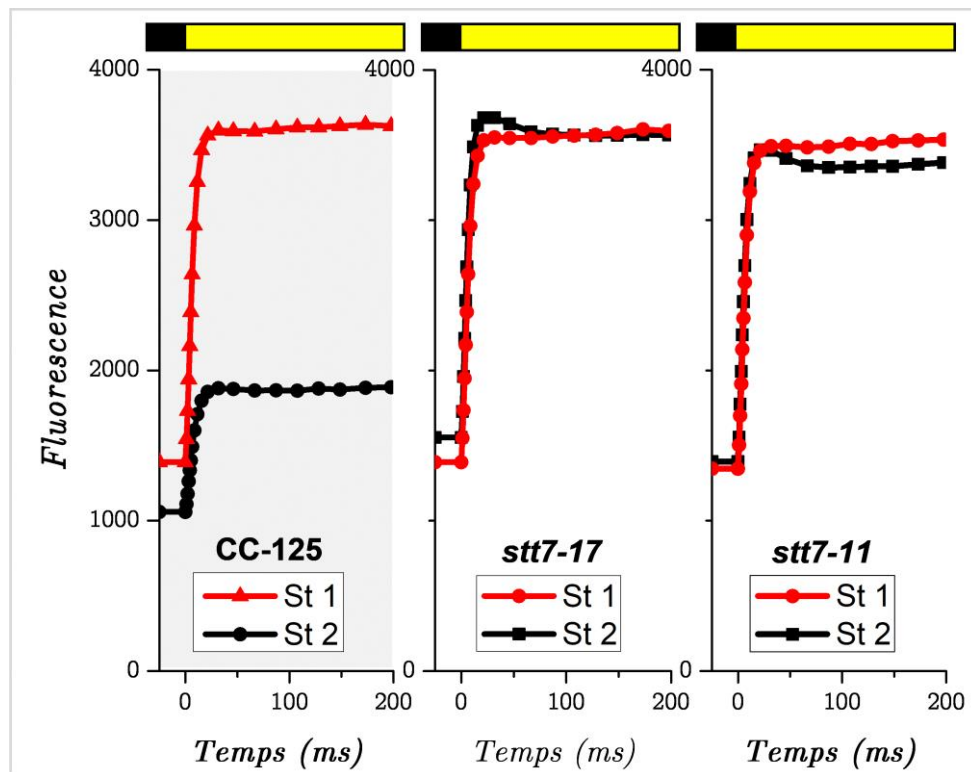
Nous avons également obtenu par le laboratoire d'Adrien Burlacot (Carnegie Institution for Science, Université de Stanford, États-Unis) un nouveau mutant *stt7* produit par la technologie CRISPR-Cas9.

CRISPR-Cas9 est un outil moléculaire qui permet de modifier spécifiquement un gène cible en utilisant une nucléase Cas (pour *CRISPR-associated*, qui est associée au CRISPR pour *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) et un ARN guide complémentaire à une séquence de quelques nucléotides (une vingtaine) du gène cible pour induire des cassures double brin dans l'ADN. Une transformation a donc été réalisée par électroporation sur des cellules d'une souche sauvage de référence (CC-125, *mt+*) en présence de la nucléase Cas9 et de l'ARN guide dont la cible correspond à 23 nucléotides du gène *STT7* (à la position 6957017 du Chr. 02, soit au niveau de l'exon 1 du gène) formant ainsi la ribonucléoprotéine (RNP). À cela une préparation d'ADN de la cassette de résistance à l'hygromycine a été ajoutée. Les cellules ainsi traitées puis étalées sur milieu TAP additionné d'hygromycine, ont permis de présélectionner les transformants qui avaient insérés la cassette de résistance à l'antibiotique dans leur génome nucléaire. Une amplification par PCR avec des oligonucléotides spécifiques du gène *STT7* a été réalisée sur plusieurs colonies pour vérifier la présence de la cassette au niveau de la séquence cible (de l'ARN guide) et sélectionner ainsi des transformants mutés dans le gène *STT7*.

Nous avons ainsi récupéré deux transformants, indépendants, qui devraient posséder une insertion de la cassette de résistance à l'hygromycine au niveau de l'exon 1 du gène *STT7*. Il était important dans un premier temps de s'assurer que cette transformation entraînait le blocage, complet, du mécanisme des transitions d'état. Des mesures d'émission de fluorescence ont montré que ces transformants sont effectivement affectés dans les transitions d'état (*Figure 37*). L'un d'eux (*stt7-17*) reste bloqué à l'état 1, qu'il soit placé dans des conditions oxydantes (état 1) ou réductrices (état 2). En revanche, le second (*stt7-11*) montre une diminution non négligeable du  $F_M$  à l'état 2 par rapport à l'état 1.

Il est également connu que la transformation insertionnelle chez *Chlamydomonas*, même ciblée, peut conduire à des insertions multiples, entraîner également des délétions de l'ADN plus ou moins importantes au point d'insertion et affecter de cette façon plusieurs gènes (Dent et al, 2005). Comme pour les précédents mutants, un séquençage complet de leur génome a donc été réalisé, ainsi que la souche réceptrice utilisée pour la transformation génétique (CC-125). L'assemblage des lectures de séquençage a confirmé une insertion dans

le gène *STT7* dans les deux souches (*ANNEXE 5*), avec cependant une différence, sans conséquence dans l'effet recherché, au niveau de la taille des séquences nucléotidiques de leur insert (7740 pb pour l'un et 420 pb pour l'autre). En revanche, au moins une insertion supplémentaire dans le génome nucléaire s'est produite pour l'un des transformants (*stt7-11*). Cette insertion se situe dans un gène qui code une protéine impliquée dans le transfert cyclique d'électrons autour du photosystème I, PGR5 (*Proton Gradient Regulation 5*). Une autre information importante est à signaler, leur génome nucléaire est parfaitement haploïde.



*Figure 37 : Mesures des transitions d'état dans les mutants *stt7* obtenus par la méthodologie CRISPR-Cas9*

Nous avons également testé leur capacité de croisement génétique avec une souche sauvage de signe sexuel opposé (*Tableau 8*). Elles montrent des caractéristiques très semblables à leur souche réceptrice CC-125, qui est aussi une souche sauvage de référence largement utilisée et bien caractérisée (Gallaher et al, 2015), avec cependant un défaut de survie dans la descendance pour *stt7-11*.

**Tableau 8 : Caractéristiques de croisement génétique des transformants *stt7-CRISPR-Cas9***

(\*) Formation des zygotes : (0) pas de zygote ; (+) quelques zygotes ; (+++) régulier.

(\*\*) Produit méiotique : proportion de zygotes qui ont passé la méiose, déterminée sur un total de 40 zygotes.

(\*\*\*) Viabilité cellulaire : proportion de cellules qui ont formé colonies, déterminée sur un total de 25 zygotes disséqués, soit 100 cellules.

<i>Souche</i>	<i>Agglutination avec CC-124, mt-</i>	<i>Signe sexuel</i>	<i>Formation de zygote (*)</i>	<i>Produit méiotique (**)</i>	<i>Viabilité (***)</i>
CC-125	+++	<i>plus</i>	+++	90%	43%
<i>stt7-17</i>	+++	<i>plus</i>	+++	95%	43%
<i>stt7-11</i>	+++	<i>plus</i>	+++	80%	15%

Ainsi, la transformation par la méthodologie CRISPR-Cas9 a permis l'obtention de mutants dont la lésion génétique a été maîtrisée, puisque les deux transformants ont une insertion, plus ou moins grande, à la même position dans l'exon 1 du gène *STT7*. En revanche, l'un deux, *stt7-11*, n'est pas complètement satisfaisant : il contient une insertion dans un autre gène impliqué dans le processus de la photosynthèse (*PGR5*). De plus, chez ce même mutant, les transitions d'état ne sont pas complètement bloquées et le croisement génétique est bien moins efficace, avec une faible viabilité cellulaire de la descendance. Évidemment tous ces défauts peuvent être éliminés en réalisant des rétrocroisements, mais la seule interrogation qui subsiste : dans quel contexte génétique est-il souhaitable de procéder à ces croisements ?

## 5. Discussion et perspectives

Avant de démarrer ces travaux sur ces mutants *stt7*, qui montrent qu'aucun des allèles n'est satisfaisant, nous avions connaissance de l'existence d'autres mutants alléliques qui pourraient satisfaire aux critères d'un « bon » mutant (exemple de *stm1* - (Kruse et al, 1999), et (Berry et al, 2011)). Toutefois, étant donné leur utilisation répandue dans différents laboratoires et les nombreux articles publiés qui ont résulté de leur étude, nous avons jugé pertinent de mener ce travail en utilisant ces souches (*stt7-1* et *stt7-9*).

Nous avons donc déterminé la nature de la mutation au niveau du gène *STT7*, dans la série des *stt7-1*. Dans ces souches, ce gène a été fractionné, au niveau du domaine de la kinase, et distribué sur deux chromosomes bien distincts et des rétrocroisements ont montré la robustesse de cette mutation.

Au cours des années 1960, Ebersold a constaté que quelques rares gamètes appariés (< 1% (Ebersold, 1963) ; < 3-4% (Ebersold, 1967)) fusionnaient et se divisaient par mitose au lieu de se développer en zygotes compétents pour la méiose. Ces souches semblaient être des diploïdes stables, bien que certaines recombinaisons mitotiques aient probablement eu lieu (Ebersold, 1967). Ces diploïdes hybrides, hétérozygotes pour le type de reproduction, étaient capables de s'accoupler uniquement avec des souches haploïdes *mt+*. De plus, 80% ou plus de la descendance méiotique issue des zygotes triploïdes de tels croisements étaient non viables.

Les circonstances de l'apparition de ce réarrangement chromosomique remarquable dans le mutant *stt7-1* ne peuvent cependant être déterminées de manière certaine. La transformation insertionnelle est nécessairement l'origine de la mutation *stt7-1*, étant donné que le mutant a été sélectionné sur cette particularité phénotypique d'incapacité à effectuer des transitions d'état. Une insertion dans le gène pourrait être le premier évènement. Ensuite, cette souche originale a subi un croisement avec un partenaire sauvage de signe sexuel opposé, dans le but de récupérer une paroi cellulaire, avant de subir au moins un rétrocroisement. Un évènement de translocation a pu se produire pendant le premier croisement, qui se caractérise par des échanges réciproques, ou non, de matériel chromosomique entre des chromosomes non homologues pendant la méiose. Puis au cours d'un second croisement une cellule diploïde végétative a été sélectionnée, conservant ainsi le matériel génétique des deux parents (*mt+* et *mt-*). Cette suite d'évènements pourrait également expliquer la présence de régions triploïdes dans la souche *stt7-1.5b*.

Ce travail a surtout mis en évidence qu'il était important de bien connaître l'origine des mutants sur lesquels nous travaillons et également de disposer d'une bonne référence de comparaison. Il faut être prudent dans l'interprétation d'un phénotype mutant lorsqu'il s'agit d'un processus de régulation altéré, si la mutation n'est pas limitée au gène d'intérêt. C'est peut-être le cas pour le mutant *stt7-1*, qui présente un phénotype bloqué des transitions d'état contrairement à son allèle *stt7-9*. Lorsque la fonction principale de la protéine kinase *STT7* est altérée, cela se manifeste, dans certaines conditions, par l'absence de phosphorylation des protéines LHCB4 -mais également LHCSR3, PETO, TEF23/EGY1 et LHCII -mais également LHCSR3, PETO, TEF23/EGY1 et LHCII- (Bergner et al, 2015) de certains de leurs résidus sérine ou thréonine. On sait que la différence phénotypique entre les deux mutants alléliques se caractérisent principalement par le maintien dans *stt7-9* d'un faible niveau de phosphorylation de certaines de ces protéines (jusqu'à un niveau équivalent au sauvage dans le cas de LHCB4) attribué par une expression résiduelle de *STT7*. Mais cette différence pourrait aussi s'expliquer par l'altération d'une autre protéine kinase à sérine/thréonine dans *stt7-1*, qui aurait une activité complémentaire/indépendante/supplémentaire à *STT7*. Nous avons identifié, suite à cette nouvelle organisation chromosomique du génome nucléaire du mutant *stt7-1*, qu'un gène, Cre09.g387023, situé sur le chromosome 2 du génome de référence (v6.1) et codant pour une kinase à sérine/thréonine (*Tableau 7*) a subi de la même manière que le gène *STT7* un fractionnement et une redistribution sur deux chromosomes distincts, ce qui entraîne l'extinction de ce gène. De plus, cette nouvelle méthodologie CRISPR-Cas9 qui a été utilisée pour l'obtention de ces nouveaux mutants est un très bel outil moléculaire mais ne permet toujours pas a priori de s'affranchir des vérifications de base afin de s'assurer que le mutant obtenu ne contienne pas d'autres insertions et/ou délétions.

Avant de rendre disponibles ces souches à la communauté Chlamydomonas, la complémentation fonctionnelle du mutant *stt7-17*-CRISPR/Cas9 est à obtenir et des vérifications phénotypiques sont encore à réaliser. Il faudra s'assurer par des mesures de fluorescence à froid que ces mutants sont véritablement bloqués à l'état 1, sans changements au niveau du PSII et du PSI. D'autres expériences d'analyse phénotypiques de ces mutants, qui n'ont pas du tout été évoqué pendant cette analyse, concernent la phosphorylation des protéines cibles de la kinase *STT7* lors de la transition état 1 à l'état 2, et les relations entre transitions d'état et capacité à produire un transfert d'électrons cyclique et des supercomplexes PSI/Cyt *b<sub>6</sub>f*.





## Partie B. Une étude de l'induction d'extinction non photochimique de la fluorescence (NPQ-qE)

Nous avons vu que le quenching énergétique (qE) constituait la composante prédominante du NPQ. Son induction, qui résulte d'une forte acidification du lumen, est très rapide (entre 10 et 60 s). Cette extinction de fluorescence est également réversible en quelques minutes. Ce mécanisme a été très largement étudié chez les algues vertes et les plantes (Bonente et al, 2008; Gerotto et al, 2015; Gilmore & Yamamoto, 1992; Horton et al, 1991; Li et al, 2004a; Niyogi et al, 1997a; Niyogi et al, 1997b; Niyogi et al, 1998), ce qui a permis de dévoiler des acteurs et processus impliqués dans la mise en place du NPQ-qE, comme le cycle des Xanthophylles et la protéine PSBS. *Chlamydomonas* a également été largement utilisée pour ces études (Bonente et al, 2011; Elrad et al, 2002; Finazzi et al, 2006; Peers et al, 2009), mettant en évidence les variations de fonctionnement du qE associée à un autre effecteur protéique LHCSR3.

Une de ces études, réalisée au laboratoire sur *Chlamydomonas* (Finazzi et al, 2006), a montré que contrairement aux plantes supérieures, *Chlamydomonas* présentait une capacité limitée à induire une extinction de fluorescence non photochimique lorsqu'il était exposé à une forte lumière. Quelles que soient les conditions de culture de *Chlamydomonas* (hétérotrophie en très faible lumière, correspondant aux conditions classiques du laboratoire pour cultiver cette micro-algue, ou phototrophie à 100  $\mu\text{E}$ , conditions pour la culture d'*Arabidopsis*), le principal mécanisme impliqué dans ce NPQ était le qT (une transition vers l'état 2). Cette limitation serait due à une génération réduite du gradient de protons à travers la membrane des thylakoïdes (Finazzi et al, 2006). La contribution du NPQ a cependant pu être augmentée par un stress supplémentaire soit en condition de forte lumière, soit par une baisse de la température, soit par une limitation de la fixation du  $\text{CO}_2$ . Les auteurs ont cependant observé que le NPQ ainsi obtenu et mesuré avec leur souche sauvage restait très largement inférieur, à celui évoqué dans la littérature, d'une amplitude environ trois fois inférieure (Finazzi et al, 2006; Niyogi et al, 1997b). Ces différences d'amplitude étaient attribuées aux différentes conditions physiologiques dans lesquelles le NPQ était mesuré.

L'obtention du mutant *npq4* chez *Chlamydomonas*, qui présente une délétion au niveau des gènes *LHCSR3.1* et *LHCSR3.2*, a permis de montrer que c'est l'expression de la protéine LHCSR3 qui est essentielle au développement d'un quenching énergétique chez cette

micro-algue et que son niveau d'accumulation dépend des conditions de culture (Peers et al, 2009). En effet, comme il a été montré précédemment (Finazzi et al, 2006; Niyogi et al, 1997a; Niyogi et al, 1997b) des cellules de type sauvage cultivées sous une lumière de faible intensité sont incapables de produire un NPQ-qE significatif, alors que de cultures sous une intensité lumineuse plus élevée (au moins 300  $\mu\text{E}$ ) développent une extinction de fluorescence rapide et forte lors d'une exposition à une très forte lumière. Dans ces conditions, le mutant *npq4*, qui ne peut pas exprimer la protéine LHCSR3, conserve le même phénotype que la souche sauvage cultivée en faible lumière. Cette protéine LHCSR3 joue le rôle à la fois de senseur du pH (acide) et de quencher d'excitation lumineuse (Bonente et al, 2011).

En tenant compte de ces spécificités du développement du qE chez *Chlamydomonas*, j'ai repris l'étude du NPQ. Dans un premier temps, l'évaluation du NPQ-qE a été accomplie dans le cadre d'une collaboration (hors projet de ma thèse), ce qui m'a permis de valider mes conditions de mesures du qE sur *Chlamydomonas*.

Le protocole utilisé a été largement inspiré de (Allorent et al, 2013) :

*a) Culture des cellules* : les cellules sont dans un premier temps cultivées en milieu Tris-Acétate-Phosphate (TAP) soumises à une aération par agitation (160 rpm) et sous une lumière blanche d'intensité modérée (50  $\mu\text{mol}$  de  $\text{photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

*b) Préparation des cellules* : les cellules sont ensuite récoltées pendant la phase exponentielle de culture (2 à  $4\cdot 10^6$  cellules par millilitre de milieu ( $\text{cell}/\text{mL}$ )) puis centrifugées, re-suspendues en milieu « minimum » (MIN) et ajustées à  $2\cdot 10^7$   $\text{cell}/\text{mL}$ . Ces suspensions ainsi obtenues sont conservées pendant 30 à 45 minutes dans les mêmes conditions d'illumination que pendant leur culture.

*c) Traitement forte lumière* : les cellules en suspension en milieu MIN sont ensuite exposées à une lumière blanche de forte intensité (500  $\mu\text{mol}$  de  $\text{photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et agitées (160 rpm).

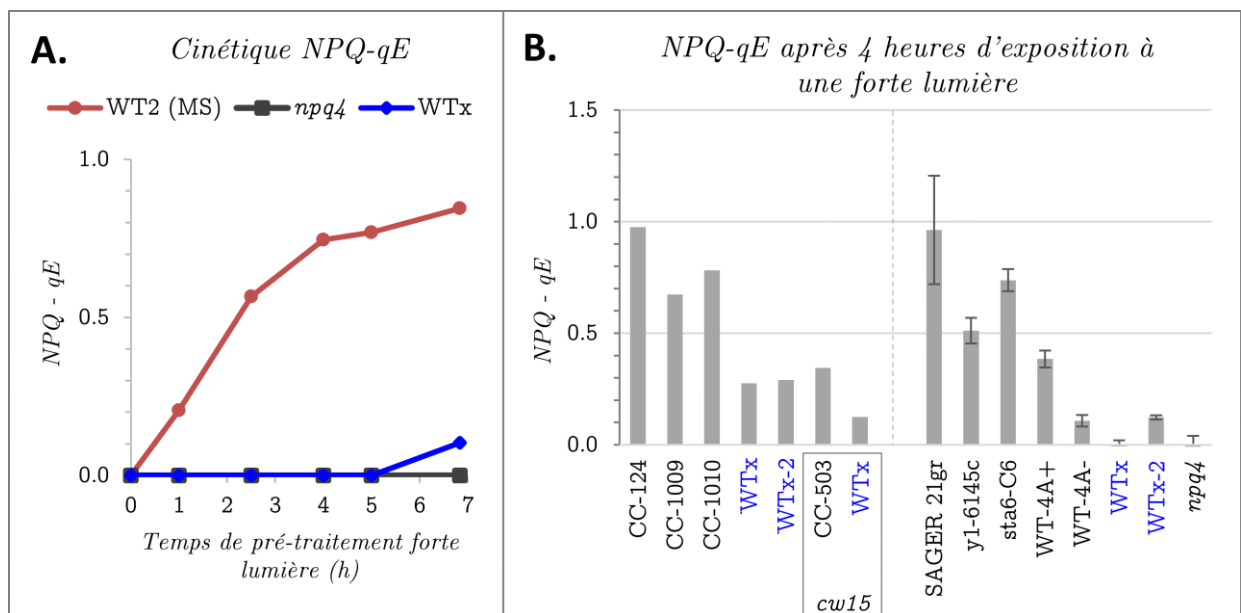
*d) Mesure de la réponse NPQ* : après ce traitement, les cellules sont soumises à une période d'adaptation à l'obscurité pendant 15 min sous une agitation vigoureuse (350 rpm) pour garantir la relaxation du NPQ induit par la pré-illumination (principalement pour être placées à l'état 1). La réponse du NPQ est mesurée à l'aide d'un système d'imagerie de fluorescence (SpeedZen, JBeamBio). L'induction est obtenue en exposant les échantillons à une lumière actinique (740  $\mu\text{mol}$  de  $\text{photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) suivie de sa relaxation à l'obscurité mesurée au bout de 10 minutes. Des impulsions saturantes (d'une durée de 250 ms et

d'intensité de 2 700  $\mu\text{mol}$  de  $\text{photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) sont utilisées pour mesurer la fluorescence maximale de la chlorophylle ( $F_M$ ) tout au long de cette évaluation. La première mesure correspond au  $F_M$  à l'état initial -algues adaptées à l'obscurité- puis les suivants,  $F_M'$ , sous éclairage, puis après coupure de la lumière actinique (entraînant la relaxation rapide du quenching énergétique).

*e) Calcul du NPQ* : Le NPQ-qE est déterminé pendant la relaxation à l'obscurité par la relation suivante :

$$\text{NPQ-qE} = (F_M'(\text{D}) - F_M'(\text{L})) / F_M'(\text{L})$$

où  $F_M'(\text{L})$  correspond à la fluorescence maximale après 10 minutes d'éclairage et  $F_M'(\text{D})$  à la fluorescence maximale 10 à 20 secondes après la coupure de la lumière actinique.



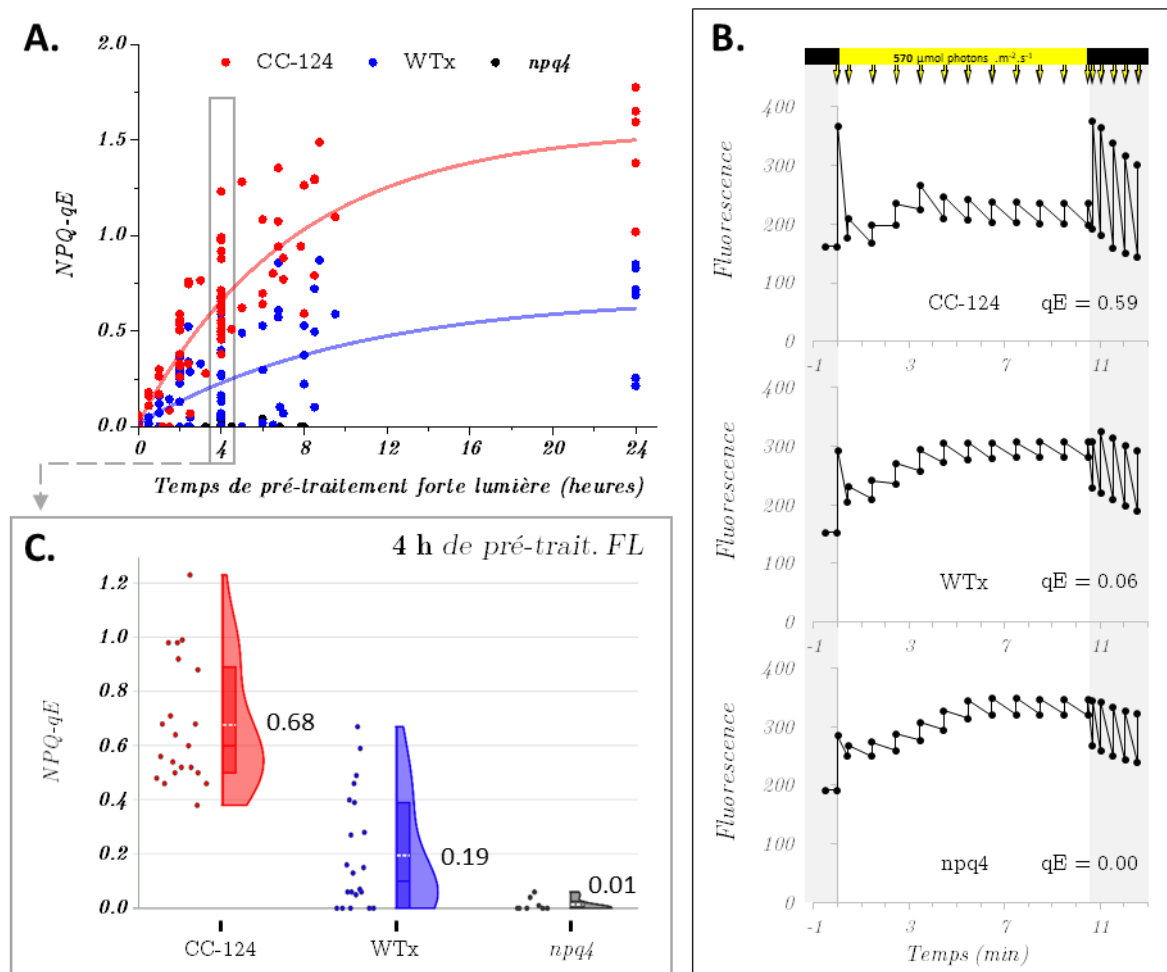
**Figure 38 : Mesures du NPQ-qE après exposition à une forte lumière FL (500 μE)**  
 (A) Cinétique d'induction du NPQ-qE chez *Chlamydomonas reinhardtii*, réalisée sur une souche de type sauvage (WT2 de Michael Schroda – Kaiserslautern, Allemagne), sur un mutant NPQ-qE qui n'exprime pas LHCSR3 (*npq4*) et sur une souche sauvage du laboratoire (WTx). (B) Comparaison du NPQ-qE de plusieurs souches sauvages d'origine différentes après 4 heures de pré-traitement FL (résultats issus de trois expériences indépendantes, à droite n=2). En bleu, des souches de notre laboratoire, de même contexte génétique : WTx, WTx-2 et cw15(WTx).

## 1. Première observation

À la suite de cette première expérience, nous avons entrepris de mesurer le NPQ sur une de nos souches de référence de type sauvage. La souche de référence précédemment utilisée (WT2) et le mutant *npq4*, qui ne développe pas de qE en raison de son incapacité à exprimer la protéine LHCSR3, ont servi respectivement de témoin positif et négatif (*Figure 38-A*). À notre grande surprise, notre souche (que sera nommée WT<sub>x</sub> tout au long de cette partie) s'est révélée altérée dans l'induction de qE. Alors que la souche de référence présente une induction du NPQ-qE qui démarre dès la première heure d'exposition de forte lumière (tFL : 500  $\mu\text{mol}$  de photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) pour atteindre un maximum d'efficacité à partir de 4 heures, c'est seulement à partir de 7 heures de tFL que cette souche WT<sub>x</sub> commence à développer un qE. Dans cette expérience, ce qE qui se développe tardivement dans WT<sub>x</sub> reste néanmoins très inférieur à celui du WT. Cette expérience a été reconduite mais en y associant différentes souches considérées comme étant de type sauvage (*Figure 38-B*), comme par exemple CC-503-*cw15*, qui est la référence utilisée initialement pour le séquençage et l'assemblage du génome nucléaire de *Chlamydomonas* (Merchant et al, 2007), mais qui présente toutefois un défaut dans sa paroi cellulaire (*cw15*). La mesure a été effectuée après 4 heures de pré-traitement FL puis 15 min d'adaptation à l'obscurité. On observe que ces trois souches (indiquées en bleu, WT<sub>x</sub>, WT<sub>x</sub>-2 et WT<sub>x</sub>-*cw15*, toutes dans le même contexte génétique que WT<sub>x</sub>) présentent un faible qE en comparaison avec l'ensemble des autres souches de références. On remarque cependant que CC-503-*cw15* a développé un qE limité, mais en comparaison avec notre souche WT<sub>x</sub>-*cw15* (ces deux souches présentent le même défaut de la paroi cellulaire), ce résultat montre toujours cette même différence significative (3 fois plus élevé). Il est important de noter que parmi ces souches testées, l'une d'entre elles (WT-4A, *mt*-) semble similaire à nos souches WT<sub>x</sub> concernant le NPQ-qE.

Ainsi, comme observé précédemment (Finazzi et al, 2006) mais dans des conditions physiologiques différentes, ces nouveaux résultats confirment que l'une de nos souches de référence présente effectivement un NPQ-qE limité par rapport à d'autres souches de type sauvage (excepté pour WT-4A, *mt*- qui sera discuté plus loin).

Pour déterminer le problème physiologique responsable de ce phénotype, une première caractérisation a été menée.



**Figure 39 : Mesures du NPQ-qE d'une souche sauvage de référence pour le NPQ (CC-124), la souche WTx et du mutant npq4.**

**A. Cinétiques d'induction du NPQ-qE**, jusqu'à 24 h de pré-traitement forte lumière (tFL). Les mesures sont issues de plusieurs expériences indépendantes. **B. Exemples d'acquisition des changements de fluorescence** sous différents régimes lumineux, obscurité -barre noire- et FL -barre jaune- (après 4 h de tFL). Les trois échantillons ont été soumis aux mêmes procédures de traitement et de manipulation. **C. Ensemble de mesures du NPQ-qE** après 4 h de tFL. Toutes les mesures précédentes correspondant à 4 h de tFL sont reportées pour chaque souche et sont présentées sous forme de diagrammes en violon et de diagrammes en boîte, avec les moyennes du NPQ-qE indiquées. Chaque point situé à gauche des diagrammes représente une mesure. CC-124 et WTx : n=21 et npq4 : n=8

Pour toutes ces mesures, les cellules ont été cultivées en milieu TAP, récoltées pendant la phase exponentielle, centrifugées puis re-suspendues en milieu MIN et ajustées à  $2.10^7$  cell/mL avant le traitement FL. Après ce traitement, les cellules sont soumises à une période d'adaptation à l'obscurité pendant 15 min sous une agitation vigoureuse.  $NPQ-qE = (F_M'(D) - F_M'(L)) / F_M'(L)$

## 2. Caractérisation du phénotype dans WT<sub>x</sub>

Nous avons vu comment le développement du NPQ-qE est mis en place chez *Chlamydomonas* (la nécessité, par exemple, d'une période d'exposition des cellules à une lumière de forte intensité pour induire l'expression de la protéine LHCSR3) et comment la mesure peut être réalisée (conditions et mode d'acquisition,...). Différents paramètres physiologiques et moléculaires impliqués dans le quenching énergétique peuvent être ainsi vérifiés.

### 2.1. Mesure de l'extinction de fluorescence chlorophyllienne

À partir des conditions préétablies décrites dans le *paragraphe 1*, nous avons réalisé plusieurs mesures du NPQ-qE sur WT<sub>x</sub>, sur une période allant jusqu'à 1 an. Cela inclut un total de 25 cultures indépendantes, chaque fois en comparaison avec une souche témoin qui produit un qE comparable en amplitude à celui publié par d'autres laboratoires (Allorent et al, 2016; Petroutsos et al, 2011; Redekop et al, 2020; Tibiletti et al, 2016) (CC-124). Le mutant *npq4*, a été le plus souvent -mais pas toujours- utilisé comme témoin négatif. Toutes ces mesures sont regroupées en *Figure 39-A*, correspondant soit aux cinétiques d'apparition du qE en fonction du temps de tFL (jusqu'à 24 heures et pour une culture donnée) soit aux mesures ponctuelles effectuées après un tFL. Ainsi, les courbes issues de l'ensemble des points de mesure pour chaque souche mettent en évidence une évolution comparable du NPQ-qE induite par le traitement de forte lumière pour les deux souches de référence. Cependant, des variations se manifestent au niveau de l'amplitude, avec des valeurs en moyenne 3 fois plus faibles pour WT<sub>x</sub> par rapport à CC-124. Des mesures représentatives des changements de fluorescence après 4 heures d'exposition en FL sont présentées en *Figure 39-B* : les valeurs du qE, déterminées par les  $F_M'$  mesurés avant et après la coupure de la lumière actinique, montre une différence encore plus grande entre CC-124 et WT<sub>x</sub> pour ce jeu de données (les cultures et suspensions de ces trois souches ayant été traitées simultanément et de manière identique). Il est à noter également que la diminution du NPQ-qE observée dans WT<sub>x</sub>, s'accompagne d'une baisse de la fluorescence maximale ( $F_M$ , mesurée sur des cellules adaptées à l'obscurité pendant 15 minutes et agitées pour être dans l'état 1 (voir *Partie A* de ce chapitre)), en comparaison avec CC-124. Cette diminution du  $F_M$  est encore plus marquée avec *npq4*. Nous interprétons cette observation comme le résultat du défaut de ce mécanisme de photoprotection (qE) qui peut entraîner des photodommages au niveau du PSII (et du PSI). En effet, différentes études ont montré que le qE protège contre une augmentation de la production d'espèces réactives à l'oxygène (comme l'exemple du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et contre la



photoinhibition, en cas d'excès de lumière (Allorent et al, 2013; Barera et al, 2021; Roach et al, 2015).

Cet ensemble de données met également en évidence que, pour un temps d'exposition à une forte lumière donné, les valeurs de qE affichent une grande variabilité pour les deux souches de référence, CC-124 et WT<sub>x</sub>, en dépit de conditions expérimentales contrôlées. Dans la *Figure 39-C*, on peut observer ces valeurs recueillies après 4 heures de tFL mais, malgré ces fluctuations, la disparité entre CC-124 et WT<sub>x</sub> reste évidente.

Ces résultats renforcent notre première observation d'un défaut du mécanisme NPQ le plus rapide (qE) dans notre souche de référence (WT<sub>x</sub>), par rapport à une référence sauvage pour ce processus. Ce défaut se caractérise par une cinétique lente et de faible amplitude de l'extinction rapide de l'émission de fluorescence en présence d'un excès de lumière, ainsi que par une faible relaxation lors du retour à l'obscurité, mais ce défaut n'est pas semblable à celui du mutant *npq4*.

Nous ne pouvons toujours pas éliminer la possibilité que ce défaut soit causé par les conditions physiologiques. En effet, avant le pré-traitement en forte lumière, les cellules sont cultivées en faible lumière, bénéficiant d'un apport en carbone réduit (acétate) dans le milieu puis transférées dans un milieu dépourvu d'acétate. Il faut attendre 24 heures d'exposition à une forte lumière dans ces conditions pour atteindre un NPQ-qE avoisinant une valeur de 2 (dans le cas de CC-124). Cet ordre de grandeur correspond aux mesures publiées chez *Chlamydomonas* (Niyogi et al, 1997b; Niyogi et al, 1998; Peers et al, 2009) lorsque celui-ci était cultivé en condition photoautotrophe (sans aucun apport en carbone réduit et sous une lumière modérée). Une étude récente (Ruiz-Sola et al, 2023) a montré que l'expression de LHCSR3 était inhibée en présence d'acétate. Les auteurs ont montré que c'est en réalité la production de CO<sub>2</sub> issu du métabolisme de l'acétate qui était responsable de cette inhibition. Si le métabolisme de l'acétate, sous le contrôle d'un grand nombre de gènes, diffère entre WT<sub>x</sub> et CC-124, la pré-culture en milieu TAP pourrait entraver d'avantage la mise en place du NPQ-qE dans WT<sub>x</sub>.

### *2.1.1. Effet de l'acétate dans le milieu de pré-culture*

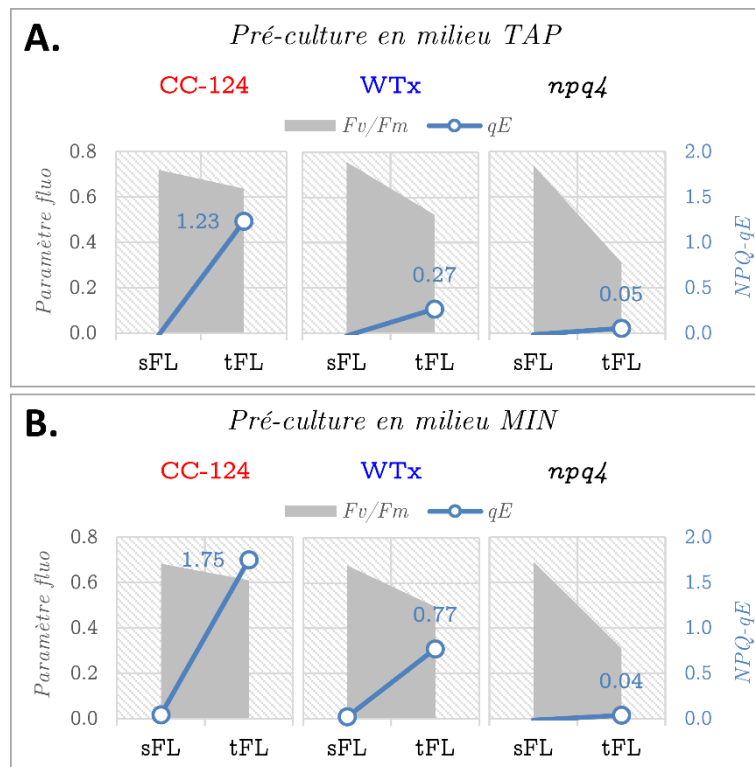
Pour déterminer l'effet des conditions de pré-culture, nous avons cultivé en milieu liquide et pendant 4 jours des cellules (qui étaient maintenues sur milieu TAP solide et faible lumière), soit en mixotrophie (en présence de 17 mM d'acétate dans le milieu (Harris, 1989) et d'une lumière modérée - 50  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) soit en phototrophie (dans un milieu

sans acétate sous une lumière de même intensité). Une dilution intermédiaire de ces cellules a été réalisée, dans le même milieu, TAP ou MIN, pour maintenir une croissance cellulaire et de sorte que les cultures soient en phase exponentielle le jour de l'expérience, avec une concentration n'atteignant pas plus de  $4.10^6$  cell/mL. Ainsi, avant d'appliquer le pré-traitement en forte lumière, les cellules de chaque souche (et condition) sont centrifugées, puis re-suspendues en milieu minimum (MIN). Les suspensions sont ajustées à une concentration de  $2.10^7$  cell/mL puis replacées sous la même lumière modérée (et sous agitation) pendant 30 à 45 minutes avant de subir le traitement FL (une fraction de chaque culture est conservée dans ces conditions et sera utilisée comme témoin « sans pré-traitement forte lumière », sFL). Après cette période de pré-traitement FL ( $500 \mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), les cellules sont traitées et analysées comme précédemment.

Les mesures obtenues dans ces deux conditions sont montrées en *Figure 40*. Sur cette figure sont présentés le rendement maximal du PSII ( $F_V/F_M$ ) sur cellules adaptées à l'obscurité pendant une période de 15 minutes, en gris (axe des ordonnées correspondantes sur la partie gauche) et la valeur du NPQ-qE, en bleu (axe des ordonnées correspondantes se situant à droite). Ces caractéristiques ont été déterminées avant (sFL) et après le traitement forte lumière (tFL), pour chaque souche (CC-124, WTx et *npq4*) et chaque condition de pré-culture (**A** : TAP et **B** : MIN).

Ainsi, les résultats présentés en *Figure 40* révèlent qu'en l'absence d'acétate dans le milieu de pré-culture, une augmentation d'environ 40% du NPQ-qE est favorisée après 4 heures de tFL. Cette observation est valable pour les deux souches de référence, CC-124 et WTx, mais elles maintiennent une nette disparité dans leur valeur du NPQ-qE. Seul le mutant *npq4* est insensible à la présence ou non d'acétate.

Ces résultats sont en accord avec ce qui a été rapporté précédemment, lorsque le NPQ est évalué en présence d'acétate (Ruiz-Sola et al, 2023). L'exposition à une forte luminosité augmente le taux de fixation du  $\text{CO}_2$ , ce qui réduit la quantité de  $\text{CO}_2$  intracellulaire. Cette disponibilité en carbone joue un rôle crucial dans la régulation du NPQ. Lorsque les niveaux de carbone inorganique sont bas, la quantité de transcrit LHCSR3 augmente. Cette régulation, indépendante de la lumière, est dirigée par CIA5, qui est également le facteur principal qui gouverne l'expression des gènes associés au mécanisme de concentration du carbone (*CCM* pour *CO<sub>2</sub> concentrating mechanism*).



**Figure 40 : Effet des conditions de pré-culture sur l'évaluation du NPQ-qE**

Des cultures ont été cultivées pour leur croissance cellulaire soit (A) en milieu Tris-Acétate-Phosphate (TAP), soit (B) en milieu minimum (MIN), sous un régime lumineux modéré (50  $\mu$ E). Les cellules ont ensuite été traitées et analysées comme précédemment (voir Figure 39). Concentration cellulaire :  $2.10^7$  cell/mL de milieu MIN ; sFL : témoin sans traitement forte lumière, tFL : 4 heures de traitement FL.

Ainsi, il est possible d'expliquer la disparité observée entre les précultures en milieux TAP et MIN de la manière suivante : étant donné une préculture en milieu TAP, les microalgues ont assimilé l'acétate stocké dans le chloroplaste sous forme d'amidon. Dans ces conditions de préculture, où l'acétate est abondant, même après une re-suspension en MIN, la concentration intracellulaire en  $\text{CO}_2$  n'est pas immédiatement réduite. Il est probable qu'un délai soit nécessaire pour cette réduction et ainsi favoriser la transcription des gènes en réponse à une forte exposition à la lumière. Une manière de réduire cette disparité serait d'introduire une étape supplémentaire lors de la préparation des cellules. Cette étape consisterait à effectuer un lavage des cellules avec le milieu MIN afin d'éliminer intégralement l'acétate présent dans le culot après la centrifugation des cultures. Une fois cette procédure réalisée, les cellules pourraient être re-suspendues dans le milieu MIN, et leur concentration ajustée. Cette approche permettrait de minimiser la présence d'acétate et limiter ainsi le  $\text{CO}_2$  intracellulaire dès le début du traitement FL.

Dans le cas du mutant *npq4*, si l'expression de la protéine LHCSR3 est inhibée en présence d'acétate, il n'est pas surprenant de ne pas observer d'effet entre ces deux conditions de culture puisque, cette protéine ne peut pas être exprimée dans ce mutant.

On observe également que l'évolution du rapport  $F_V/F_M$  est similaire pour chacune des souches, qu'elles soient cultivées (sous une lumière modérée) en milieu TAP ou MIN. Ce rendement est cependant légèrement plus élevé lorsque les cellules sont cultivées en TAP. Est-ce dû à l'assimilation de l'acétate qui protégerait *Chlamydomonas* de la photoinhibition ? La présence d'acétate dans le milieu se révèle avoir ce rôle, en limitant la production d'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) (Roach et al, 2013). Cultiver *Chlamydomonas* en milieu avec acétate améliore ses capacités de photoprotection.

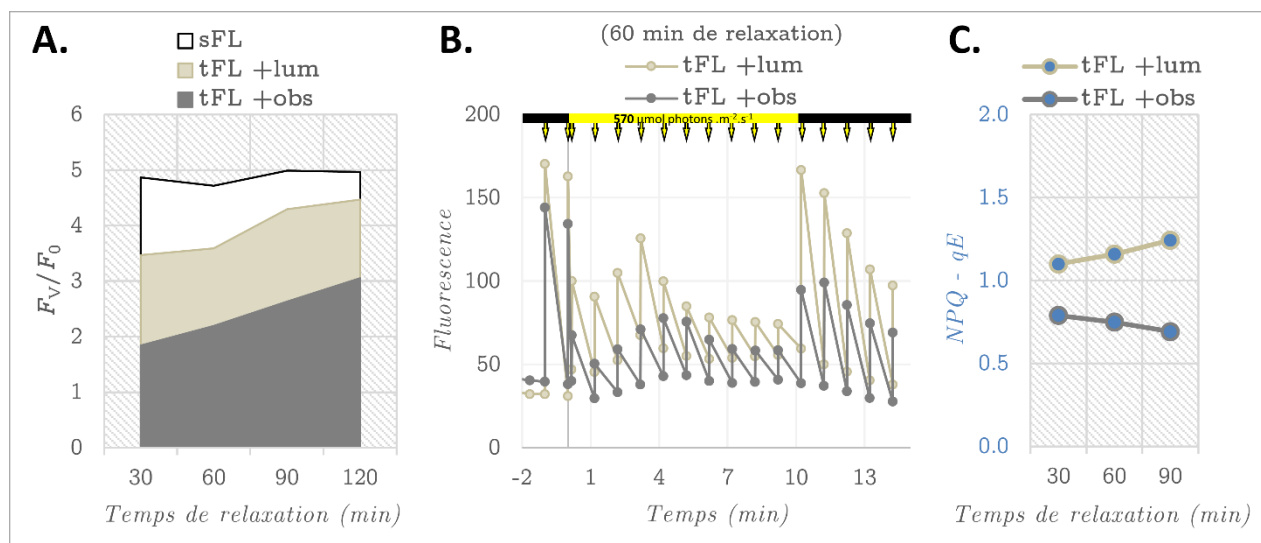
### 2.1.2. Effet de l'adaptation des cellules après un traitement forte lumière

Même si la culture de *Chlamydomonas* est effectuée en milieu TAP, le traitement en forte lumière est toujours pratiqué sur des suspensions en milieu sans acétate. Dans ces conditions (4 heures à 500  $\mu E$ ), une production d'oxygène singulet est inéluctable et favorise la dégradation de la protéine D1 (Keren et al, 1995; Ohad et al, 1990; Schroda et al, 1999), ce qui peut entraîner une photoinhibition du PSII. Il existe cependant un mécanisme de réparation du PSII dont le processus est le suivant : désassemblage du PSII, remplacement de la sous-unité D1 endommagée par une sous-unité néo synthétisée et réassemblage du PSII (Keren et al, 1995; Theis & Schroda, 2016). La photoinhibition se produit lorsque la vitesse de détérioration du PSII dépasse la vitesse de réparation.

Nous avons voulu vérifier si nos conditions de traitement à une forte lumière favoriseraient ou non le processus de photoinhibition, et le cas échéant, d'identifier des moyens pour atténuer son effet. Il a été montré qu'après une exposition à une lumière intense le mécanisme de réparation du PSII nécessite un retour en faible lumière (Keren & Ohad, 1998; Murata et al, 2012).

Pour ce faire, nous avons effectué, comme précédemment, des mesures de changements de fluorescence induits par une lumière actinique sur une suspension de cellules provenant d'une souche de référence (CC-125) ayant subi divers traitements (*Figure 40*) : une première partie est conservée dans les conditions de croissance à 50  $\mu E$  (sFL) tandis qu'une autre est soumise à un tFL pendant 4 heures. Après cette période, cette dernière fraction est de nouveau partitionnée, pour être soit remplacée sous une lumière modérée (tFL +lum), soit incubée à l'obscurité (tFL +obs). Les mesures ont ensuite été effectuées à différents temps d'incubation

(relaxation) après cette période de traitement de 4 heures et en utilisant sFL comme témoin. Avant chaque mesure, les cellules ont été adaptées à l'obscurité pendant au moins 2 minutes.



**Figure 41 : Effets du temps de relaxation sur la fluorescence, après une exposition à une forte lumière.**

Après un traitement de 4 heures à 500  $\mu\text{E}$  (tFL), une suspension de cellules d'une souche sauvage (CC-125) est soit placée à l'obscurité (+obs) soit en présence d'une lumière de faible intensité, 50  $\mu\text{E}$  (+lum). Une fraction de cette suspension qui n'a pas subi d'exposition à une forte lumière (sFL) est également conservée en faible lumière. Des mesures de fluorescence ont été réalisées à différents temps d'incubation (30, 60, 90 et 120 minutes). (A) Évolution des rapports  $F_V/F_0$  (sur des cellules adaptées à l'obscurité pendant au moins 1 min) dans chaque condition d'incubation. ( $F_V = F_M - F_0$ ). (B) Acquisition des changements de fluorescence sous l'effet d'une lumière actinique après une période de relaxation de 60 minutes à l'obscurité ou à 50  $\mu\text{E}$  (suivie d'une courte période d'obscurité), suite au tFL. (C) Effets des conditions d'incubation et du temps de relaxation sur la mesure du NPQ-qE.

À partir de ces différentes acquisitions, nous avons pu suivre l'évolution du rapport  $F_V/F_0$  (lorsque toutes les cellules sont adaptées à l'obscurité –en absence d'induction du NPQ-qE) pour chaque condition de relaxation (Figure 40-A). On observe ainsi que le  $F_V/F_0$  est largement augmenté dès 30 minutes à 50  $\mu\text{E}$ , par rapport à la situation où les cellules sont placées directement, et maintenues, à l'obscurité. Cette augmentation en présence de faible lumière peut être attribuée à une réparation et une récupération de PSII, après une destruction par photoinhibition pendant le tFL, mais également à une transition vers l'état 1. En effet, malgré une période de 15 minutes à l'obscurité et sous agitation favorisant un retour le plus proche de l'état 1 (voir *Partie A* de ce chapitre), nous observons que les cellules se trouvaient dans un état proche de l'état 2 avant l'ouverture de la lumière actinique (correspondant à la phase II des courbes de changement de fluorescence). Lorsque l'on observe les courbes de cette expérience, par exemple après 60 minutes d'incubation (Figure 40-B), cette phase II est présente dans les deux situations. Ces observations suggèrent que le mécanisme, réversible, des transitions d'état (qT) n'est pas responsable de

cette augmentation du rapport  $F_V/F_0$  mais bien une réparation des PSII. Cette photoinhibition (ou vitesse de réparation du PSII) semble également avoir un impact sur la détermination du NPQ-qE. En *Figure 40-C* sont reportées les valeurs du qE de cette souche de type sauvage suivant les conditions d'incubation après le tFL. Ces valeurs sont réduites (ou sous-estimées) lorsque les suspensions sont incubées directement à l'obscurité.

*Note* : dans l'exemple donné en *Figure 40-B*, la relaxation rapide de l'extinction de fluorescence au retour à l'obscurité (point  $F_M'_{(D)}$  saisi 10 secondes après la coupure de la lumière actinique) est probablement plus lente lorsque l'incubation après tFL est réalisée en absence de lumière (tFL +obs). La séquence d'acquisition n'a pas permis (dans cet exemple en particulier) de recueillir le maximum  $F_M'_{(D)}$  pour la condition « tFL +obs ». Une extrapolation pour estimer la valeur  $F_M'_{(D)}$  ne permet cependant pas d'obtenir une estimation similaire du qE par rapport à celle obtenue en condition tFL +lum. Par la suite, et si besoin, cette séquence aura été ajustée.

En fonction de ces résultats, nous avons ainsi, par la suite, adapté le protocole en le complétant d'une période d'incubation entre 15 et 30 minutes en lumière modérée (50  $\mu$ E) avant la mesure de fluorescence, pour favoriser/initier le mécanisme de réparation du PSII.

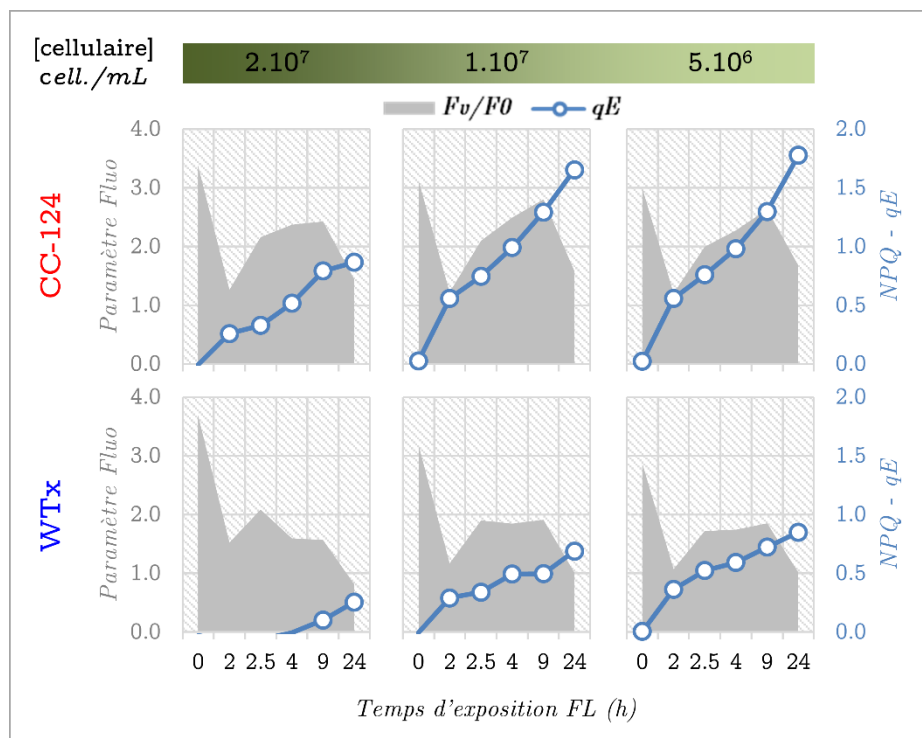
### 2.1.3. Effet de la concentration cellulaire

L'intensité de la lumière permettant de saturer la vitesse de transfert d'électrons photosynthétique dans une culture de micro-algues dépend d'une combinaison complexe de facteurs. Parmi ces facteurs, on peut citer la saturation due aux propriétés cinétiques de la photosynthèse elle-même, la concentration cellulaire et la forme des cellules. Nous avons souhaité tester si cette lumière était vraiment saturante, dans nos conditions de culture et de mesure, pour l'estimation du qE. Pour ce faire, plutôt que de modifier directement l'intensité lumineuse, nous avons choisi de faire varier la concentration cellulaire. Cette approche (et grâce au système d'acquisition que nous utilisons) permet d'explorer simultanément plusieurs conditions. En diluant graduellement la densité cellulaire, passant d'une densité élevée à une densité plus faible, cela permet d'augmenter l'intensité lumineuse moyenne à laquelle les cellules sont exposées, tout en améliorant l'uniformité de l'éclairage.

Initialement, la concentration cellulaire dans laquelle se trouvaient les suspensions pour évaluer le NPQ était à  $2.10^7$  cell/mL de milieu (Allorent et al, 2013). Nous avons dilué deux fois successivement cette suspension d'un rapport de 2. Les densités ainsi testées sont  $2.10^7$ ,  $10^7$  et  $5.10^6$  cell/mL. Nous avons choisi de conserver les conditions de pré-culture en milieu TAP plutôt qu'en MIN et également choisi d'effectuer une incubation de 30 minutes à 50  $\mu$ E après le tFL.

Ainsi, nous observons en *Figure 42* (courbes bleues) que lorsque la concentration cellulaire diminue, c'est-à-dire lorsque l'intensité lumineuse perçue par les cellules augmente,

le développement du NPQ- $qE$  observé jusqu'à 24 heures de tFL, est augmenté. Cette observation est valable pour CC-124 et WT $x$ , bien que leur différence, observée jusqu'à présent, soit moins prononcée aux concentrations les plus faibles. Il est intéressant de remarquer que lorsque les cellules de WT $x$  sont diluées quatre fois plus que CC-124, tout en maintenant des conditions d'illumination et de traitement identiques, elles forment un  $qE$  équivalent. Cette souche, WT $x$ , est donc capable de développer un NPQ- $qE$  comparable à celui de la souche de référence pour ce mécanisme, que ce soit en termes de vitesse d'induction et d'efficacité. Cependant, elle requiert une intensité lumineuse plus élevée que la souche CC-124.



**Figure 42 : Effet de la concentration cellulaire sur l'induction du NPQ- $qE$**

Cinétiques d'induction du NPQ- $qE$  réalisées sur des cellules des souches de références, CC-124 et WT $x$ , à différentes concentrations cellulaires. Chaque suspension a été soumise au même traitement FL (500  $\mu E$ ) pendant 4 heures, suivies d'une première période de 30 min à 50  $\mu E$  (relaxation) et d'une autre de 15 min à l'obscurité (adaptation). Des suspensions non traitées à une FL ont été conservées pour représenter les témoins au temps 0 (sans tFL).

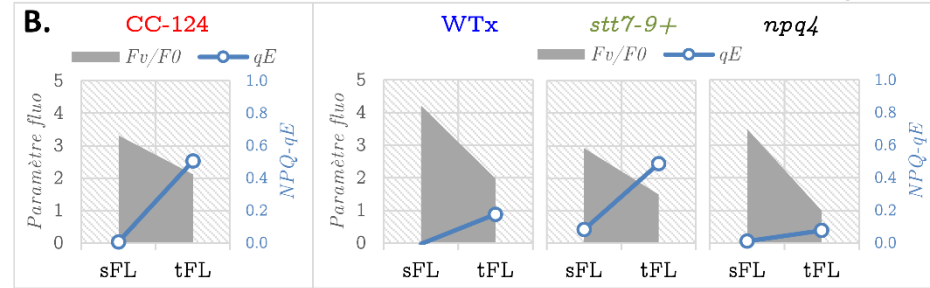
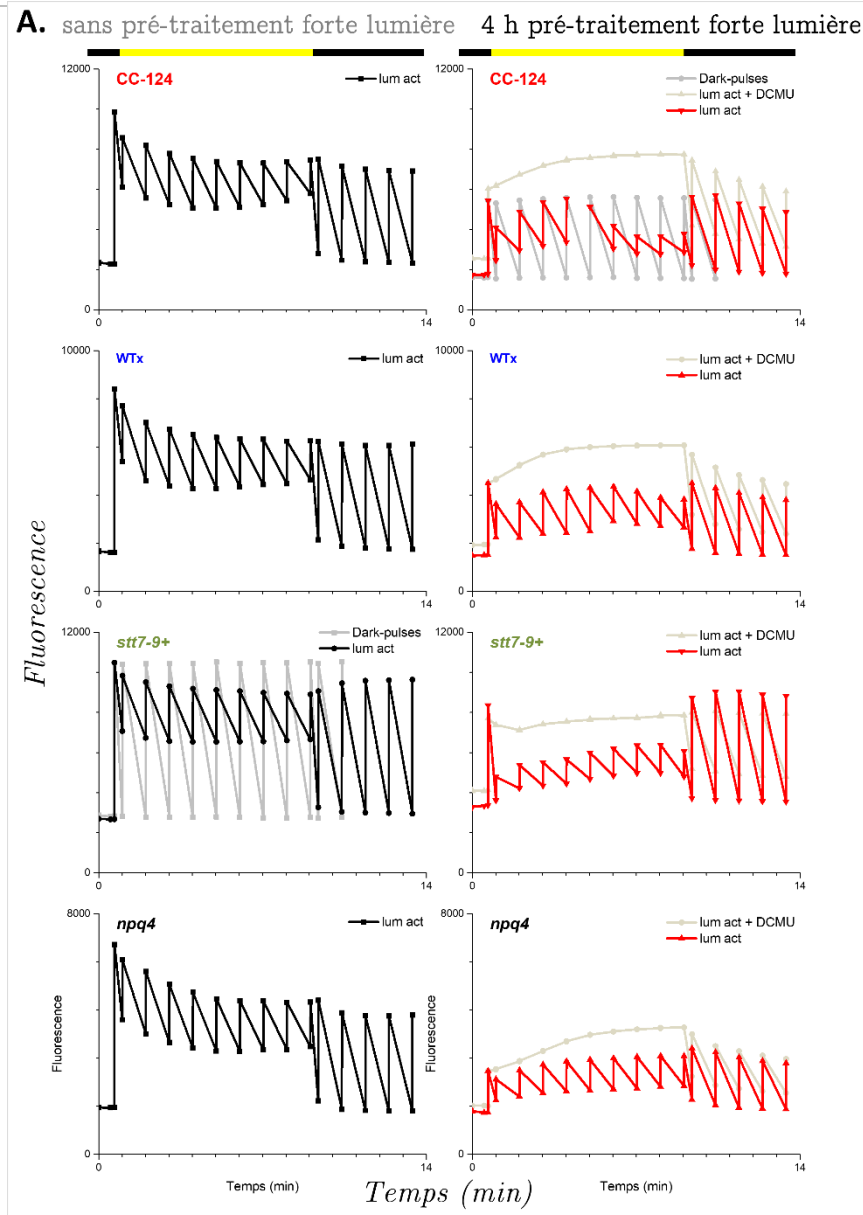
Comme précédemment, une fraction de chaque suspension a été conservée dans les conditions de pré-culture et utilisée comme témoin sans traitement forte lumière (au temps 0). Ces témoins nous permettent de contrôler l'état initial du PSII avant le traitement, qui est déterminé par le rapport  $F_V/F_0$  (correspondant au rendement maximal du PSII) sur des cellules adaptées à l'obscurité. Ainsi, lorsque l'on suit ce rendement pendant toute la période du traitement FL (Figure 42, courbes grises), on observe une première chute de ce rapport,

comme nous l'avons constaté précédemment (paragraphe 2.1.1 et 2.1.2). Nous avons interprété cette chute par une forte contribution du qI. Ce mécanisme s'opère rapidement lors d'un transfert brutal sous un régime lumineux intense (Keren et al, 1995), qui est visible en *Figure 42* par cette forte diminution du rendement après 2 heures de tFL. Cette baisse est rapide (dès 30 minutes) suivie d'une remontée lente de ce rapport, observable pour les deux souches et dans les différentes conditions lumineuses (ou de différentes concentrations cellulaires). Ce retour s'explique par une adaptation au stress lumineux, qui persiste au moins pendant les neuf premières heures de tFL. Plus précisément, la vitesse de réparation du PSII dans ces conditions dépasse celle de sa dégradation. Cette réparation semble cependant plus efficace dans la souche CC-124. Bien que ce processus s'opère dans WTx, celui-ci montre davantage de difficultés à retrouver son état initial (avant le tFL) et c'est particulièrement le cas lorsque le NPQ-qE n'est pas induit (à  $2.10^7$  cell/mL). Dans le cas de CC-124, on peut clairement observer que l'efficacité du NPQ-qE augmente à mesure que l'intensité lumineuse (perçue) augmente et cela se traduit également par une meilleure capacité de récupération du rendement maximal du PSII.

En résumé, cette expérience, qui expose les cellules à différentes intensités lumineuses en diminuant la densité cellulaire, montre que dans les conditions initiales de traitement à une forte lumière, la saturation lumineuse n'était pas atteinte. En revanche, WTx est capable d'induire un NPQ-qE, bien que son efficacité reste inférieure à celle de CC-124. Mais lorsque le tFL est appliqué aux concentrations cellulaires les plus faibles (en lumière saturante), cet excès d'énergie d'excitation favorise davantage la photoinhibition chez WTx, entraînant ainsi une diminution plus significative du rendement maximal du PSII.

Dans nos conditions de mesure d'émission de fluorescence (sur des cellules non agitées pendant 15 minutes d'acquisition), après une exposition à une forte lumière, nous pouvons nous interroger sur la contribution d'un autre mécanisme de photoprotection (qT) dans l'estimation du rendement maximal du PSII mais également du NPQ-qE. En effet, comme nous l'avons mentionné, même après une période d'adaptation à l'obscurité (15 minutes) soumis à une forte agitation, conditions qui doivent favoriser une récupération vers l'état 1, les cellules restent dans une situation proche de l'état 2.





**C.**

1. Composition en chlorophylle

	CC-124	WTx	stt7-9+	npq4
[Cell] (cell/mL)	1.10 <sup>7</sup>	1.10 <sup>7</sup>	1.10 <sup>7</sup>	6.10 <sup>6</sup>
[Chl] (µg/10 <sup>6</sup> cell)	1.39	1.31	1.51	1.64
Chl a/b	2.9	3.2	2.8	3.1

2. Paramètres de fluorescence sur matériel adaptés à l'obscurité

sans pré-traitement forte lumière (sFL)				
$F_M/Cell$	100%	85%	106%	43%
$F_V/F_M$	0.77	0.81	0.75	0.78
$F_V/F_0$	3.32	4.22	2.93	3.50
4h pré-traitement forte lumière (FL)				
$F_M/Cell$	100%	83%	153%	31%
$F_V/F_M$	0.68	0.66	0.60	0.50
$F_V/F_0$	2.12	1.98	1.50	0.99
$F_M FL / F_M sFL$	55%	54%	80%	40%

3. Paramètre NPQ

qE	0.51	0.18	0.49	0.08
----	------	------	------	------

**Figure 43 : Détermination de la composition en chlorophyllienne, des paramètres de fluorescence et mesure du NPQ (qE et qT) sur différentes souches de références du NPQ (qE et qT)**

Ces mesures ont été réalisées à partir de pré-cultures en milieu TAP. Les cellules ont été récoltées puis re-suspendues et ajustées à 1.10<sup>7</sup> cellules par mL de milieu MIN. Le dosage de la chlorophylle a été réalisé par la méthode Porra, et les mesures de fluorescence sur un montage nommé « fluo liquide » avec lequel une homogénéisation et aération de l'échantillon est possible.

#### 2.1.4. Effet de la sédimentation/anaérobiose pendant la mesure des changements de fluorescence

Les mesures précédentes ont été réalisées avec un système d'imagerie de fluorescence, chaque échantillon est placé dans un puits et sans agitation pendant les 15 min d'acquisition. Par cette technique, la sédimentation des cellules ne peut pas être maîtrisée et une partie de ces cellules pourraient se retrouver en conditions anaérobiques (voir *Introduction* de ce chapitre, *mesure du NPQ*). Cette situation favorise une transition vers un état 2 (migration d'une partie des LHCII vers le PSI).

Une expérience a été menée sur CC-124, WTx, *stt7-9* (mutant du qT) et *npq4* (mutant du qE). Ces souches sont cultivées en TAP à 50 $\mu$ E, transférées en MIN et ajustées à une concentration cellulaire de 10<sup>7</sup> cell/mL (sauf *npq4*, -en raison d'une estimation initiale inexacte du volume de la culture). Un dosage des chlorophylles sur ces suspensions a été réalisé puis celles-ci ont été fractionnées afin qu'une partie soit maintenue dans les conditions de cultures (50  $\mu$ E) et l'autre soit exposée à une forte lumière, pendant 4 heures. Les mesures des changements de fluorescence (*Figure 43-A*) ont ensuite été menées sur un montage différent, qui présente l'inconvénient que les échantillons ne peuvent être traités que successivement et dans ce cas, il est impératif de maîtriser les différents temps d'incubation entre tous les échantillons. Cependant, pendant la période nécessaire d'une mesure complète des changements de fluorescence (environ 15 minutes), une remise en suspension des cellules (par aspiration/refoulement à la pipette) est possible, permettant ainsi d'éviter leur sédimentation.

Nous constatons que cette technique, qui favorise une homogénéisation des cellules, est efficace et maintient le matériel dans des conditions constantes. C'est ce que nous observons (*Figure 43-A*, courbes gris clair) lorsque les cellules sont adaptées et maintenues à l'obscurité pendant la période des 15 minutes de mesure, le contrôle régulier de la fluorescence maximale ( $F_M$ ) est parfaitement stable. Cependant, même si une anaérobiose peut s'installer lors des mesures avec le montage caméra par une sédimentation cellulaire favorisant ainsi une transition vers l'état 2, induite par le processus qT, l'efficacité du NPQ ne semble pas être affectée. En effet, après le tFL, la dynamique de fluorescence que l'on observe dans la souche CC-124 lors d'une remise en suspension et aération (*Figure 43-A*, courbe rouge) est équivalente à celle observée précédemment (*Figure 39-B*) et la valeur du NPQ-qE déterminée pendant la relaxation à l'obscurité n'est pas augmentée (0.51 après 4 heures de tFL, *Figure 43-C-3*). On note également (*Figure 43-C-2*) que la fluorescence maximale ( $F_M$ , déterminée

sur les cellules adaptées à l'obscurité et agitées pendant 15 minutes) est atténuée (45%) après l'exposition en forte lumière (tFL) de manière équivalente dans CC-124 et WTx. Cela est en partie dû à une transition vers un état 2 après le tFL, état qui se confirme par l'augmentation du  $F_M$  lors d'une période de lumière actinique (correspondant à la phase II (voir *Introduction* de ce chapitre, *paragraphe 2 - La mesure du NPQ*) et (Allorent et al, 2013)) et également en présence d'un inhibiteur spécifique du PSII, le DCMU (*Figure 43-A*, courbes brun clair). Cette observation suggère que, suite à une exposition prolongée à une forte lumière, la transition de l'état 2 à l'état 1 soit plus lente qui nécessiterait une période de récupération à l'obscurité plus longue. Cette atténuation générale du  $F_M$  est moins prononcée (20%) dans le mutant *stt7-9*, qui est incapable (ou de manière très limitée, voir *Partie A* de ce chapitre) d'accomplir des transitions vers l'état 2. Dans les mêmes conditions en présence de DCMU, le  $F_M$  est (à peu près) stable. En plus du qT, une photoinhibition du PSII (qI) doit vraisemblablement être engagée pendant les quatre heures à 500  $\mu\text{E}$ .

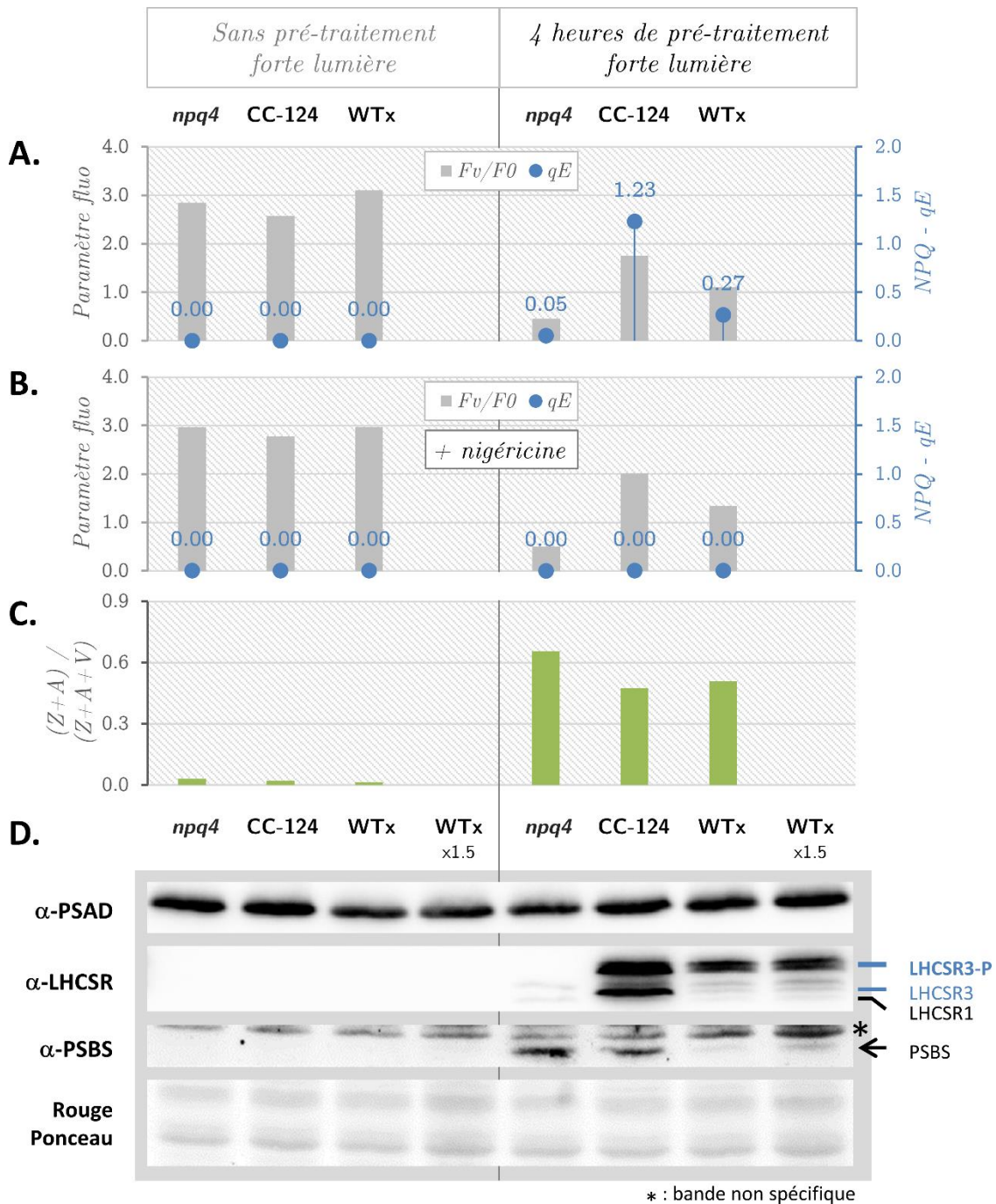
Après ce tFL, on observe qu'il ne reste que 40% d'émission de fluorescence maximale possible dans le mutant *npq4*, ce qui illustre bien que le qE, induit essentiellement par la protéine LHCSR3, est également essentiel pour la photoprotection (même si la concentration cellulaire initiale de ce mutant était plus faible, cette observation est toujours vraie, voir *Figure 40*). On peut se demander, dans cette situation où la protéine LHCSR3 est absente, quel serait le processus qui est favorisé et qui permet de protéger l'appareil photosynthétique de cet excès de lumière ? Dans différentes études (Allorent et al, 2013; Roach et al, 2013), les auteurs n'ont pas observé de différence dans le profil de phosphorylation des antennes du PSII entre une souche sauvage et le mutant *npq4*. La contribution du qI (au niveau du PSII et probablement du PSI) dans ce mutant devient alors plus importante.

Il est à noter également que le rapport Chl *a*/Chl *b* (*Figure 43-C-1*) est légèrement plus élevé dans WTx et *npq4* (sur cultures acclimatées) par rapport à CC-124. Un rapport Chl *a*/Chl *b* plus élevé peut se traduire par une plus petite taille d'antenne, les molécules de chlorophylle *b* n'étant présentes que dans les protéines LHC qui constituent les antennes. Des mesures réalisées sur les 2 souches de référence (CC-124 et WTx) n'ont pas montrées de différence de taille d'antenne (déterminée par le  $t_{1/2}$  de la montée de fluorescence de la chlorophylle en présence de DCMU, qui est inversement proportionnel à la taille d'antenne fonctionnelle du PSII).

Pour conclure, lorsque les cellules sont maintenues en suspension pendant la mesure de changement de fluorescence, et avec une oxygénation adéquate, on observe des similitudes

entre les caractéristiques de WTx et celles de CC-124 et *npq4*. Comme nous l'avons observé précédemment, après un traitement à une forte lumière, les mécanismes de photoprotection (qE, qT et qI) sont activés. Cependant, en cas d'inefficacité de l'un de ces mécanismes, en raison d'une altération d'un gène ou des gènes essentiels à leur fonction, comme *STT7* pour le qT et *LHCSR3.1/2* pour le qE, il semble que chacune de leur contribution soit ajustée. On observe une photoinhibition (qI) après le tFL dans toutes les souches et un quenching supplémentaire lorsque les cellules sont capables de réaliser des transitions d'état, se rapprochant vers un état 2 au début de l'illumination de la lumière actinique. L'observable le plus remarquable est certainement l'absence de la diminution du  $F_M'$  après quelques minutes de lumière actinique dans les deux souches, WTx et *npq4*, qui n'induisent pas ou peu de quenching énergétique (qE). Cette redescende du  $F_M'$  est attribuée à la dynamique de LHCSR3 (Phase III, (Allorent et al, 2013)). Comme dans le cas des LHCI mobile, cette protéine peut être phosphorylée par la kinase STT7 (Bergner et al, 2015; Xue et al, 2015a) et également migrer du PSII vers le PSI. Ainsi, après la phase de transition d'un état 2 vers un état 1 (phase II), cette partie mobile de LHCSR3, qui se retrouve dé-phosphorylée, peut à nouveau jouer leur rôle de quencher au niveau du PSII. Cette phase III est directement observable avec le mutant *stt7-9* où, en absence de transitions d'état, un quenching rapide de fluorescence se produit dès l'ouverture de la lumière actinique (absence de la phase II).

À la lumière de ces observations, il est justifié de se demander si l'expression de LHCSR3 est affectée dans cette souche WTx. De plus, nous pourrions nous interroger sur d'éventuelles altérations dans le cycle des xanthophylles, un processus qui participe également à la dissipation du gradient de protons.



**Figure 44 : Observation des caractéristiques de fluorescence et biochimique de l'induction du NPQ- $qE$ .**

Les cellules ont été cultivées en milieu TAP (50  $\mu E$ ) et récoltées en phase exponentielle, puis resuspendues en milieu MIN à une concentration de  $10^7$  cell/mL et replacées sous agitation à 50  $\mu E$  pendant 30 à 45 min. Une fraction de chaque culture est conservée dans ces conditions tandis que le reste est exposé à une forte lumière (500  $\mu E$ ) pendant 4 heures. Après cette période d'incubation, les cellules en suspensions sont toutes placées à l'obscurité 15 min sous une forte agitation, puis le NPQ- $qE$  est déterminé (**A**) en absence et (**B**) en présence de nigéricine (ionophore échangeur de  $H^+/K^+$ ), (**C**) composition pigmentaire déterminée par HPLC et (**D**) accumulation de différentes protéines évaluée par immuno-empreintes à partir de cellules entières. Les protéines ont été fractionnées par électrophorèse ( $[Chl]=10$   $\mu g$ /puits) sur un gel de gradient de polyacrylamide 12-18% - urée 8M et sondées avec les anticorps spécifiques comme indiqués : PSAD (sous-unité du PSI), LHCSR (*light-harvesting complex stress-related*, qui reconnaît à la fois LHCSR1, LHCSR3 et la forme phosphorylée de LHCSR3) et PSBS (sous-unité du PSII). La coloration des protéines au rouge ponceau sert de témoin de charge.

## 2.2. Caractéristiques biochimique et moléculaire de l'extinction de fluorescence

Le NPQ-qE implique le cycle des xanthophylles et l'accumulation de LHCSR3. Chez *Chlamydomonas*, la protéine PSBS est également essentielle pour induire une pleine capacité du NPQ lors d'une acclimatation à une lumière élevée (Correa-Galvis et al, 2016). Nous avons alors déterminé si WTx présente ces mêmes caractéristiques que l'on observe chez une souche sauvage.

1) Pour cela, nous avons comparé le NPQ-qE, la composition en pigments (en utilisant la technique de chromatographie liquide à haute performance, HPLC) et l'accumulation des principales protéines impliquées dans le quenching énergétique chez *Chlamydomonas*, LHCSR3 (Bonente et al, 2011; Peers et al, 2009) et PSBS (Allorent et al, 2016; Tibiletti et al, 2016; Tilbrook et al, 2016) (par la technique des immuno-empreintes) entre des cellules acclimatées à une lumière modérée (50  $\mu$ E) et des cellules exposées à une forte lumière (500  $\mu$ E) pendant 4 heures (tFL). Cette comparaison a été effectuée sur des cellules des souches de référence (CC-124 et WTx) et du mutant qui n'exprime pas LHCSR3, *npq4* (Figure 44).

a) NPQ-qE : Conformément à nos précédentes observations, après le tFL, WTx présente un faible qE (4 fois plus faible dans cette expérience) par rapport à CC-124 (Figure 44-A) et dans le cas du mutant *npq4*, celui-ci est évidemment encore plus faible.

b) Contrôle du gradient de protons : Afin de nous assurer que nous mesurons bien un quenching énergétique induit par un fort gradient de protons à travers les membranes du thylakoïdes, la mesure de changement de fluorescence a également été réalisée en présence de nigéricine (10  $\mu$ M) (Figure 44-B). La nigéricine est un ionophore qui agit comme un échangeur proton/potassium et va ainsi éliminer le gradient de protons qui se forme en présence de lumière sans supprimer la composante électrique de ce gradient électrochimique (Gilmore et al, 1998; Walters & Horton, 1991). Ce traitement provoque en effet la suppression du qE dans toutes les cultures.

c) Le cycle des Xanthophylles : Ensuite nous avons analysé la composition des pigments dans ces cultures avant et après le tFL (ANNEXE 6 : chromatogrammes HPLC). Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux pigments impliqués dans le cycle des xanthophylles : violaxanthine (V), anthéroxanthine (A) et zéaxanthine (Z). L'évaluation de l'état dans lequel les pigments xanthophylles sont présents dans ces souches, et dans ces différentes conditions, peut être obtenue en déterminant le DEPS (pour *état de dé-époxydation*). Ce DEPS est calculé à partir des quantités déterminées pour chaque pigment

et de la manière suivante :  $(A + Z) / (V + A + Z)$ . On peut ainsi constater (*Figure 44-C*) que des cellules acclimatées à 50  $\mu\text{E}$  ne montrent pas de DEPS (lorsqu'elles sont soumises à une faible lumière, la majeure partie des pigments présents est la violaxanthine). Cependant, après avoir été exposées à une forte lumière, la violaxanthine dé-époxydase (VDE) a été activée, entraînant la conversion de la violaxanthine en anthéroxanthine puis en zéaxanthine, conduisant ainsi à l'augmentation du DEPS. C'est le cas pour les trois souches testées (CC-124, WTX et *npq4*). Nous pouvons conclure que leur cycle des xanthophylles n'est pas altéré.

*d) Expression des protéines du NPQ-qE :* Après cela, nous avons évalué l'accumulation des différentes protéines (*Figure 44-D*). Nous avons en particulier considéré celles qui sont impliquées dans le qE et dont on avait les anticorps à notre disposition,  $\alpha$ -LHCSR, qui reconnaît à la fois LHCSR1, LHCSR3 et sa forme phosphorylée (Bonente et al, 2011) et  $\alpha$ -PSBS (Tibiletti et al, 2016). Les échantillons extraits de cellules entières ont été chargés à concentration en chlorophylle constante (10  $\mu\text{g}$ /puits) et la sous-unité du PSI (PSAD) a été utilisée comme témoin de charge, même si ce choix n'est pas complètement pertinent (tant que nous ne connaissons pas l'origine du défaut dans WTX, toutes les protéines présentes dans le chloroplaste sont susceptibles d'être affectées), la coloration des protéines (LHCII) au rouge ponceau sert également de témoin de charge.

Néanmoins, lorsque l'on compare l'accumulation des protéines entre les deux conditions de traitement lumineux (50  $\mu\text{E}$  et 500  $\mu\text{E}$ ), on observe que la souche de référence pour le NPQ, CC-124, présente des signaux pour les protéines LHCSR3 et PSBS uniquement après le traitement en forte lumière. Effectivement, nos conditions de pré-cultures (en présence d'acétate et à 50  $\mu\text{E}$ ) puis un transfert en milieu MIN (dans ces mêmes conditions d'illumination pendant 4 heures) ne permettent pas l'expression de ces protéines (Correa-Galvis et al, 2016; Peers et al, 2009) et une détection de leur accumulation n'est donc pas possible. C'est seulement après le tFL qu'une accumulation de ces protéines est visible, expliquant ainsi la capacité de CC-124 à induire un NPQ-qE (*Figure 39-A*). De manière similaire, on observe l'accumulation de LHCSR1 et de la forme phosphorylée de LHCSR3 (LHCSR3-P) dans les mêmes conditions. LHCSR1 est une protéine qui est également impliquée dans le qE, dans une moindre mesure que LHCSR3 dans nos conditions de tFL (lumière blanche) (Peers et al, 2009) ; sa capacité pour le qE est plus importante en réponse à un stress lumineux de type UV-B (Allorent et al, 2016; Tilbrook et al, 2016). La protéine LHCSR3, qui possède plusieurs sites de phosphorylation qui sont reconnus par la kinase STT7 (Bergner et al, 2015), présente également une accumulation de sa forme phosphorylée

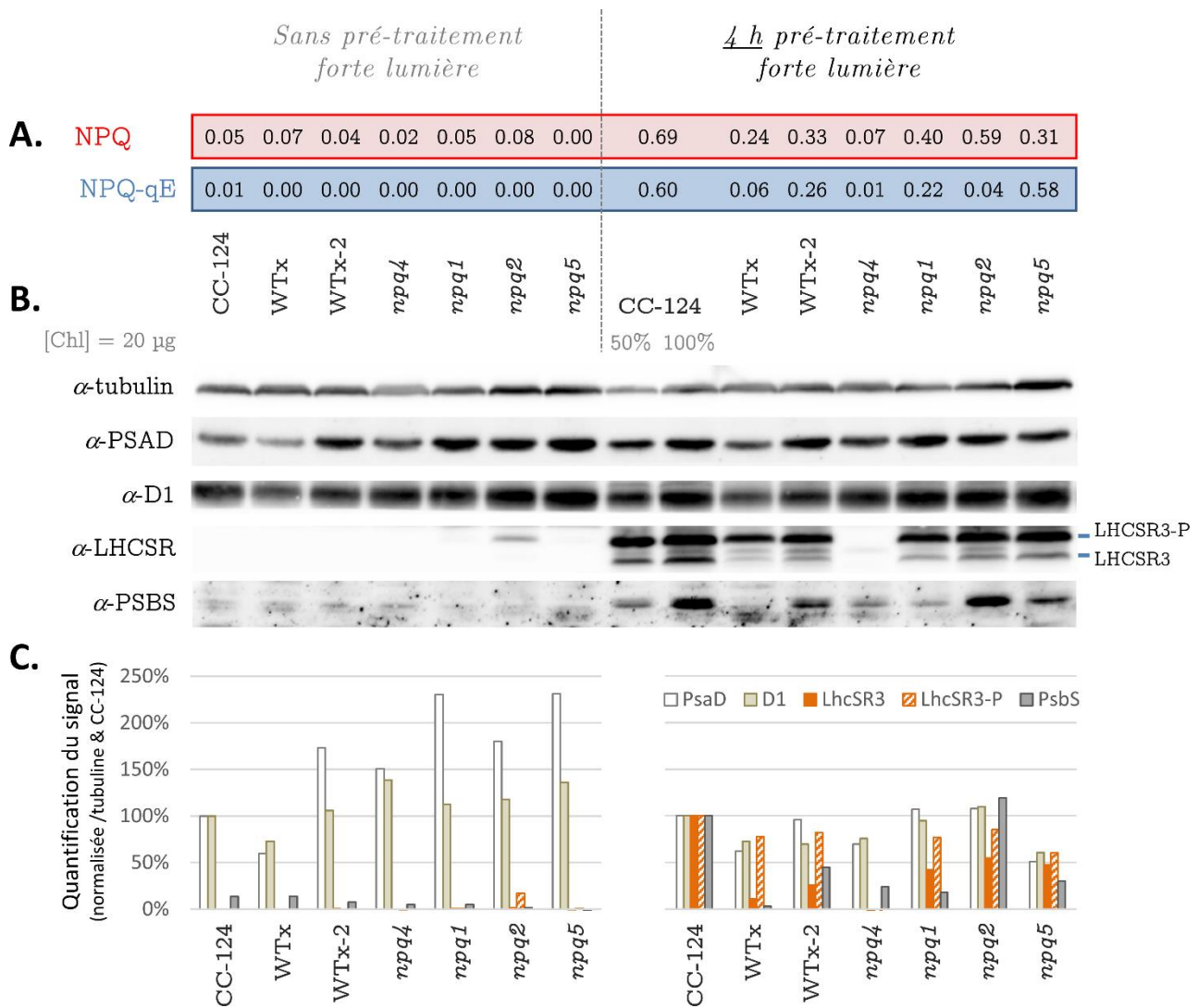
après l'exposition à une forte lumière, mais sa présence ne semblerait pas requise pour déclencher le NPQ-qE (Bonente et al, 2011; Girolomoni et al, 2019). En effet, dans ces études, les auteurs ont montré qu'un mutant *stt7*, dont le gène de la kinase STT7 est altéré, induisait plus rapidement le NPQ et de manière plus intense par rapport au WT. L'efficacité d'extinction de fluorescence de LHCSR3 est plus importante lorsque celle-ci n'est pas phosphorylée.

L'absence de la protéine LHCSR3 est confirmée dans le mutant *npq4*, tout comme celle de sa forme phosphorylée. En revanche, ce mutant du NPQ-qE (LHCSR3 dépendant) est capable d'exprimer et d'accumuler les protéines PSBS et LHCSR1 dans les mêmes proportions que la souche de référence CC-124. Comme nous l'avons précisé auparavant, ces protéines sont induites par une forte lumière mais sans rôle majeur dans le NPQ-qE en l'absence de LHCSR3, comme nous l'observons dans le mutant *npq4*. Cependant ces protéines contribuent à renforcer l'activité de LHCSR3, ce qui permet une extinction plus importante.

En ce qui concerne WTx, celui-ci présente des signaux très faibles (presque à la limite de détection) de la protéine LHCSR3 et de PSBS, même après une exposition de 4 heures à une forte lumière. Cette forte diminution de l'accumulation de ces protéines, et en particulier LHCSR3, explique cette faible induction du quenching du PSII que nous observons dans cette souche. Nous remarquons cependant une accumulation plus importante de LHCSR3-P que de sa forme non-phosphorylée (à concentration de chlorophylle constante, CC-124 ne présente que 2 fois plus de LHCSR3-P). Ce niveau de phosphorylation de LHCSR3 dans WTx ne semble pas être efficace pour le NPQ-qE.

Dans le cadre de nos conditions de culture et d'évaluation du NPQ-qE, il semble que notre souche de référence WTx, qui présente une capacité réduite à provoquer un quenching énergétique, ne soit pas en mesure d'exprimer suffisamment la protéine LHCSR3. Bien que cette dernière joue un rôle essentiel dans le mécanisme de photoprotection, c'est la forme phosphorylée de LHCSR3 qui est présente en quantité significative dans WTx. Nous nous interrogeons alors sur l'absence d'accumulation de la protéine PSBS dans cette souche WTx. En effet, il a été démontré que l'induction de l'expression et l'accumulation de PSBS par une lumière intense ne dépendent pas de la protéine LHCSR3, mais la présence de PSBS est essentielle pour son accumulation (Correa-Galvis et al, 2016). Par conséquent, il est légitime de se demander si la protéine PSBS pourrait jouer un rôle, qu'il soit direct ou indirect, dans le processus de déphosphorylation de LHCSR3. L'absence de PSBS semble entraver la capacité de LHCSR3-P à contribuer au mécanisme NPQ-qE.





**Figure 45 : Mesures du NPQ et accumulation des protéines entre avant et après une exposition à une forte lumière**

La préparation et le traitement des cellules ont été réalisés comme précédemment. Les protéines ont été fractionnées par électrophorèse ([Chl]=20 µg/puits) sur un gel de polyacrylamide 12% - urée 8M. Les niveaux de protéines ont été quantifiés à l'aide du programme Image Lab (Bio-Rad) puis normalisés par rapport à l'accumulation de la protéine tubuline, et enfin exprimés sous forme de ratio par rapport aux niveaux de CC-124.

**Tableau 9 : Rapports de LHCSR3-P / LHCSR3 (déterminés sur cellules entières)**

CC-124	WTx	WTx-2	<i>npq4</i>	<i>npq1</i>	<i>npq2</i>	<i>npq5</i>
2.0	14.5	6.4	0.0	3.7	3.1	2.6

2) Nous avons également comparé l'expression de ces protéines dans ces mêmes souches (CC-124, WT<sub>x</sub> et *npq4*) avec d'autres mutants du NPQ connus chez *Chlamydomonas* : *npq1* (Niyogi et al, 1997a; Niyogi et al, 1997b), qui ne peut convertir la violaxanthine en anthéroxanthine lors de l'exposition à une lumière excessive, *npq2* (Niyogi et al, 1997a), qui présente un défaut dans l'enzyme zéaxanthine époxydase (ZEP) et *npq5* (Elrad et al, 2002), qui est dépourvu de la sous-unité LHCBM1, un composant majeur du complexe d'antenne trimérique LHCII. En plus de ces mutants, une autre souche de référence dans le même contexte génétique que WT<sub>x</sub> (WTX-2) a été étudiée.

Les cellules ont été préparées et traitées comme précédemment. En plus de déterminer la relaxation rapide du quenching énergétique (NPQ-qE), nous avons déterminé, sur les suspensions adaptées à l'obscurité (avant et après le tFL), l'extinction rapide de fluorescence (*Figure 45-A*), 10 secondes après l'ouverture de la lumière actinique (NPQ – phase I). Concernant l'accumulation des protéines (*Figure 45-B*), à partir d'extraction sur cellules entières, nous avons utilisé des anticorps supplémentaires, l'un dirigé contre une sous-unité du PSII (PSBA/D1), un autre contre une sous-unité du PSI (PSAD), et enfin, la tubuline, une protéine constitutive des microtubules dont l'expression est constante et indépendante de nos conditions. Cette dernière est utilisée comme témoin de charge et a permis de quantifier l'accumulation de ces protéines (PSAD, D1, LHCSR3, LHCSR3-P et PSBS) dans toutes les souches, suivie d'une normalisation rapportée à leur accumulation dans la souche de référence pour le NPQ, CC-124 (*Figure 45-C*). Même si la plupart des mutants NPQ utilisés sont affectés au niveau du cycle des xanthophylles, il ne nous semblait pas nécessaire de déterminer le DEPS, étant donné que le précédent dosage des pigments (*Figure 44-C*) n'a pas mis en évidence de défaut du cycle des xanthophylles dans WT<sub>x</sub>.

Ces résultats, présentés en *Figure 45*, indiquent tout d'abord que, sous une lumière modérée, l'ensemble des souches ne présente pas des niveaux d'accumulation équivalents des sous-unités du PSII (D1) et du PSI (PSAD), comme cela est observable après une normalisation par rapport à l'accumulation de la tubuline, puis par rapport à CC-124 (*Figure 45-C*). En général, les souches testées accumulent davantage de PSAD que CC-124, et dans une moindre mesure, de D1. En revanche, la souche WT<sub>x</sub> présente, quant à elle, une accumulation de ces deux protéines inférieure de 25 et 33%. Pourquoi observe-t-on de telles différences par rapport à la souche de référence CC-124 ? Cela peut être attribué à plusieurs facteurs, notamment la variabilité génétique, le contexte génétique -par exemple, les mutants *npq* sont de même origine, obtenus à partir d'une transformation insertionnelle réalisée dans

une seule et même souche réceptrice (Niyogi et al, 1997a)-, ainsi qu'une adaptation en réponse aux conditions de conservation à long terme des souches. Cette tendance se reflète également dans le rapport Chl *a*/Chl *b*, que nous avons précédemment observé (*Figure 43*). De plus, dans ces mêmes conditions qui ne favorisent pas l'induction du NPQ (*Figure 45-A*), aucune accumulation des protéines LHCSR3 ou PSBS n'est observée dans ces souches (*Figure 45-B*). Cependant, il est à noter un signal faible de reconnaissance de l'anticorps envers la forme phosphorylée de la protéine LHCSR3 dans le cas de la souche *npq2*, mutant qui accumule, même en faible lumière, beaucoup de zéaxanthine en raison de l'absence de l'enzyme ZEP (Jahns et al, 2000; Niyogi et al, 1997a).

Après un tFL, le mutant *npq4*, comme attendu, ne présente pas de NPQ-qE (que ce soit caractérisé par une extinction rapide de fluorescence ou par une relaxation rapide de cette extinction). Concernant l'accumulation des protéines en condition tFL (toujours par rapport à la tubuline et à CC-124), on n'observe pas de LHCSR3, peu de PSBS et 25% en moins des sous-unités du PSII et PSI (D1 et PSAD). La comparaison des niveaux d'accumulation entre sFL et tFL chez *npq4*, révèle qu'une exposition prolongée à une forte lumière a entraîné une réduction de moitié la quantité de ces deux protéines chez ce mutant. Cette diminution, en particulier celle de D1, est en accord avec une photoinhibition précédemment suspectée et constatée par la baisse du rapport  $F_V/F_M$  (ou  $F_V/F_0$ ) dans cette souche, après un tFL. Il est important de noter que cette diminution de la sous-unité PSAD suggère également une photodestruction du PSI. Les autres mutants du NPQ présentent également cette sensibilité à la lumière, plus ou moins importante, par rapport à CC-124, mais c'est d'autant plus remarquable chez *npq5*, qui, dans ces conditions FL, est soumis à une plus forte photoinhibition. Effectivement, il a été montré que LHCBM1 participait au piégeage de l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) et dans la résistance à l'ion superoxyde ( $O_2^-$ ) (Ferrante et al, 2012). Ainsi, en l'absence de LHCBM1 (*npq5*), une réduction des complexes antennaires LHCI, sous forme trimérique, est observée, entraînant une diminution du NPQ-qE et une forte sensibilité à la photoinhibition (Elrad et al, 2002; Ferrante et al, 2012).

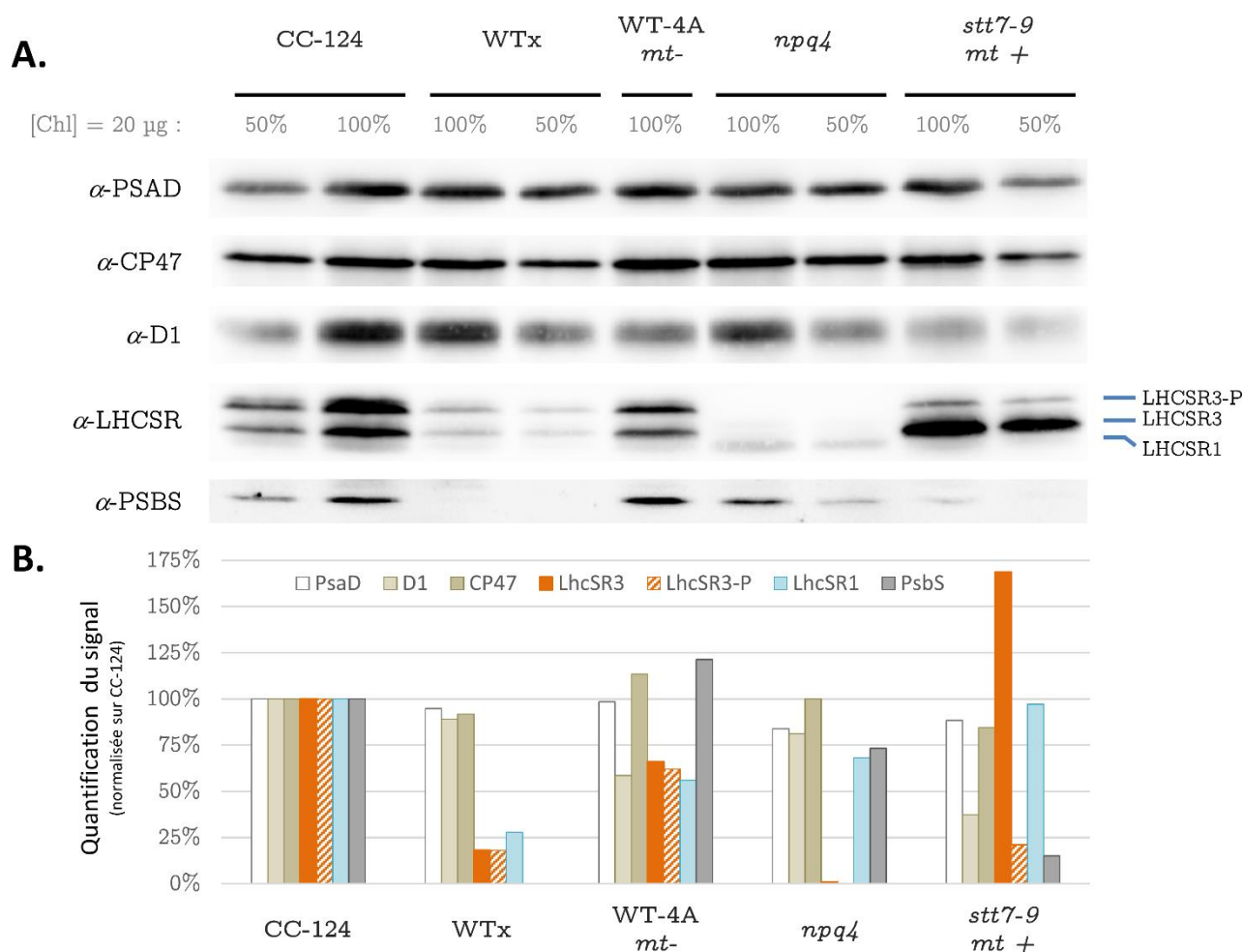
Parmi toutes les souches *npq* testées, on observe que seul le mutant *npq2* présente une extinction rapide de fluorescence et d'une accumulation en protéine PSBS de manière équivalente à celle de CC-124. En revanche, la relaxation du quenching (à l'obscurité) est très semblable à celle du mutant *npq4*. Cette dernière caractéristique chez ce mutant *npq2* ne peut être attribuée à l'absence de la protéine LHCSR3, puisque cette protéine est exprimée dans ce mutant (*Figure 45-B*) et qu'une extinction rapide et importante de la fluorescence

s'est produite. Cette protéine est cependant exprimée 2 fois moins que dans la souche CC-124, malgré la présence d'une accumulation équivalente au sauvage de la protéine PSBS. Cette très faible relaxation à l'obscurité du qE s'explique par l'absence de l'enzyme qui permet de convertir la zéaxanthine en anthéroxanthine puis en violaxanthine (ZEP). Ainsi, ce mutant est incapable de déquencher rapidement la fluorescence (dans les 10 à 20 premières secondes). Les deux autres mutants, *npq1* et *npq5*, présentent un faible NPQ, conformément à ce qui a été publié précédemment (Elrad et al, 2002; Ferrante et al, 2012; Li et al, 2016; Niyogi et al, 1997a). Ils accumulent la protéine LHCSR3 à un niveau similaire de *npq2* (qui est réduit de moitié par rapport à CC-124). Cependant, la protéine PSBS est réduite à seulement 20-25% par rapport à *npq2* et CC-124 pour ces deux mutants.

Concernant nos souches de référence du laboratoire (WTx et WTx-2), même si elles sont dans un même contexte génétique, on observe de légères variations entre elles. Ces deux souches accumulent peu de protéines LHCSR3 et PSBS et présentent un faible qE par rapport à CC-124 et les mutants *npq* (à l'exception de *npq4*). Cependant, ces caractéristiques sont encore plus effondrées dans WTx. À l'inverse, ce dernier, qui accumule moins des sous-unités PSAD et D1 en condition normale, ne montre aucune variation pour ces mêmes protéines après un tFL (c'est-à-dire, peu ou pas de photoinhibition supplémentaire par rapport à CC-124).

Il convient de noter une caractéristique générale commune à l'ensemble de ces données (à l'exception du mutant *npq4*) : une importante accumulation de la forme phosphorylée de la protéine LHCSR3 est observée. Les rapports LHCSR3-P/LHCSR3 constatés dans les souches analysées sont consignés dans le *Tableau 9*. Alors que CC-124 affiche le double de la forme phosphorylée (comme observé en *1-d*), ce rapport augmente légèrement, atteignant presque le quadruple dans le cas des mutants *npq* (excepté *npq4*). Même si nos souches de références accumulent moins de protéine LHCSR3 par rapport à ces autres souches témoins, la forme phosphorylée de cette protéine est largement prédominante et en particulier chez WTx.

Malgré une accumulation prédominante de la protéine LHCSR3 sous forme phosphorylée dans ces souches, avec un rapport LHCSR3-P/D1 se rapprochant de celui observé chez CC-124, cette forme s'avère peu efficace pour induire un NPQ-qE, en particulier chez WTx et WTx-2.



**Figure 46 : Immunodétection de protéines sur des membranes purifiées du thylakoïde après une exposition à une forte lumière**

(A) Les cellules des souches sauvage de référence (CC-124, WTx et WT4A, *mt-*), du mutant du qE (*npq4*), et d'un mutant du qT (*stt7-9*, *mt+*), ont été préparées et traitées comme précédemment (culture en TAP, transfert en MIN, exposition 4 h à 500 µE). Une extraction des membranes du thylakoïde est réalisée puis une séparation des protéines, par électrophorèse sur un gel de gradient de polyacrylamide 12-18% - 8M urée, et sondées avec les anticorps comme indiqués: PSAD (sous-unité du PSI), D1 (PsbA, sous-unité du Photosystème II), CP47 (PsbB, sous-unité de l'antenne interne du Photosystème II), LHCSR (*light-harvesting complex stress-related*, qui reconnaît à la fois LHCSR1, LHCSR3 et la forme phosphorylée de LHCSR3) et PSBS (sous-unité du PSII) ; 100% correspond à 20 µg de chlorophylle. (B) Les niveaux de protéines ont été quantifiés à l'aide du programme Image Lab (Bio-Rad) et exprimés sous forme de ratio par rapport aux niveaux de CC-124.

**Tableau 10 : Rapports de LHCSR3-P / LHCSR3 (déterminés sur membranes purifiées du thylakoïde)**

CC-124	WTx	WT-4A, <i>mt-</i>	<i>npq4</i>	<i>stt7-9</i> , <i>mt+</i>
1.5	1.3	1.4	0.0	0.1

3) Nous avons ensuite comparé l'accumulation de ces mêmes protéines à partir de membranes purifiées. Le processus d'extraction des membranes vise à augmenter les protéines membranaires, en particulier celles présentes dans le chloroplaste (ses membranes étant majoritaires), afin d'améliorer la réactivité des anticorps spécifiques. Cette extraction a été réalisée à partir de suspensions cellulaires soumis à un traitement forte lumière (500  $\mu$ E) pendant 4 heures. La détection de la sous-unité de l'antenne interne du PSII (CP47) a également été effectuée. Il convient de noter qu'aucun témoin de charge n'a été employé lors de cette analyse, la charge à concentration en chlorophylle constante servant comme unique point de référence. Cette analyse a été menée sur notre souche de référence WT<sub>x</sub>, en comparaison avec la souche de référence qui présente une induction du NPQ-qE (CC-124) et le mutant qui ne le déclenche pas en l'absence de LHCSR3 (*npq4*). Nous avons également introduit un mutant des transitions d'état NPQ-qT (*stt7-9, mt+*). Par ailleurs, nous avons souhaité examiner l'accumulation de ces protéines dans une autre souche sauvage de référence, nommée WT-4A, *mt-*, en raison de sa similitude frappante avec WT<sub>x</sub> en termes de NPQ-qE (*Figure 38-B*).

Les résultats de ces accumulations, à concentration de chlorophylle constante, et les quantifications correspondantes (par rapport à CC-124), sont présentés en *Figure 46*.

Après un tFL, nous observons dans WT<sub>x</sub>, comme précédemment, de faible accumulation en LHCSR3 et LHCSR1, par rapport à CC-124, et une absence de PSBS.

En ce qui concerne les protéines des photosystèmes, on observe dans WT-4A, *mt-* et *stt7-9, mt+*, un déséquilibre dans la répartition des sous-unités du PSI et du PSII (en particulier D1), qui pourrait s'expliquer par une photoinhibition plus importante au niveau du PSII dans ces deux souches. Un contrôle sans traitement FL serait cependant nécessaire pour confirmer cette éventualité.

Malgré leur équivalence en termes d'extinction énergétique de la fluorescence (les valeurs du NPQ-qE pour ces échantillons avant purification des membranes : WT-4A : 0.24 -similaire à WT<sub>x</sub> observé jusqu'à présent-, contre 0.64 pour CC-124), WT-4A et WT<sub>x</sub> présentent des différences dans leur profil d'accumulation des protéines du NPQ (LHCSR3, LHCSR1 et PSBS). De plus, bien que WT-4A montre une réduction d'accumulation de la protéine LHCSR3, cette diminution est seulement d'environ 50% par rapport à CC-124. En outre, cette souche accumule la protéine PSBS de manière comparable à CC-124.

Quant au mutant *stt7-9*, (mutant des transitions d'état dans lequel le gène *STT7* présente une délétion dans la partie 3'), celui-ci montre un signal de reconnaissance de l'anticorps envers la forme phosphorylée de la protéine LHCSR3. Cette observation n'est cependant pas inattendue. Comme nous l'avons déjà constaté précédemment dans la *Partie A* de ce chapitre, ce mutant n'est pas complètement bloqué à l'état 1, et qu'une petite fraction des antennes LHCSR3 peut être phosphorylées. Par conséquent, la faible activité de STT7 dans ce mutant peut également entraîner la phosphorylation de LHCSR3. Dans cette expérience, ce mutant provoque un NPQ-qE équivalent à celui observé chez CC-124 (avec une valeur de 0.66). En comparaison avec CC-124, *stt7-9* affiche une importante accumulation de la forme non phosphorylée de LHCSR3 et une faible accumulation de la protéine PSBS. Cette observation renforce la suggestion précédemment avancée selon laquelle PSBS pourrait être impliquée dans la régulation de l'activité de LHCSR3-P.

Ces rapports LHCSR3-P/LHCSR3 déterminés à partir de membranes purifiées du thylakoïde (*Tableau 10*), présente cependant une uniformité parmi les souches de références (CC-124, WTx et WT-4A), toutes présentant une légère accumulation supérieure de la forme phosphorylée. Ce résultat est différent de ce que nous avons observé à partir d'extraits de cellules entières (voir *Tableau 9*) où, en particulier, WTx affichait un rapport de 14.

Dans l'ensemble, les données observées au cours des trois dernières expériences suggèrent de manière convaincante que les protéines LHCSR3 et PSBS sont peu abondantes dans les membranes du thylakoïde de la souche de référence WTx. Cependant, il est important de noter que même si l'accumulation globale de la protéine LHCSR3 (sous sa forme phosphorylée et non phosphorylée) est réduite par rapport à une souche de référence qui induit un fort NPQ-qE, cette protéine s'accumule largement sous sa forme phosphorylée dans WTx. Il est à noter qu'un facteur impliqué dans la phosphorylation de LHCSR3 requiert l'intégrité cellulaire, qui est perdue lors de la purification des membranes du thylakoïde (voir *Tableau 9* et *Tableau 10* pour plus de détails). Le plus frappant dans cette souche, c'est la quasi-absence de la protéine PSBS. Cette observation nous amène à nous interroger sur la transcription du gène PSBS en réponse à une forte lumière.

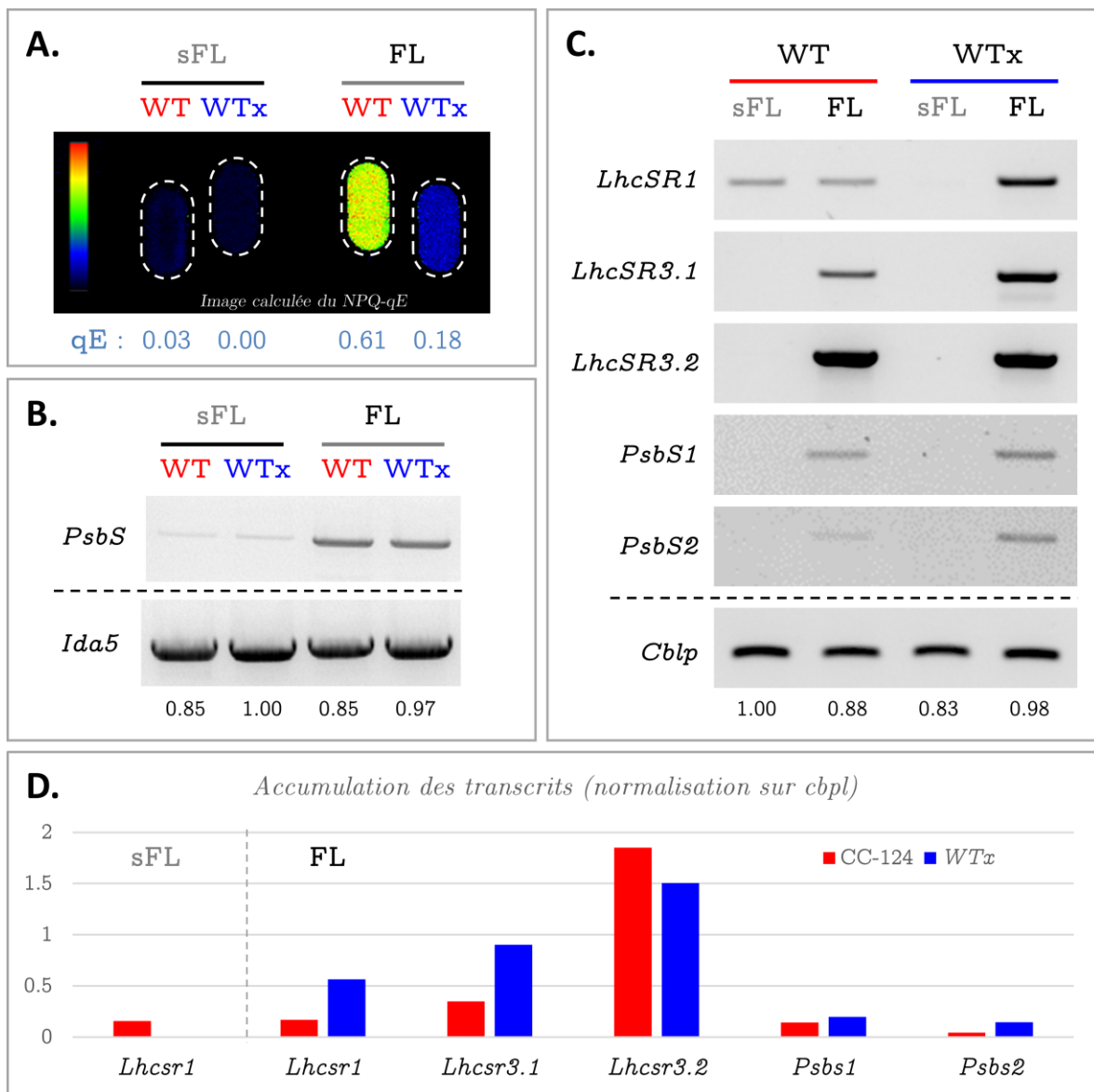
### 2.3. Analyse de l'accumulation des transcrits des acteurs principaux du NPQ-qE

Pour renforcer notre analyse des protéines, nous avons également effectué une analyse de l'expression des gènes connus pour être régulés chez *Chlamydomonas* en réponse à une exposition à une lumière intense et impliqués dans le qE. Les gènes étudiés sont *LHCSR1*, *LHCSR3.1*, *LHCSR3.2*, *PSBS1* et *PSBS2*. Sachant que PSBS ne s'accumule que transitoirement jusqu'à un niveau maximal pendant l'acclimatation FL puis subit une dégradation, sans réduction du qE (Correa-Galvis et al, 2016; Redekop et al, 2020), il était donc intéressant de connaître le niveau de transcription de *PSBS* dans la souche WTx après 4 heures d'exposition à une FL, en comparaison avec CC-124. L'expression de gènes qui sont non liés et exprimés de manière constitutive, *CBLP* (pour *Chlamydomonas G protein b-subunit-like polypeptide* et codant pour la petite sous-unité ribosomique 40S cytosolique RACK1) et *IDA5* (pour *inner dynein arms*, gène de structure de l'actine), ont été utilisés comme témoins.

Cette analyse (voir *Figure 47*) a été effectuée à l'aide de la technique de réaction en chaîne par polymérase inverse (RT-PCR) en utilisant une approche semi-quantitative avec des gènes témoins. L'ARN, de la souche de référence CC-124 et de WTx, a été isolé à partir de cellules maintenues dans les conditions de culture (50 µE) et après une exposition de quatre heures à une forte lumière (500 µE). Un contrôle de l'induction du NPQ-qE de ces cultures a également été réalisé, afin de s'assurer qu'après le tFL, l'expression de LHCSR3 était engagée dans CC-124.

Ainsi, les résultats montrent qu'en l'absence d'exposition à une forte lumière, lorsque le NPQ-qE n'est pas induit (*Figure 47-A*), on observe une absence totale (ou un niveau très faible) de l'ensemble des transcrits étudiés pour les deux souches testées (*Figure 47-B&C*). Cependant, il convient de noter qu'une accumulation significative du transcrit *Lhcsr1* est observé dans CC-124 dans ces conditions (en absence de stress lumineux) ; un signal à peine perceptible est également observable dans WTx. Après un traitement à une forte lumière pendant 4 heures, au cours duquel le NPQ-qE est induit dans les deux souches testées (avec une meilleure efficacité pour CC-124), on observe une accumulation de tous ces transcrits, *Lhcsr1*, *Lhcsr3.1*, *Lhcsr3.2*, *Psbs1* et *Psbs2*. De plus, on constate un niveau de transcrit supérieur pour les gènes LHCSR3.1 et LHCSR1 après le tFL dans la souche WTx par rapport à CC-124 (*Figure 47-D*).





#### Figure 47 : Niveau de transcription de gènes impliqués dans le NPQ

Des cultures des souches de référence, CC-124 (WT) et WTx, ont été exposées à une forte lumière (500  $\mu$ E) pendant 4 heures, ou conservées dans les conditions de croissance (50  $\mu$ E). Le NPQ-qE a été évalué avant de récolter les cellules à partir desquelles l'extraction de l'ARN total a été réalisée.

(A) Images calculées du qE avec de fausses couleurs (le rouge correspond à la valeur maximale et le bleu à la valeur minimale), les valeurs numériques moyennes sont affichées sous l'image. (B et C) Analyse par RT-PCR semi-quantitative des gènes photoprotecteurs inductibles par de forte intensité lumineuse (*LHCSR1*, *LHCSR3.1*, *LHCSR3.2*, *PSBS1*, *PSBS2*). (D) Évaluation du signal relatif à chaque transcrit par rapport au transcrit *Cblp* pour chaque souche et condition respective ; le gène *CBLP* (pour *Chlamydomonas G protein b-subunit-like polypeptide* et le gène *IDA5* (pour *inner-arms dynein*) ont été utilisés comme témoin. (*PsbS* fait référence au niveau de transcrits obtenu en utilisant un oligonucléotide spécifique commun pour les sous-unités 1 et 2).

Bien qu'une quantification plus précise de l'expression de ces gènes soit préférable, nous pouvons néanmoins conclure que WT<sub>x</sub> ne présente pas de défaut de transcription de ces gènes impliqués dans le NPQ-qE.

### 3. Discussion et conclusion

Cette caractérisation préliminaire du NPQ dans notre souche de référence WT<sub>x</sub> a tout d'abord permis d'améliorer ou de compléter certaines étapes du protocole initialement établi pour déterminer le NPQ-qE, tout en maintenant son principe de base. Nous avons, par exemple, constaté que le retour à une lumière modérée après une forte exposition lumineuse est essentiel pour une relaxation du qI, ce qui permet en outre une estimation plus précise du qE. De plus, l'efficacité du NPQ-qE n'était également pas optimale avec l'intensité lumineuse utilisée. La préparation des cellules joue également un rôle crucial dans ces mesures. Bien que la culture de *Chlamydomonas* en photohétérotrophie présente l'avantage de fournir rapidement une grande quantité de matériel biologique, il est important de noter que réaliser les pré-cultures en milieu TAP n'est probablement pas la meilleure option pour la caractérisation de ce processus, à moins de s'assurer que les échantillons soient complètement dépourvus d'acétate avant toute exposition à une lumière intense. Cependant, il sera nécessaire de vérifier ce dernier point. Si le lavage des cellules dans le milieu MIN suivi de l'ajustement de la concentration cellulaire ne s'avère pas efficace, il sera préférable d'effectuer toutes les cultures sans acétate, et cela à chaque étape du protocole. Par ailleurs, il semble approprié de mesurer et estimer le NPQ-qE après une exposition de 4 heures à une lumière intense. En effet, après cette période, la photoinhibition diminue grâce au processus NPQ-qE en place, et la protéine PSBS demeure présente, dans une souche de référence sauvage, telle que CC-124.

En ce qui concerne le phénotype observé dans notre souche de référence WT<sub>x</sub>, il est clairement caractérisé par un défaut dans le NPQ-qE, bien que cette souche ne soit pas complètement incapable de l'induire. On note une mise en place plus lente et une efficacité réduite. La principale raison est probablement dû à une faible accumulation de la protéine LHCSR3, sans pour autant présenter un quelconque défaut de transcription des gènes *LHCSR3.1* et *LHCSR3.2*. En effet, la production globale de cette protéine dans cette souche pourrait contribuer efficacement au quenching énergétique, cependant LHCSR3 est majoritairement accumulée sous une forme phosphorylée. Ces protéines LHCSR (LHCSR1 et LHCSR3) peuvent contribuer à l'extinction énergétique des deux photosystèmes, à la fois en interagissant directement avec les supercomplexes LHCII-PSII et avec les LHCII associés

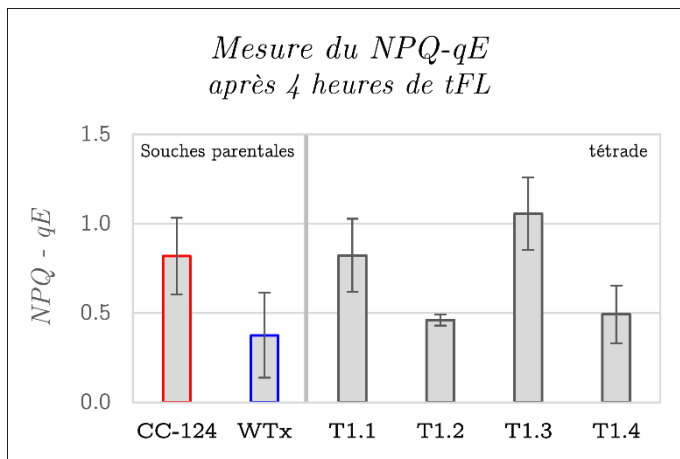
au PSI (Girolomoni et al, 2019; Kosuge et al, 2018), cependant la phosphorylation de ces protéines LHCSR n'est pas nécessaire pour leur liaison (Scholz et al, 2019). De plus, lorsque la kinase STT7 (responsable de la phosphorylation de LHCSR3) est altérée, les mutants *stt7* affichent une forte accumulation de LHCSR3 non phosphorylée et présentent un NPQ au moins équivalent à celui de la souche CC-124. Il a été observé que lorsque les cellules étaient acclimatées à une forte lumière pendant 10 générations, le NPQ se développe rapidement et de manière plus intense chez le mutant *stt7* que dans une souche WT (Bonente et al, 2011; Girolomoni et al, 2019). Par conséquent, étant donné que cette forme phosphorylée ne participe pas directement dans l'induction du NPQ-qE et que, par ailleurs, les transitions d'état ne sont pas bloquées ou réduites dans cette souche WT<sub>x</sub> (données non présentées), il semblerait que la régulation de la phosphorylation de la protéine LHCSR3 soit spécifiquement affectée. Cette déphosphorylation pourrait être liée à la présence de la protéine PSBS. En effet, parmi les protéines étudiées dans cette caractérisation de WT<sub>x</sub>, ce dernier n'accumule pas PSBS. Il existe également une autre sous-unité du PSII (PSBR) qui est requise pour une liaison efficace de LHCSR3 aux supercomplexes LHCII-PSII (Xue et al, 2015b). L'absence de ces deux partenaires, bien que n'ayant aucun impact sur l'expression de LHCSR3, pourrait également perturber le processus de déphosphorylation.

Les résultats de cette étude préliminaire ont mis en évidence des caractéristiques et des comportements inhabituels dans la souche de référence WT<sub>x</sub>, suggérant la présence potentielle d'une ou plusieurs mutations génétiques qui la distinguent nettement d'une souche sauvage (représentative). Par conséquent, une caractérisation plus approfondie, incluant des analyses génétiques, est nécessaire pour confirmer le caractère mutant de cette souche. Il sera ainsi possible d'explorer certaines pistes suggérées par les données obtenues.

## 4. Vers l'identification d'une (ou des) mutation(s) responsable(s) de ce phénotype faible NPQ

### 4.1. Origine de la mutation

Afin de connaître l'origine de la ou des mutations impliquées, une première analyse génétique par croisement a été réalisée. L'analyse des descendants d'un croisement WT $\times$  avec CC-124 a montré, sur 15 tétrades complètes, une ségrégation 2:2 du phénotype NPQ (*Figure 48*). De plus, nous n'avons pas observé de liaison entre le phénotype et le signe sexuel. Ce résultat suggère une mutation (ou plusieurs, mais qui seraient liées génétiquement) dans le génome nucléaire.



**Figure 48 : Mesure du NPQ-qE sur une tétrade représentative du croisement génétique entre WT $\times$  et CC-124**

Ces mesures ont été réalisées sur des cellules cultivées en milieu liquide TAP et traitée comme précédemment pour l'induction du NPQ-qE. Les parents, WT $\times$  et CC-124, représentent ici les témoins.

Concentration cellulaire :  $2 \cdot 10^7$  cell/mL et  $n=4$ .

Nous avons ensuite réalisé plusieurs croisements. Un premier croisement intra-tétrade, entre les descendants T1.3 et T1.4, puis, à partir de la nouvelle descendance, un second croisement inter-tétrade, entre deux clones (de signe opposé et présentant un faible NPQ-qE).

Dans ce dernier croisement, tous les descendants -20 tétrades complètes- étaient tous dans le contexte WT $\times$ , ne pouvant induire de NPQ au niveau WT. Nous avons donc sélectionné des clones qui induisaient le plus faible NPQ-qE, tout en s'assurant que l'un d'eux était de signe sexuel plus (*mt+*), ce point est essentiel dans la poursuite de l'étude génétique de ce mutant.

## 4.2. Potentielle identification par la technique de séquençage du génome nucléaire

### 4.2.1. Utilisation de données préexistantes

Ayant déjà à disposition des données de séquençage du génome complet de cette souche, nous avons pu, dans un premier temps, faire une recherche de polymorphisme nucléotidique (SNP pour *single nucleotide polymorphism*) et d'insertion/délétion (Indel) dans la séquence de gènes-candidats, comme *LHCSR1*, *LHCSR3.1*, *LHCSR3.2*, *PSBS*, *PSBR*, mais aussi de nombreux autres gènes pouvant intervenir directement ou indirectement dans le NPQ.

N'ayant pas observé de différence dans ces gènes, nous avons poursuivi notre recherche en réalisant une analyse comparative de la séquence du génome du mutant (WTx) par rapport à celle de la souche sauvage de référence, que nous avons utilisée jusqu'à présent, CC-124 (données de séquençage précédemment obtenues). Ainsi nous avons pu établir une liste de SNPs et d'Indels présents uniquement dans le mutant WTx. Cependant, cette liste s'est avérée très grande. Même avec une analyse des gènes porteurs de mutation potentielle, l'identification du gène responsable du phénotype chez WTx à partir de cette liste pourrait être longue et fastidieuse.

Nous avons, par exemple, suspecté un gène en particulier. Celui-ci code pour une protéine localisée dans le chloroplaste (déterminé par des programmes de prédiction, TargetP et Predalgo) et sans fonction connue. Dans WTx, la séquence de ce gène présente une insertion d'un transposon, situé dans un exon. Une complémentation fonctionnelle a été effectuée par transformation avec la séquence sauvage du gène, mais sans permettre de récupérer un phénotype sauvage du NPQ-qE.

Il nous semblait donc impossible de tester un par un tous ces gènes qui présentent une variation dans leur séquence nucléotidique.

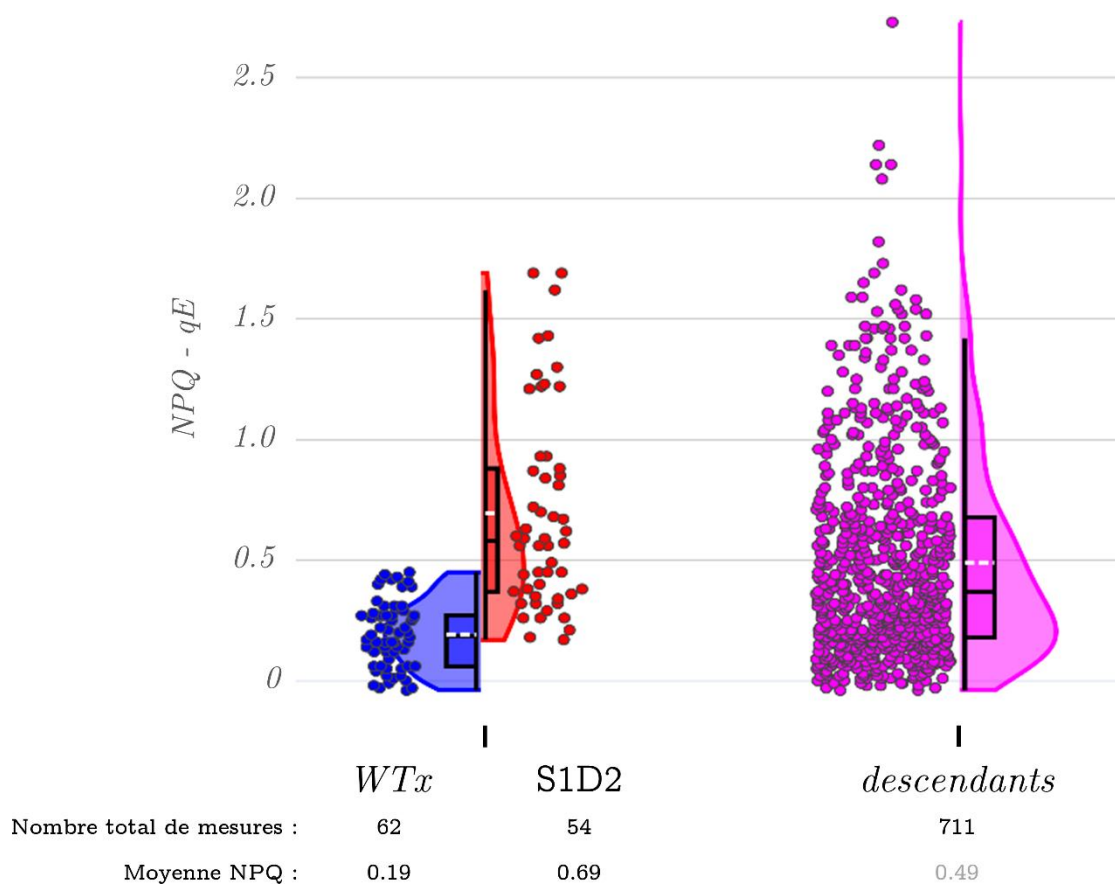
### 4.2.2. Autre stratégie, nouveaux séquençages

Une stratégie envisagée pour déterminer le ou les gènes impliqués serait de croiser notre souche WTx avec le sauvage CC-124. Puis, à partir des descendants (une centaine de clones) et en utilisant les conditions initiales de mesure du qE (lorsque WTx ne réalise pas ou peu de qE), nous sélectionnerions deux groupes : l'un qE<sup>+</sup> et l'autre qE<sup>-</sup>. Par la suite, nous procéderions au séquençage complet du génome pour chaque groupe. Cette approche devrait permettre de mettre en évidence aisément la ou les mutations dans WTx liée(s) à son phénotype.

Ce croisement a été réalisé, les tétrades disséquées et les cellules récupérées. Cependant, nous avons changé de stratégie en cours d'étude. Comme pour la localisation de la mutation présente dans le mutant *p71* (*Chapitre 2 - Partie A* de ce manuscrit, ou (Bujaldon et al, 2020)), WTx a été croisé avec une souche sauvage qui est hautement polymorphe, S1-D2, *mt-* (CC-2290). Ainsi, après une sélection d'une centaine de descendants avec le phénotype WTx et séquencé l'ADN issu de leur culture, la région dépourvue de polymorphismes dérivés de S1-D2 pourra être facilement identifiée grâce à une approche bioinformatique. Toutefois, il était nécessaire de s'assurer que S1-D2 pouvait induire un NPQ-qE avec une efficacité équivalente à celle de CC-124. Cette vérification (données non présentées) a été concluante, ce qui nous a permis de procéder au criblage des descendants.

Dans le but de sélectionner les clones mutants issus du croisement de la souche S1-D2, *mt-* avec WTx, *mt+*, une adaptation des conditions de culture a été nécessaire pour permettre la mesure du NPQ-qE sur un grand nombre d'échantillons. Le système d'imagerie de l'émission de fluorescence (SpeedZen - JBeambio) facilite cette approche, permettant d'effectuer les mesures de la fluorescence soit à partir de cultures sur boîte de Pétri soit dans des plaques à 96 puits (12x8). Toutefois, dans ce dernier cas, il est recommandé de n'utiliser qu'une moitié de la plaque (6x8), afin d'optimiser le signal d'émission de fluorescence.

Ainsi, nous avons récupéré environ une centaine de clones issus de ce dernier croisement, avec la souche S1-D2, après avoir disséqué les tétrades. Dans un premier temps, des pré-cultures ont été réalisées dans des plaques 96 puits contenant du milieu TAP, en incluant également les souches parentales comme témoins, en vue de mesurer le NPQ-qE. Ces plaques ont ensuite été placées sous une lumière d'une intensité de 80  $\mu$ E. Après une semaine de croissance dans ces conditions, nous avons procédé à un transfert avec dilution (en TAP) dans de nouvelles plaques. En parallèle, nous avons également réalisé ce même transfert de ces cultures, sur milieu MIN (en boîtes de Pétri). Nous avons ainsi réparti (6x8) souches par boîte ou par plaque, dont (2x2) réservés aux témoins. La préparation des cellules en plaque pour la mesure du NPQ-qE a également été adaptée. Ces cultures ont été récoltées par centrifugation, puis re-suspendues avec du milieu MIN avant d'être replacées dans les conditions de culture.



**Figure 49 :** Criblage des clones issus du croisement de *WTx*, *mt+* avec *S1-D2*, *mt-* sur leur caractéristique NPQ-*qE*

Après 48 heures, une re-suspension par aspiration/refoulement à la pipette est réalisée puis ont été soumises au traitement forte lumière (tFL : 4 heures à 500  $\mu\text{E}$ ). Concernant les cultures sur milieu solide, le tFL a été mené directement sur les boîtes de Pétri après croissance des cellules (6 jours de croissance à 80  $\mu\text{E}$ ). Enfin, avant la mesure des changements de fluorescence, comme précédemment, un retour aux conditions de pré-culture pendant 30 minutes puis 15 minutes d'adaptation à l'obscurité sont assurés.

Nous avons regroupé l'ensemble des mesures en *Figure 49* (obtenues à partir de 3 pré-cultures indépendantes des descendants et des souches parentales, soit 62 points de mesure pour WTx, 54 pour S1-D2 et 711 pour les descendants, tous confondus). Nous observons, malgré ces conditions non optimales pour la culture de *Chlamydomonas*, que WTx, comme attendu, présente en moyenne une faible induction du NPQ-qE par rapport à la souche sauvage S1-D2. En ce qui concerne les mesures des descendants, cette représentation met en évidence que la variabilité des mesures ne permet pas de distinguer clairement deux groupes. Il est donc nécessaire d'effectuer une sélection minutieuse, plaque par plaque, boîte par boîte.

Nous avons ainsi constitué deux groupes, l'un regroupant 40 clones de type [WTx] et 43 de type [S1-D2].

Dans un futur proche, en séquençant l'ADN de ces deux groupes de descendants, nous espérons être en mesure de localiser la région où se trouve la mutation. Il est également probable que nous ayons recours au séquençage de l'ADN issu du croisement de WTx avec CC-124 pour une identification plus précise.





# Conclusion générale

L'objectif de cette thèse était d'approfondir notre compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents qui permettent aux organismes photosynthétiques d'optimiser leur processus de photosynthèse en réponse aux variations de l'intensité lumineuse. Un accent particulier a été mis sur la régulation des processus de biosynthèse et d'assemblage des antennes photosynthétiques.

Ce travail a permis d'apporter de nouveaux éléments sur l'interaction entre ALB3.1, cpSRP43 et GUN4 dans la formation des antennes chlorophylliennes et des supercomplexes photosynthétiques, montrant une étroite relation entre la biosynthèse des chlorophylles et des protéines LHC. Nous avons également réuni des observations qui révèlent une spécificité de la biogénèse des antennes périphériques du PSI, qui n'obéit pas aux mêmes régulations que celles du PSII. La nature distincte des voies de biogénèse de ces deux systèmes antennaires représente un champ d'étude peu abordé à ce jour. C'est pourtant là que se situe le domaine des interactions entre biogénèse des antennes et acclimatation des cellules à un environnement changeant. La persistance d'une fraction des LHCP assemblée dans le chloroplaste en l'absence de ces protéines, ALB3.1 et cpSRP43, suggère aussi l'existence d'une voie alternative, peu efficace, pour la biogénèse des protéines LHC. Cette observation soulève des questions sur les mécanismes moléculaires spécifiques impliquant d'autres acteurs qui pourront être vérifiés par une analyse génétique approfondie.

Par ailleurs, au cours de l'étude des mécanismes de photoprotection, nous avons mis en évidence l'importance de connaître de façon précise l'origine des souches sur lesquelles nous travaillons, de disposer de bonnes références de comparaison et, surtout, d'avoir accès à une information approfondie de la nature moléculaire des mutations impliquées dans l'observation d'un phénotype. Il a été particulièrement surprenant d'observer que notre souche de référence au laboratoire pouvait en fait être décrite comme un mutant du NPQ-qE. L'identification de variations alléliques dans cette souche par rapport à d'autres souches dites « sauvages » présentant un NPQ-qE plus robuste, permettra certainement d'approfondir notre connaissance de ces mécanismes NPQ. Ces mutations pourraient révéler de nouveaux acteurs impliqués dans la régulation de l'expression des protéines clés du NPQ-qE (LHCSR3 et PSBS), ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour la compréhension de ces processus complexes et leur utilisation potentielle dans des environnements changeants.

Enfin l'étude de la mutation *stt7-1* a été, dans un premier temps, très perturbante en produisant des résultats inattendus. Confrontée à la présence des deux locus sexuels (mt+ et mt-) dans l'analyse d'une culture de cette souche, j'ai d'abord pensé à une contamination due à la présence de deux souches différentes qui seraient issues de la même boîte de Pétri. J'ai alors mis en doute la fiabilité de l'entretien de la collection de mutants dont j'ai la responsabilité dans le laboratoire. Puis, une fois réunis les premiers éléments démontrant la large diploïdie de ce mutant, alors les réarrangements de son génome ont été particulièrement intéressants à étudier en raison de leur complexité. L'histoire génétique de ce mutant est intrigante. Les méthodes que nous avons utilisées pour caractériser ce réarrangement chromosomique de grande ampleur n'étant disponible que depuis peu, on peut légitimement s'interroger sur la fréquence de leur apparition et le mécanisme qui y préside. Il y a là encore tout un nouveau champ d'étude pour la communauté des chercheurs « Chlamydomonaciens » qui mérite d'être abordé.

Comme souvent pour un travail de thèse, le mien aura donné accès à plus de questions nouvelles qu'il n'a apporté de réponses aux questions que je me posais. Mais n'est-ce pas le propre de ce qu'on appelle *la recherche fondamentale* ?

# Matériel et méthodes



## ***Souches de Chlamydomonas reinhardtii***

### Souches de type sauvage (WT pour *wild-type*) :

- WT-T222, WT-S34 et WT-S24 : souches de référence du laboratoire
- CC-124 et CC-125 : souches de référence obtenues au Chlamydomonas Resource Center (<https://www.chlamycollection.org/>)

### Souches mutantes :

- BF3, BF4 : mutants obtenus par mutagenèse classique par la méthode UV et isolés au laboratoire par Pierre Bennoun. Ces deux mutants présentent une mutation ponctuelle (substitution), dans le gène (Cre01.g043350) codant pour la chlorophylle a oxygénase (CAO) pour BF3 (Bujaldon et al, 2017) et dans ALB3.1 (Cre06.g251900) pour BF4 (Bujaldon et al, 2020).
- *p71*, *p55* et *p62* : mutants obtenus par mutagenèse classique par un traitement à la 5-fluorodéoxyuridine et isolés au laboratoire par Jacqueline Girard-Bascou. *p71* présente une insertion d'un transposon (TOC1) dans le gène *cpSRP43* (Cre04.g231026) (Bujaldon et al, 2020).
- Mutants de la kinase STT7 : *stt7-1* (Fleischmann et al, 1999) et *stt7-9* (Depège et al, 2003).
- Mutant NPQ : *npq4* présente une délétion de deux gènes *LHCSR3.1* et *LHCSR3.2* (Peers et al, 2009).

## ***Conditions de cultures***

Les souches de Chlamydomonas sont conservées à 25°C (ou 18°C) sur milieu Tris Acétate Phosphate (TAP) solide (15 g.L<sup>-1</sup> d'agar) sous faible intensité lumineuse (1 à 2 μmol de photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (μE), ou en milieu liquide TAP ou minimum (MIN) (Harris, 2009) sous un éclairage variant, selon l'objet de l'expérience, de 5 à 50 μE. Les cultures liquides sont maintenues en agitation constante à 160 rotations par minute (rpm).

## ***Croisements génétiques***

Après induction de la gamétogenèse, atteinte au bout de 4 jours sur milieu appauvri en azote (N/10), les gamètes sont suspendus dans 3 mL d'eau distillée stérile, à environ 2.10<sup>7</sup> cellules.mL<sup>-1</sup>. Après 30 minutes d'agitation en faible lumière, les suspensions des gamètes des deux souches de signes opposés sont combinées dans un seul Erlenmeyer (d'une

capacité de 10 mL) puis ce dernier est placé immobile sous une lumière moyenne (environ 50  $\mu\text{E}$ ). Dès l'apparition de signes montrant que le croisement a commencé (aspect inhomogène de la suspension - l'agrégation des gamètes peut être vérifiée au microscope), des gouttes sont déposées sur du milieu TAP30 (TAP contenant 30  $\text{g.L}^{-1}$  d'agar) et replacées dans les mêmes conditions de lumière. Le lendemain, les boîtes dans lesquelles les gouttes ont été déposées sont placées à l'obscurité pour une maturation durant au moins 7 jours. Après cette maturation, les zygotes sont isolés sur la base de leur forte adhérence au milieu TAP30, et subissent la méiose après environ 16 h (Harris, 2009).

Pour une analyse en vrac, les zygotes sont placés en TAP liquide et la méiose est induite sous une faible lumière (environ 5  $\mu\text{E}$ ) sans agitation pendant 24h. Les suspensions sont ensuite agitées pendant 24h supplémentaires, en faible lumière ou en lumière modérées (l'intensité dépendra des besoins et sensibilités des souches croisées). Les produits de méiose sont étalés sur TAP ou MIN solide.

Pour une analyse de la descendance en tétrades, les zygotes sont isolés et après méiose, les quatre cellules sont séparées (manuellement ou avec l'aide d'un micromanipulateur Singer).

## Biologie Moléculaire

### *Préparations*

- *Extraction d'ADN*

1 mL de culture de *Chlamydomonas* en phase stationnaire est centrifugé à 13 200 rpm pendant 10 min, repris dans 100  $\mu\text{L}$  d'eau et 300  $\mu\text{L}$  de tampon d'extraction (100 mM Tris pH 8, 2% SDS, 0,4 M NaCl, 40 mM EDTA, 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  RNase A) et incubé à 50°C pendant 15 min. Après centrifugation, le surnageant est extrait au phénol/chloroforme/alcool isoamylique. La phase aqueuse est de nouveau extraite à l'alcool isoamylique. L'ADN contenu dans la phase aqueuse est précipité en présence de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  pH 5 et d'isopropanol. Après centrifugation et lavage dans l'éthanol 70%, l'ADN est re-suspendu dans du TE (10mM Tris-HCl pH 7.5, 100 $\mu\text{M}$  EDTA) ; 5  $\mu\text{L}$  d'extrait est utilisé pour réaliser une PCR.

- *Extraction d'ADN par Chelex*

Des préparations rapides d'ADN peuvent être effectuées grâce à la résine Chelex 100 (Bio-Rad). Quelques cellules sont prélevées à partir de culture sur milieu solide et mises en

suspension dans 10  $\mu\text{L}$  d'eau, ou bien 10  $\mu\text{L}$  de culture liquide sont prélevés. 10  $\mu\text{L}$  d'éthanol 100% sont ajoutés et le mélange est incubé 5 min à température ambiante. 80  $\mu\text{L}$  de solution Chelex 5% sont alors ajoutés et les tubes sont incubés 8 min à 95°C. Les extraits sont ensuite refroidis à température ambiante ; 1  $\mu\text{L}$  d'extrait (surnageant) est utilisé pour réaliser une PCR.

- *Extraction d'ADN pour séquençage Illumina*

400 mL de en phase stationnaire ( $2.10^7$  cell/mL) sont récoltés et centrifugés (5 min – 5000 rpm - 5°C). Le culot est ensuite re-suspendu dans 50 mL d'eau suivi d'une nouvelle centrifugation (5 min – 5 000 rpm - 5°C). Le surnageant est éliminé puis le culot est congelé. À partir de cette dernière étape, le protocole correspond aux consignes du kit utilisé, DNeasy Plant Maxi kit (Qiagen).

- *Extraction d'ADN pour séquençage Nanopore*

L'extraction et la sélection de l'ADN à haut poids moléculaire a été réalisé à partir du protocole (Chaux-Jukic et al, 2022).

- *Extraction d'ARN*

200 mL de culture en phase exponentielle de croissance ( $2.10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup>) sont centrifugés (5 min, 4°C, 4 500 rpm). Les cellules, re-suspendues dans 600  $\mu\text{L}$  de tampon AE (50 mM Na-Ac pH 5.3 ; 10 mM EDTA), sont lysées par 75  $\mu\text{L}$  de SDS, extraites par 750  $\mu\text{L}$  de phénol acide chaud (pH 4.8, 65°C, 5 min), puis congelées dans l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite décongelés, vortexés et centrifugés (4°C, 13 200 rpm, 10 min). La phase aqueuse est récupérée, une nouvelle fois traitée au phénol acide, puis deux fois au phénol/chloroforme/alcool iso-amylque (25:24:1), afin de retirer le maximum d'impuretés. La phase aqueuse est ensuite précipitée avec 1.25 mL d'éthanol absolu, pendant 30 min à 20°C. Après centrifugation, le culot d'ARN est lavé avec 500  $\mu\text{L}$  d'éthanol 70%, puis re-suspendues dans 100 à 300  $\mu\text{L}$  de TES (2 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS) ou dans de l'eau pour les analyses de rétrotranscription.

- *Quantification des acides nucléiques*

Les concentrations d'ADN et d'ARN ont été mesurées par un spectrophotomètre à 260 nm et établit selon la relation 1 unité de DO<sub>260 nm</sub> équivaut à 50  $\mu\text{g}$  d'ADN par  $\mu\text{L}$  ou 1 unité de DO<sub>260 nm</sub> équivaut à 40  $\mu\text{g}$  d'ARN par  $\mu\text{L}$ . Ou bien, la concentration est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible compact et autonome, NanoDrop™ One (Thermo Scientific), à partir d'1  $\mu\text{L}$  d'échantillon.



Tableau 11 : Amorces oligonucléotidiques utilisées

gène	Nom amorce	Séquence 5' - 3'	Tm °C	Taille de l'amplicon (bp)
<b>Oligonucléotides pour PCR</b>				
<i>aphVIII</i>	1F- <i>aphVIII</i>	ACGGGGAGCTAAGCTACCGCTTCA	64.2	1068
	1R- <i>aphVIII</i>	AAGCAGCATCTAACCCTGCGTC	60.0	
<i>GUN4 complet</i>	F1 <i>GUN4BiG</i>	ATTGACCCTGAGCAAACCTGCGT	59.1	4285
	R1 <i>GUN4BiG</i>	CCACAGTGTGCCGTGTTTCAGCT	61.8	
<i>STT7 (-5')</i>	F <i>STT7-CK</i>	TGCCGCATTGAGCGGTCTACA	60.9	1166
	R <i>STT7-CK</i>	CGCTTGCCCAGGACAATGTCAT	59.8	
<i>STT7 complet</i>	2F1 <i>STT7gen</i>	AATGTACGATGGTGTCCAGC	61.3	8850
	2R6 <i>STT7gen</i>	TTAGGTCACCTCGTGCAACT	62.4	
<i>CGL46</i>	F1CK <i>CGL46</i>	CGACTTCGTGGAGGCCCTTCATGC	62	622
	RA <i>CGL46</i>	TGCGCCTTGTCCACGTTGAT	59.3	
<i>CGL46 + gypsy</i>	F1CK <i>CGL46</i>	CGACTTCGTGGAGGCCCTTCATGC	62	1402
	R2 <i>GYPSY7a</i>	CGGTGACTCTACTTGGGCAACC	59.2	
<b>Oligonucléotides pour RT-PCR</b>				
<b>Les amorces spécifiques de (Miller et al, 2010) - ceux de PSBS amplifient à la fois PSBS1 et PSBS2</b>				
<i>PSBS</i>	F-CDS- <i>PSBS</i>	ATGGCCATGACTCTGTGCGAC		738
	R-CDS- <i>PSBS</i>	TTAGGCGGACTCCTCGTCC		
<i>IDA5</i>	F-CDS- <i>IDA5</i>	GCCAGGTCTCTGCTCTGGTG		1077
	R-CDS- <i>IDA5</i>	ACTCGGACTTGGCGATCCA		
<b>Amorces spécifiques de (Tokutsu et al, 2019)</b>				
<i>LHCSR1</i>	F- <i>LHCSR1</i>	TGTTGGCAGAATTGTGTGACATGG		199
	R- <i>LHCSR1</i>	GCCCATTTCTTATACATCCGATGCAC		
<i>LHCSR3.1</i>	F- <i>LHCSR3.1</i>	GCTTGTTCCTCCGCTCGAGC		412
	R- <i>LHCSR3.1</i>	GCTCCGTGGAGCCTGCTC		
<i>LHCSR3.2</i>	F- <i>LHCSR3.2</i>	CCGCTTGCTTCTGCTCAAGTTC		441
	R- <i>LHCSR3.2</i>	CTCTCGCCTGTTGTCAACATC		
<i>PSBS1</i>	F- <i>PSBS1</i>	AGGGTAGAACAGCTATGGTTTCGT		530
	R- <i>PSBS1</i>	CCGTCAGATCCCCTTCTCTCTG		
<i>PSBS2</i>	F- <i>PSBS2</i>	CAGGGTAGAACAGCTATGGTTTCAG		331
	R- <i>PSBS2</i>	GCGTTGTACGTCTTGCGTCAC		
<i>CBLP</i>	F- <i>CBLP</i>	AGGTCTGGAACCTGACCAACT		312
	R- <i>CBLP</i>	AAGCACAGGCAGTGGATGA		

## ***Amplifications des acides nucléiques***

- *RT-PCR semi-quantitative*

La PCR semi-quantitative par **RT** (transcription inverse) a été réalisée à partir d'une préparation d'ARN ajustée à 2 µg/µL. Une première étape de traitement à la DNase est réalisée pour éliminer l'ADN résiduel. Ensuite, la synthèse du cDNA a été effectuée en utilisant l'enzyme SuperScript III Reverse Transcriptase (SSIII – Invitrogen) avec une étape de dénaturation, suivi d'une incubation à 50°C. Enfin, l'amplification spécifique des cDNA cibles a été réalisée avec la polymérase LA Pol GC Rich (Takara), impliquant des cycles de dénaturation, d'hybridation et d'élongation (**PCR**).

- *Amorces*

Le dessin des amorces a été réalisé à l'aide du programme FastPCR (PrimerDigital). Les paramètres utilisés définissent une longueur optimale de 20 nucléotides et une température de fusion comprise entre 58 et 62°C avec un optimal de 60°C.

Certains des oligonucléotides spécifiques employés étaient déjà disponibles dans des publications.

## ***Transformation du génome nucléaire de *Chlamydomonas****

Le protocole de co-transformation est adapté de (Shimogawara et al, 1998). 200 mL de cultures sont récoltés en phase exponentielle ( $2.10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup>) puis centrifugés (4 000 rpm pendant 7 min). Le culot cellulaire est re-suspendu en milieu TAP contenant 40 mM de saccharose. 250 µL de suspension sont incubés avec 500 ng d'ADN du gène cible (produit de PCR), 160 ng d'ADN du gène *aphVIII* (produit de PCR) et 40 µg d'ADN entraîneur de sperme de saumon, pendant 20 min dans un bain thermostaté à 16°C. Les cellules sont ensuite électroporées à 10 µF, 1 800 V.cm<sup>-1</sup>. Les cellules sont alors incubées à 16°C pendant 30 min puis diluées dans 5 mL de TAP-sucrose 40 mM) et incubées 18 à 24 heures en très faible lumière et une faible agitation. Le lendemain les cultures électroporées sont étalées sur milieu TAP (ou MIN) contenant de la paromomycine (10 µg.mL<sup>-1</sup>) pour la sélection de l'intégration du gène *aphVIII* (marqueur de sélection).

Gène de résistance à la paromomycine : la cassette contenant le gène *aphVIII* a été obtenue par digestion du plasmide pBC1 (dérivant du vecteur pSL103) par les enzymes de restrictions SacI et KpnI (New Englands Biolabs) puis amplifié par PCR.

### ***Coloration au DAPI***

1 mL de culture en phase exponentielle est centrifugé (3 500 rpm, 5 min). Le culot cellulaire est re-suspendu dans 1 mL d'éthanol à 70% (70% v/v dans milieu Minimum). L'échantillon est incubé pendant 15 min à l'obscurité et à température ambiante, puis centrifugé (3 500 rpm, 5 min). L'étape incubation éthanol 70% pendant 15 min puis centrifugation est renouvelée. Les cellules sont ensuite lavées avec du milieu MIN puis re-suspendues dans 1 mL de milieu MIN. Cinq minutes avant l'analyse (FACS ou microscope) la solution de DAPI (0.5 µL à 1 mg/mL) est ajoutée à la suspension puis incubée (obscurité).

## **Biochimie**

### ***Dosage chlorophylle***

Les concentrations de chlorophylle ont été déterminées après extraction des pigments dans le méthanol selon la méthode de (Porra et al, 1989). 1 mL de culture en phase exponentielle est centrifugée (10000 g, 2 min) puis re-suspendu et vortexé dans 1 mL de méthanol 100% et placé à l'obscurité pendant 5 min. Après incubation, l'échantillon est centrifugé (21000 g, 5 min). Pour évaluer la quantité totale de chlorophylle dans l'échantillon, l'absorbance de l'extrait est mesuré à 652 et 665.2 nm, et ces valeurs d'absorbance ont été utilisées dans l'équation suivante :  $[\text{Chl}]_{\text{total, Chla+b}} \mu\text{g/mL} = (22.12 \times A_{652}) + (2.71 \times A_{665.2})$

### ***Préparation protéiques cellulaire totaux***

Les protéines sont extraites à partir de cellules entières en présence d'inhibiteurs de protéase et à 0°C. 50 mL de culture cellulaire en phase exponentielle sont centrifuges (4°C, 5 min, 4500 rpm). Le culot est re-suspendu dans 3 mL d'HEPES 6 (5 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM EDTA). Après le transfert dans différents tubes Eppendorf et une centrifugation (1 min, 13 200 rpm), le surnageant est éliminé et les cellules re-suspendues dans 40 à 75 µL de DTT 0.1M-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M. Les échantillons sont congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C.

### **Purification des membranes des thylakoïde**

Les membranes des thylakoïdes ont été isolées en présence d'inhibiteurs de protéases et à 0°C, selon la méthode de (Chua & Bennoun, 1975). 200 mL de culture en phase exponentielle sont récoltés par centrifugation (5000 rpm pendant 5 min) et re-suspendues

dans 5 ml HEPES 2 (5 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM EDTA, 0.3 M sucrose) à une concentration cellulaire environ 5.107 cell/mL. Les cellules sont ensuite cassées à la presse de French à 6000 psi (400 psig on Aminco, with 1" diameter cell on "high" ratio). L'échantillon est récolté directement sur 4 mL HEPES 3 (5 mM HEPES pH 7.5, 10 mM EDTA, 1.8 M sucrose) dans tube SW41 puis centrifuger (1h à 36 000 rpm 4°C). L'interface est récupérée et additionnée de 10 mL HEPES 6 (5 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM EDTA). Cet ensemble est centrifugé (15 000 rpm 30 min, 4°C). Le culot est re-suspendu dans 100 µL HEPES 2 (en s'assurant avant d'avoir bien éliminé le surnageant) puis vortexé. Une dernière centrifugation est réalisée (10 min 20 000 rpm) puis l'échantillon est finalement re-suspendu dans 100 µL de DTT/carbonate.

### ***Immuno-empreintes***

Les gels dénaturants d'acrylamide et urée sont préparés comme décrit précédemment kuras. Les échantillons sont chargés à niveau de chlorophylle constant (10 ou 20 µg par puits). Le transfert électrique demi-sec est fait sur une membrane de nitrocellulose (Amersham, 0.45 µm NC, GE Healthcare). Des anticorps primaires dirigés contre les polypeptides cibles sont utilisés après saturation de la membrane avec des protéines de lait. Après lavage, les anticorps secondaires anti-IgG de lapin ou de souris (dans le cas du  $\alpha$ -tubuline) conjugués à la HRP (Horseradish peroxidase - Promega) sont incubés pendant 1 heure à température ambiante ou une nuit à 4°C. La membrane est ensuite lavée puis les signaux sont induits avec un réactif « enhanced chemiluminescence » (Clarity Biorad) puis détectés avec une caméra Chemidoc™ (Biorad).

## **Biophysique - Mesures de fluorescence**

Les cinétiques d'induction de fluorescence ont été effectuées à température ambiante à l'aide d'un fluoromètre DeepGreen (JBeamBio) et d'un système d'imagerie de fluorescence de la chlorophylle (SpeedZen 200, JBeamBio). L'efficacité maximale du photosystème II,  $F_V/F_M$  ( $F_V = F_M - F_0$ ), a été déterminée en utilisant des cellules préalablement adaptées à l'obscurité. La fluorescence maximale ( $F_M$ ) a été mesurée soit après un éclairage bref et saturant, soit pendant une illumination continue en présence de 10 µM de 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée (DCMU).

Pour évaluer les transitions d'état, les cultures ont été incubées pendant 20 minutes sous forte agitation à l'obscurité ou éclairées en présence de l'inhibiteur du PSII, DCMU

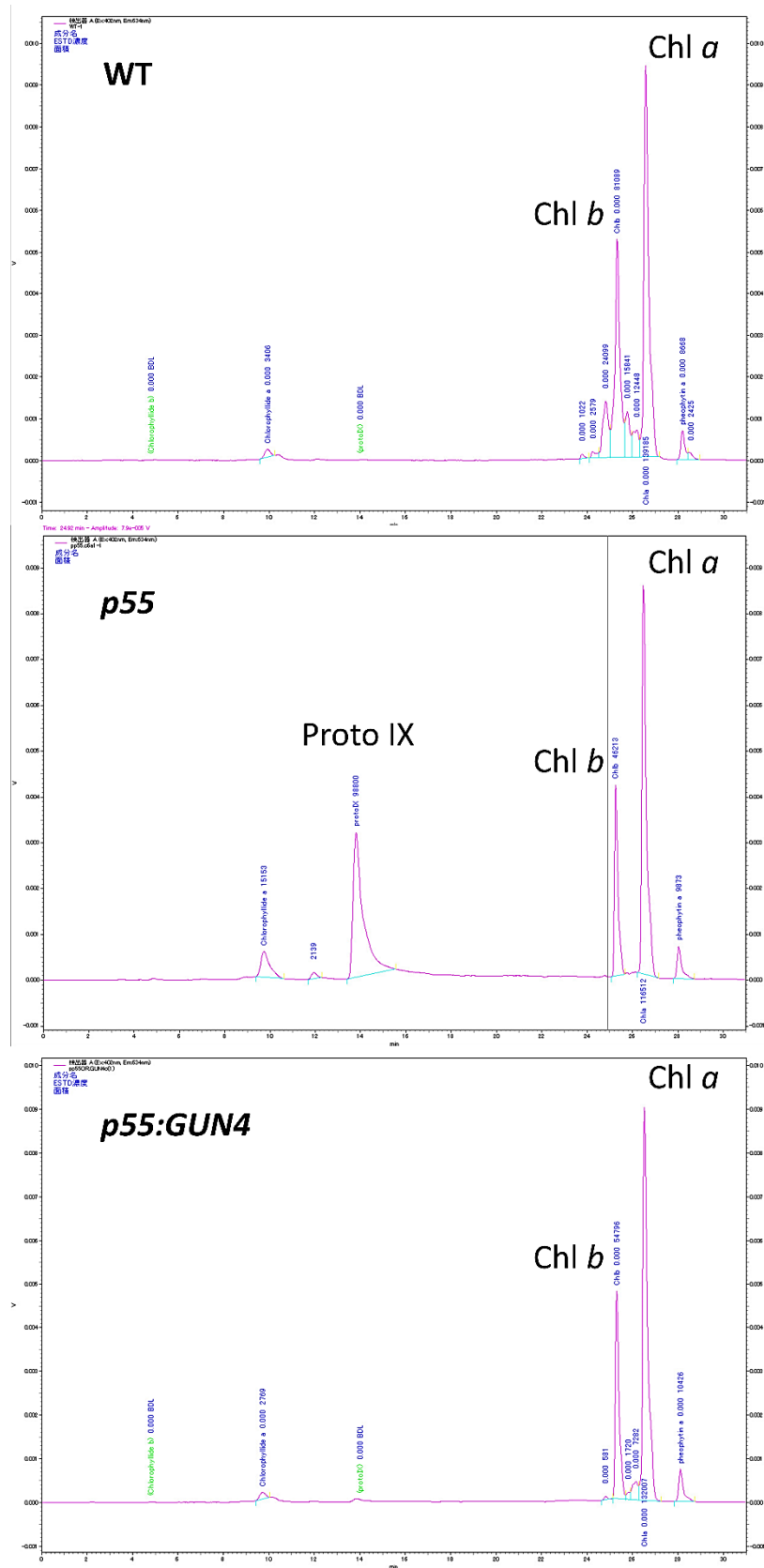
(10  $\mu\text{M}$ ), pour obtenir l'état 1. L'état 2 a été atteint en incubant les cellules dans des conditions anaérobies, en présence de glucose (20 mM) et de glucose oxydase (2 mg/mL) et à l'obscurité pendant 20 minutes. Les cinétiques d'induction de fluorescence ont été mesurées au fluoromètre (JBeamBio) après l'ajout de 10 mM de DCMU.

Les spectres d'émission de fluorescence à froid (77 K) ont été mesurés avec un dispositif construit en interne. Les échantillons ont été immergés dans de l'azote liquide et excités avec une source LED (LS-450, Ocean Optics - LED bleue, 450 nm). Les spectres d'émission ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre CCD (QE6500, Ocean Optics).

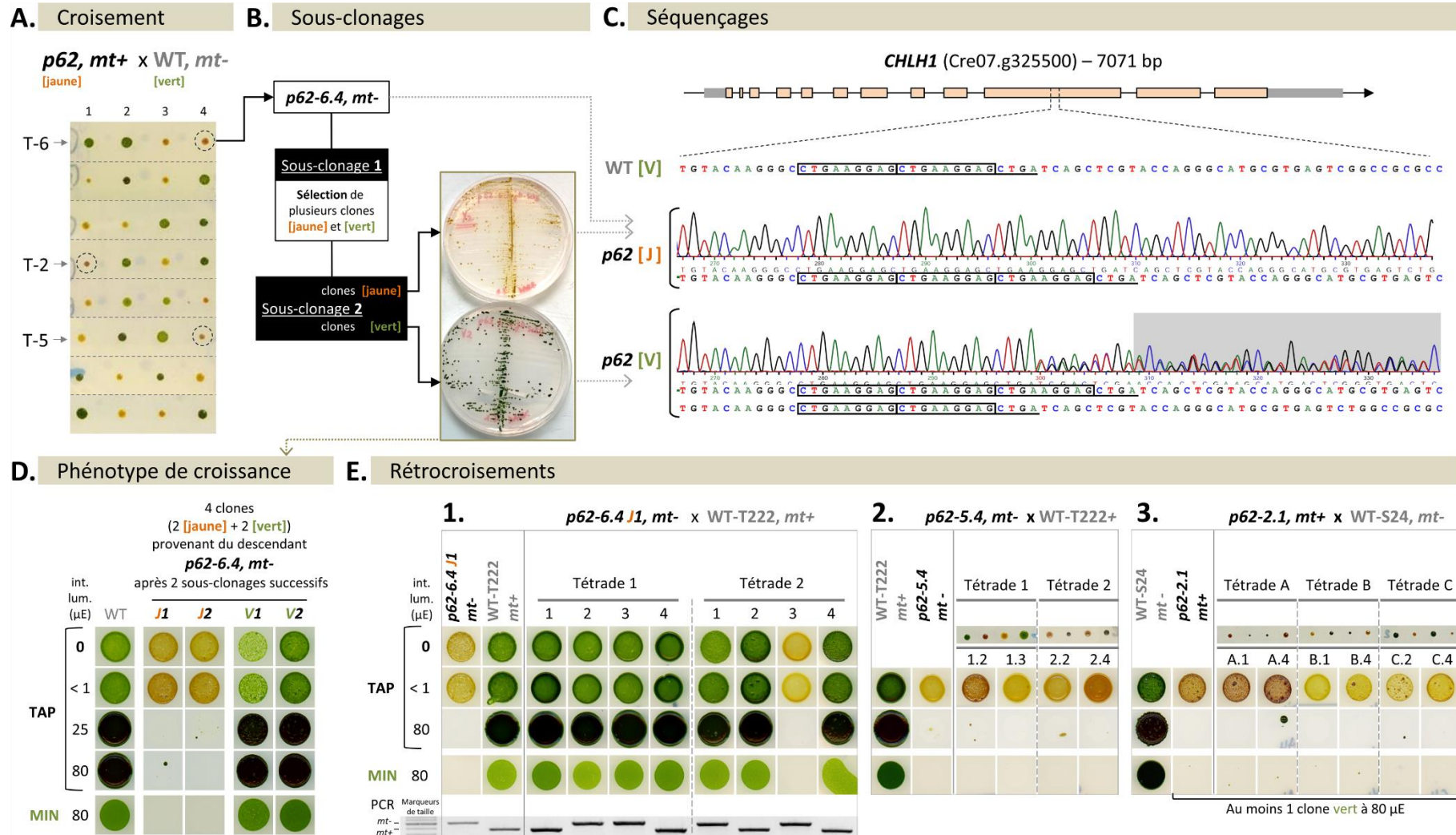
# ANNEXES



**ANNEXE 1 : Chromatogrammes HPLC des pigments contenus dans le mutant p55, le mutant complétement par GUN4 (p55 :GUN4) et une souche sauvage (WT)**  
 (Extraction et analyse par chromatographie réalisées par le laboratoire de Y. Takahashi, Japon)







- (A) Tétrades obtenues après un croisement de la souche originale du mutant *p62* (phénotype jaune-brun ; [jaune]) avec une souche sauvage WT ([vert]) ; des descendants [jaune] ont été récupérés (indiqués par un cercle).
- (B) Sous-clonages successifs du descendant *p62-6.4* (tétrade n°6, clone n°4) sur milieu TAP et à l'obscurité, au cours desquels des clones [vert] sont observés.
- (C) Séquençage -électrophorégrammes et séquences nucléotidiques- d'une partie du gène *CHLH1* de différents clones *p62*, comparées à la séquence du WT.
- (D) Phénotype de croissance sur milieu TAP ou MIN et sous différentes intensités lumineuses, de 4 sous-clones *p62* ([jaune] ou [vert]) comparés à une souche WT.
- (E) Rétrocroisements des 3 descendants *p62* [jaune] issus du croisement en A. : (1.) *p62-6.4-J1a, mt-* (clone [jaune] obtenu après 2 sous-clonages), (2.) *p62-5.4, mt-* et (3.) *p62-2.1, mt+*. Phénotype de croissance et (uniquement pour le rétrocroisement 1) détermination du signe sexuel (*mt*) par PCR.

**ANNEXE 2B : Étude génétique et phénotypique du mutant p62**

Texte correspondant à la figure présentée en ANNEXE 2A

**A.** Dans un premier temps, un croisement a été réalisé à partir de la souche *p62* originale, (conservée à l’obscurité) avec une souche de référence sauvage. *Pour rappel, le phénotype caractéristique du mutant est une pigmentation jaune-brunâtre ([jaune]) tandis que celui du sauvage est vert ([vert]).* Nous avons ainsi obtenu plusieurs tétrades, chacune présentait une ségrégation mendélienne, 2 clones [vert] et 2 autres [jaune], ce qui indique que la mutation responsable est bien d’origine nucléaire. Nous avons sélectionné des descendants [jaune], dont -6.4, -5.4 et -2.1.

**B.** Le descendant *p62-6.4* a été sous-cloné deux fois successivement (par la technique d’isolement) à l’obscurité. Le premier isolement a révélé l’apparition de clones [vert] montrant ainsi une instabilité du phénotype, ce qui peut se traduire par une réversion génétique chez ce mutant. Toutefois, un second sous-clonage n’a pas permis pas d’observer une nouvelle évolution, ces clones ont conservé leur phénotype [vert] et c’est également le cas des clones [jaune].

**C.** Nous nous sommes alors intéressés de plus près à l’insertion des 9 bases qui était responsable de la mutation initiale dans *p62*. Le séquençage, après amplification par PCR, d’une partie de l’exon 10 du gène *CHLH1* (où se situe l’insertion) a été réalisée à partir de différentes cultures, soit de clones qui ont maintenu leur phénotype [jaune], soit qui ont évolué [vert]. Les résultats (ANNEXE 2-C) montrent une instabilité du motif supplémentaire dans cette région du gène des sous-clones [vert], qui se caractérise par une combinaison de séquences avec et sans l’insertion de 9 nucléotides. Est-ce une duplication du gène ? Ce mutant serait diploïde (ou aneuploïde) ? Dans ces situations, la version sauvage serait dominante (apparition d’une pigmentation verte).

**D.** Des cultures (test en goutte) de ces derniers sous-clones de *p62-6.4* (2 clones de chaque phénotype pigmentaire, soit *p62-6.4-J1*, *J2*, *V1* et *V2*) ont été réalisées sur milieu TAP à différentes intensités lumineuses (obscurité,  $\approx 1$ , 25 et 80  $\mu\text{mol de photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) et sur milieu MIN à 80  $\mu\text{mol de photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Ces cultures, dans ces différentes conditions, montrent que les sous-clones verts présentent une croissance de type sauvage et que les deux autres restent extrêmement sensibles à la lumière. Cependant, malgré cette photosensibilité, des colonies avec une pigmentation verte sont présentes dans les dépôts cellulaires.

La progression de cette instabilité phénotypique perdure.

*ANNEXE 2B : Étude génétique et phénotypique du mutant p62 (suite)*

**E.** S'interrogeant encore sur l'origine de ce phénotype (duplication du gène, diploïdie), nous avons réalisé des rétrocroisements. Le premier (**1.**) correspond au croisement d'un de ces sous-clones jaunes (*p62-6.4-J1*) avec une souche sauvage et les deux autres (**2.** et **3.**) correspondent à deux autres descendants du croisement initial en (**A**) croisés également avec une souche sauvage.

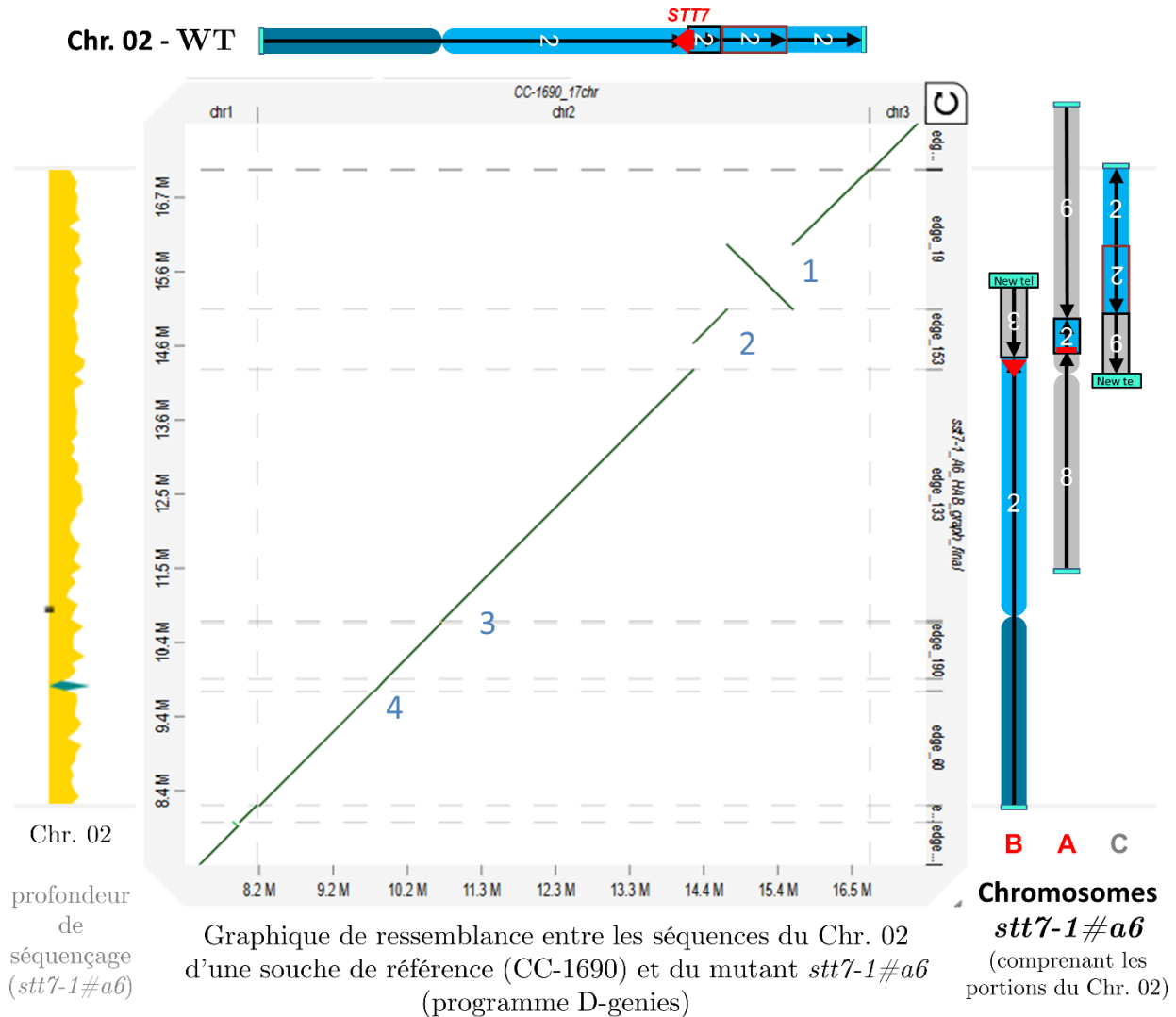
Les résultats du rétrocroisement 1 indiquent que le phénotype jaune (attribué à la mutation dans *CHLH1*) ne suit plus une ségrégation 2:2. En effet, les tests en gouttes révèlent qu'au sein d'au moins une tétrade, l'intégralité de la descendance présente un phénotype sauvage, tandis que d'autres cas, seulement un descendant sur quatre avait le phénotype mutant. En revanche, les deux autres rétrocroisements ont permis des tétrades de type 2:2, seulement les tests de croissance montrent l'apparition de colonies avec une pigmentation verte.

On note que la probabilité de retrouver des colonies vertes en condition photoautotrophique est également élevée.

Ainsi, cette étude génétique du mutant *p62* montre que la mutation dans le gène *CHLH1* est très instable. Dans un premier temps, le traitement chimique (mutagénèse) a provoqué une mutation dans le gène *CHLH1*, entraînant la duplication d'une séquence de 9 nucléotides au sein de deux autres motifs identiques à cette séquence. Cependant, il semble que cette mutation puisse être corrigée (présence des deux formes « mutant » et « wt » dans les résultats de séquençage du gène pour les sous-clones verts), probablement par un mécanisme de réparation de l'ADN, favorisé par des conditions délétères pour le mutant.

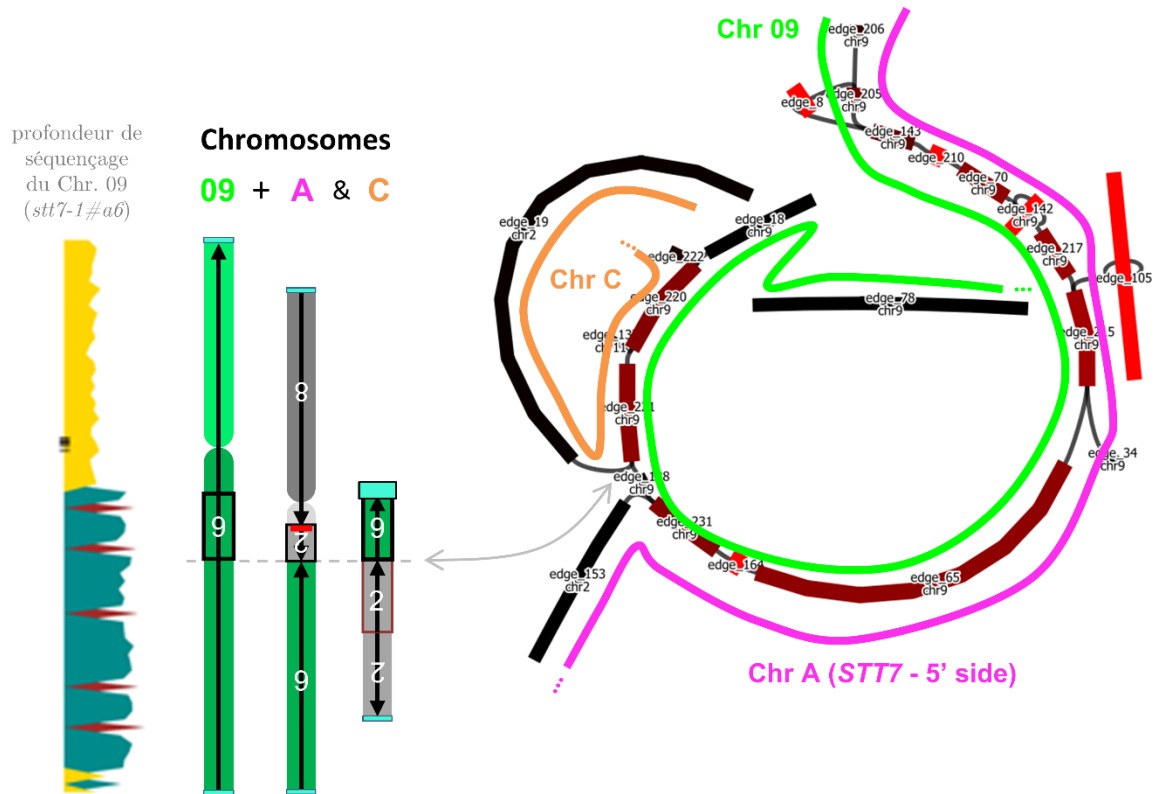
Ces observations montrent ainsi l'impossibilité de réaliser une complémentation fonctionnelle dans ce mutant et ne permettra également pas une étude phénotypique dans des conditions de variations lumineuses environnementales.

**ANNEXE 3 : Reconstruction des chromosomes du mutant *stt7-1#a6* avec l'aide de D-genies - for Dot plot large Genomes in an Interactive, Efficient and Simple way (Cabanettes & Klopp, 2018). Exemple du chromosome 02.**



Le graphique en points suit l'ordre des séquences des fichiers FASTA, de CC-1690 (21gr) et *stt7-1#a6*. Les bords supérieur et droit du panneau graphique présentent les noms des séquences, tandis que les côtés gauche et inférieur affichent les échelles de taille des séquences. Les correspondances d'alignement sont présentées sous forme de lignes colorées sur le panneau graphique (la valeur de similarité est ici supérieure à 75%). Plusieurs cassures sont visibles, correspondant soit à une inversion de séquence (1), soit des régions répétées, comme le centromère (3) ou une insertion, par exemple d'un transposon (4) ou bien une insertion/délétion (2) (mais cette représentation ne permettant pas d'observer une ploïdie, l'utilisation d'un autre programme bioinformatique est nécessaire, exemple de Bandage –voir ANNEXE 4).

**ANNEXE 4 : Reconstruction des chromosomes du mutant *stt7-1#a6* avec l'aide de Bandage (Bioinformatics Application for Navigating De novo Assembly Graphs Easily {Wick, 2015 #1129} - Exemple du chromosome 09.**

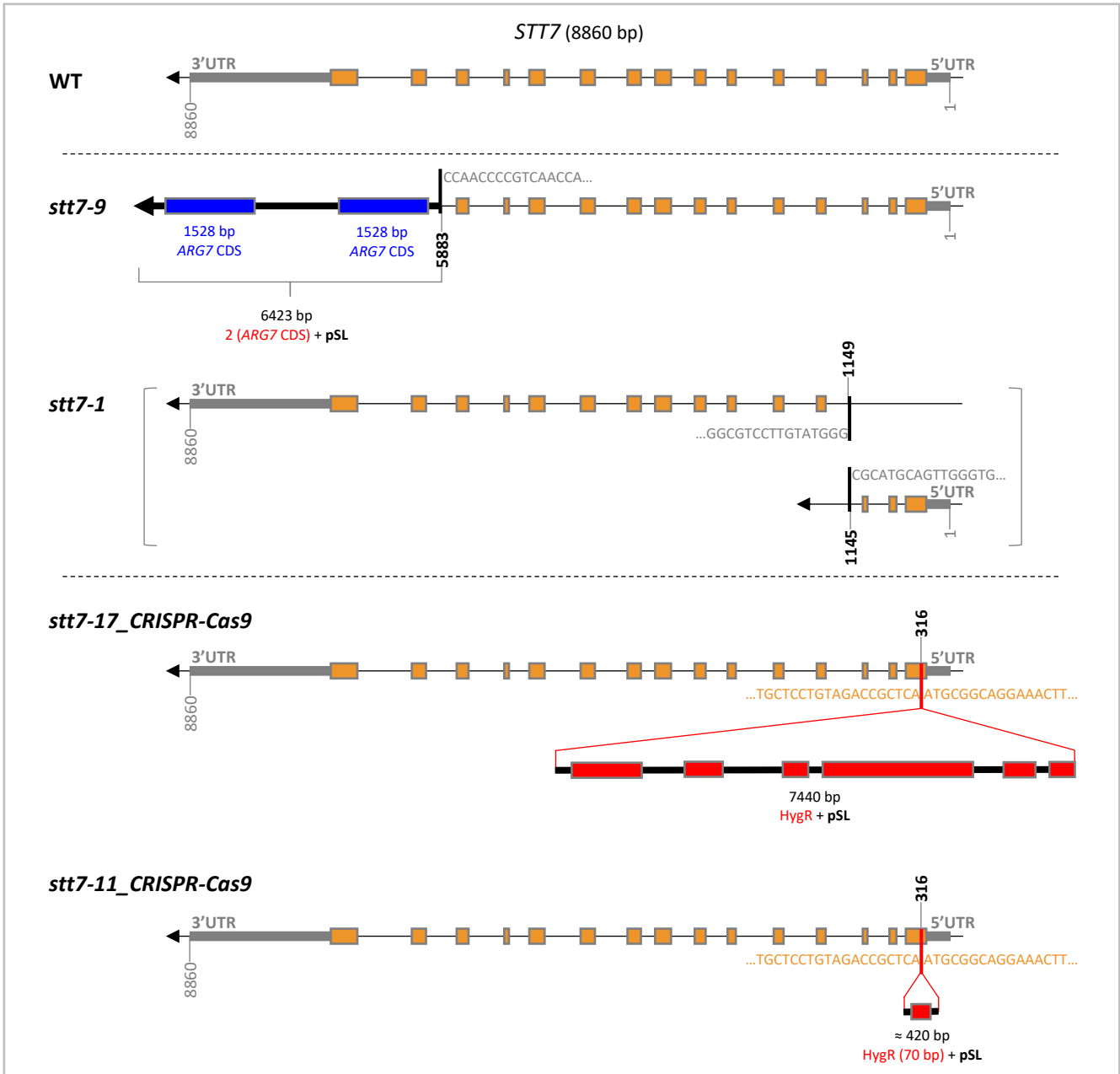


Sur la partie droite, un exemple de visualisation avec Bandage. Son utilisation permet de mettre en évidence des nœuds (où l'on observe plusieurs entrées ou sorties de séquences sur l'assemblage). Ainsi, sur le chromosome 09 de *stt7-1#a6*, un nœud apparaît où sortent deux portions différentes du chromosome 02. À gauche, la structure génique sous-jacente des trois chromosomes (09, A et C) de *stt7-1#a6*, déduite de la visualisation Bandage.

## ANNEXE 5 : Représentation génomique du gène *STT7* dans les différents mutants *stt7*

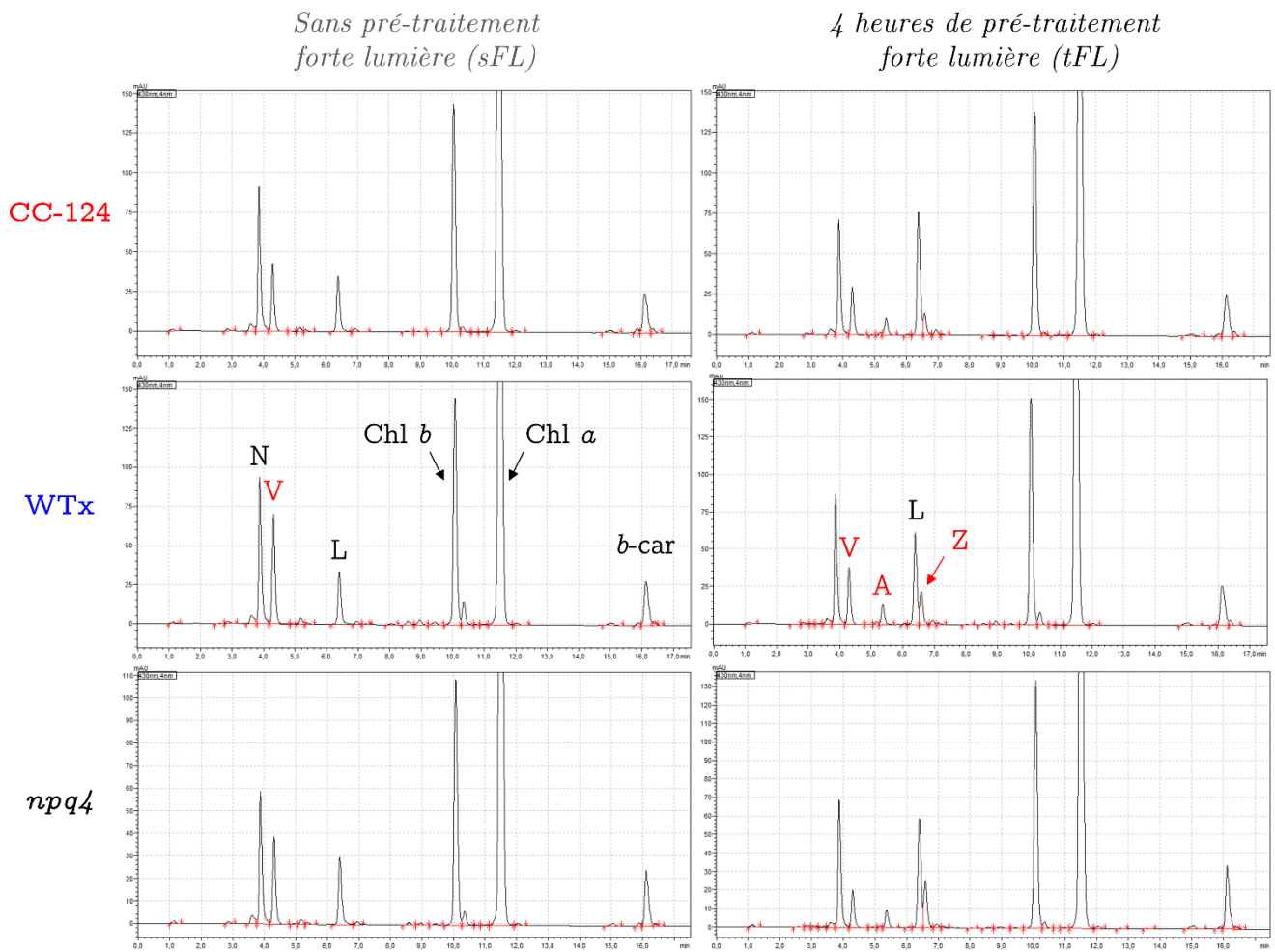
*ARG7* CDS : séquence codante de *ARG7*, le gène codant pour l'argininosuccinate lyase - un marqueur nucléaire sélectionnable - chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

HygR : cassette de résistance à l'hygromycine ; pSL plasmide utilisé contenant HygR.



**ANNEXE 6 : Chromatogrammes HPLC des pigments contenus dans les souches CC-124, WTx et npq4 avant et après traitement forte lumière.**

V : violaxanthine ; A : anthéroxanthine ; Z : zéaxanthine ; L : lutéine ; N : néoxanthine ; Chl : chlorophylle ;  $\beta$ -car :  $\beta$ -carotène.



# Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Identification d'interactants à ALB3.1.....</i>	<i>82</i>
<i>Tableau 2 : Contenu en chlorophylle et rapport Chl a/Chl b des deux mutants étudiés, p55 et p6290</i>	
<i>Tableau 3 : Liste des gènes perdus dans le mutant p55.....</i>	<i>96</i>
<i>Tableau 4 : Propriétés fonctionnelles des mutants gun4.....</i>	<i>99</i>
<i>Tableau 5 : Quantification des mesures de transitions d'état.....</i>	<i>120</i>
<i>Tableau 6 : Propriétés de croisement génétique des différentes souches mutantes stt7 comparé à une souche de référence (WT-T222).....</i>	<i>128</i>
<i>Tableau 7 : Mutations supplémentaires occasionnées par le réarrangement chromosomique dans stt7-1 – gènes scindés.....</i>	<i>137</i>
<i>Tableau 8 : Caractéristiques de croisement génétique des transformants stt7-CRISPR-Cas9.....</i>	<i>141</i>
<i>Tableau 9 : Rapports de LHCSR3-P / LHCSR3 (déterminés sur cellules entières).....</i>	<i>168</i>
<i>Tableau 10 : Rapports de LHCSR3-P / LHCSR3 (déterminés sur membranes purifiées du thylakoïde).....</i>	<i>172</i>
<i>Tableau 11 : Amorces oligonucléotidiques utilisées.....</i>	<i>192</i>



# Liste des figures

<i>Figure 1 : Schéma et structure du chloroplaste (d'une plante supérieure) .....</i>	<i>11</i>
<i>Figure 2 : Perte progressive de l'opéron de l'ATP synthétase au cours de l'évolution dans le chloroplaste d'eucaryotes photosynthétiques.....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 3 : Vue d'ensemble du transport des protéines chloroplastiques d'origine nucléaire et leur adressage vers les différents sous compartiments du chloroplaste.....</i>	<i>16</i>
<i>Figure 4 : Représentation schématique de la chaîne photosynthétique.....</i>	<i>18</i>
<i>Figure 5 : Les principaux pigments photosynthétiques présents chez les végétaux.....</i>	<i>19</i>
<i>Figure 6 : Structure et organisation du complexe LHCII-PSII (chez les plantes) .....</i>	<i>23</i>
<i>Figure 7 : Structure du complexe LHCI-PSI .....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 8 : Les différents mécanismes du quenching non photochimique (NPQ) .....</i>	<i>26</i>
<i>Figure 9 : Chlamydomonas reinhardtii .....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 10 : Cycle de vie de Chlamydomonas reinhardtii.....</i>	<i>30</i>
<i>Figure 11 : Vue d'ensemble de la biogénèse des antennes photosynthétiques.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 12 : Conversion de la protoporphyrine (PPIX) en Chl a et Chl b - branche magnésium de la biosynthèse des tétrapyrroles.....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 13 : Ressources génétique pour l'étude de la biogénèse des antennes photosynthétiques.....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 14 : Phénotype d'un double mutant <i>srp43-alb3.1</i> .....</i>	<i>86</i>
<i>Figure 15 : Effet de l'intensité lumineuse sur la croissance cellulaire .....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 16 : Effet de l'oxygène sur la croissance cellulaire en présence de lumière.....</i>	<i>92</i>
<i>Figure 17 : Effet de la longueur d'onde sur la croissance cellulaire .....</i>	<i>93</i>
<i>Figure 19 : Complémentation fonctionnelle du mutant <i>p55</i>.....</i>	<i>94</i>
<i>Figure 18 : Alignement des paires de lecture séquencées des mutants <i>p55</i> et <i>p62</i> sur le génome de référence et d'une souche sauvage (WT).....</i>	<i>94</i>
<i>Figure 20 : Spectre d'absorption du mutant <i>p62</i>.....</i>	<i>97</i>
<i>Figure 21 : spectres d'émission de fluorescence à basse température (77 K) des mutants <i>gun4</i> ...</i>	<i>100</i>
<i>Figure 22 : Accumulation des protéines au niveau des thylakoïdes du mutant <i>p55</i> .....</i>	<i>102</i>
<i>Figure 23 : Séparation des complexes PSI, PSII et PSI-LHCI sur gradient de sucrose.....</i>	<i>102</i>
<i>Figure 24 : Évolution de l'accumulation des protéines photosynthétiques au cours d'une exposition à une lumière intense (1000 <math>\mu</math>E).....</i>	<i>103</i>
<i>Figure 25 : Schéma des transitions d'état .....</i>	<i>112</i>
<i>Figure 26 : Évolution de l'émission de fluorescence sur une feuille intacte en fonction du temps et des conditions d'éclairement.....</i>	<i>115</i>
<i>Figure 27 : Évolution de l'émission de fluorescence sur Chlamydomonas reinhardtii en fonction du temps et des conditions d'éclairement.....</i>	<i>115</i>

Figure 28 : Mesures des transitions d'état .....	118
Figure 29 : Schéma de la structure du gène <i>STT7</i> des différentes souches .....	123
Figure 30 : Le polypeptide <i>STT7</i> et alignement de sa séquence (peptidique) avec les versions mutées .....	124
Figure 31 : Test de signe par PCR des différentes souches <i>stt7</i> et autres contrôles.....	126
Figure 32 : Caractéristiques de tailles cellulaire et nucléaire de deux mutants <i>stt7</i> .....	129
Figure 33 : Généalogie des mutants <i>stt7</i> .....	130
Figure 34 : Séquençage du génome complet de différentes souches <i>stt7</i> .....	132
Figure 35 : Reconstruction chromosomique de la souche <i>stt7-1#a6</i> .....	134
Figure 36 : Exemple de cinétique de fluorescence sur transformants.....	138
Figure 37 : Mesures des transitions d'état dans les mutants <i>stt7</i> obtenus par la méthodologie CRISPR-Cas9.....	140
Figure 38 : Mesures du NPQ-qE après exposition à une forte lumière FL (500 $\mu$ E).....	148
Figure 39 : Mesures du NPQ-qE d'une souche sauvage de référence pour le NPQ (CC-124), la souche WTx et du mutant <i>npq4</i> . .....	150
Figure 40 : Effet des conditions de pré-culture sur l'évaluation du NPQ-qE.....	154
Figure 41 : Effets du temps de relaxation sur la fluorescence, après une exposition à une forte lumière. ....	156
Figure 42 : Effet de la concentration cellulaire sur l'induction du NPQ-qE.....	158
Figure 43 : Détermination de la composition en chlorophyllienne, des paramètres de fluorescence et mesure du NPQ-qE sur différentes souches de références du NPQ ( <i>qE</i> et <i>qT</i> ).....	160
Figure 44 : Observation des caractéristiques de fluorescence et biochimique de l'induction du NPQ-qE. ....	164
Figure 45 : Mesures du NPQ et accumulation des protéines entre avant et après une exposition à une forte lumière.....	168
Figure 46 : Immunodétection de protéines sur des membranes purifiées du thylakoïde après une exposition à une forte lumière.....	172
Figure 47 : Niveau de transcription de gènes impliqués dans le NPQ .....	176
Figure 48 : Mesure du NPQ-qE sur une tétrade représentative du croisement génétique entre WTx et CC-124 .....	179
Figure 49 : Criblage des clones issus du croisement de WTx, <i>mt+</i> avec S1-D2, <i>mt-</i> sur leur caractéristique NPQ-qE.....	182



# Table des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine di/tri-phosphate

$\beta$ -car :  $\beta$ -carotène

CDS : *coding sequence* ou séquence codante

Chl : chlorophylle

Chr. : chromosome

DCMU : 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl-urée (diuron)

E : Einstein (unité de mesure) -  $\mu\text{E}$  pour  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ou  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

FL : forte lumière

Glu-TR : glutamyl-ARNt réductase

LHCI/II : *light-harvesting complex of PSI/PSII*

LHCSR : *light-harvesting complex-stress related*

LTD : LHCP translocation defect

Mg-Ch : magnésium-chélatase

MIN : minimum (milieu de culture)

MT : *mating type* ou signe sexuel

NADP : nicotinamide dinucléotide phosphate

NPQ : *non-photochemical quenching* ou extinction de fluorescence non photochimique

Pb : paire de base

PCR : *polymerase chain reaction* ou RCP, réaction de polymérisation en chaîne

PQ : plastoquinone

PQH2 : plastoquinol

PSI/PSII : Photosystème I/II

ROS : *reactive oxygen species* ou ERO, espèces réactives de l'oxygène

SRP : *signal recognition particle*

TAP : Tris-acétate-phosphate

TIC : *translocon of the inner envelope of chloroplasts*

TOC : *translocon of the outer envelope of chloroplasts*

VDE : violaxanthine dé-époxydase

WT : *wild type* ou type sauvage

ZEP : zéaxanthine époxydase



# BIBLIOGRAPHIE

- Allen J (2003) Why chloroplasts and mitochondria contain genomes. *Comparative and Functional Genomics* **4**: 31-36
- Allen JF (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1098**: 275-335
- Allen JF, Bennett J, Steinback KE, Arntzen CJ (1981) Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature* **291**: 25-29
- Allorent G, Lefebvre-Legendre L, Chappuis R, Kuntz M, Truong TB, Niyogi KK, Ulm R, Goldschmidt-Clermont M (2016) UV-B photoreceptor-mediated protection of the photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: 14864-14869
- Allorent G, Tokutsu R, Roach T, Peers G, Cardol P, Girard-Bascou J, Seigneurin-Berny D, Petroustos D, Kuntz M, Breyton C, Franck F, Wollman FA, Niyogi KK, Krieger-Liszkay A, Minagawa J, Finazzi G (2013) A dual strategy to cope with high light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **25**: 545-557
- Alric J, Lavergne J, Rappaport F (2010) Redox and ATP control of photosynthetic cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii* (I) aerobic conditions. *Biochim Biophys Acta* **1797**: 44-51
- Andersson B, Anderson JM (1980) Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **593**: 427-440
- Arnon DI, Allen MB, Whatley FR (1954) Photosynthesis by Isolated Chloroplasts. *Nature* **174**: 394-396
- Ashenafi EL, Nyman MC, Shelley JT, Mattson NS (2023) Spectral properties and stability of selected carotenoid and chlorophyll compounds in different solvent systems. *Food Chemistry Advances* **2**: 100178
- Baker NR (2008) Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 89-113
- Barbrook AC, Howe CJ, Purton S (2006) Why are plastid genomes retained in non-photosynthetic organisms? *Trends Plant Sci* **11**: 101-108
- Barera S, Dall'Osto L, Bassi R (2021) Effect of lhcsr gene dosage on oxidative stress and light use efficiency by *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *J Biotechnol* **328**: 12-22
- Bellaïf S, Barneche F, Peltier G, Rochaix JD (2005) State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* **433**: 892-895
- Bellaïf S, Ferris P, Naver H, Göhre V, Rochaix J-D (2002) Loss of Albino3 Leads to the Specific Depletion of the Light-Harvesting System. *The Plant Cell* **14**: 2303-2314
- Ben-Shem A, Frolov F, Nelson N (2003) Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* **426**: 630-635
- Bennett J (1977) Phosphorylation of chloroplast membrane polypeptides. *Nature* **269**: 344-346
- Bennoun P, Béal D (1997) Screening algal mutant colonies with altered thylakoid electrochemical gradient through fluorescence and delayed luminescence digital imaging. *Photosynth Res* **51**: 161-165

- Bennoun P, Béal D (1998) New Digital Imaging Instrument For Measuring Fluorescence and Delayed Luminescence. In *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, Rochaix J-D, Goldschmidt-Clermont M, Merchant S (eds), Vol. 7, 23, pp 451-458. Springer Netherlands
- Bennoun P, Levine RP (1967) Detecting Mutants That Have Impaired Photosynthesis by Their Increased Level of Fluorescence. *Plant Physiol* **42**: 1284-1287
- Berger H, Blifernez-Klassen O, Ballottari M, Bassi R, Wobbe L, Kruse O (2014) Integration of carbon assimilation modes with photosynthetic light capture in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Plant* **7**: 1545-1559
- Bergner SV, Scholz M, Trompelt K, Barth J, Gäbelein P, Steinbeck J, Xue H, Clowez S, Fucile G, Goldschmidt-Clermont M, Fufezan C, Hippler M (2015) STATE TRANSITION7-Dependent Phosphorylation Is Modulated by Changing Environmental Conditions, and Its Absence Triggers Remodeling of Photosynthetic Protein Complexes. *Plant physiology* **168**: 615-634
- Berry LL, Brzezowski P, Wilson KE (2011) Inactivation of the STT7 gene protects PsaF-deficient *Chlamydomonas reinhardtii* cells from oxidative stress under high light. *Physiologia plantarum* **141**: 188-196
- Blifernez-Klassen O, Berger H, Mittmann BGK, Klassen V, Schelletter L, Buchholz T, Baier T, Soleimani M, Wobbe L, Kruse O (2021) A gene regulatory network for antenna size control in carbon dioxide-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Plant Cell* **33**: 1303-1318
- Boekema EJ, Van Roon H, Van Breemen JF, Dekker JP (1999) Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Eur J Biochem* **266**: 444-452
- Bonaventura C, Myers J (1969) Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim Biophys Acta* **189**: 366-383
- Bonente G, Ballottari M, Truong TB, Morosinotto T, Ahn TK, Fleming GR, Niyogi KK, Bassi R (2011) Analysis of LhcSR3, a protein essential for feedback de-excitation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS Biol* **9**: e1000577-e1000577
- Bonente G, Passarini F, Cazzaniga S, Mancone C, Buia MC, Tripodi M, Bassi R, Caffarri S (2008) The occurrence of the psbS gene product in *Chlamydomonas reinhardtii* and in other photosynthetic organisms and its correlation with energy quenching. *Photochem Photobiol* **84**: 1359-1370
- Brzezowski P, Schlicke H, Richter A, Dent RM, Niyogi KK, Grimm B (2014) The GUN4 protein plays a regulatory role in tetrapyrrole biosynthesis and chloroplast-to-nucleus signalling in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **79**: 285-298
- Brzezowski P, Sharifi MN, Dent RM, Morhard MK, Niyogi KK, Grimm B (2016) Mg chelatase in chlorophyll synthesis and retrograde signaling in *Chlamydomonas reinhardtii*: CHLI2 cannot substitute for CHLI1. *J Exp Bot* **67**: 3925-3938
- Bujaldon S, Kodama N, Rappaport F, Subramanyam R, de Vitry C, Takahashi Y, Wollman F-A (2017) Functional Accumulation of Antenna Proteins in Chlorophyll *b*-Less Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Plant* **10**: 115-130



- Bujaldon S, Kodama N, Rathod MK, Tourasse N, Ozawa SI, Sellés J, Vallon O, Takahashi Y, Wollman FA (2020) The BF4 and *p71* antenna mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et biophysica acta Bioenergetics* **1861**: 148085
- Cabanettes F, Klopp C (2018) D-GENIES: dot plot large genomes in an interactive, efficient and simple way. *PeerJ* **6**: e4958
- Caffarri S, Kouril R, Kereïche S, Boekema EJ, Croce R (2009) Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *EMBO J* **28**: 3052-3063
- Cardol P, Alric J, Girard-Bascou J, Franck F, Wollman FA, Finazzi G (2009) Impaired respiration discloses the physiological significance of state transitions in *Chlamydomonas*. *PNAS* **106**: 15979-15984
- Cariti F, Chazaux M, Lefebvre-Legendre L, Longoni P, Ghysels B, Johnson X, Goldschmidt-Clermont M (2020) Regulation of Light Harvesting in *Chlamydomonas reinhardtii* Two Protein Phosphatases Are Involved in State Transitions. *Plant Physiol* **183**: 1749-1764
- Cazzaniga S, Kim M, Bellamoli F, Jeong J, Lee S, Perozeni F, Pompa A, Jin E, Ballottari M (2020) Photosystem II antenna complexes CP26 and CP29 are essential for nonphotochemical quenching in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant, cell & environment* **43**: 496-509
- Chaux-Jukic F, Agier N, Eberhard S, Xu Z (2022) Extraction and selection of high-molecular-weight DNA for long-read sequencing from *Chlamydomonas reinhardtii*. *bioRxiv*: 2022.2008.2016.504088
- Chekounova E, Voronetskaya V, Papenbrock J, Grimm B, Beck CF (2001) Characterization of *Chlamydomonas* mutants defective in the H subunit of Mg-chelatase. *Mol Genet Genomics* **266**: 363-373
- Chen YE, Yuan S, Lezhneva L, Meurer J, Schwenkert S, Mamedov F, Schröder WP (2019) The Low Molecular Mass Photosystem II Protein PsbTn Is Important for Light Acclimation. *Plant Physiol* **179**: 1739-1753
- Choquet Y, Rahire M, Girard-Bascou J, Erickson J, Rochaix JD (1992) A chloroplast gene is required for the light-independent accumulation of chlorophyll in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J* **11**: 1697-1704
- Choquet Y, Vallon O (2000) Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins. *Biochimie* **82**: 615-634
- Chua NH, Bennoun P (1975) Thylakoid membrane polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type and mutant strains deficient in photosystem II reaction center. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 2175-2179
- Correa-Galvis V, Redekop P, Guan K, Griess A, Truong TB, Wakao S, Niyogi KK, Jahns P (2016) Photosystem II Subunit PsbS Is Involved in the Induction of LHCSR Protein-dependent Energy Dissipation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **291**: 17478-17487
- Craig RJ, Gallaher SD, Shu S, Salomé PA, Jenkins JW, Blaby-Haas CE, Purvine SO, O'Donnell S, Barry K, Grimwood J, Strenkert D, Kropat J, Daum C, Yoshinaga Y, Goodstein DM, Vallon O, Schmutz J, Merchant SS (2023) The *Chlamydomonas* Genome Project, version 6: Reference assemblies for mating-type plus and minus strains reveal extensive structural mutation in the laboratory. *Plant Cell* **35**: 644-672

- Daley DO, Whelan J (2005) Why genes persist in organelle genomes. *Genome Biol* **6**: 110
- Dall'Osto L, Bressan M, Bassi R (2015) Biogenesis of light harvesting proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1847**: 861-871
- Daniell H, Lin CS, Yu M, Chang WJ (2016) Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biol* **17**: 134
- Davison PA, Schubert HL, Reid JD, Iorg CD, Heroux A, Hill CP, Hunter CN (2005) Structural and Biochemical Characterization of Gun4 Suggests a Mechanism for Its Role in Chlorophyll Biosynthesis. *Biochemistry* **44**: 7603-7612
- de Grey ADNJ (2005) Forces maintaining organellar genomes: is any as strong as genetic code disparity or hydrophobicity? *BioEssays* **27**: 436-446
- Delepelaire P, Wollman F-A (1985) Correlations between fluorescence and phosphorylation changes in thylakoid membranes of *Chlamydomonas reinhardtii* in vivo: A kinetic analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **809**: 277-283
- DeLille J, Peterson EC, Johnson T, Moore M, Kight A, Henry R (2000) A novel precursor recognition element facilitates posttranslational binding to the signal recognition particle in chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 1926-1931
- Delosme R, Olive J, Wollman FA (1996) Changes in light energy distribution upon state transitions: An in vivo photoacoustic study of the wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1273**: 150-158
- Dent RM, Haglund CM, Chin BL, Kobayashi MC, Niyogi KK (2005) Functional genomics of eukaryotic photosynthesis using insertional mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **137**: 545-556
- Depège N, Bellafiore S, Rochaix JD (2003) Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science* **299**: 1572-1575
- Drapier D, Girard-Bascou J, Stern DB, Wollman FA (2002) A dominant nuclear mutation in *Chlamydomonas* identifies a factor controlling chloroplast mRNA stability by acting on the coding region of the atpA transcript. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **31**: 687-697
- Drop B, Webber-Birungi M, Yadav SK, Filipowicz-Szymanska A, Fusetti F, Boekema EJ, Croce R (2014) Light-harvesting complex II (LHCII) and its supramolecular organization in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1837**: 63-72
- Dumas L, Zito F, Blangy S, Auroy P, Johnson X, Peltier G, Alric J (2017) A stromal region of cytochrome b(6)f subunit IV is involved in the activation of the Stt7 kinase in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: 12063-12068
- Duy D, Soll J, Philippar K (2007) Solute channels of the outer membrane: from bacteria to chloroplasts. *Biol Chem* **388**: 879-889
- Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ (2004) Ancient invasions : from endosymbionts to organelles. *Science* **304**: 253-257
- Ebersold WT (1956) Crossing over in *Chlamydomonas Reinhardi*. *American Journal of Botany* **43**: 408-410

- Ebersold WT (1963) Heterozygous diploid strains of *Chlamydomonas reinhardi*. In *Genetics*, Vol. 48, pp 888-&.
- Ebersold WT (1967) *Chlamydomonas reinhardi*: heterozygous diploid strains. *Science* **157**: 447-449
- Elrad D, Grossman AR (2004) A genome's-eye view of the light-harvesting polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current genetics* **45**: 61-75
- Elrad D, Niyogi KK, Grossman AR (2002) A major light-harvesting polypeptide of photosystem II functions in thermal dissipation. *Plant Cell* **14**: 1801-1816
- Erickson E, Wakao S, Niyogi KK (2015) Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **82**: 449-465
- Eversole RA (1956) Biochemical mutants of *Chlamydomonas reinhardi*. *American Journal of Botany* **43**: 404-407
- Ferrante P, Ballottari M, Bonente G, Giuliano G, Bassi R (2012) LHCBM1 and LHCBM2/7 polypeptides, components of major LHCII complex, have distinct functional roles in photosynthetic antenna system of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **287**: 16276-16288
- Finazzi G, Johnson GN, Dall'Osto L, Zito F, Bonente G, Bassi R, Wollman FA (2006) Nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry* **45**: 1490-1498
- Fleischmann MM, Ravanel S, Delosme R, Olive J, Zito F, Wollman FA, Rochaix JD (1999) Isolation and characterization of photoautotrophic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in state transition. *J Biol Chem* **274**: 30987-30994
- Formighieri C, Cazzaniga S, Kuras R, Bassi R (2013) Biogenesis of photosynthetic complexes in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* requires ARSA1, a homolog of prokaryotic arsenite transporter and eukaryotic TRC40 for guided entry of tail-anchored proteins. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **73**: 850-861
- Formighieri C, Ceol M, Bonente G, Rochaix JD, Bassi R (2012) Retrograde signaling and photoprotection in a *gun4* mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Plant* **5**: 1242-1262
- Gallaher SD, Fitz-Gibbon ST, Glaesener AG, Pellegrini M, Merchant SS (2015) *Chlamydomonas* Genome Resource for Laboratory Strains Reveals a Mosaic of Sequence Variation, Identifies True Strain Histories, and Enables Strain-Specific Studies. *Plant Cell* **27**: 2335-2352
- Galloway RE, Goodenough UW (1985) Genetic analysis of mating locus linked mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **111**: 447-461
- Gerotto C, Franchin C, Arrigoni G, Morosinotto T (2015) In Vivo Identification of Photosystem II Light Harvesting Complexes Interacting with PHOTOSYSTEM II SUBUNIT S. *Plant Physiol* **168**: 1747-1761
- Gillham NW (1965) Induction of chromosomal and nonchromosomal mutations in *Chlamydomonas reinhardi* with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Genetics* **52**: 529-537
- Gilmore AM, Shinkarev VP, Hazlett TL, Govindjee (1998) Quantitative Analysis of the Effects of Intrathylakoid pH and Xanthophyll Cycle Pigments on Chlorophyll a Fluorescence Lifetime Distributions and Intensity in Thylakoids. *Biochemistry* **37**: 13582-13593

- Gilmore AM, Yamamoto HY (1992) Dark induction of zeaxanthin-dependent nonphotochemical fluorescence quenching mediated by ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1899-1903
- Girolomoni L, Cazzaniga S, Pinnola A, Perozeni F, Ballottari M, Bassi R (2019) LHCSR3 is a nonphotochemical quencher of both photosystems in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**: 4212-4217
- Göhre V, Ossenbühl F, Crèvecoeur M, Eichacker LA, Rochaix J-D (2006) One of Two Alb3 Proteins Is Essential for the Assembly of the Photosystems and for Cell Survival in *Chlamydomonas*. *The Plant Cell* **18**: 1454-1466
- Gould SB, Waller RF, McFadden GI (2008) Plastid evolution. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 491-517
- Govindjee G, Govindjee R (1974) The absorption of light in photosynthesis. *Scientific American* **231**: 68-82
- Green BR, Durnford DG (1996) The Chlorophyll-Carotenoid Proteins of Oxygenic Photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 685-714
- Grovenstein PB, Wilson DA, Lankford KD, Gaston KA, Perera S, Mitra M (2013) Identification and molecular characterization of the second *Chlamydomonas gun4* mutant, *gun4-II*. *F1000Research* **2**: 142
- Harris EH (1989) A comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. In *The Chlamydomonas Sourcebook*. London: Academic Press
- Harris EH (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol* **52**: 363-406
- Harris EH (2009) Introduction to *Chlamydomonas* and Its Laboratory Use - Volume 1. In *The Chlamydomonas Sourcebook (Second Edition)*, p iii. London: Academic Press
- Horton P, Ruban AV, Rees D, Pascal AA, Noctor G, Young AJ (1991) Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHCII chlorophyll-protein complex. *FEBS Lett* **292**: 1-4
- Horton P, Ruban AV, Walters RG (1996) Regulation of Light Harvesting in Green Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 655-684
- Huang Z, Shen L, Wang W, Mao Z, Yi X, Kuang T, Shen J-R, Zhang X, Han G (2021) Structure of photosystem I-LHCI-LHCII from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in State 2. *Nature Communications* **12**: 1100
- Hutin C, Havaux M, Carde J-P, Kloppstech K, Meierhoff K, Hoffman N, Nussaume L (2002) Double mutation cpSRP43-/cpSRP54- is necessary to abolish the cpSRP pathway required for thylakoid targeting of the light-harvesting chlorophyll proteins. *The Plant Journal* **29**: 531-543
- J FC, Lin SM, Macaya EC, Fernandez-Garcia C, Verbruggen H (2016) Chloroplast genomes as a tool to resolve red algal phylogenies: a case study in the Nemaliales. *BMC Evol Biol* **16**: 205
- Jahns P, Depka B, Trebst A (2000) Xanthophyll cycle mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* indicate a role for zeaxanthin in the D1 protein turnover. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 371-376

- Jansson S (1999) A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* **4**: 236-240
- Jansson S, Pichersky E, Bassi R, Green BR, Ikeuchi M, Melis A, Simpson DJ, Spangfort M, Staehelin LA, Thornber JP (1992) A nomenclature for the genes encoding the chlorophylla/b-binding proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology Reporter* **10**: 242-253
- Jarvis P, López-Juez E (2013) Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**: 787-802
- Jarvis P, Robinson C (2004) Mechanisms of Protein Import and Routing in Chloroplasts. *Current Biology* **14**: R1064-R1077
- Jeong J, Baek K, Yu J, Kirst H, Betterle N, Shin W, Bae S, Melis A, Jin E (2018) Deletion of the chloroplast LTD protein impedes LHCI import and PSI-LHCI assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Experimental Botany* **69**: 1147-1158
- Ji S, Siegel A, Shan S-o, Grimm B, Wang P (2021) Chloroplast SRP43 autonomously protects chlorophyll biosynthesis proteins against heat shock. *Nature Plants* **7**: 1420-1432
- Johnson GN (2011) Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1807**: 384-389
- Johnson X, Vandystadt G, Bujaldon S, Wollman FA, Dubois R, Roussel P, Alric J, Beal D (2009) A new setup for in vivo fluorescence imaging of photosynthetic activity. *Photosynth Res* **102**: 85-93
- Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, Krauß N (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411**: 909-917
- Keren N, Gong H, Ohad I (1995) Oscillations of reaction center II-D1 protein degradation in vivo induced by repetitive light flashes. Correlation between the level of RCII-QB- and protein degradation in low light. *J Biol Chem* **270**: 806-814
- Keren N, Ohad I (1998) State transition and photoinhibition. In *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, pp 569–596. Springer, Dordrecht
- Kirst H, García-Cerdán JG, Zurbriggen A, Melis A (2012a) Assembly of the Light-Harvesting Chlorophyll Antenna in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* Requires Expression of the *TLA2-CpFTSY* Gene. *Plant Physiology* **158**: 930-945
- Kirst H, Garcia-Cerdan JG, Zurbriggen A, Ruehle T, Melis A (2012b) Truncated Photosystem Chlorophyll Antenna Size in the Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii* upon Deletion of the *TLA3-CpSRP43* Gene. *Plant Physiology* **160**: 2251-2260
- Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH, Phillippy AM (2017) Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Res* **27**: 722-736
- Kosuge K, Tokutsu R, Kim E, Akimoto S, Yokono M, Ueno Y, Minagawa J (2018) LHCSR1-dependent fluorescence quenching is mediated by excitation energy transfer from LHCSR1 to photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: 3722-3727
- Krieger-Liszkay A, Feilke K (2015) The Dual Role of the Plastid Terminal Oxidase PTOX: Between a Protective and a Pro-oxidant Function. *Frontiers in plant science* **6**: 1147

- Kruse O, Nixon PJ, Schmid GH, Mullineaux CW (1999) Isolation of state transition mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* by fluorescence video imaging. *Photosynthesis Research* **61**: 43-51
- Larkin RM, Alonso JM, Ecker JR, Chory J (2003) GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling. *Science* **299**: 902-906
- Leister D (2003) Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet* **19**: 47-56
- Lemeille S, Turkina MV, Vener AV, Rochaix JD (2010) Stt7-dependent phosphorylation during state transitions in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **9**: 1281-1295
- Lemeille S, Willig A, Depège-Fargeix N, Delessert C, Bassi R, Rochaix JD (2009) Analysis of the chloroplast protein kinase Stt7 during state transitions. *PLoS Biol* **7**: e45
- Li H (2018) Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics* **34**: 3094-3100
- Li J, Goldschmidt-Clermont M, Timko MP (1993) Chloroplast-encoded chlB is required for light-independent protochlorophyllide reductase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **5**: 1817-1829
- Li X-P, Gilmore AM, Caffarri S, Bassi R, Golan T, Kramer D, Niyogi KK (2004a) Regulation of Photosynthetic Light Harvesting Involves Intrathylakoid Lumen pH Sensing by the PsbS Protein. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 22866-22874
- Li X, Patena W, Fauser F, Jinkerson RE, Saroussi S, Meyer MT, Ivanova N, Robertson JM, Yue R, Zhang R, Vilarrasa-Blasi J, Wittkopp TM, Ramundo S, Blum SR, Goh A, Laudon M, Srikumar T, Lefebvre PA, Grossman AR, Jonikas MC (2019) A genome-wide algal mutant library and functional screen identifies genes required for eukaryotic photosynthesis. *Nature Genetics* **51**: 627-635
- Li XP, Björkman O, Shih C, Grossman AR, Rosenquist M, Jansson S, Niyogi KK (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **403**: 391-395
- Li XP, Gilmore AM, Caffarri S, Bassi R, Golan T, Kramer D, Niyogi KK (2004b) Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. *J Biol Chem* **279**: 22866-22874
- Li Z, Peers G, Dent RM, Bai Y, Yang SY, Apel W, Leonelli L, Niyogi KK (2016) Evolution of an atypical de-epoxidase for photoprotection in the green lineage. *Nat Plants* **2**: 16140
- Liu C, Willmund F, Whitelegge JP, Hawat S, Knapp B, Lodha M, Schroda M (2005) J-domain protein CDJ2 and HSP70B are a plastidic chaperone pair that interacts with vesicle-inducing protein in plastids 1. *Molecular biology of the cell* **16**: 1165-1177
- Liu F, Pang S (2016) Chloroplast genome of *Sargassum horneri* (Sargassaceae, Phaeophyceae): comparative chloroplast genomics of brown algae. *Journal of Applied Phycology* **28**: 1419-1426
- Lopez-Juez E (2007) Plastid biogenesis, between light and shadows. *J Exp Bot* **58**: 11-26
- Loppes R, Matagne R (1972) Allelic complementation between *arg-7* mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetica* **43**: 422-430

- Madireddi SK, Nama S, Devadasu ER, Subramanyam R (2014) Photosynthetic membrane organization and role of state transition in *cyt*, *cpII*, *stt7* and *npq* mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* **137**: 77-83
- Malkin R, Niyogi KK (2000) Photosynthesis. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Buchanan BB, Gruissem W, Jones R (eds), pp 568–628. American Society of Plant Biologists
- Malnoë A (2018) Photoinhibition or photoprotection of photosynthesis? Update on the (newly termed) sustained quenching component qH. *Environmental and Experimental Botany* **154**: 123-133
- Malnoë A, Schultink A, Shahrasbi S, Rumeau D, Havaux M, Niyogi KK (2018) The Plastid Lipocalin LCNP Is Required for Sustained Photoprotective Energy Dissipation in Arabidopsis. *Plant Cell* **30**: 196-208
- Maoka T (2020) Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of natural medicines* **74**: 1-16
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D (2002) Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12246-12251
- Matagne RF (1978) Fine structure of the *arg-7* ciston in *Chlamydomonas reinhardtii*. Complementation between *arg-7* mutants defective in argininosuccinate lyase. *Mol Gen Genet* **160**: 95-99
- Mazor Y, Borovikova A, Nelson N (2015) The structure of plant photosystem I super-complex at 2.8 Å resolution. *eLife* **4**: e07433
- McFadden GI (1999) Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 513-519
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Marechal-Drouard L, Marshall WF, Qu LH, Nelson DR, Sanderfoot AA, Spalding MH, Kapitonov VV, Ren Q, Ferris P, Lindquist E, Shapiro H, Lucas SM, Grimwood J, Schmutz J, Cardol P, Cerutti H, Chanfreau G, Chen CL, Cognat V, Croft MT, Dent R, Dutcher S, Fernandez E, Fukuzawa H, Gonzalez-Ballester D, Gonzalez-Halphen D, Hallmann A, Hanikenne M, Hippler M, Inwood W, Jabbari K, Kalanon M, Kuras R, Lefebvre PA, Lemaire SD, Lobanov AV, Lohr M, Manuell A, Meier I, Mets L, Mittag M, Mittelmeier T, Moroney JV, Moseley J, Napoli C, Nedelcu AM, Niyogi K, Novoselov SV, Paulsen IT, Pazour G, Purton S, Ral JP, Riano-Pachon DM, Riekhof W, Rymarquis L, Schroda M, Stern D, Umen J, Willows R, Wilson N, Zimmer SL, Allmer J, Balk J, Bisova K, Chen CJ, Elias M, Gendler K, Hauser C, Lamb MR, Ledford H, Long JC, Minagawa J, Page MD, Pan J, Pootakham W, Roje S, Rose A, Stahlberg E, Terauchi AM, Yang P, Ball S, Bowler C, Dieckmann CL, Gladyshev VN, Green P, Jorgensen R, Mayfield S, Mueller-Roeber B, Rajamani S, Sayre RT, Brokstein P, others (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**: 245-250
- Miller R, Wu G, Deshpande RR, Vieler A, Gärtner K, Li X, Moellering ER, Zäuner S, Cornish AJ, Liu B, Bullard B, Sears BB, Kuo MH, Hegg EL, Shachar-Hill Y, Shiu SH, Benning C (2010) Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. *Plant Physiol* **154**: 1737-1752

- Mochizuki N, Brusslan JA, Larkin R, Nagatani A, Chory J (2001) Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2053-2058
- Moseley J, Quinn J, Eriksson M, Merchant S (2000) The Crd1 gene encodes a putative di-iron enzyme required for photosystem I accumulation in copper deficiency and hypoxia in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J* **19**: 2139-2151
- Moseley JL, Page MD, Alder NP, Eriksson M, Quinn J, Soto F, Theg SM, Hippler M, Merchant S (2002) Reciprocal Expression of Two Candidate Di-Iron Enzymes Affecting Photosystem I and Light-Harvesting Complex Accumulation. *The Plant Cell* **14**: 673-688
- Mozzo M, Mantelli M, Passarini F, Caffarri S, Croce R, Bassi R (2010) Functional analysis of Photosystem I light-harvesting complexes (Lhca) gene products of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1797**: 212-221
- Murata N (1969) Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum*. *Biochim Biophys Acta* **172**: 242-251
- Murata N (1970) Control of excitation transfer in photosynthesis. IV. Kinetics of chlorophyll a fluorescence in *Porphyra yezoensis*. *Biochim Biophys Acta* **205**: 379-389
- Murata N, Allakhverdiev SI, Nishiyama Y (2012) The mechanism of photoinhibition in vivo: Re-evaluation of the roles of catalase,  $\alpha$ -tocopherol, non-photochemical quenching, and electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1817**: 1127-1133
- Mussnug JH, Wobbe L, Elles I, Claus C, Hamilton M, Fink A, Kahmann U, Kapazoglou A, Mullineaux CW, Hippler M, Nickelsen J, Nixon PJ, Kruse O (2005) NAB1 Is an RNA Binding Protein Involved in the Light-Regulated Differential Expression of the Light-Harvesting Antenna of *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell* **17**: 3409-3421
- Natali A, Croce R (2015) Characterization of the major light-harvesting complexes (LHCBM) of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One* **10**: e0119211
- Nawrocki WJ, Bailleul B, Cardol P, Rappaport F, Wollman FA, Joliot P (2019) Maximal cyclic electron flow rate is independent of PGRL1 in *Chlamydomonas*. *Biochimica et biophysica acta Bioenergetics* **1860**: 425-432
- Ng PK, Lin SM, Lim PE, Liu LC, Chen CM, Pai TW (2017) Complete chloroplast genome of *Gracilaria firma* (Gracilariaceae, Rhodophyta), with discussion on the use of chloroplast phylogenomics in the subclass Rhodymeniophycidae. *BMC Genomics* **18**: 40
- Nilkens M, Kress E, Lambrev P, Miloslavina Y, Müller M, Holzwarth AR, Jahns P (2010) Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in Arabidopsis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1797**: 466-475
- Niyogi KK, Bjorkman O, Grossman AR (1997a) *Chlamydomonas* Xanthophyll Cycle Mutants Identified by Video Imaging of Chlorophyll Fluorescence Quenching. *Plant Cell* **9**: 1369-1380
- Niyogi KK, Björkman O, Grossman AR (1997b) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 14162-14167
- Niyogi KK, Grossman AR, Björkman O (1998) Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* **10**: 1121-1134



- Ohad I, Adir N, Koike H, Kyle DJ, Inoue Y (1990) Mechanism of photoinhibition in vivo. A reversible light-induced conformational change of reaction center II is related to an irreversible modification of the D1 protein. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 1972-1979
- Ohad I, Siekevitz P, Palade GE (1967) Biogenesis of chloroplast membranes. I. Plastid dedifferentiation in a dark-grown algal mutant *Chlamydomonas reinhardi*. *J Cell Biol* **35**: 521-552
- Ossenbühl F, Göhre V, Meurer J, Krieger-Liszkay A, Rochaix J-D, Eichacker LA (2004) Efficient Assembly of Photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* Requires Alb3.1p, a Homolog of Arabidopsis ALBINO3. *The Plant Cell* **16**: 1790-1800
- Ozawa S-I, Bald T, Onishi T, Xue H, Matsumura T, Kubo R, Takahashi H, Hippler M, Takahashi Y (2018) Configuration of Ten Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Complex I Subunits in *Chlamydomonas reinhardtii* Photosystem I. *Plant Physiology* **178**: 583-595
- Pan X, Cao P, Su X, Liu Z, Li M (2020) Structural analysis and comparison of light-harvesting complexes I and II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1861**: 148038
- Peers G, Truong TB, Ostendorf E, Busch A, Elrad D, Grossman AR, Hippler M, Niyogi KK (2009) An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature* **462**: 518-521
- Peter E, Grimm B (2009) GUN4 is required for posttranslational control of plant tetrapyrrole biosynthesis. *Mol Plant* **2**: 1198-1210
- Petroutsos D, Busch A, Janssen I, Trompelt K, Bergner SV, Weinl S, Holtkamp M, Karst U, Kudla J, Hippler M (2011) The chloroplast calcium sensor CAS is required for photoacclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **23**: 2950-2963
- Pinnola A, Bassi R (2018) Molecular mechanisms involved in plant photoprotection. *Biochem Soc Trans* **46**: 467-482
- Ponce-Toledo RI, Deschamps P, López-García P, Zivanovic Y, Benzerara K, Moreira D (2017) An Early-Branching Freshwater Cyanobacterium at the Origin of Plastids. *Current biology : CB* **27**: 386-391
- Popot JL, de Vitry C (1990) On the microassembly of integral membrane proteins. *Annu Rev Biophys Chem* **19**: 369-403
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **975**: 384-394
- Pribil M, Pesaresi P, Hertle A, Barbato R, Leister D (2010) Role of plastid protein phosphatase TAP38 in LHCI dephosphorylation and thylakoid electron flow. *PLoS Biol* **8**: e1000288
- Qin X, Suga M, Kuang T, Shen JR (2015) Photosynthesis. Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI supercomplex. *Science* **348**: 989-995
- Ravi V, Khurana JP, Tyagi AK, Khurana P (2007) An update on chloroplast genomes. *Plant Systematics and Evolution*

- Redekop P, Rothhausen N, Rothhausen N, Melzer M, Mosebach L, Dülger E, Bovdilova A, Caffarri S, Hippler M, Jahns P (2020) PsbS contributes to photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii* independently of energy dissipation. *Biochimica et biophysica acta Bioenergetics* **1861**: 148183
- Roach T, Na CS, Krieger-Liszkay A (2015) High light-induced hydrogen peroxide production in *Chlamydomonas reinhardtii* is increased by high CO<sub>2</sub> availability. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **81**: 759-766
- Roach T, Sedoud A, Krieger-Liszkay A (2013) Acetate in mixotrophic growth medium affects photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* and protects against photoinhibition. *Biochim Biophys Acta* **1827**: 1183-1190
- Rochaix J-D (2011a) Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1807**: 375-383
- Rochaix J-D (2014) Regulation and Dynamics of the Light-Harvesting System. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 287-309
- Rochaix JD (2011b) Assembly of the photosynthetic apparatus. *Plant Physiol* **155**: 1493-1500
- Ruban AV (2016) Nonphotochemical Chlorophyll Fluorescence Quenching: Mechanism and Effectiveness in Protecting Plants from Photodamage. *Plant Physiol* **170**: 1903-1916
- Ruiz-Sola M, Flori S, Yuan Y, Villain G, Sanz-Luque E, Redekop P, Tokutsu R, Küken A, Tschla A, Kepesidis G, Allorent G, Arend M, Iacono F, Finazzi G, Hippler M, Nikoloski Z, Minagawa J, Grossman AR, Petroustos D (2023) Light-independent regulation of algal photoprotection by CO<sub>2</sub> availability. *Nat Commun* **14**: 1977
- Sager R (1955) Inheritance in the Green Alga *Chlamydomonas Reinhardi*. *Genetics* **40**: 476-489
- Sager R, Palade GE (1957) Structure and development of the chloroplast in *Chlamydomonas*. I. The normal green cell. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* **3**: 463-488
- Salomé PA, Merchant SS (2019) A Series of Fortunate Events: Introducing *Chlamydomonas* as a Reference Organism. *Plant Cell* **31**: 1682-1707
- Scholz M, Gäbelein P, Xue H, Mosebach L, Bergner SV, Hippler M (2019) Light-dependent N-terminal phosphorylation of LHCSR3 and LHCB4 are interlinked in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **99**: 877-894
- Schroda M, Vallon O, Wollman FA, Beck CF (1999) A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of Photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell* **11**: 1165-1178
- Shapiguzov A, Ingelsson B, Samol I, Andres C, Kessler F, Rochaix JD, Vener AV, Goldschmidt-Clermont M (2010) The PPH1 phosphatase is specifically involved in LHCI dephosphorylation and state transitions in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 4782-4787
- Sheng X, Watanabe A, Li A, Kim E, Song C, Murata K, Song D, Minagawa J, Liu Z (2019) Structural insight into light harvesting for photosystem II in green algae. *Nature Plants* **5**: 1320-1330
- Shikanai T (2007) Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 199-217

- Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman A, Usuda H (1998) High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics* **148**: 1821-1828
- Singh SK, Hasan SS, Zakharov SD, Naurin S, Cohn W, Ma J, Whitelegge JP, Cramer WA (2016) Trans-membrane Signaling in Photosynthetic State Transitions: REDOX- AND STRUCTURE-DEPENDENT INTERACTION IN VITRO BETWEEN STT7 KINASE AND THE CYTOCHROME b6f COMPLEX. *J Biol Chem* **291**: 21740-21750
- Starko S, Bringloe TT, Soto Gomez M, Darby H, Graham SW, Martone PT (2021) Genomic Rearrangements and Sequence Evolution across Brown Algal Organelles. *Genome Biology and Evolution* **13**
- Stengel A, Soll J, Bolter B (2007) Protein import into chloroplasts: new aspects of a well-known topic. *Biol Chem* **388**: 765-772
- Stoebe B, Maier UG (2002) One, two, three: nature's tool box for building plastids. *Protoplasma* **219**: 123-130
- Su X, Ma J, Pan X, Zhao X, Chang W, Liu Z, Zhang X, Li M (2019) Antenna arrangement and energy transfer pathways of a green algal photosystem-I-LHCI supercomplex. *Nature Plants* **5**: 273-281
- Su X, Ma J, Wei X, Cao P, Zhu D, Chang W, Liu Z, Zhang X, Li M (2017) Structure and assembly mechanism of plant C<sub>2</sub>S<sub>2</sub>M<sub>2</sub>-type PSII-LHCII supercomplex. *Science* **357**: 815-820
- Takahashi Y, Yasui TA, Stauber EJ, Hippler M (2004) Comparison of the subunit compositions of the PSI-LHCI supercomplex and the LHCI in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry* **43**: 7816-7823
- Taniguchi M, Du H, Lindsey JS (2018) PhotochemCAD 3: Diverse Modules for Photophysical Calculations with Multiple Spectral Databases. *Photochem Photobiol* **94**: 277-289
- Tarahi Tabrizi S, Langley DB, Harrop SJ, Duff AP, Willows RD (2015) Structure of GUN4 from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Acta crystallographica Section F, Structural biology communications* **71**: 1094-1099
- Theis J, Niemeyer J, Schmollinger S, Ries F, Rütgers M, Gupta TK, Sommer F, Muranaka LS, Venn B, Schulz-Raffelt M, Willmund F, Engel BD, Schroda M (2020) VIPP2 interacts with VIPP1 and HSP22E/F at chloroplast membranes and modulates a retrograde signal for HSP22E/F gene expression. *Plant, cell & environment* **43**: 1212-1229
- Theis J, Schroda M (2016) Revisiting the photosystem II repair cycle. *Plant signaling & behavior* **11**: e1218587
- Tibiletti T, Auroy P, Peltier G, Caffarri S (2016) *Chlamydomonas reinhardtii* PsbS Protein Is Functional and Accumulates Rapidly and Transiently under High Light. *Plant Physiol* **171**: 2717-2730
- Tilbrook K, Dubois M, Crocco CD, Yin R, Chappuis R, Alloreant G, Schmid-Siegert E, Goldschmidt-Clermont M, Ulm R (2016) UV-B Perception and Acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **28**: 966-983
- Tokutsu R, Fujimura-Kamada K, Matsuo T, Yamasaki T, Minagawa J (2019) The CONSTANS flowering complex controls the protective response of photosynthesis in the green alga *Chlamydomonas*. *Nat Commun* **10**: 4099

- Tokutsu R, Kato N, Bui KH, Ishikawa T, Minagawa J (2012) Revisiting the Supramolecular Organization of Photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*\*. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 31574-31581
- Tu CJ, Peterson EC, Henry R, Hoffman NE (2000) The L18 Domain of Light-harvesting Chlorophyll Proteins Binds to Chloroplast Signal Recognition Particle 43. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 13187-13190
- Vallon O, Wollman FA, Olive J (1986) Lateral distribution of the main protein complexes of the photosynthetic apparatus in *Chlamydomonas reinhardtii* and in spinach - an immunocytochemical study using intact thylakoid membranes and a PSII enriched membrane preparation. *Photobiochem Photobiophys* **12**: 203-220
- Vener AV, Van Kan PJ, Gal A, Andersson B, Ohad I (1995) Activation/deactivation cycle of redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. Role of plastoquinol bound to the reduced cytochrome bf complex. *J Biol Chem* **270**: 25225-25232
- Wakabayashi K-i, Misawa Y, Mochiji S, Kamiya R (2011) Reduction-oxidation poise regulates the sign of phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 11280-11284
- Walters RG, Horton P (1991) Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynth Res* **27**: 121-133
- Wang WY, Wang WL, Boynton JE, Gillham NW (1974) Genetic control of chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas*. Analysis of mutants at two loci mediating the conversion of protoporphyrin-IX to magnesium protoporphyrin. *J Cell Biol* **63**: 806-823
- Wei X, Su X, Cao P, Liu X, Chang W, Li M, Zhang X, Liu Z (2016) Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution. *Nature* **534**: 69-74
- Werner R, Mergenhagen D (1998) Mating Type Determination of *Chlamydomonas reinhardtii* by PCR. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**: 295-299
- Wick RR, Schultz MB, Zobel J, Holt KE (2015) Bandage: interactive visualization of de novo genome assemblies. *Bioinformatics* **31**: 3350-3352
- Wobbe L, Bassi R, Kruse O (2016) Multi-Level Light Capture Control in Plants and Green Algae. *Trends in Plant Science* **21**: 55-68
- Wollman F-A (2001) State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J* **20**: 3623-3630
- Wollman F-A, Girard-bascou J (1994) Une algue pour l'étude de la génétique des organites: *Chlamydomonas reinhardtii*. *M S-Med Sci* **10**: I-XIII
- Wollman F-A, Lemaire C (1988) Phosphorylation processes interacting in vivo in the thylakoid membranes from *C. reinhardtii*. In *Photocatalytic Production of Energy Rich Compounds*, Hall D, Grassi G (eds), pp 210-214. Elsevier, Amsterdam
- Wollman FA, Minai L, Nechushtai R (1999) The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1411**: 21-85
- Woodson JD, Chory J (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nature Reviews Genetics* **9**: 383-395

- Xue H, Bergner SV, Scholz M, Hippler M (2015a) Novel insights into the function of LHCSR3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant signaling & behavior* **10**: e1058462
- Xue H, Tokutsu R, Bergner SV, Scholz M, Minagawa J, Hippler M (2015b) PHOTOSYSTEM II SUBUNIT R is required for efficient binding of LIGHT-HARVESTING COMPLEX STRESS-RELATED PROTEIN3 to photosystem II-light-harvesting supercomplexes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **167**: 1566-1578
- Yamamoto HY (1979) Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. *Pure and Applied Chemistry* **51**: 639-648
- Yang YN, Le TTL, Hwang JH, Zulfugarov IS, Kim EH, Kim HU, Jeon JS, Lee DH, Lee CH (2022) High Light Acclimation Mechanisms Deficient in a PsbS-Knockout Arabidopsis Mutant. *International journal of molecular sciences* **23**
- Younas M, Scholz M, Marchetti GM, Hippler M (2023) Remodeling of algal photosystem I through phosphorylation. *Bioscience reports* **43**
- Zaks J, Amarnath K, Sylak-Glassman EJ, Fleming GR (2013) Models and measurements of energy-dependent quenching. *Photosynth Res* **116**: 389-409
- Zerges W (2002) Does complexity constrain organelle evolution? *Trends in Plant Science* **7**: 175-182
- Zhang W, Willows RD, Deng R, Li Z, Li M, Wang Y, Guo Y, Shi W, Fan Q, Martin SS, Rockwell NC, Lagarias JC, Duanmu D (2021) Bilin-dependent regulation of chlorophyll biosynthesis by GUN4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**
- Ziehe D, Dünschede B, Schünemann D (2018) Molecular mechanism of SRP-dependent light-harvesting protein transport to the thylakoid membrane in plants. *Photosynthesis Research* **138**: 303-313
- Zito F, Finazzi G, Delosme R, Nitschke W, Picot D, Wollman FA (1999) The Qo site of cytochrome b6f complexes controls the activation of the LHCII kinase. *EMBO J* **18**: 2961-2969

# Table des matières

Sommaire .....	5
<b>Chapitre 1 - Introduction générale</b> .....	<b>9</b>
1. Le chloroplaste .....	9
1.1. Origine .....	10
1.2. Structure .....	10
1.3. Conséquences de la nature endosymbiotique du chloroplaste.....	11
1.3.1. <i>Évolution du génome chloroplastique depuis les événements d'endosymbiose</i> ....	11
1.3.2. <i>Maintien d'un génome au sein du chloroplaste : conséquences et enjeux</i> .....	14
1.3.3. <i>Importation et acheminement des protéines dans le chloroplaste</i> .....	14
1.4. Fonctions.....	16
1.4.1. <i>La fonction majeure du chloroplaste : la photosynthèse</i> .....	16
1.4.2. <i>Autres fonctions essentielles</i> .....	18
2. Les pigments photosynthétiques.....	19
2.1. Chlorophylles.....	19
2.2. Caroténoïdes .....	20
3. Les photosystèmes et leurs antennes .....	21
3.1. PSII – LHCII.....	22
3.2. PSI – LHCI .....	24
4. Régulation de la photosynthèse & Acclimatation.....	25
5. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	28
6. Objectif de la thèse.....	33
<b>Chapitre 2 - Biogenèse des antennes photosynthétiques</b> .....	<b>35</b>
Introduction .....	37
<b>Partie A. Importation des protéines LHC dans le chloroplaste &amp; Intégration et assemblage des LHC dans les membranes des thylakoïdes</b> .....	<b>43</b>
1. Importation des protéines LHC dans le chloroplaste.....	43
1.1. Préambule .....	43
1.2. Article 1 .....	43
1.3. Résumé de l'article 1.....	61
1.4. Conclusion.....	63
2. Intégration et assemblage des LHC dans les membranes des thylakoïdes .....	65
2.1. Préface .....	65
2.2. Article 2 .....	65
2.3. Résumé de l'article 2.....	81
2.4. Conclusion.....	82

3. Discussion et perspectives.....	85
3.1. D'autres mutants d'antenne.....	85
3.2. Une autre voie avec d'autres partenaires ? .....	87
<b>Partie B. Biosynthèse des chlorophylles et leur régulation .....</b>	<b>89</b>
1. Introduction.....	89
2. Les caractéristiques de ces mutants.....	90
2.1. Moins de chlorophylle et une extrême photosensibilité .....	90
2.2. Spécificité de la photosensibilité.....	91
2.2.1. <i>Effet de l'oxygène</i> .....	92
2.2.2. <i>Effet de la longueur d'onde</i> .....	92
2.3. Identification des mutations.....	95
2.3.1. <i>Le mutant p55</i> .....	95
2.3.2. <i>Le mutant p62</i> .....	96
3. Caractérisation des antennes dans le mutant <i>p55</i> , altéré dans la synthèse de chlorophylles .....	98
3.1. Propriétés fonctionnelles des photosystèmes et des antennes .....	98
3.2. Accumulation des protéines PS et LHC .....	101
3.2.1. <i>Obscurité et faible lumière</i> .....	101
3.2.2. <i>Variation des protéines photosynthétiques lors de la transition de l'obscurité à une luminosité intense</i> .....	103
4. Conclusion .....	104
Discussion et perspectives.....	105
<b>Chapitre 3 - Régulation de la capture de l'énergie lumineuse et de la photochimie...</b>	<b>107</b>
Introduction .....	107
1. Les principaux mécanismes d'acclimatation à la lumière .....	107
1.1. Le quenching énergétique (qE).....	108
1.1.1. <i>Le cycle des Xanthophylles</i> .....	108
1.1.2. <i>Les protéines PSBS, LHCSR</i> .....	108
1.2. Les transitions d'état (qT) .....	109
2. La mesure du NPQ.....	112
<b>Partie A. Une étude fonctionnelle et génétique des mutants de transitions d'état (<i>stt7</i>) .....</b>	<b>117</b>
1. Caractérisation phénotypique des mutants <i>stt7</i> .....	117
1.1. Les mesures de transition d'état.....	117
1.2. Structure du gène <i>STT7</i> .....	121
1.3. La fonction de reproduction sexuée.....	125
1.4. Taille cellulaire et contenu en ADN.....	129
2. Généalogie des souches <i>stt7</i> .....	131
3. Ce que révèle le séquençage (à lectures longues) du génome entier.....	133

4. Nouvelles souches de référence .....	137
4.1. Souche de type sauvage.....	137
4.2. Autres mutants nuls <i>stt7</i> .....	139
5. Discussion et perspectives.....	142
<b>Partie B. Une étude de l'induction d'extinction non photochimique de la fluorescence (NPQ-qE) .....</b>	<b>145</b>
1. Première observation.....	149
2. Caractérisation du phénotype dans WT <sub>x</sub> .....	151
2.1. Mesure de l'extinction de fluorescence chlorophyllienne.....	151
2.1.1. Effet de l'acétate dans le milieu de pré-culture.....	152
2.1.2. Effet de l'adaptation des cellules après un traitement forte lumière.....	155
2.1.3. Effet de la concentration cellulaire.....	157
2.1.4. Effet de la sédimentation/ananérobiose pendant la mesure des changements de fluorescence.....	161
2.2. Caractéristiques biochimique et moléculaire de l'extinction de fluorescence .....	165
2.3. Analyse de l'accumulation des transcrits des acteurs principaux du NPQ-qE .....	175
3. Discussion et conclusion .....	177
4. Vers l'identification d'une (ou des) mutation(s) responsable(s) de ce phénotype faible NPQ .....	179
4.1. Origine de la mutation .....	179
4.2. Potentielle identification par la technique de séquençage du génome nucléaire.....	180
4.2.1. Utilisation de données préexistantes.....	180
4.2.2. Autre stratégie, nouveaux séquençages .....	180
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>185</b>
Matériel et méthodes.....	187
ANNEXES .....	197
Liste des tableaux .....	207
Liste des figures.....	208
Table des abréviations.....	211
BIBLIOGRAPHIE .....	213
Table des matières .....	229







