

Caractérisation des protéines HCF101 et NFU1, impliquées dans le transfert et la maturation des centres fer-soufre au sein du chloroplaste de la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*

Auteur : Kairis, Antoine

Promoteur(s) : Remacle, Claire

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

Année académique : 2022-2023

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/18456>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Université de Liège

Faculté des Sciences

Département des Sciences de la vie

**Caractérisation des protéines HCF101 et NFU1, impliquées
dans le transfert et la maturation des centres fer-soufre au
sein du chloroplaste de la microalgue verte
*Chlamydomonas reinhardtii***

Laboratoire de Génétique et Physiologie des microalgues

Professeur C. Remacle

Septembre 2023

Mémoire présenté par Antoine Kairis en vue de l'obtention du grade de Master en Biochimie,
Biologie Moléculaire et Cellulaire

Remerciements

Un travail de fin d'étude, c'est 6 mois de travail, des expériences qui ne fonctionnent pas, Word qui ne coopère pas et trop peu d'heures de sommeil mais c'est surtout l'aboutissement de 5 ans d'étude qui ne peuvent pas se conclure sans être bien encadré. Ainsi, je souhaite remercier le Professeur Claire Remacle qui m'a donné de nombreux conseils, m'a encouragé et a toujours su rester enthousiaste face à des western blots vides. Merci à elle pour cet apprentissage et pour le temps qu'elle a pris afin de relire ce manuscrit.

Je tenais aussi à remercier le Professeur Nicolas Rouhier qui m'aura encadré deux semaines à Nancy afin que j'essaie "l'expérience du siècle". J'en profite pour remercier Yanis qui m'aura hébergé (et nourri) pendant ces deux semaines, malgré la période dans laquelle il se trouvait.

Ce travail n'aurait certainement pas été le même s'il n'avait pas été réalisé au sein du "côté algues" et l'ambiance de tous les jours dans ce labo a beaucoup contribué à l'envie de venir travailler tous les jours (et d'y rester). Je voulais donc remercier l'entièreté du labo : Michelle et Nadine, qui surveillaient ma consommation de café du coin de l'œil, Damien et Paulina avec qui nous partageons une addiction commune à la caféine, le Troupe (ils se reconnaîtront) pour les nombreuses discussions, leurs "trucs et astuces" sur à peu près tout (un briquet ne m'a jamais été aussi utile) ainsi que pour les fins de vendredi enrichissantes. Pierre et Alain qui m'auront aussi conseillé plus d'une fois et avec qui ça a été un plaisir de vider une pièce. Bien sûr, mes deux camarades d'infortune, Hadrien et Sarah, avec qui on s'encourageait quand rien ne voulait marcher comme on le voulait, on y sera arrivé après tout. Je voulais aussi remercier Stéphanie, Agnieszka et Nanou que je n'ai jamais vues autrement que souriantes. Et, évidemment, Anna qui mérite une mention spéciale pour toute l'aide qu'elle m'aura apportée alors qu'en pleine rédaction d'article et de thèse ; les westerns du samedi n'auraient pas eu la même saveur si j'avais été seul à devoir en faire.

Le "côté plantes" mérite lui aussi des remerciements pour m'avoir supporté pendant un certain nombre de temps de midi qu'ils auraient probablement espérés plus calmes.

Mes derniers remerciements vont, tout à fait naturellement, à ma famille. Ils m'ont toujours soutenu pendant ces 5 années et toujours veillé à ce que je reste fonctionnel malgré ma fâcheuse tendance à ne pas les écouter quand ils me disent de boire, manger et dormir. Ils méritent bien plus que ces quelques lignes.

Antoine

1. Résumé	1
2. Introduction.....	2
1. Présentation générale de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2
2. Les centres Fe-S, biosynthèse et fonctions.....	4
2A. Présentation générale.....	4
2B. Biogenèse des centres Fe-S chloroplastiques.....	4
2C. Les protéines NiFU-like chloroplastiques.....	5
2D. La protéine high-chlorophylle-fluorescence 101 (HCF101).....	7
3. Exemples de voies métaboliques Fe-S dépendantes.....	8
3A. Métabolisme de fermentation en anoxie.....	8
3B. Synthèse de chlorophylle à l'obscurité	9
3. Objectifs du travail	10
4. Matériel et méthodes	11
1. Souches et milieux de culture	11
2. Alignement de Séquences Multiples	11
3. Arbre phylogénétique.....	11
4. Prédiction de structures tridimensionnelles.....	11
5. Extraction de chloroplastes.....	12
6. Extraits totaux de <i>Chlamydomonas</i>	12
7. Mesures de croissance.....	12
8. Extraction d'ADN.....	13
9. Détermination du mating-type	13
10. Transformation de la souche d'expression et culture	14
11. Production de protéine recombinante.....	14
12. Purification des protéines étiquetées par chromatographie d'affinité (IMAC), échangeuse d'anions et exclusion de taille.....	14
13. Fixation de la protéine HCF101 sur colonne au bromure de cyanogène.....	15
14. Expérience de capture de partenaire de HCF101.....	15
15. Purification d'anticorps anti-HCF101	15
16. Électrophorèse sur gel et transfert sur membrane	16
17. Préparation des échantillons pour Tandem-Mass-Tag Labelling.....	16
18. Ratio Photosystème I/Photosystème II.....	17
19. Efficacité du PSII	18

20.	Mesure de production d'hydrogène	18
5.	Résultats	19
1.	Optimisation d'un protocole d'isolement de chloroplastes	19
2.	Étude de la protéine high chlorophylle fluorescence 101 (HCF101) et de son rôle dans la cellule	20
2A.	Analyses <i>in silico</i>	20
2A.I.	Les cystéines conservées chez les plantes terrestres ne le sont pas toutes dans les différents clades.....	20
2A II.	HCF101 est cotranscrit avec les gènes codant les sous-unités PsaA, PsaB et PsaC du PSI	23
2B.	Résultats <i>in vitro</i> : Recherche de partenaires de HCF101 et purification d'anticorps	24
2B.I.	Purification de la protéine CrHCF101 sous forme recombinante	25
2B.II.	Recherche de partenaires de HCF101.....	27
2B.III.	Purification d'anticorps polyclonaux anti-HCF101 et analyse de leur spécificité.....	28
2C.	Résultats <i>in vivo</i> : caractérisation biochimique et physiologique d'un mutant <i>hcf101</i>	29
2C.I.	Génération d'une souche complémentée diploïde	29
2C.II.	Localisation et présence de la protéine HCF101 dans les différentes souches	31
2C.III.	La croissance du mutant <i>hcf101</i> est affectée en milieu liquide.....	32
2C.IV.	Analyse de paramètres photosynthétiques.....	33
3.	Étude de la protéine « NifU-like protein » (NFU1) et de son rôle dans la cellule	37
3A.	Résultats <i>in vivo</i> : caractérisation biochimique et physiologique de mutants <i>nfu1</i>	37
3A.I.	Caractérisation de souches complémentées avec une version tronquée de NFU1 en conditions oxygènes et anoxiques	37
3A.II.	Étude des mutants <i>nfu1</i> après une période de croissance à l'obscurité en hétérotrophie suivie d'une période d'anoxie	40
3A.II.1.	Investigation de la présence de la protéine NFU1 chez les mutants	41
3A.II.2.	Activité hydrogénase chez le mutant <i>nfu1-1</i> après une période de croissance à l'obscurité suivie d'une période d'anoxie.....	43
3A.II.3.	Étude de l'enzyme DPOR chez les mutants <i>nfu1</i> après culture d'une semaine à l'obscurité	44
6.	Discussion	46
7.	Bibliographie	53

8. Annexes..... 61

1. Résumé

Étudiant : Antoine Kairis

Promoteur : Claire Remacle

Laboratoire : Génétique et physiologie des microalgues

Année académique : 2022-2023

Titre : Caractérisation des protéines HCF101 et NFU1, impliquées dans le transfert et la maturation des centres fer-soufre au sein du chloroplaste de la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*

Jusqu'à maintenant, peu de choses sont connues concernant la machinerie de biosynthèse de centres fer-soufre (Fe-S) chloroplastique, chez les microalgues. En effet, la plupart des connaissances ont été obtenues chez la plante terrestre *Arabidopsis thaliana*. Ce travail a contribué à l'étude chez *Chlamydomonas* des protéines HCF101 et NFU1, qui sont impliquées dans le transfert et la maturation des centres Fe-S dans le chloroplaste, en combinant des approches *in silico*, *in vitro* et *in vivo*.

L'analyse *in silico* de HCF101 combinant des prédictions de structure et des alignements de séquence a permis de mettre en évidence 3 résidus cystéine, conservés dans la lignée verte et capables de coordonner un centre Fe-S. L'analyse physiologique a montré que le mutant *hcf101* présentait une vitesse de croissance plus faible que les souches contrôles et une diminution des activités du photosystème I et II. Des expériences exploratoires pour déterminer de nouveaux partenaires potentiels ont également été menées. La caractérisation de NFU1 se basait aussi sur de l'analyse de mutants du gène NFU1. L'objectif consistait à déterminer le rôle de la protéine dans des conditions de culture particulière : l'adaptation à l'hétérotrophie et l'anoxie. Les résultats ont montré que les mutants *nfu1* présentaient un protéome profondément modifié dans ces conditions de culture, notamment une surabondance de protéines clés à centres Fe-S du métabolisme fermentatif telles que les hydrogénases et leurs facteurs de maturation.

2. Introduction

1. Présentation générale de *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii (*C. reinhardtii*) est une algue unicellulaire haploïde de taille approximative de 10 µm appartenant à la classe des Chlorophyceae, membre des Viridiplantae. Munie de deux flagelles, elle possède un unique chloroplaste en forme de coupe provenant d'un événement d'endosymbiose primaire (Rockwell et al., 2014) et occupant la majorité de l'espace intracellulaire et (Sasso et al., 2018). La cellule est aussi caractérisée par un imposant pyrénnoïde, une structure où de grandes quantités de Rubisco sont concentrées, participant au mécanisme de concentration du carbone inorganique (Barrett et al., 2021). Les cellules de *C. reinhardtii* possèdent une paroi extracellulaire sans cellulose, composée de différents carbohydrates et polypeptides (Imam et al., 1985) (**Fig. 1**).

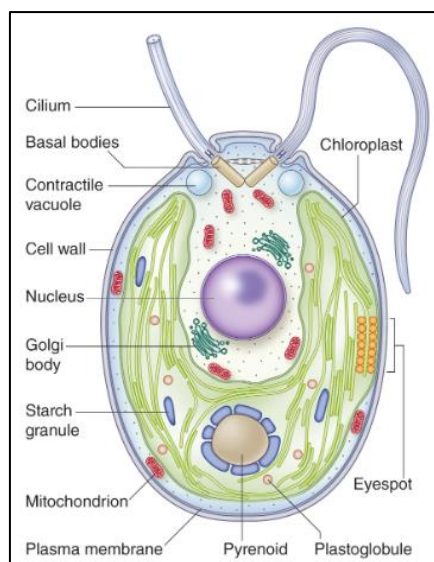


Figure 1. Représentation schématique d'une cellule de *C. reinhardtii*. Adapté de (Sasso et al., 2018)

Son mode de vie est haplophasique : sa reproduction est d'abord asexuée, par mitose (Harris, 2001), mais l'algue peut aussi se reproduire par voie sexuée, qui peut être induite en laboratoire en transférant les cellules dans un milieu carencé en d'azote (Treier et al., 1989). La reproduction sexuée peut alors s'effectuer entre deux cellules des types sexuels opposés (ou "mating-type") : mt^- et mt^+ . Ceux-ci dépendent de la présence des gènes *MID*, donnant le caractère moins et réprimant le caractère plus, et *FUS1* qui est nécessaire au caractère plus pour s'exprimer (Goodenough et al., 2007). Lors de cette reproduction sexuée, les cellules de mating-type opposé vont se différencier en gamètes et interagir grâce à des protéines flagellaires qui permettent l'adhésion (Adair, 1985) ; différents gènes sont activés et la paroi cellulaire est dégradée puis les cellules fusionnent en un zygote binucléé dont les noyaux fusionneront rapidement; la méiose se déroulera lorsque les conditions redeviendront favorables et les cellules résultantes retournent sous forme végétative grâce à la présence d'azote (Goodenough et al., 2007; Pozuelo et al., 2000) (**Fig.2**).

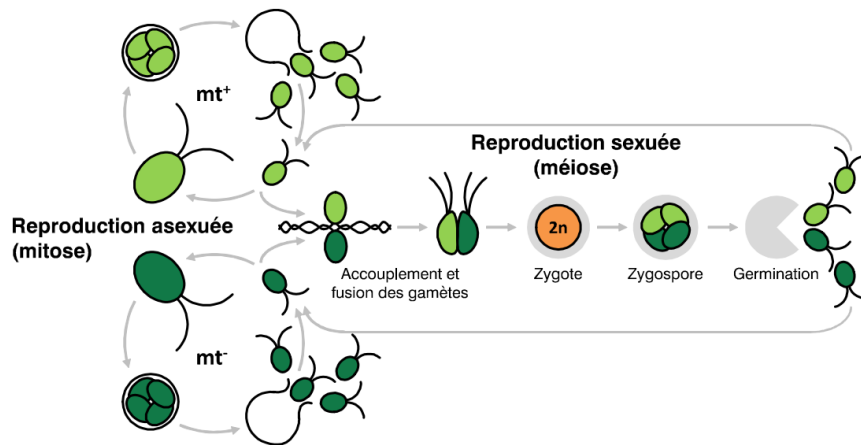


Figure 2. Représentation schématique du cycle de vie de *C. reinhardtii*. Adapté de Emonds-Alt, 2017.

La microalgue est un photoautotrophe facultatif : elle est capable de croître en utilisant uniquement le CO₂ et l'énergie lumineuse (photoautotrophie), en utilisant uniquement une source de carbone extérieure, l'acétate, à l'obscurité (hétérotrophie) mais aussi d'assimiler l'acétate tout en produisant ses propres molécules organiques à la lumière (mixotrophie), cette dernière condition permettant à l'algue de se diviser rapidement (Goodenough, 2023). Cette caractéristique permet d'étudier l'organisme dans différentes conditions dans lesquelles il est capable de croître et d'analyser, par exemple, des mutants dans des gènes codants pour des protéines de l'appareil photosynthétique ou impliquée dans sa maturation.

Le génome de *C. reinhardtii* a été complètement séquencé. Il contient 15000 gènes répartis sur 17 chromosomes et compte 125 millions de paires de bases dont le pourcentage moyen en GC est de 65% (Merchant et al., 2007). L'étude de mutants est un outil puissant pour déterminer le rôle des gènes et de leurs protéines associées. Chez *C. reinhardtii*, si la mutagenèse classique, via des agents physiques et chimiques, est possible, la méthode la plus populaire pour générer des mutants nucléaires est l'insertion aléatoire d'une cassette possédant un marqueur de sélection (Berthold et al., 2002; Kindle, 1990) ; la transformation du génome peut être effectuée par électroporation, un champ électrique "perfore" la membrane de la cellule et les molécules d'ADN peuvent alors atteindre le noyau, ou méthode biolistique, à l'aide d'un "canon à ADN" qui propulse des billes de tungstène couvertes de molécules d'ADN sur les cellules pouvant alors intégrer l'ADN exogène (Kindle et al., 1989; Shimogawara et al., 1998). Les mutants générés par cette méthode peuvent alors être sélectionnés et criblés pour un phénotype. Le Chlamydomonas Library Project (CLiP) est une banque contenant ~60.000 mutants de ce type et couvrant 83% du génome nucléaire (Li et al., 2016, 2019). Elle facilite grandement l'étude des différents mécanismes cellulaires. Cependant, cette banque est sous-représentée en certains types de mutants, par exemple les mutants respiratoires, et comportent fréquemment des insertions dans les extrémités 5' et 3'UTRs, ce qui génèrent des mutants partiels et non perte de fonction. Récemment, la technique de Crispr-Cas9 a été mise au point chez l'algue (Shin et al., 2016b) ce qui permet d'éditer le génome de façon très précise.

2. Les centres Fe-S, biosynthèse et fonctions

2A. Présentation générale

Les centres fer-soufre (Fe-S) sont des cofacteurs métalliques ubiquistes essentiels à la fonction de protéines souvent vitales pour les organismes. Certaines données indiquent que les centres Fe-S pourraient avoir été les premiers cofacteurs métalliques associés à des protéines, au vu de leur capacité à se former spontanément, avec de faibles concentrations de cystéine, de fer et de soufre, dans l'eau à pH alcalin (Jordan et al., 2021). Au sein de la cellule, deux formes sont majoritairement représentées: les formes [2Fe-2S] et [4Fe-4S] (**Fig. 3**), qui sont liées par des cystéines à leur protéine bien que d'autres acides aminés peuvent également servir de ligand (Hirabayashi et al., 2015). Ainsi, on retrouve des centres Fe-S chez tous les organismes qui vont servir dans de nombreuses voies métaboliques en tant que donneur/accepteur d'électrons. Par exemple, dans le complexe I de la chaîne respiratoire (Hinchliffe and Sazanov, 2005), le photosystème I (PSI, sous-unités PsaA, B et C), des protéines dans des mécanismes de fermentation mais aussi dans des protéines détectant des stress rédox ou impliquées dans la réparation de l'ADN (Ibrahim et al., 2020; Lukianova and David, 2005; Przybyla-Toscano et al., 2021). Ils sont synthétisés par 3 types de machineries chez les eucaryotes photosynthétiques: dans le cytoplasme par la machinerie CIA (Cytoplasm Iron-sulfur cluster Assembly), dans la mitochondrie par la machinerie ISC (Iron-Sulfur Cluster) et, dans le chloroplaste via la machinerie SUF (Sulfur mobilization) (Balk and Schaedler, 2014).

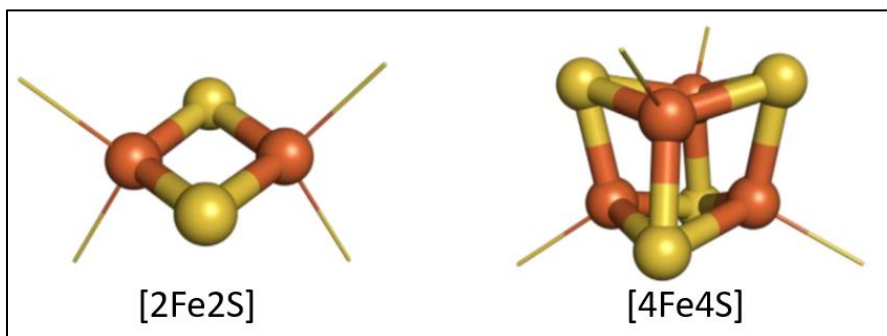


Figure 3. Représentation des centres Fe-S majoritaires dans la cellule. En orange, les atomes de fer et en jaune, les atomes de soufre. Adapté de Boncella et al., 2022

2B. Biogenèse des centres Fe-S chloroplastiques

Dans les chloroplastes des eucaryotes photosynthétiques, les centres Fe-S sont assemblés suivant 2 grandes étapes (i) la synthèse à proprement parlé du centre Fe-S, sur un complexe protéique "d'échafaudage", et (ii) la maturation/l'insertion du centre Fe-S nouvellement formé au sein des protéines cibles, via des protéines spécialisées. Le mécanisme décrit ci-dessous est établi à partir de données principalement obtenues chez *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*). Le soufre est d'abord fourni au complexe d'assemblage par un complexe cystéine désulfurase/sulfure transférase, qui convertit une cystéine en alanine par persulfuration de sa cystéine catalytique et transfère l'atome de soufre au complexe SUFBC₂D (Przybyla-Toscano et al., 2018).

Le fer serait délivré par des protéines DnaJ-like, les chaperonnes DJA5 et DJA6 (Zhang et al., 2021). La source des électrons nécessaires à la formation du cofacteur est encore inconnue mais une molécule de FAD a été proposée comme servant de relais entre le complexe et du NADPH (Couturier et al., 2013). Le centre [2Fe-2S] ainsi formé va pouvoir suivre des étapes de conversion en centre [4Fe-4S] et de transfert, via différentes protéines de la machinerie, avant d'être finalement inséré dans sa protéine cible (Przybyla-Toscano et al., 2018). Ainsi les centres [2Fe-2S] sont pris en charge par certaines glutarédoxines (GRXS14/16) et la protéine SUFA1. Ce sont par contre les protéines 'NifU-like proteins' 1-3 (NFU1-3) et high chlorophyll fluorescence 101 (HCF101) qui transfèrent les centres [4Fe-4S] à leurs protéines cibles (**Fig. 4**) (Przybyla-Toscano et al., 2018). Si les protéines de cette voie de biosynthèse ont majoritairement été étudiées chez les plantes terrestres comme indiqué plus haut, des homologues ont été retrouvés chez les algues, ce qui suggère que des mécanismes proches entre ces groupes d'organismes (Przybyla-Toscano et al., 2021).

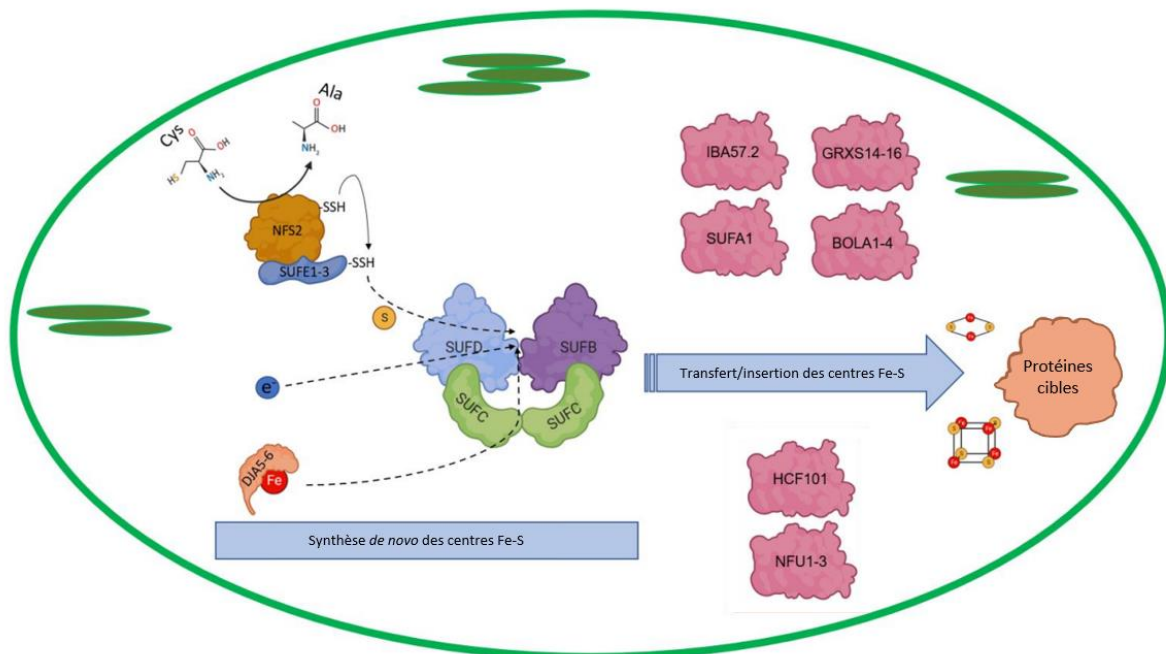


Figure 4. Modèle de fonctionnement du système SUF chez les plantes. Le système de distribution du soufre (S) est illustré dans le coin supérieur gauche, le fer (Fe) est acheminé par les chaperons DJA5-6 dans le coin inférieur gauche, les électrons sont représentés par une sphère bleue. Le complexe d'échafaudage de cluster fer-soufre (Fe-S) (SUFBC2D) se trouve au centre de la figure, et les facteurs agissant tardivement sont représentés en rose. La nomenclature des protéines d'Arabidopsis est indiquée. Adapté de (Przybyla-Toscano et al., 2021).

2C. Les protéines NifU-like chloroplastiques

Chez *A. thaliana*, 3 isoformes chloroplastiques de protéines NifU-like (NFU1-3) sont capables de lier et transférer des centres Fe-S à certaines protéines cibles : des résultats existent concernant la capacité de NFU2 à lier à la fois des centres [2Fe-2S] et des centres [4Fe-4S] (Gao et al., 2013) tandis que les isoformes NFU1 et NFU3 ne sont capables que de fixer un centre [4Fe-4S] (Nath et al., 2016; Roland et al., 2020).

Les protéines NFU chloroplastiques de *A. thaliana* possèdent deux domaines de type NFU, un premier en N-terminal, qui possède deux cystéines très conservées et un deuxième qui a perdu ces cystéines ; la fixation du cofacteur se fait à l'interface d'un homodimère, chacun des monomères lie les atomes de fer via les cystéines du domaine fonctionnel (Gao et al., 2013). Chez les plantes à fleurs, les protéines NFU2 et NFU3 semblent essentielles puisque le double mutant est incapable de croître (Nath et al., 2016; Touraine et al., 2019). Des sesquimutants, homozygotes mutants pour un gène et hétérozygotes mutant/sauvage pour le deuxième, ont pu être caractérisés. Il semblerait que NFU2 et NFU3 joueraient un rôle dans la maturation du PSI en transférant un centre [4Fe-4S] à un intermédiaire supplémentaire, HCF101 (Satyanarayan et al., 2021; Touraine et al., 2019). L'activité et la présence du PSI sont aussi négativement impactées dans un mutant *nfu1*, qui peut survivre sans présenter de phénotype macroscopique visible, mais ces phénotypes sont beaucoup moins marqués, ce qui suggère qu'il existe une hiérarchisation de la nécessité de ces protéines : NFU3 serait plus importantes que NFU2, elle-même plus importante que NFU1, impliquant une redondance fonctionnelle entre ces protéines (Satyanarayan et al., 2021 ; Touraine et al., 2019). D'autres cibles des protéines NFU ont été proposées chez *A. thaliana*. Par exemple, NFU1 interagirait avec la nitrite réductase (NIR) et la 5'-adenylyl-phosphosulfate réductase 2 (APR2) (Roland et al., 2020), NFU2 avec la dihydroxyacide déshydrogénase (DHAD) et la sulfite-réductase (SiR) (Touraine et al., 2019), NFU3 avec la ferrédoxine-dépendante glutamine oxoglutarate-aminotransférases (Fd-GOGATs)(Nath et al., 2016)j. Chez *C. reinhardtii*, cependant, seule 2 des trois isoformes sont conservées : CrNFU1, orthologue de AtNFU1, et CrNFU2, orthologue de AtNFU2 et 3 (Przybyla-Toscano et al., 2021). Il est donc possible que des modifications des fonctions existent. De plus, si la protéine NFU2 de *C. reinhardtii* est classique, la protéine NFU1, quant à elle, présente une particularité. En effet, cette dernière, en plus des domaines NFU classiques, possède un domaine à motif GIY-YIG, typique de certaines endonucléases (Belfort, 1997), de fonction inconnue (Fig. 5).

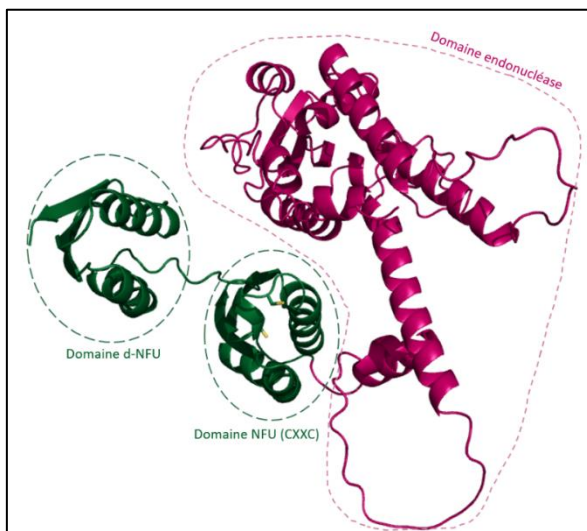


Figure 5. Prédiction de structure générée par AlphaFold (Jumper et al., 2021; Mirdita et al., 2021) de la protéine NFU1 de *C. reinhardtii*. Le domaine supplémentaire est coloré en bordeaux. Les deux domaines NFU sont colorés en vert. Le premier, contenant les cystéines (en jaune) est noté "Domaine NFU". Le second, dégénéré, est noté "Domaine d-NFU".

2D. La protéine high-chlorophylle-fluorescence 101 (HCF101)

Le nom 'high-chlorophylle-fluorescence 101' (HCF101) attribué à cette protéine vient du mutant correspondant (mutant *hcf101* de *A. thaliana*) qui a été découvert, après mutagenèse aléatoire, par un criblage basé sur l'émission de fluorescence (Meurer et al., 1996). La protéine HCF101, d'un poids moléculaire de 59 kDa avec sa séquence d'adressage, est une protéine chloroplastique chez *A. thaliana*. Elle fait partie d'une superfamille de protéines, les P-Loop-ATPases et d'une sous-famille dite "FSC" pour "Fe-S cluster", capable de lier un ou plusieurs centres Fe-S (Lezhneva et al., 2004). Ayant un domaine N-terminal DUF59 (domain of unknown function 59), la protéine a été classée dans les FSC-NTPases de classe I (Lezhneva et al., 2004) auquel s'ajoute un second domaine de fonction inconnue (DUF971) et le domaine le plus imposant dans lequel on retrouve le P-loop (**Fig. 6A**). Les P-Loop-NTPases sont des protéines jouant un rôle dans l'hydrolyse du lien phosphate β - γ des nucléosides triphosphates (Leipe et al., 2003) mais, à ce jour, une activité ATPasique de la protéine HCF101 n'a encore jamais été démontrée. Par contre, cette protéine est capable de lier un centre [4Fe-4S] par monomère via des mesures biochimiques (Schwenkert et al., 2010). HCF101 est donc, dans le modèle actuel, la protéine qui transférerait ses centres Fe-S aux sous-unités du photosystème I PsaA, B et C ; un simple mutant *hcf101* d'*A. thaliana* n'est d'ailleurs pas capable de croître s'il n'est pas cultivé sur un milieu comprenant du sucrose et présente un phénotype chlorotique ainsi qu'un retard de croissance (Lezhneva et al., 2004). Chez *A. thaliana*, HCF101 agirait en aval des protéines NFU et serait donc le dernier intermédiaire de maturation des apo-protéines cibles PsaA, B et C (**Fig. 6B**) (Touraine et al., 2019). Le gène *HCF101* est présent chez *C. reinhardtii* (Przybyla-Toscano et al., 2021) mais, jusqu'à présent, aucune donnée n'existe concernant le rôle de cette protéine chez la microalgue. Elle est pourtant remarquablement conservée, même au sein d'autres groupes d'algues (Pyrih et al., 2021).

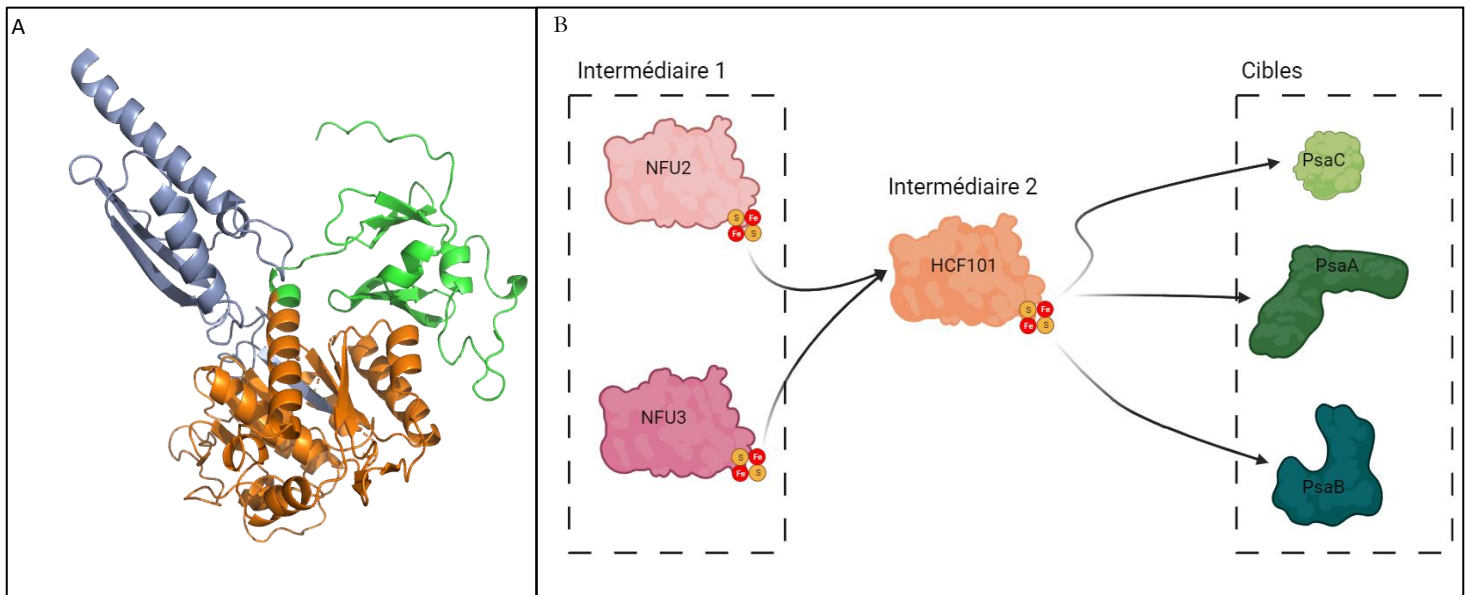


Figure 6. Structure et rôle connu de HCF101 chez *A. thaliana*. A) Prédiction de structure générée par AlphaFold (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022) de la protéine HCF101 de *A. thaliana*. Le domaine DUF59 est coloré en gris. Le domaine DUF971 est coloré en vert. Le domaine principal contenant le P-loop est en orange. B) Schéma représentant le rôle de HCF101 en aval des protéines NFU dans la maturation du PSI, adapté de (Touraine et al., 2019).

3. Exemples de voies métaboliques Fe-S dépendantes

3A. Métabolisme de fermentation en anoxie

Une des particularités de l'organisme modèle *C. reinhardtii* est de pouvoir, quand il est en condition d'anoxie, passer de la respiration à la fermentation pour assurer la production d'ATP et le maintien de la balance rédox (Catalanotti et al., 2013). Ainsi, *C. reinhardtii* possède différentes protéines dont le rôle est la fermentation du pyruvate, après la glycolyse. Le métabolisme fermentatif conduit à la production de formate, d'acétate et d'ATP, tout en oxydant du NADH (Fig. 7) (Posewitz et al., 2023). De plus, la microalgue est aussi capable de produire de l'hydrogène à partir de protons via les enzymes HYDA1 et HYDA2 ([FeFe]-hydrogénases) qui seraient apparues suite à un évènement de duplication de gène (Meuser et al., 2012) (Mus et al., 2007). Les protéines pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (PFR1), hydrogénase (HYD) et activatrice de la pyruvate-formate lyase (PFLA) présentées dans la Fig. 7 ont besoin de centres Fe-S afin de fonctionner et sont décrites ci-dessous.

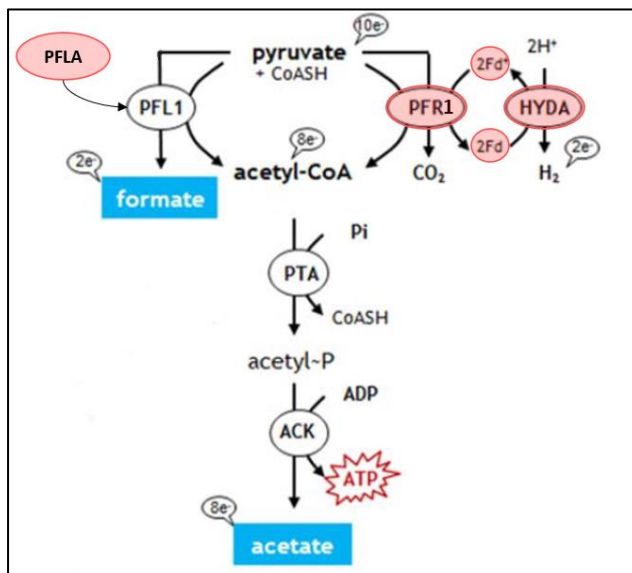


Figure 7. Schéma simplifié des mécanismes de fermentation chez *C. reinhardtii*. ACK : acétate kinase; FDX : ferrédoxine ; HYDAs : hydrogénases ; PFL : pyruvate-formate lyase ; PFLA : enzyme activatrice de la pyruvate-formate lyase ; PFR1 : pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase. Les enzymes à centres Fe-S sont en rouge. Adapté de (Posewitz et al., 2023).

La protéine PFR1 catalyse la décarboxylation du pyruvate : cette réaction génère du CO₂ et de l'acétyl-CoA (Ragsdale, 2003). La réaction catalysée par PFR1 réduit une ferrédoxine, une autre protéine à centre Fe-S. La ferrédoxine servira de donneur d'électrons à la réaction catalysée par les protéines HYD qui catalysent la conversion de 2 protons et 2 électrons en hydrogène moléculaire (Noth et al., 2013). La protéine PFR1, chez *C. reinhardtii*, a un poids moléculaire de 130 kDa (cf. Résultats) et peut coordonner 3 centres [4Fe4S] (van Lis et al., 2020).

L'enzyme activatrice de la pyruvate-formate lyase (PFLA) est une protéine activant la pyruvate-formate lyase (PFL1) en introduisant un radical dans cette dernière ; elle coordonne un centre [4Fe-4S] via 3 cystéines et un radical S-adénosyl-L-méthionine (Shisler et al., 2017).

Les protéines HYD catalysent la recombinaison d'électrons et de protons pour donner de l' H_2 . HYDA1 et HYDA2 nécessitent les facteurs de maturation HYDG et HYDEF pour être fonctionnelles (Hemschemeier et al., 2023). Ces différentes protéines, HYDA1/2, HYDG et HYDEF nécessitent des centres Fe-S, et elles sont donc dépendantes de la machinerie SUF décrite plus haut (Sawyer et al., 2017). Le centre Fe-S des protéines HYDA1/A2 est particulier, il consiste en un "H-cluster", un sous-cluster di-fer, ($[2Fe_H]$) relié à un centre $[4Fe-4S]$ classique (Peters et al., 2015) dont l'assemblage se fait grâce aux protéines de maturation HYDEF et HYDG (Britt et al., 2020; Posewitz et al., 2004).

3B. Synthèse de chlorophylle à l'obscurité

Lors de la croissance en lumière, c'est la protochlorophyllide *a* (Pchl *a*) oxydoréductase (POR ou LPOR pour "light-dépendant") qui catalyse la réaction d'addition d'un proton sur la double liaison entre le C17 et le C18 de la protochlorophyllide donnant ainsi de la chlorophyllide *a* (Chl *a*) (Scrutton et al., 2012). La LPOR, avant la catalyse, forme un complexe ternaire avec un donneur d'électron, le NADH, et son substrat, la Pchl *a* (Reinbothe et al., 2010). Deux photons vont être absorbés par le substrat lié et cet état excité va permettre l'activation de l'enzyme et la catalyse de la réaction (Sytnina et al., 2008). La microalgue verte *C. reinhardtii* a conservé un caractère ancestral de synthèse de chlorophylle à l'obscurité. C'est un trait qui a été conservé chez de nombreux organismes et perdu plusieurs fois au cours de l'évolution, entre autre chez les angiospermes (Hunsperger et al., 2015). *C. reinhardtii* l'a probablement conservée car le caractère est évolutivement intéressant dans des environnements présentant des conditions d'illumination variables. La DPOR ("dark-operative" protochlorophyllide oxydoréductase), responsable de cette capacité, ne nécessite pas de lumière et est composée de trois sous-unités, ChlB, ChlN et ChlL, dont les gènes sont encodés dans le génome chloroplastique. La DPOR est active en tant que complexe hétéro-octamérique : deux hétéro-tétramères, contenant chacun un monomère ChlB, un monomère ChlN et un dimère ChlL (BNL_2), s'associent pour former le complexe qui permet la catalyse de la réaction $PChlide \rightarrow Chlide\ a$. Ce complexe va coordonner, au total, 4 centres $[4Fe-4S]$: 1 entre les sous-unités ChlL du dimère L_2 (L-cluster) et un deuxième entre ChlN et ChlB (NB-cluster), et ceci en dimère (**Fig. 8**) (Moser et al., 2013; Muraki et al., 2010; Nomata et al., 2008, 2006). Un mécanisme impliquant plusieurs intermédiaires radicalaires de la Pchl *a*, via des transferts de protons et d'électrons, avant la réduction finale en Chl *a* a été proposé (Nomata et al., 2014).

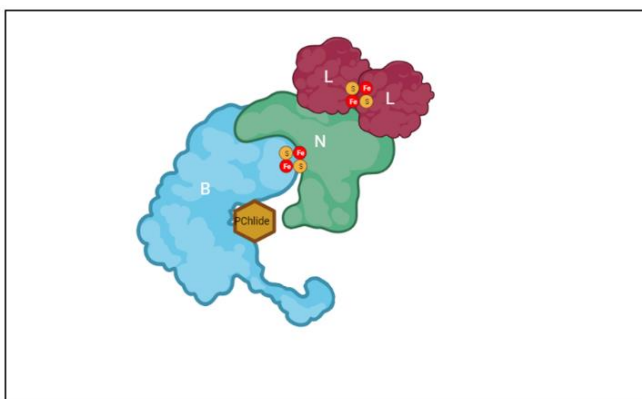


Figure 8. Le complexe DPOR est un dimère d'hétérotétramère. Représentation schématique d'un tétramère $ChBNL_2$. Les sous-unités L sont en bordeaux, N en vert et B en bleu. Les centres $4Fe-4S$ sont représentés en jaune (soufre) et rouge (fer). La protochlorophyllide est insérée dans une poche de ChlB. Les proportions ne sont pas respectées.

3. Objectifs du travail

Ce mémoire avait deux grandes lignes directrices : la caractérisation de mutants *hcf101* et *nfu1* de *C. reinhardtii*.

Pour HCF101 : les objectifs étaient i) déterminer si le mutant *hcf101* était un mutant knock-out (KO) ou knock-down (KD) et ii) d'identifier d'éventuels défauts dans l'appareil photosynthétique des microalgues mutantes à partir de mesures physiologiques, de mesures de taux de croissance, de mesures d'abondances de protéines cibles potentielles. Pour obtenir ces résultats, générer une souche complémentée pour le mutant *hcf101* était essentiel pour valider les différentes observations.

Pour les mutants *nfu1* : la caractérisation des mutants *nfu1-1* et *nfu1-2* avait déjà été entamée dans des travaux précédents celui-ci et des souches complémentées, dont certaines avec une version tronquée du gène NFU1, avaient été générées. Les objectifs consistaient à poursuivre la caractérisation des mutants/transformants mais aussi d'apporter des résultats originaux par rapport à des phénotypes liés à la croissance à l'obscurité suivie d'une période d'anoxie.

4. Matériel et méthodes

1. Souches et milieux de culture

La souches sauvages (CC-4533 cw15 mt-), les mutants *nfu1-1* et *nfu1-2* de *C. reinhardtii* (NFU1, Cre18.g748447_4532.1) et le mutant *bef101* (HCF101, Cre01.g045902_4532.1) ont été commandés auprès de la banque CliP (<https://www.chlamylibrary.org/>) (Li et al., 2019). Les différentes souches ont été cultivés à 25°C en conditions phototrophes minimales dans un milieu Tris-minimal-phosphate (TMP), ou en conditions mixotrophes dans un milieu Tris-acétate-phosphate (TAP) sous une lumière continue de faible intensité (30-50 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ou à l'obscurité (Harris, 1989).

2. Alignement de séquences multiples

Un alignement de séquences multiples (MSA) a été effectué pour comparer les séquences d'acides aminés de différentes protéines HCF101. Le logiciel Clustal Omega a été employé pour réaliser cet alignement, en utilisant les paramètres par défaut (Goujon et al., 2010; McWilliam et al., 2013; Sievers et al., 2011). Les séquences ont été extraites de la base de données du JGI. Numéros d'accension : *Arabidopsis thaliana* – AT3G24430 (Arabidopsis.org), *Populus trichocarpa* - Potri.018G076600.3 (Phytozome), *Physcomitrium patens* - Pp3c19_20070V3.1 (Phytozome), *Chlamydomonas reinhardtii* - Cre01.g045902 (Phytozome), *Chromera velia* - Cvel_23131.t1 (Phycocosm), *Vitrella brassicaformis* - Vbra_10576.t1 (Phycocosm), *Nannochloropsis gaditana* - rna1953 (Phycocosm), *Cyanidioschyzon merolae* - XM_005538500.1 (Phycocosm), *Ectocarpus siliculosus* - rna9702 (Phycocosm), *Ostreococcus tauri* - OT_ostta17g01360T0 (Phycocosm), *Galdieria sulphuraria* - XM_005704422.1 (Phycocosm).

3. Arbre phylogénétique

L'arbre a été généré à partir des matrices de distances obtenues lors de l'alignement de séquences multiples. Les séquences sont les mêmes. L'outil utilisé pour le générer, Simple Phylogeny, était disponible sur le même site que Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/simple_phylogeny/) et a utilisé la technique de Neighbour-Joining pour générer l'arbre (Goujon et al., 2010; Larkin et al., 2007; McWilliam et al., 2013).

4. Prédiction de structures tridimensionnelles

Les structures des protéines HCF101 (Cre01.g045902) et NFU1 (Cre18.g748447_4532.1) de *C. reinhardtii* ont été générées via l'interface ColabFold (Mirdita et al., 2022). Les paramètres pour l'alignement de séquences multiples étaient les suivants : `msa_mode = mmseqs2_uniref_env`, `pair_mode = unpaired_paired`. Ces MSA ont servi d'entrée pour la prédiction des modèles par AlphaFold2 (Jumper et al., 2021) dont les options étaient : `model_type = alphafold2_ptm`, `num_recycles = 3`, `recycle_early_stop_tolerance = 0.0`, `pairing_strategy = greedy`. Les meilleurs modèles ont été traités par amber, directement durant le job. La

prédiction de HCF101 de *A. thaliana* a été récupérée dans la banque de données AlphaFold Protein Structure DB (UniProt : Q6STH5, <https://alphafold.ebi.ac.uk/>) (Varadi et al., 2022). Les structures ont été visualisées en utilisant le logiciel PyMol (<https://pymol.org>, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC).

5. Extraction de chloroplastes

L'extraction de chloroplastes des microalgues est adapté de (Mason et al., 2006). L'entièreté du protocole se déroule à 4°C. Les algues ont été cultivées dans 400 ml de TAP (Tris – Acétate – Phosphate) pH 7,2, jusqu'à obtenir un contenu total en chlorophylle de 5 mg. Les cultures ont été centrifugées à 3000 *g*, 10 min puis resuspendues dans 100 ml de tampon Hepes-KOH 50 mM pH 7,2 avant d'être centrifugées une nouvelle fois à 3000*g*, 5 min. Le culot est récupéré dans 2 ml de tampon Hepes-KOH 50 mM pH 7,2 auxquels sont ajoutés 10 ml de tampon d'isolement (Sorbitol 300 mM Hepes-KOH 50 mM pH 7,2 EDTA 2 mM, MgCl₂ 1mM, BSA 1%). Les cellules sont directement passées à travers une seringue à laquelle est attachée une aiguille de diamètre G27, avec un débit d'au moins 0,1 ml s⁻¹. Les cellules et les chloroplastes sont récupérés en centrifugeant 2 min à 1500 *g*. Le culot est repris dans 2 ml de tampon d'isolement. Cette solution est délicatement posée sur gradient de Percoll qui a été préalablement préparé (3 phases : 20%, 45% et 65%). Le tout a été centrifugé 15 min à 4200 *g*. La bande contenant les chloroplastes à l'interface 45-65% a été récupérée et reprise dans 10 ml de tampon d'isolement, puis centrifugée une dernière fois à 4000 *g* pendant 5 min. Les chloroplastes sont repris dans 250 µl de Hepes-KOH 50 mM pH 8 Sorbitol 300 mM et conservés à -80°C.

6. Extraits totaux de Chlamydomonas

Les cellules sont récupérées et la densité optique (DO) à 750 nm a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis LAMBDA™ 265 (PerkinElmer), en diluant les échantillons 2x. 1,5 ml de culture sont centrifugés 2 min à 20000 *g*. Le surnageant est retiré, le culot est solubilisé dans du tampon SDS-PAGE [sodium dodécyl sulfate (SDS) 2%, glycérol 10%, dithiothréitol (DTT) 100 mM, Tris 60 mM pH 6,8] (volume = 242 µl * DO mesurée), et mis à 95°C pendant 5 min. Les échantillons sont conservés à -80°C. Après décongélation et centrifugation 5 min à 20000 *g*, 15 µl d'extrait peuvent être directement déposés sur gel.

7. Mesures de croissance

La croissance des algues a été déterminée deux fois par jour en mesurant la densité optique (DO) à 750 nm jusqu'à ce que la phase stationnaire soit atteinte, à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis LAMBDA™ 265 (PerkinElmer). Le nombre de cellules/ml a été déduit à partir de la DO en utilisant un droit étalon. La formule pour calculer les temps de doublement est tirée de (Pulich and Ward, 1973) :

$$D2 = [\log(DO_2) - \log(DO_1)] * (3,3) / (t/24)$$

Où D2 le nombre de division par jour, DO₁ et DO₂ les densités optiques mesurées en début et fin de phase exponentielle, respectivement, t est le nombre d'heures entre les deux mesures.

8. Extraction d'ADN

0,5 cm² de cellules cultivées sur boîte de pétri ont été mélangées dans un tampon [protéinase K (4 mg/ml) (Protéinase K, Invitrogen, EO0491), H₂O, GoTaq Buffer 1X] puis incubées 1h à 58°C et 1h à 96°C.

9. Détermination du mating-type

Protocole adapté de (Werner and Mergenhagen, 1998). Un mix PCR a été préparé. Pour 25 µl par tube :

	Volume (µl)		Volume (µl)
H ₂ O	15,2	Primer 1 (20 µM)	1,25
GoTaq Buffer 5x	5	Primer 2 (20 µM)	1,25
dNTP (10 mM)	0,5	DNA*	1
DMSO 100%	0,675	GoTaq polymérase (5U/µl)	0,125

* L'ADN provient de l'extraction à la protéinase K décrite ci-dessus.

Programme PCR

Étapes	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	30 s	1
Dénaturation	95°C	60 s	30
Hybridation	54°C	60 s	
Extension	72°C	60 s	
Extension finale	72°C	420 s	1

Les produits sont posés sur gel d'agarose 1,5%, la migration se déroule à 100 V pendant 45 min.

Primers :

mid-up: 5'-ATG GCC TGT TTC TTA GC-3'

mid-low:5'-CTA CAT GTG TTT CTT GAC G-3'

fus1-up: 5'-ATG CCT ATC TTT CTC ATT CT-3'

fus1-low: 5'-GCA AAA TAC ACG TCT GGA AG-3'

Gène *mid* pour *mt*⁻ et gène *fus* pour *mt*⁺ (Ferris and Goodenough, 1997; Misamore et al., 2003).

10. Transformation de la souche d'expression bactérienne et culture

Les bactéries BL21 (DE3) cat-Psuf(Fur*) (Corless et al., 2020) électro-compétentes (50 µL) ont été mélangées avec environ 10 ng de plasmide et transformées par électroporation. Après ajout de 500 µl de LB liquide, elles sont incubées à 37°C, sous agitation, pendant 1 heure. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîtes de Petri contenant du milieu LB agar solide avec du chloramphénicol (50 µg/ml).

11. Production de protéine recombinante

Un clone a été incubé en milieu LB liquide (3 ml) à 37°C, sous agitation, avec du chloramphénicol (50 µg/ml). 200 µl de cette culture sont utilisés pour ensemercer une culture de 200 ml de LB maintenue à 37°C, sous agitation, pendant la nuit en présence de kanamycine (50 µg/ml) et d'ampicilline (50 µg/ml). Le lendemain, trois erlenmeyers de 800 ml de milieu LB contenant 50 µg/ml de chloramphénicol sont ensemercés avec 40 ml de pré-culture et incubés à 37°C, sous agitation. Quand la DO à 600 nm atteint 0.6, l'expression est induite en ajoutant 100 µM d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Les bactéries sont cultivées dans les mêmes conditions pendant 4 h avant d'être centrifugées à 5000 rpm (Beckman Coulter, Avanti JXN-26, rotor JLA-8.1) pendant 20 min. Le surnageant est éliminé et les culots sont resuspendus dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazole 20 mM.

12. Purification des protéines étiquetées par chromatographie d'affinité (IMAC), échangeuse d'anions et exclusion de taille

La protéine d'intérêt a été purifiée grâce à la présence d'une séquence poly-His en N-terminal insérée dans le plasmide pET15b (Annexe). Les cellules sont lysées par sonication (2 cycles d'une minute, Branson sonifier, amplitude de 20%) puis le lysat est centrifugé à 20000 rpm (Beckman Coulter, Avanti JXN-26, rotor JA 25.50) pendant 40 minutes. Ensuite, la fraction soluble est chargée sur une résine Cytiva™ : Ni Sepharose™ 6 Fast Flow équilibrée à l'aide d'un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM, imidazole

20 mM. La colonne est ensuite lavée avec 5 volumes du même tampon avant que les protéines retenues soient éluées avec 30 ml de tampon d'élution (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazole 250 mM). L'échantillon est dialysé contre 1L de tampon Tris-HCl 30 mM pH 8 EDTA 1mM (TE).

L'échantillon dialysé est chargé sur une colonne à résine Q-sépharose (échangeuse d'anions) qui a été préalablement équilibrée avec du tampon TE. Seules les protéines chargées négativement sont retenues, via des interactions électrostatiques avec la résine. Les protéines retenues sont ensuite éluées à l'aide d'un gradient entre 0 et 0,4 M de NaCl préparé dans du TE pour un volume de 500 ml. Les fractions ont été collectées automatiquement et un profil d'élution réalisé en mesurant la densité optique à 280 nm. La protéine d'intérêt est finalement concentrée jusque 1 ml par ultrafiltration avant d'être déposée sur une colonne Superdex200 16x600 mm couplée à un système FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) de type ÄKTA-Purifier pour une séparation par chromatographie d'exclusion de taille. Les fractions d'intérêt sont regroupées et la concentration de la protéine déterminée par dosage spectrophotométrique (A à 280 nM).

13. Fixation de la protéine HCF101 sur colonne au bromure de cyanogène

L'échantillon de protéine purifiée est dialysé contre un tampon NaHCO_3 50 mM. 1 g de résine a été lavé avec 100 ml de HCl 1 mM puis équilibrée avec une solution de NaHCO_3 50 mM. La résine a été incubée avec la protéine recombinante purifiée pendant la nuit, sous agitation. La résine hybridée a ensuite été transférée dans une colonne et lavée avec du tampon NaHCO_3 50 mM avant d'être incubée 1h avec un tampon Tris-HCl 1M pH 8. La colonne a été lavée avec du tampon NaHCO_3 50 mM puis équilibrée avec du tampon TE.

14. Expérience de capture de partenaires de HCF101

50 ml de culture d'algues en phase exponentielle ont été centrifugés à 1200 g pendant 5 minutes. Le culot a été repris dans 3 ml de Tris-HCl 30 mM pH 8 puis placé à -80°C pendant 15 min. Après décongélation, les cellules sont lysées par sonication (2 cycles d'une minute, Branson sonifier, amplitude de 20%) et centrifugées à 20000 rpm (Beckman Coulter, Avanti JXN-26, rotor JA 25.50) pendant 20 minutes. 5 ml d'extrait solubles sont passés sur la colonne qui est ensuite lavée avec du Tris-HCl 30 mM pH 8. Les protéines sont éluées en passant du tampon Tris-HCl 30 mM pH, 8 200 mM NaCl sur colonne. Des fractions de 1,5 ml ont été récoltées. Une deuxième élution a ensuite lieu en augmentant la concentration de NaCl à 1M, des fractions de 1,5 ml ont ensuite été récoltées en sortie de colonne. La présence de protéines dans les fractions a été vérifiée par spectrophotométrie (A à 280 nm).

15. Purification d'anticorps anti-HCF101

Le sérum de lapin immunisé a été passé 2 fois sur la colonne CN-Br sépharose activée hybridée à la protéine recombinante HCF101 de *C. reinhardtii*, qui a été équilibrée avec du tampon Tris-HCl 200mM pH 8, EDTA 1 mM. La colonne a ensuite été lavée 1 première fois avec du tampon Tris-HCl 200mM pH 8 EDTA et une deuxième avec du tampon Tris-HCl 200mM pH 8, EDTA, 1mM NaCl 500 mM. Les anticorps sont élués avec 10 ml d'acide acétique 50 mM et l'éluat est divisé en fraction de 800 µl dans des eppendorfs contenant 200 µl de Tris 1M pH 8. La colonne est rééquilibrée avec du tampon Tris-HCl 200 mM EDTA 1 mM. La présence des anticorps dans les fractions est mesurée par spectrophotométrie (A à 280 nm). Les fractions intéressantes sont conservées, rassemblées puis concentrées par ultrafiltration à l'aide d'une cellule Amicon contenant une membrane sélective à 10 kDa et ceci sous pression d'azote.

16. Électrophorèse sur gel dénaturant, transfert sur membrane et immunodétection

Pour la réalisation des western blots, les échantillons (extraits totaux ou extraits chloroplastiques) sont repris dans du tampon Laemmli (Tris 50 mM, glycérine 10%, SDS 2%, bleu de bromophénol 0,02%, β -mercaptoéthanol 10%), dénaturés à 95°C pendant 10 min (si nécessaire) puis déposés sur gels de polyacrylamide, en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) de 12, 15 ou 17,5 % selon les besoins. Par la suite, les protéines sont transférées sur des membranes PVDF (Cytiva Amersham Hybond) à une tension de 100 V pendant une heure à 4°C dans du tampon de transfert (Tris 25 mM pH 8,3, NaCl 250 mM, méthanol 20%). Préalablement, les membranes PVDF ont été activées dans du méthanol. Les membranes ont ensuite été incubées dans un tampon de blocage (solution de blocage 1% (Blocking Reagent 10%, Roche dans le tampon TBS (Tris 50 mM pH 7,5 NaCl 150 mM) pendant une heure. Les anticorps primaires ont été ajoutés aux membranes et incubés pendant une heure sous agitation douce. Après plusieurs étapes de lavage [TBS et TBST (TBS + Tween 20 0,1%)], les membranes sont incubées avec des anticorps secondaires (anticorps anti-IgG de lapin conjugués à la HRP, dilués à 1:5000) pendant 30 minutes. La détection des protéines est réalisée en utilisant un kit de chemiluminescence pour western blots (Roche) et la fluorescence a été détecté avec un IBright FL1000 (Invitrogen by ThermoFisher). Les anticorps primaires polyclonaux utilisés sont : α -HCF101 (contre la protéine recombinante, sérum : 1:5000 | purifiés : 1:1000), α -NFU1 (contre la protéine recombinante, sérum : 1:5000), α -PFR1 (1:1000, Agrisera AS07 275), α -FNR (1:5000, Agrisera AS15 2909), α -HYDA1/A2 (1:1000, Agrisera AS09 514), α -PsaC (1:2500, Agrisera AS10 939), α -AOX (1:34000, fourni par S Merchant, UCLA, USA), α -ChIL (1:1000, fourni par le Prof. Fujita, Japan).

17. Préparation des échantillons pour Tandem-Mass-Tag Labelling

En phase exponentielle, 10^8 cellules ont été récoltées et centrifugées 5 min à 1000 g. Les cellules ont ensuite été lysées dans 1 ml de tampon de lyse (Tampon RIPA : [triéthylammonium bicarbonate (TEAB) 100 mM pH 7,6 NaCl 150 mM isooctylphénoxy-polyéthoxyéthanol (IGEPAL) 1% désoxycholate (DOC) 0,5 % sodium dodécyl sulfate (SDS) 0,1 % n-dodécyl β -D-maltoside (DDM) 0,2 % fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) 0,5 mM acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) 0,5 mM]) et mélangées

10 min à température ambiante. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 10 min à 21000 g à 4°C. Le surnageant a été conservé et le contenu en protéine dosé à l'acide bicinchoninique (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). Pour chaque réplique, la même quantité de protéines a été prise (100 µg). 10 mM de dithiothréitol (DTT) ont été ajoutés avant de mettre les échantillons à 45°C pour 30 min. Du chloroacétamide 50 mM a été ajouté et les échantillons sont conservés 30 min à l'obscurité. Pour enlever les détergents des échantillons, les colonnes Pierce Detergent Removal (ThermoFisher) ont été utilisées et le protocole du fabricant a été suivi. Le contenu est de nouveau dosé Pierce™ BCA Protein Assay Kit. 80 µg de protéines ont été précipitées une nuit à 4°C à l'acide trichloroacétique 20%. Le culot est lavé à l'acétone puis séché.

Les échantillons ont été envoyés dans le laboratoire du Dr. D. Vertommen (UCLouvain) afin d'être analysés par Tandem-Mass-Tag (TMT) labelling (TMTsixplex Label Reagent Set). Cette méthode permet d'étudier l'abondance relative de protéines entre différents échantillons en fixant de manière covalente une molécule rapportrice aux peptides obtenus par digestion à la trypsine des protéines. Cette molécule est composée d'un groupe réactif, d'une partie "neutre" qui sépare le groupement réactif, et du rapporteur MS/MS. Avant analyse, chacune de ces molécules rapportrices possède la même masse. Les peptides des différents échantillons sont marqués avec des tags différents puis mis ensemble. Une première étape de MS va séparer les différents peptides : la masse des tags est identique et un seul pic va apparaître pour chaque peptide, même provenant d'échantillons différents. La seconde étape de MS va permettre de générer, par la partie rapportrice de la molécule, un ion rapporteur spécifique à chaque échantillon. Les différents peptides de l'échantillon vont donc être ségrégués en fonction de leur échantillon d'origine. Les analyses ont été faites en triplicata biologique de chaque souche. Le traitement statistique des données MS/MS, aussi effectué au laboratoire du Dr. Vertommen, a été effectué à l'aide du moteur de recherche Sequest HT dans Proteome Discoverer 2.5, en utilisant une base de données de référence *C. reinhardtii* obtenue à partir d'Uniprot.

Ratio Photosystème I/Photosystème II

Le ratio Photosystème I/Photosystème II (PSI/PSII) a été mesuré par shift électrochromique (ECS). L'électrochromisme correspond au changement du maximum d'absorption d'un composé lorsqu'un champ électrique est appliqué. C'est un phénomène qui affecte notamment les pigments photosynthétiques (Bailleul et al, 2010). Les deux photosystèmes subissent une séparation de charge lorsqu'ils sont stimulés par une impulsion laser saturante (7 ns), et le signal obtenu correspond à la totalité des centres réactionnels présents. En présence d'inhibiteurs du PSII (3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée (DCMU) 10 µM et hydroxylamine (HA) 1 mM), le signal correspond uniquement à celui des centres réactionnels du PSI. Le rapport PSI/PSII peut alors être calculé (Bailleul et al., 2010). Cette mesure a été prise à l'aide d'un Joliot-Type-Spectrophotometer (JTS-10, BioLogic France). Les longueurs d'onde utilisées sont 520 nm (signal des xanthophylles) et 546 nm (signal du cytochrome *b₆f*). Les mesures à 520 nm sont corrigées en soustrayant la contribution à 546 nm.

18. Efficacité du PSII

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un système d'imagerie SpeedZen (BeamBio/API, France), les images sont enregistrées par une caméra CCD (UI-3240CP-NIR-GL rev.2, IDS, Obersulm Allemagne). Les échantillons sont ramenés à 10 µg de chlorophylle / ml. Les mesures de fluorescence de la chlorophylle ont été effectuées sur 3x200 µl de chaque échantillon, disposés sur une plaque multipuits. La plaque contenant les échantillons a été incubée 10 min à l'obscurité avant les mesures.

Une sonde à LEDs vertes produisant des impulsions de 35 µs a été utilisée pour mesurer la fluorescence de la chlorophylle *a* dans des conditions d'obscurité (F_o) et après une impulsion saturante de lumière rouge (F_m , 4100 µmol photons $m^{-2} s^{-1}$ µmol photons $m^{-2} s^{-1}$) pour atteindre le rendement quantique maximal du PSII ($F_v/F_m = F_m - F_o/F_m$). Les échantillons ont ensuite été adaptés à différentes densités de flux photoniques photosynthétiques (PPFD : 4, 7, 15, 37, 72, 131, 189, 386, 606 et 893 µmol $m^{-2} s^{-1}$) pendant 5 minutes et les valeurs de fluorescence ont été mesurées (F_s). Une impulsion saturante a ensuite été administrée pour réduire complètement les accepteurs du PSII et atteindre le rendement maximal de fluorescence (F_m'). Ces paramètres ont été utilisés pour calculer le rendement quantique du PSII ($\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$) et le taux de transfert d'électrons relatif ($\tau_{ETR} = \Phi_{PSII} * PPFD$) (Maxwell and Johnson, 2000).

19. Mesure de production d'hydrogène

Après croissance à l'obscurité, les cellules sont concentrées pour atteindre une concentration de chlorophylle de 25 µg de chlorophylle/ml. Elles sont réacclimatées pendant 1h à l'obscurité dans du milieu de culture TAP frais, sous agitation faible, avant d'induire l'anoxie. Les conditions anoxiques ont été atteintes en scellant la suspension cellulaire dans des cuvettes spectrophotométriques en présence de catalase (1 000 unités ml^{-1}), de glucose (10 mM) et de glucose oxydase (2 mg ml^{-1}) pendant 1h. L'entièreté de la mesure s'est effectuée sous tente (Glas-Col 108D XX-1H Glove Bag, Templeton Coal Company, Inc) en atmosphère anoxique (N_2). L'évolution de la production d'hydrogène a été mesurée avec une sonde prévue à cet effet (Unisense, UNISENSE A/S, Denmark). 400 µl de culture sont lysées en ajoutant 100 µl de Triton (10x) et 800 µl de tampon K_2PO_4 pH 6,8 méthylviologène 43 mM dithionite de sodium 140 mM, bullé à l'azote pendant 15 minutes. Les calculs de production se basent sur la mesure de la pente qui équivaut à la concentration de H_2 au cours du temps.

5. Résultats

1. Optimisation d'un protocole d'isolement de chloroplastes

L'isolement de fractions enrichies en chloroplastes à partir de cellules entières est requis lorsqu'on étudie des protéines adressées à ces organelles. Mason et al., 2006 ont décrit une méthode simple, rapide et peu coûteuse qui consiste à faire passer à travers une aiguille de seringue, à une certaine vitesse, une grande quantité de cellules afin d'augmenter la pression jusque ~ 80 psi (Mason et al., 2006). Cette pression permet de faire éclater les cellules et conserve intacte une partie des chloroplastes. Ces derniers sont récupérés en effectuant une étape de centrifugation sur gradient de Percoll pour séparer membranes thylakoidiennes, chloroplastes et cellules entières. En utilisant cette technique, je me suis aperçu que la protéine NFU1 apparaissait sous forme de doublet en western blot (**Fig 9**). Ceci suggérait que des protéases étaient actives et clivaient celle-ci, en dépit de la présence d'albumine bovine pendant les différentes étapes de l'isolement, qui aurait dû freiner l'action des protéases. Pour pallier ce problème, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases [fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) à 1 mM, un inhibiteur de protéases à sérine, et 0.1% d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, P9599)] ont été ajoutés dans le tampon d'isolement (voir matériel et méthodes).

Sachant que la protéine NFU1 était clivée quand ce protocole d'isolement de chloroplastes a été appliqué sans ajout de protéases, un extrait total ainsi que les deux types d'échantillons chloroplastiques, traités ou non avec les inhibiteurs de protéases, ont été testés par western blot pour déterminer l'efficacité des modifications. La bande à la taille attendue pour NFU1 était bien visible dans chacun des échantillons (**Fig. 9**). Une bande supplémentaire, témoignant de la dégradation de la protéine NFU1, était visible dans l'échantillon de chloroplastes extraits en absence d'inhibiteurs (**Fig. 9**). Cette même bande était absente de l'extrait total mais aussi de l'échantillon de chloroplastes isolés avec inhibiteurs (**Fig. 9**). Ceci indique que des protéases dégradent effectivement NFU1 lors de l'isolement de chloroplastes et que l'ajout d'inhibiteurs de protéases permet d'éviter cette dégradation. Les différentes expériences nécessitant des chloroplastes isolés ont donc été faites en utilisant des échantillons produits avec cette méthode.

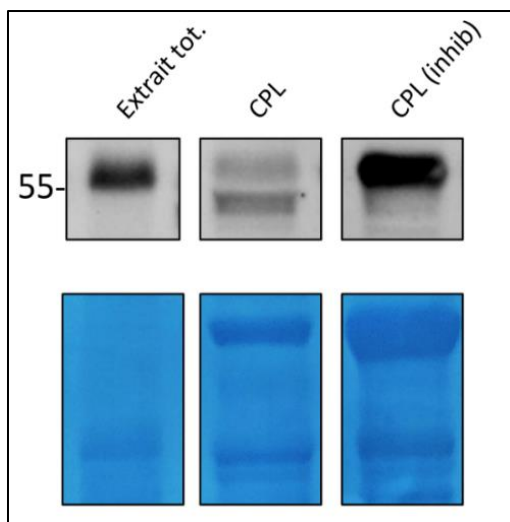


Figure 9. Comparaison des méthodes d'extraction de protéines et détection de NFU1 par western blots. 15 μ l d'extrait total (chargement par rapport à la densité optique) ou 20 μ g de chloroplastes ont été déposés. Extrait tot. = échantillon d'extrait total, CPL = échantillon de chloroplastes isolés sans inhibiteurs de protéases, CPL (inhib) = échantillon de chloroplastes isolés avec des inhibiteurs de protéases. Le marqueur de poids moléculaire (en kDa) est indiqué à gauche. La membrane colorée au bleu de Coomassie sert de témoin de chargement.

2. Étude de la protéine high chlorophylle fluorescence 101 (HCF101) et de son rôle dans la cellule

2A. Analyses *in silico*

2A.I. Les cystéines conservées chez les plantes terrestres ne le sont pas toutes dans les différents clades

En tant que donneur principal de centres 4Fe-4S à l'appareil photosynthétique, la protéine HCF101 est essentielle au cycle de développement des plantes à fleurs (Cook and Miles, 1990; Schwenkert et al., 2010). Des expériences de mutagenèse dirigée menées sur la protéine recombinante d'*A. thaliana* exprimée chez *E. coli* montrent que trois cystéines (C128, C347 et C419) sur les huit que compte HCF101 seraient essentielles à la fixation du cofacteur métallique. Afin de déterminer si ces cystéines sont conservées au sein de la protéine de *C. reinhardtii*, la séquence en acides aminés a été analysée. La protéine CrHCF101 possède 6 cystéines et, sur les 3 ayant été déterminées comme essentielles, seule la cystéine en position 128 est conservée, les cystéines 347 et 419 étant remplacées par une sérine (S356) et une valine (V428), respectivement. Ainsi, certaines cystéines proposées comme liant le centre 4Fe-4S dans l'isoforme d'*A. thaliana* sont absentes dans l'orthologue de *C. reinhardtii*. Par contre, 4 autres cystéines sont communes aux deux isoformes. Afin de déterminer si certaines d'entre elles pourraient jouer un rôle dans la fixation d'un centre 4Fe-4S, des prédictions de structure d'HCF101 ont été générées par le logiciel AlphaFold2 pour la protéine d'*A. thaliana* (AtHCF101) et celle de *C. reinhardtii* (Jumper et al, 2021 ; Mirdita et al., 2022). Le modèle pour AtHCF101 a été obtenu à partir de l'AlphaFold DB, celui pour CrHCF101 a été généré via le notebook Google Collab (voir "Matériel et méthodes"). La prédiction de structure de AtHCF101 indique que les cystéines C128, C347 et C419, sont spatialement éloignées les unes des autres, ce qui ne suggère pas une implication dans la liaison du centre 4Fe-4S (**Fig. 10A**). Les structures de AtHCF101 et CrHCF101 ont

ensuite été superposées avec le logiciel PyMol (“The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.”) en utilisant la fonction "align()", qui effectue un alignement de séquences avant de superposer les modèles. De manière intéressante, les cystéines C184, C303 et C339 de AtHCF101, conservées chez CrHCF101 (C193, C312 et C348) sont situées à des distances de 8,6, 9,5 et 10,9 Å et disposées de façon à pouvoir fixer un cofacteur (**Fig. 10B**). En acceptant quelques approximations, si on considère que la distance entre 2 atomes de Fe vaut 2,26 Å et celle entre 2 atomes de S vaut 3,55 Å (Sticht and Rösch, 1998), alors les atomes de Fe se trouvent à une distance de 4,5 Å des cystéines qui peuvent les lier (C193, C312 et C348 chez *C. reinhardtii*) (Annexe 1), ce qui reflète une proximité compatible pour la formation de liaison fer-soufre.

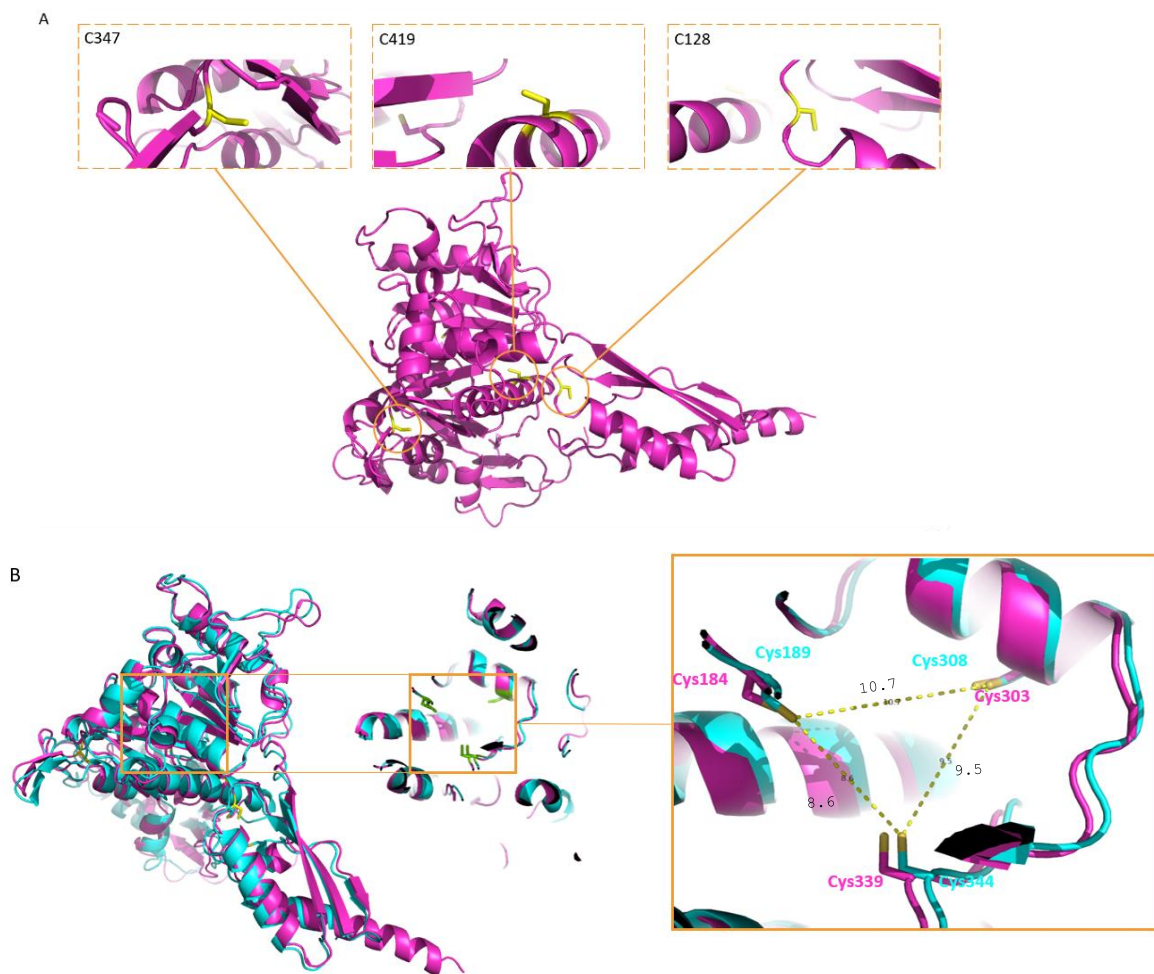


Figure 10. Prédiction de structure pour les protéines AtHCF101 et CrHCF101 par AlphaFoldv2 (Jumper et al., 2021). A) Structure prédite de HCF101 de *A. thaliana*. Les cystéines considérées comme essentielles à la fixation d'un centre 4Fe-4S (Schwenkert et al., 2010) sont mises en évidence en jaune. B) Superposition des prédictions de structure de AtHCF101 (violet) et CrHCF101 (cyan). Les cystéines 184, 303 et 339 d'*A. thaliana* sont espacées d'une distance moyenne de 9.6 Å.

Pour déterminer le degré de conservation de ces trois cystéines, 11 séquences homologues de CrHCF101 ont été alignées. Celles-ci proviennent de Viridiplantae, un groupe monophylétique comprenant des algues (Chlorophyta : *C. reinhardtii*, *Ostreococcus tauri*) et des plantes terrestres (Streptophyta : *Physcomitrium patens*, *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa*) dont le chloroplaste provient d'une endosymbiose primaire (Rockwell et al., 2014), d'autres algues provenant également d'une endosymbiose primaire (Archaeplastida) mais

appartenant aux Rhodophyta (*Cyanidioschyzon merolae*, *Galdieria sulphuraria*) et enfin des algues complexes dont les plastes proviennent d'une endosymbiose secondaire et appartenant au supergroupe des SAR [Stramenopiles (Ochrophyta : *Ectocarpus siliculosus*, *Nannochloropsis gaditana*), Alveolates (Colpodellida : *Vitrella brassicaformis*, *Chromera velia*)] (**Fig. 11A**). Les séquences ont été alignées à l'aide du programme Clustal Omega (Goujon et al., 2010; McWilliam et al., 2013; Sievers et al., 2011). Chez la majorité des organismes analysés, 4 cystéines sont conservées aux positions 137, 193, 312 et 348 (numérotation de CrHCF101) et parmi celles-ci se trouvent les 3 cystéines prédites (C193, C312 et C348) comme liant les centres Fe-S dans le modèle structural. La C137, quant à elle, se trouve au niveau du domaine N-terminal de la protéine. Une dernière en position 110 est conservée uniquement dans la lignée verte. Cela suggère que les acides aminés conservés ont un rôle fonctionnel et/ou structural au sein de la protéine HCF101 chez la plupart des organismes. De plus, des cystéines, qui ne sont pas conservées dans la séquence de *C. reinhardtii*, sont visibles au sein d'autres organismes. Dans le cas des séquences présentes chez les Colpodellida (*V. brassicaformis*, *C. velia*) il est possible que les C281 et C284 servent à la fixation d'un centre Fe-S à la place de celles présentes dans CrHCF101. À partir de l'alignement, un arbre phylogénétique a été généré à l'aide de l'outil ClustalW2 Phylogeny en utilisant la méthode de Neighbour-Joining. L'arbre obtenu est relativement logique : les protéines HC101 présentes chez les Streptophyta et les Chlorophyta sont regroupées en tant que groupe des Viridiplantae, celles présentes chez les deux Colpodellida sont aussi rassemblées dans leur groupe respectif (**Fig. 11B**). Toutefois, des différences peuvent être soulignées avec la phylogénie établie pour les espèces (De Vienne, 2016). Par exemple, les séquences issues des Rhodophyta auraient dû être plus proches de celles issue des Viridiplantae étant donnée leur appartenance commune au groupe des Archaeplastida (**Fig. 11B**). Les séquences issues des Colpodellida et des Ochrophyta auraient aussi probablement dû être plus proches les unes des autres étant donné leur appartenance au groupe des SAR (**Fig. 11B**).

et l'expression revient à un niveau basal après 9 h de lumière. Ce maximum d'expression coïncide avec un des pics de transcription des 3 sous-unités du PSI étudiées (**Fig. 12**). La cotranscription des gènes est un indice permettant de dire que les protéines sont présentes simultanément dans la cellule, soutenant l'hypothèse selon laquelle CrHCF101 puisse transférer les centres 4Fe-4S nécessaires à la fonction des sous-unités du PSI. Il est intéressant de noter que l'expression de ces trois sous-unités est également élevée (en comparaison à leur niveau basal d'expression) à 2 autres temps : 0.5 h avant le passage en lumière et 0.5 h après le passage en lumière. L'expression de gènes codant d'autres protéines cibles potentielles de HCF101 a ensuite été analysée. Pour ce faire, j'ai recherché différentes protéines chloroplastiques d'*A. thaliana* capables de lier un centre 4Fe-4S (Pryzbyla-Toscano et al., 2021) ainsi que la protéine TCR (triplet-cysteine repeat protein (Luu Trinh et al., 2021)) non reprise dans l'analyse réalisée par Pryzbyla-Toscano et al., 2021. Les niveaux de transcription des gènes codant ces cibles potentielles ont été comparés avec ceux des gènes codant 3 protéines de transfert de centres 4Fe-4S (NFU1, NFU2 et HCF101 (Annexes 3, 4, 5)). Les évidences de co-transcription des gènes pourraient suggérer qu'une protéine soit une potentielle cible pour la protéine de transfert. Les gènes *DNJ14* (DnaJ-like protein), *HDS1* (1-hydroxy-2-méthyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase), *IDS1* (4-hydroxy-3-méthylbut-2-enyl diphosphate réductase), *SIR4* (ferrédoxine sulfite réductase 4), *TCR* (triplet-cysteine repeat protein) et *THIC* (Hydroxyméthylpyrimidine phosphate synthase) présentent un pic d'expression à 3h, tout comme *HCF101*.

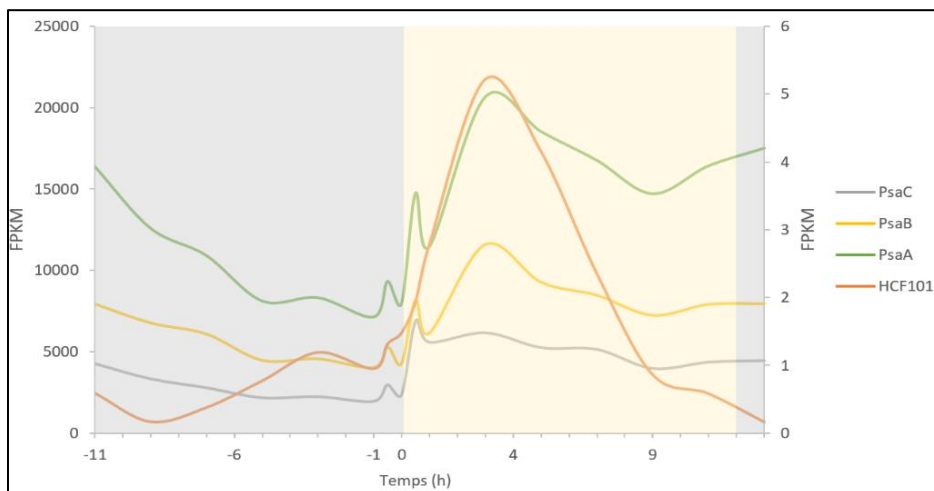


Figure 12. Niveaux d'expression des gènes HCF101 et PsaA/B/C en conditions de cycle jour-nuit. Le temps, en heure, est séparé en 2 phases : en gris une période d'obscurité et en jaune une période de lumière. Les ordonnées sont en "Fragments Per Kilobase Million", celle de gauche correspond aux mesures pour les sous-unités du PSI, celle de droite correspond aux mesures de HCF101.

2B. Résultats *in vitro* : Recherche de partenaires de HCF101 et purification d'anticorps

Les résultats précédents indiquent que CrHCF101 interviendrait dans le transfert des centres Fe-S vers certaines protéines chloroplastiques comme les sous-unités PsaA-C du PSI mais aussi potentiellement vers d'autres protéines intervenant par exemple dans le métabolisme de la thiamine (THIC) (Moulin et al., 2013), des régulateurs comme la protéine TCR, ayant un rôle dans l'oxydation du PSI (Trinh et al., 2021), ou encore IDS1, dans les voies métaboliques de synthèse de terpènes (Wang, 2000). Afin d'identifier

expérimentalement les partenaires de CrHCF101, une expérience *in vitro* de capture de partenaires a été effectuée par chromatographie d'affinité sur une colonne où la protéine recombinante CrHCF101 a été fixée de manière covalente. Le même type de colonne a été utilisé pour purifier par affinité des anticorps anti-HCF101 à partir de sérum de lapin, qui devaient servir pour la caractérisation d'un mutant *hcf101* de *C. reinhardtii*. Cette partie du travail (point 2B I., 2B II. Et 2B III.) nécessitait au préalable de purifier la protéine recombinante et l'ensemble de ce travail a été réalisé lors de mon séjour à l'Université de Lorraine chez le Prof. N. Rouhier en juin 2023.

2B.I. Purification de la protéine CrHCF101 sous forme recombinante

La séquence codante de HCF101, dépourvue de sa séquence d'adressage, a été clonée dans le vecteur d'expression pET-15b, permettant d'ajouter une étiquette poly-histidine en position N-terminale de la protéine (Annexe 1). La protéine recombinante HCF101 a été exprimée dans la souche *E. coli* BL21(DE3) avant d'être purifiée par chromatographie d'affinité (IMAC), chromatographie échangeuse d'anions (Q-sépharose) et chromatographie d'exclusion de taille en condition aérobie. A l'issue de la chromatographie d'affinité, la pureté est déjà satisfaisante même si le niveau de surexpression de départ était faible (**Fig. 13A**). Le chromatogramme obtenu à l'issue de la chromatographie échangeuse d'anions comportait trois pics principaux, un premier pic en début d'élution (fractions 3 à 6), un deuxième entre les fractions 30 à 33 et un dernier, beaucoup plus étalé, entre les fractions 57 à 66 (**Fig. 13B**). L'analyse d'aliqotes correspondant à ces fractions sur gel SDS-PAGE indique que la protéine est présente dans tous les pics (**Fig. 13B**). Ceci était surprenant et suggère l'existence de plusieurs formes de la protéine. Par le fait, bien que toutes les étapes de purification aient été réalisées en condition aérobie, une coloration brunâtre de l'échantillon était visible lors de la chromatographie d'affinité indiquant la présence de centre Fe-S résiduel mais celle-ci tendait à disparaître au fur et à mesure du temps. Il est ainsi possible que cette fraction de protéine sous forme holo représente l'un de ces pics même si cela n'a pas été analysé spécifiquement car je souhaitais purifier la protéine sous forme apo.

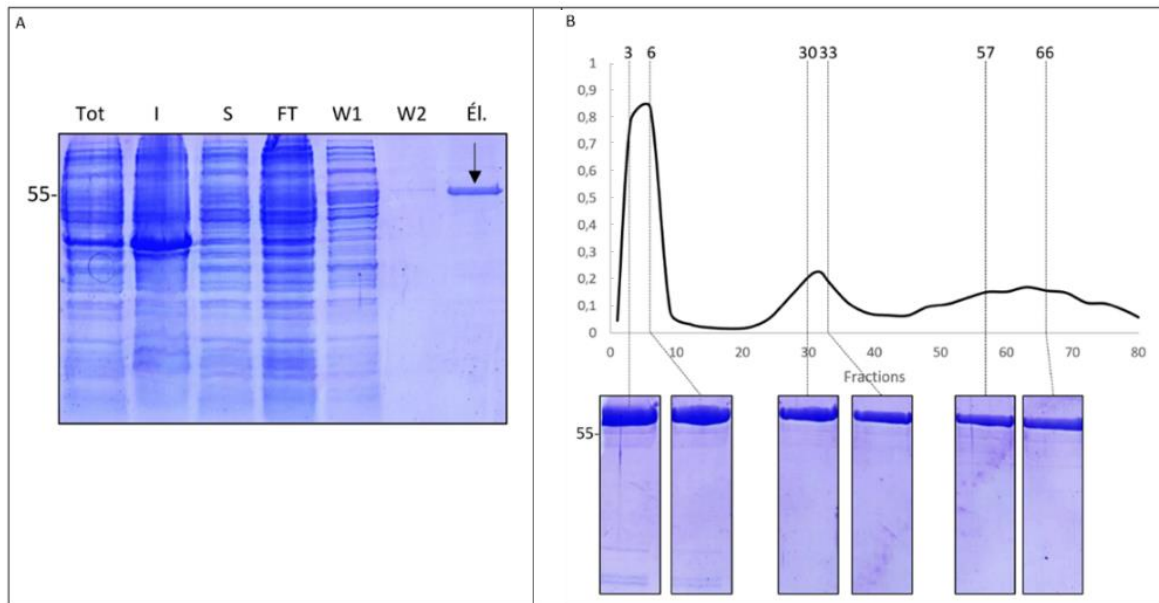


Figure 13. Purification de la protéine recombinante HCF101. A) Gel SDS-PAGE montrant les différentes fractions obtenues à l'issue de la chromatographie d'affinité. Tot = fraction totale après lyse des bactéries (2 μ l), I = fraction insoluble après centrifugation (2 μ l), S = fraction soluble après centrifugation, FT = fraction ayant traversé la colonne (5 μ l), W1 = fraction de lavage (10 μ l), W2 = échantillon en sortie de colonne en fin de lavage (10 μ l), Él. = aliquot de la fraction éluee avec 250 mM d'imidazole (10 μ g) B) Chromatographie échangeuse d'anions. L'axe Y correspond à l'absorbance mesurée à 280 nm. Le numéro de fraction déposée est inscrit en haut du spectre et indiqué par une barre pointillée. Chaque partie du gel est reliée à sa fraction correspondante. 20 μ g de protéines ont été déposés dans chaque puits. La bande intense de chaque puits correspond à CrHCF101 recombinante qui a été éluee à différentes concentrations salines. Le poids moléculaire en kDa est indiqué à gauche de chaque gel.

Puisque je cherchais à obtenir une protéine avec le plus haut niveau de pureté possible, les fractions 30 à 33 qui semblaient contenir le moins de contaminants ont été soumises, après concentration de l'échantillon, à une étape de chromatographie par exclusion de taille sur colonne Superdex S200 16/16000, couplée à un système FPLC. Là encore le chromatogramme indiquait la présence de plusieurs pics (**Fig. 14**). La majorité de la protéine se retrouvait dans le pic d'exclusion élué autour de 47 mL et correspond vraisemblablement à une forme agrégée, dont l'origine pourrait être l'étape de concentration appliquée avant chargement. La protéine HCF101 était également retrouvée dans des pics correspondant à des volumes d'élution de 60 et 72 ml. Ce dernier pic, plus important en termes d'absorbance, correspond à un poids moléculaire apparent de 96 kDa. De prime abord, il était tentant de conclure à la présence d'un dimère compte-tenu du poids moléculaire théorique de 56 kDa pour HCF101. Cependant, l'interprétation de ce résultat est rendue complexe par le fait qu'HCF101 est composée de 3 domaines et n'est pas globulaire. Il est donc tout à fait possible que ces fractions correspondent à une protéine monomérique. Cette fraction a été utilisée pour les expériences suivantes.

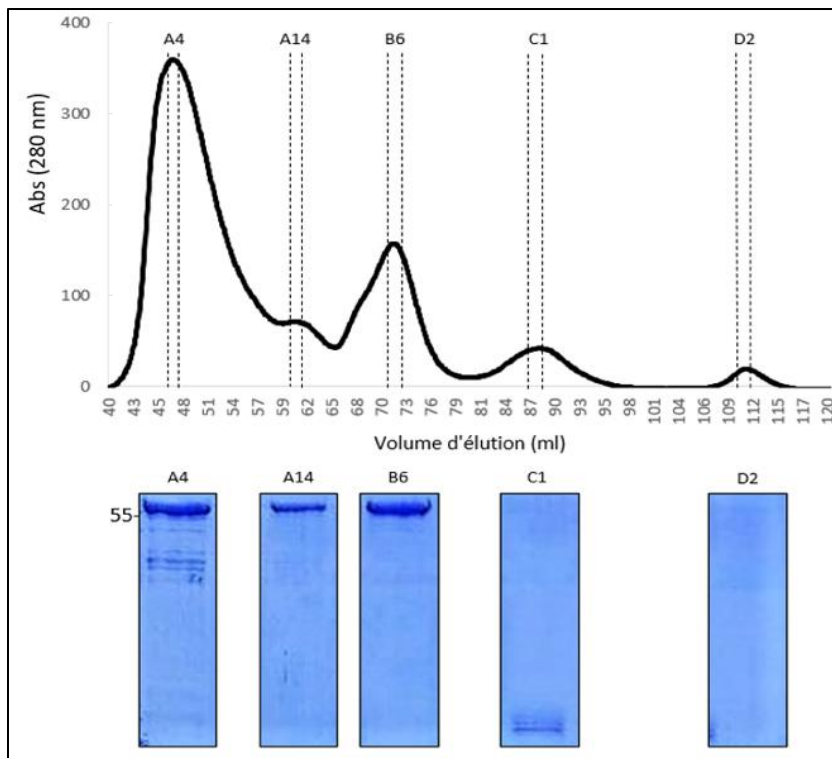


Figure 14. Profil d'élution de HCF101 après chromatographie d'exclusion de taille sur colonne Superdex S200 16/600. Le chromatogramme affiche 5 pics. Le premier pic correspond au pic d'exclusion de la colonne. Le troisième pic (volume d'élution de 72 ml) correspond à un poids moléculaire apparent de 96 kDa. Certaines fractions ont été analysées sur gel en conditions dénaturantes, chaque puits est repris sous sa fraction respective. La protéine HCF101 est retrouvée dans les trois premiers pics, les deux autres correspondent à des contaminants de petits poids moléculaires.

2B.II. Recherche de partenaires de HCF101

Pour l'expérience de capture par affinité, la protéine recombinante purifiée a d'abord été fixée de manière covalente sur une résine de bromure de cyanogène (CN-Br sépharose) activée avant de charger un extrait protéique soluble de *C. reinhardtii*. Après une étape de lavage avec un tampon 30 mM Tris-HCl pH 8, l'élution des partenaires potentiels a été effectuée dans ce même tampon en augmentant la concentration en NaCl à 200 mM puis à 1M. Une colonne CN-Br sépharose sans protéine recombinante liée a été utilisée comme contrôle de la fixation aspécifique de protéines. Le suivi de l'absorbance à 280 nm des différentes fractions éluées a permis de déterminer celles contenant des protéines (**Fig. 15A**). On remarque une absorbance plus importante dans les fractions éluées des colonnes à 200 mM en NaCl par rapport à la condition à 1 M en NaCl, mais aussi une absorbance plus importante dans les fractions éluées de la colonne d'affinité HCF101 à 200 mM, ce qui indiquait qu'une quantité plus importante de protéine avait été retenue. Deux types d'expériences ont ensuite été réalisées. La première était une analyse de la présence de la sous-unité du PSI, PsaC, par western blot compte-tenu des évidences fonctionnelles connues pour HCF101. Un signal à 13 kDa d'intensité comparable a été détecté dans la fraction non retenue sur la colonne HCF101 et dans les fractions éluées à 200 mM NaCl pour la colonne d'affinité HCF101 et la colonne « contrôle » (**Fig. 15B**). Ce résultat indique donc que la totalité de PsaC n'a pas été fixée sur les colonnes, ce qui pouvait éventuellement être attendu, mais surtout que PsaC se fixe probablement de manière aspécifique aux billes de sépharose. Il n'a pas donc pas été possible de conclure que PsaC interagit spécifiquement avec HCF101

dans les conditions utilisées. Afin de réaliser une analyse exhaustive de la composition des échantillons, les fractions d'élution ont été précipitées à l'acétone puis la concentration en protéines dans les échantillons déterminée par un dosage colorimétrique à l'acide bicinchoninique. Les échantillons précipités ont ensuite été analysés par spectrométrie de masse par notre collaborateur de l'UCLouvain (Dr. D. Vertommen). Les données de spectrométrie de masse indiquent que plus de 2000 protéines étaient retrouvées dans la fraction élue à 200 mM de NaCl tandis que seulement 78 ont été retrouvées dans la fraction à 1M de NaCl. Parmi ces protéines de la fraction 200 mM, 518 ne sont pas retrouvées dans l'expérience réalisée avec la colonne ne fixant pas HCF101. Néanmoins, on retrouve certaines protéines qui ne sont pas chloroplastiques, ce qui limite les conclusions que l'on peut tirer de cette expérience pilote. Des pistes pour améliorer le dispositif expérimental seront discutées.

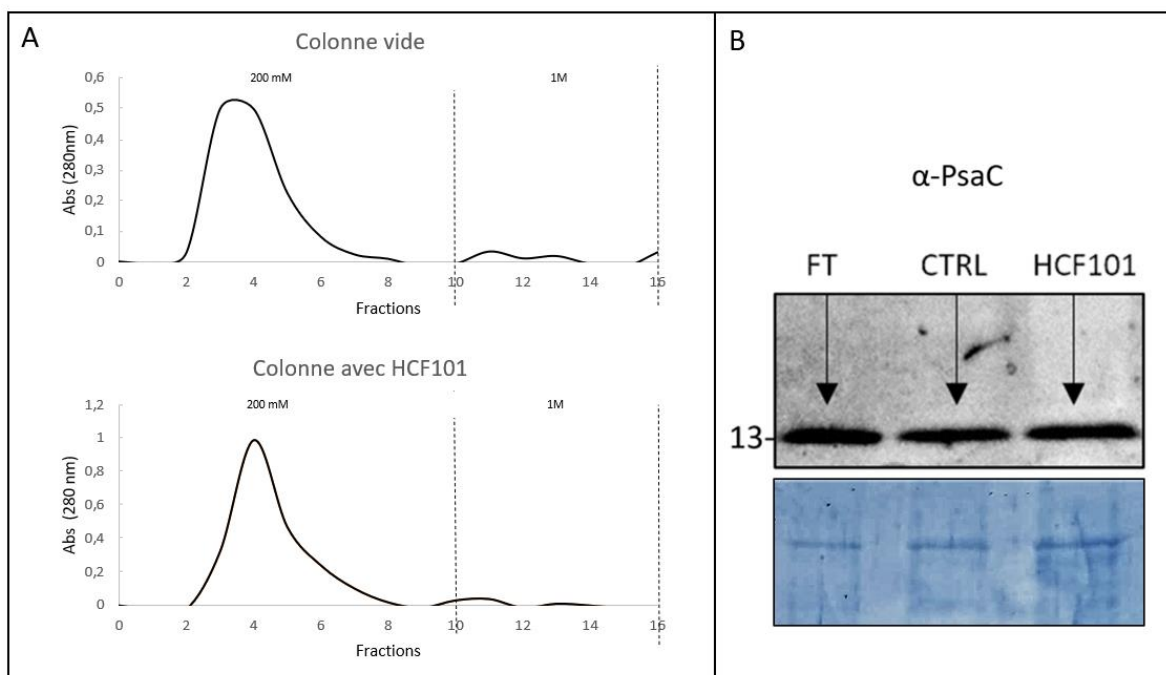


Figure 15. Chromatographie d'affinité sur colonne liant HCF101. A) Profil d'élution après passage d'extraits protéiques solubles de *C. reinhardtii* sur des colonnes CN-Br sépharose liant ou non CrHCF101. Les fractions numérotées de 0-10 correspondent au passage d'un tampon 30 mM Tris-HCl pH 8 contenant 200 mM NaCl ; et celles de 10-16 au passage d'un tampon 30 mM Tris-HCl pH 8 contenant 1M NaCl. B) Détection de PsaC par western blot sur les fractions élues à 200 mM NaCl d'une colonne liant de façon covalente HCF101 ou ne liant pas de protéines (CTRL) ainsi que sur la fraction passée à travers la colonne HCF101 (FT). Poids moléculaire en kDa représenté à gauche de la figure. La membrane a été colorée au bleu de Coomassie et sert de témoin de chargement. L'anticorps anti-PsaC a été dilué 5000x.

2B.III. Purification d'anticorps polyclonaux anti-HCF101 et analyse de leur spécificité

Pour améliorer la spécificité voire la sensibilité des anticorps anti-CrHCF101, le sérum d'un lapin immunisé contre CrHCF101 a été purifié sur colonne d'affinité où la protéine recombinante CrHCF101 a été liée de façon covalente à une colonne CN-Br sépharose activée. Après chargement du sérum sur la colonne et une étape de lavage avec un tampon 30 mM Tris-HCl pH 8, les anticorps reconnaissant la protéine fixée ont été élués dans des tubes contenant une solution de Tris-HCl 1 M pH 8 par ajout d'acide acétique à 50 mM. Les

fractions contenant des protéines (visibles par mesure de l'absorbance à 280 nm) ont été regroupées puis analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes afin de vérifier la présence des chaînes lourdes et légères des IgG. La spécificité des anticorps purifiés a ensuite été comparée à celle du sérum de départ en effectuant des western blots sur des extraits protéiques totaux ou chloroplastiques isolés d'une souche sauvage et d'une souche mutante *hcf101* (**Fig. 16**). On remarque que l'utilisation d'anticorps purifiés a permis de diminuer le nombre de bandes aspécifiques pour tous les extraits et qu'il ne subsiste quasiment plus qu'une bande détectée dans un extrait de protéines chloroplastiques issus de la souche sauvage. Dès lors, les anticorps purifiés seront utilisés pour les analyses par western blots. Ces derniers seraient sans doute de qualité suffisante pour envisager des expériences de co-IP sur des extraits chloroplastiques, dans la mesure où l'expérience de capture par affinité n'a pas donné les résultats escomptés.

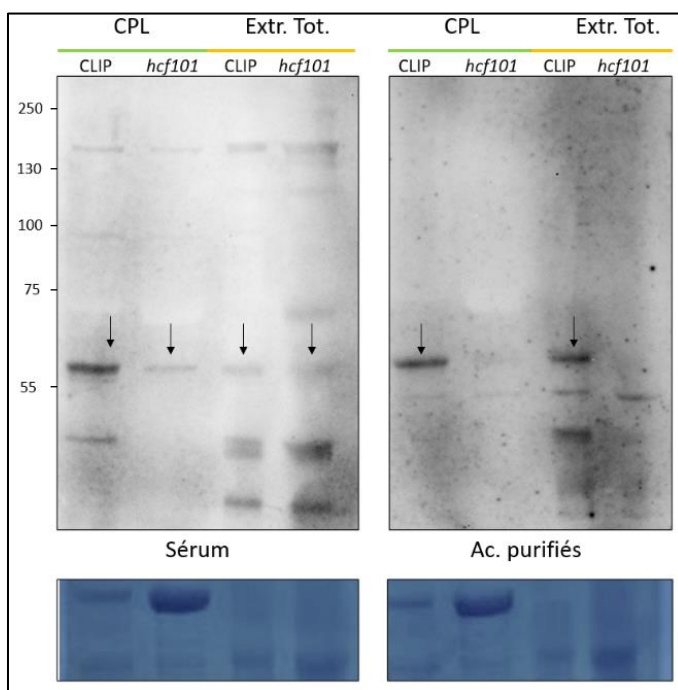


Figure 16. Spécificité des anticorps anti-HCF101 sur extraits totaux ou chloroplastiques de souches sauvages ou mutantes, avant et après purification sur colonne d'affinité. Dilution sérum = 1:3000, dilution anticorps purifiés = 1:1000. CPL = chloroplastes isolés, Extr. Tot. = extraits totaux, CLIP = souche sauvage, *hcf101* = souche mutante. 15 μ l d'extraits totaux (chargement égalisé sur la densité optique) ou 10 μ l de chloroplastes (20 μ g) ont été déposés dans les puits. Les colorations au bleu de Coomassie des membranes sont montrées comme témoin de chargement.

2C. Résultats *in vivo* : caractérisation biochimique et physiologique d'un mutant *hcf101*

2C.I. Génération d'une souche complétement diploïde

Un mutant *hcf101* possédant une cassette conférant la résistance à la paromomycine localisée dans le dernier intron du gène *HCF101* a été caractérisée moléculairement dans un travail précédent du laboratoire d'accueil (Ragnoli, 2022) (**Fig. 17A**). Afin de valider les phénotypes du mutant, il était nécessaire de générer une souche complétement, ayant une copie fonctionnelle du gène *HCF101*. Ceci peut se faire par transformation de la souche mutante avec une copie sauvage du gène. Cependant, l'isolement du gène *HCF101* par

amplification PCR s'est avéré problématique en raison de sa taille (6,777 kb) et du fort contenu en GC de la séquence (65,4 %). Il a donc été décidé d'obtenir une souche diploïde pour la complémentation, sachant que des études de croisement avaient démontré la présence d'une seule insertion dans le génome, localisée dans le gène *HCF101*. Une telle souche diploïde posséderait une copie supplémentaire, sauvage du gène, dans un environnement génétique identique au mutant. Le cycle de reproduction de *Chlamydomonas* est haplophasique et la reproduction sexuée conduit à l'obtention de produits méiotiques. Cependant, il est aussi possible d'isoler des souches diploïdes lors de croisements par complémentation intercistronique entre marqueurs d'auxotrophie (Matagne, 1978). Pour isoler une souche diploïde *hcf101/HCF101*, deux croisements ont été effectués. Un premier croisement a permis d'isoler un mutant *hcf101* résistant à la paromomycine et déficient pour la synthèse de l'arginine (mutation *arg7-8* dans le gène codant pour l'argininosuccinate lyase). Le second croisement est effectué entre ce mutant (*hcf101 arg7-8*, *mt*⁻) et une souche également déficiente pour la synthèse d'arginine, mais possédant le gène *HCF101* sauvage et de mating-type (*mt*) opposé (*HCF101 arg9-2*, *mt*⁺). La mutation de déficience pour l'arginine est localisée dans le gène codant pour la N-acétyl ornithine aminotransférase (Remacle et al., 2009). Pour obtenir des diploïdes, le produit de croisement a été étalé sur un milieu sans arginine contenant de la paromomycine pour forcer la fusion entre des gamètes de mating-type opposé et leur division. En effet, une cellule diploïde provenant de ce croisement doit récupérer la capacité de synthétiser de l'arginine par complémentation intergénique (*arg7-8/arg9-2*) et être résistante à la paromomycine (*hcf101/HCF101*). Onze colonies poussant sur ce milieu ont été conservées et testées afin de déterminer leur mating-type (**Fig. 17B**). Si elles sont diploïdes, elles doivent posséder les gènes du caractère *mt*⁻ et *mt*⁺. Après PCR, 2 bandes résultant de l'amplification des mating-types + et - étaient visibles pour la plupart des colonies, ce qui signifie qu'elles étaient diploïdes (**Fig. 17B**). Les différentes mesures à venir ont été effectuées sur la souche complétementée diploïde n°8, dont le génotype est *arg7-8/arg9-2 hcf101/HCF101 mt*⁺/*mt*⁻. La présence de la protéine HCF101 dans la souche diploïde a été vérifiée par western blot dans les expériences décrites ci-dessous.

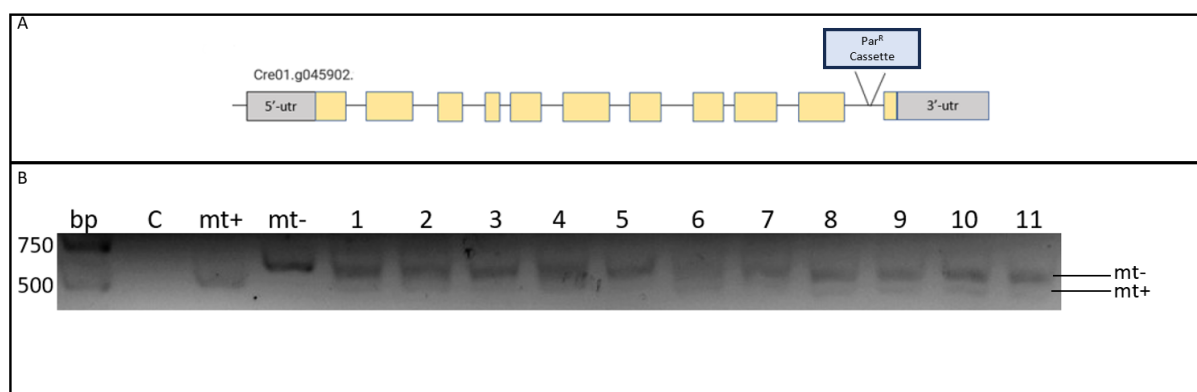


Figure 17. Screening d'une souche complétementée pour HCF101 sur base du mating-type. A) Schéma représentant le gène *HCF101*, les exons sont en jaune. B) Détermination du mating-type après deuxième croisement. *bp* = paires de bases, *C* = contrôle sans ADN, *mt*⁺ = souche sauvage, *mt*⁻ = souche *hcf101*.

2C.II. Localisation et présence de la protéine HCF101 dans les différentes souches

Chez *A. thaliana*, la protéine HCF101 est chloroplastique (Lezhneva et al., 2004) mais certaines protéines de type HCF101 sont prédites adressées dans la mitochondrie chez différents organismes (Pyrih et al., 2021). D'un point de vue phylogénétique, la protéine CrHCF101 est relativement proche de la celle d'*A. thaliana*, ce qui suggère qu'elle serait chloroplastique. De plus, différents algorithmes de prédiction de séquences d'adressage (TargetP, Predalgo (Almagro Armenteros et al., 2019; Tardif et al., 2012)) indiquent qu'elle serait chloroplastique. Dans l'optique de déterminer la localisation subcellulaire, des western blots ont été effectués sur des fractions enrichies en chloroplastes et en mitochondries. Deux marqueurs de localisation ont été utilisés : l'oxydase alternative (AOX) comme marqueur mitochondrial et la ferrédoxine-NADP⁺-oxydoréductase (FNR) comme marqueur chloroplastique. En premier lieu, on constate un signal faible pour la FNR dans l'extrait mitochondrial, indiquant une légère contamination de la fraction mitochondriale par les chloroplastes. Concernant l'AOX, deux signaux sont détectés dans la fraction mitochondriale, correspondant à une forme monomérique et dimérique. Un signal aspécifique est détecté dans la fraction chloroplastique. On peut donc considérer que la fraction chloroplastique n'est pas ou peu contaminée par des protéines mitochondriales. En second lieu, un signal intense pour la protéine HCF101 est détecté dans l'extrait chloroplastique. Ce signal existe faiblement dans l'extrait mitochondrial (**Fig. 18A**) mais serait dû à la contamination de celui-ci par des protéines chloroplastes. HCF101 est donc bien une protéine chloroplastique chez *C. reinhardtii*.

HCF101 étant nécessaire pour transférer les centres 4Fe-4S à la sous-unité PsuC chez *A. thaliana*, les mutants *bcf101* homozygotes sont incapables de croître à moins d'être cultivés sur un milieu enrichi en sucrose (Lezhneva et al., 2004). Le mutant disponible au laboratoire, quant à lui, est pourtant capable de croître sur un milieu pourvu d'acétate et sur un milieu minimum, et la composition et la teneur en pigments photosynthétiques ne sont pas modifiées (Dubois et Remacle, 2022). Ceci suggère que le mutant *bcf101* de *Chlamydomonas* pourrait ne pas être un mutant knock-out (KO). En effet, la mutation se trouvant dans le dernier intron du gène, la protéine pourrait être synthétisée. Dans le but de déterminer la quantité d'HCF101 présente dans la souche mutante, une série de dilution d'une fraction chloroplastique de la souche sauvage a été déposée et analysée par western blot. Pour les souches mutantes et complémentées, des quantités de fractions chloroplastiques correspondant à 200% et 100% (respectivement) ont été déposées sur gel. La membrane a été hybridée avec les anticorps anti-HCF101 purifiés (comme décrit précédemment). Dans des extraits issus de la souche sauvage, le signal décroît en fonction de la quantité de chloroplastes déposée. On constate qu'un signal est détecté chez le mutant, dont l'intensité est inférieure au signal correspondant à un chargement de 12,5% de protéines issues de la souche sauvage. Les niveaux de protéine HCF101 sont équivalents entre la souche sauvage et la souche complémentée diploïde (**Fig. 18B**). Le mutant semble donc capable de produire une très faible quantité de protéine HCF101 et n'est donc pas un mutant KO. Toutefois, les niveaux de protéines sont si faibles comparés à ceux présents dans les souches sauvage et complémentées

qu'il y a peu de doutes que les phénotypes observés sont associés à la mutation. Des pistes pour étudier l'effet d'un mutant KO total seront discutées dans la partie discussion du mémoire.

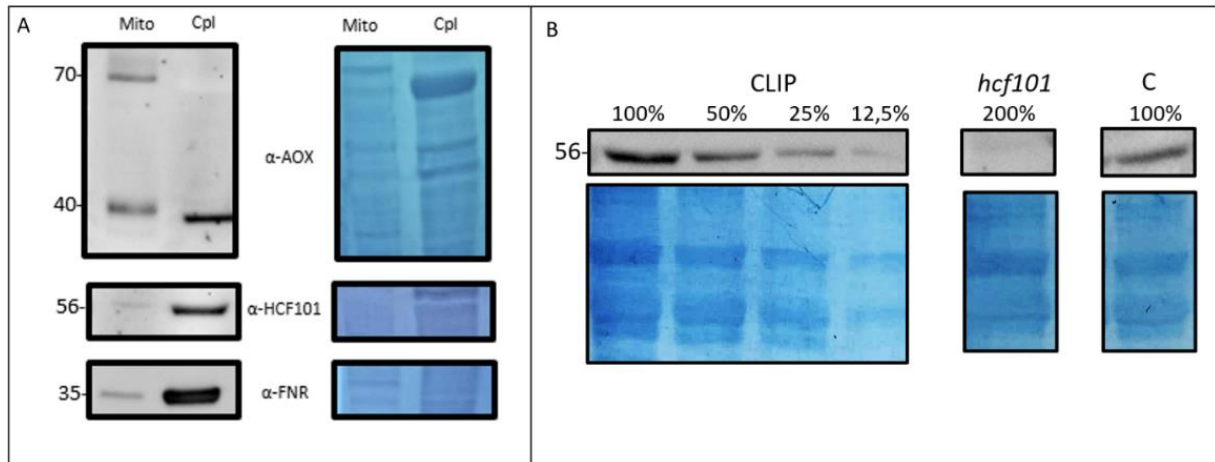


Figure 18. Présence et localisation de HCF101 chez les différentes souches. A) Détermination de la localisation de HCF101. 20 μg de protéines de la souche sauvage ont été déposés dans chaque puits. Les anticorps utilisés sont indiqués au centre de la figure : HCF101 = high-chlorophylle-fluorescence 101, AOX = oxydase alternative, FNR = ferrédoxine-NADP⁺-oxydoréductase, Mito = mitochondries, Cpl = chloroplastes. À droite, les membranes ont été colorées au bleu de Coomassie pour servir de témoin de chargement. B) Détermination de la présence et du niveau relatif de protéine HCF101 chez les différentes souches. 100% = 20 μg de protéines chloroplastique, CLIP = souche sauvage, hcf101 = souche mutante, C = complémenté diploïde. Sous chaque souche, membrane colorée au bleu de Coomassie servant de témoin de chargement. Les poids moléculaires sont indiqués en kDa.

2C.III. La croissance du mutant *hcf101* est affectée en milieu liquide

Les différentes souches (sauvage, mutante et complémentée) ont été cultivées dans deux conditions de culture, dans un milieu contenant de l'acétate (milieu TAP) et en milieu minimal (TMP) sous illumination constante (50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Les cultures ont été inoculées à la même densité cellulaire et la densité optique a été mesurée à intervalle régulier pendant plusieurs jours. La concentration en cellules est calculée à partir de la densité optique à l'aide d'une droite de régression mettant en lien ces valeurs (**Fig. 19**).

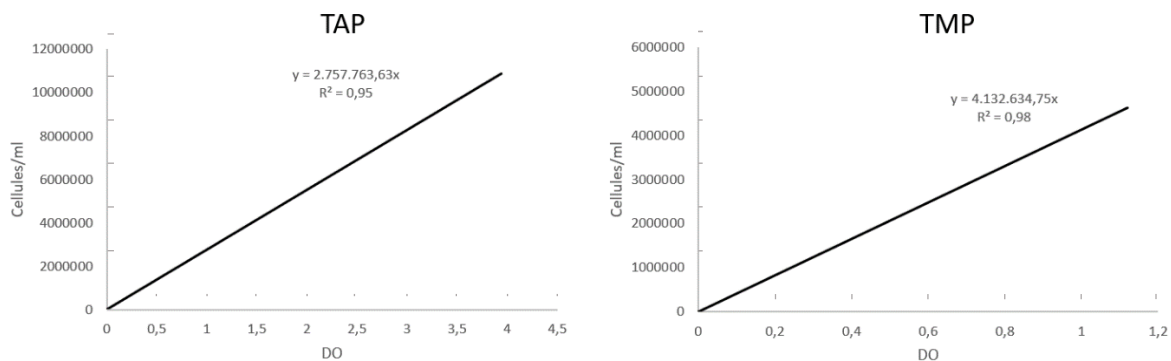


Figure 19. Nombre de cellules / ml en fonction de la densité optique mesurée. DO = densité optique (mesure d'absorbance à 750 nm).

Le nombre de divisions par jour a été calculé en suivant la formule de Pulich and Ward, 1973. En milieu TAP, la vitesse de division (comparée à la souche sauvage) est significativement différente, et 17% plus

faible chez le mutant, tandis qu'aucune différence statistiquement significative n'est observée entre les vitesses de croissance de la souche sauvage et de la souche complémentée, dans cette condition (**Fig. 20**). De la même façon, le nombre de divisions par jour de la souche *hcf101* et celui de la souche complémentée est aussi significativement différent (**Fig. 20**). En milieu TMP, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différentes souches (**Fig. 20**). La croissance est donc affectée chez le mutant, lorsqu'une source de carbone organique est accessible. Les mesures de croissance en milieu minimal devront être répétées afin de réduire les écarts-types.

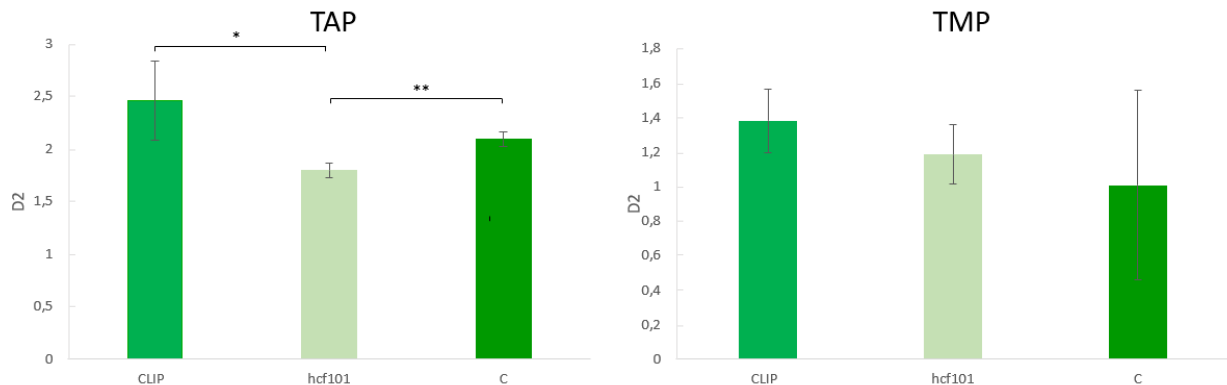


Figure 20. Vitesse de croissance des différentes souches. La vitesse de croissance (D_2) est représentée par le nombre de divisions en 24h. Les mesures proviennent de moyennes sur des tripliquas biologiques. Les cultures ont été inoculées à t_0 par $5E+05$ cellules. Les nombres de divisions par jour (D_2) sont calculés à partir des vitesses maximales en phase exponentielle. CLIP = souche sauvage, *hcf101* = souche mutante, C = souche complémentée diploïde. (*) = p -value < 0,05, (**) = p -value < 0,01.

2C.IV. Analyse de paramètres photosynthétiques

Chez le mutant *hcf101* d'*A. thaliana*, les sous-unités du PSI s'accumulent faiblement et son activité est inférieure à 5% comparée à celle du sauvage, l'activité du PSII est diminuée de presque 50 % et le quenching (photochimique et non-photochimique) est aussi affecté (Lezhneva et al., 2004). Il était donc intéressant de déterminer si les paramètres photosynthétiques sont également affectés chez le mutant *hcf101* de *C. reinhardtii* afin de déterminer l'origine du retard de croissance du mutant et éventuellement identifier d'autres fonctions assurées par HCF101. En effet, si la quantité de PSI est affectée, il est possible que l'appareil photosynthétique du mutant soit globalement affecté, ce qu'on observe chez les plantes à fleur. Selon l'idée que le PSI est majoritairement affecté chez le mutant, la première mesure a été d'évaluer le rapport PSI/PSII. Cette mesure est possible par la méthode de shift électrochromique (ECS).

Chez la souche sauvage le rapport PSI/PSII est de plus ou moins 1,1. Il n'y a pas de différence significative entre la souche sauvage et complémentée. Ce rapport est, par contre, diminué de 50 % chez le mutant *hcf101*, comparativement aux deux autres souches en milieu TAP (**Fig. 21A**).

Ces données permettent de conclure que la quantité de PSI est affectée par la mutation comme chez le mutant d'*A. thaliana* (Lezhneva et al., 2004; Stöckel and Oelmüller, 2004). Afin d'enrichir ces résultats

concernant les effets de la mutation *hcf101* sur le PSI, la quantité de PsaC du mutant a été comparée, par western blot, à celle de la souche sauvage et de la souche complémentée. À partir de chloroplastes isolés, les protéines ont été précipitées à l'acide trichloroacétique 10% (TCA) afin d'éliminer les pigments qui influent sur la migration des protéines lors des expériences d'électrophorèse (SDS-PAGE). L'intensité du signal diminue bien dans la souche sauvage pour *HCF101* en fonction de la quantité de protéines déposée. Le signal dans la souche mutante *hcf101* correspond à moins de 10% de l'intensité dans la souche sauvage ; la souche complémentée, quant à elle, présente des niveaux de PsaC équivalents à ceux de la souche sauvage pour la même quantité chargée (**Fig. 21B**). La quantité de PsaC est donc drastiquement réduite chez le mutant *hcf101*. L'ensemble des résultats permet de conclure que chez le mutant *hcf101*, les défauts observés au niveau du PSI proviennent d'un défaut d'assemblage lui-même dû à un défaut de maturation des centres 4Fe-4S liés par PsaC (et probablement de celui lié par les autres sous-unités PsaA et PsaB). Ces résultats sont en accord avec ceux décrits chez le mutant *hcf101* d'*A. thaliana* (Stöckel et Oelmüller, 2004 ; Lezhneva et al., 2004).

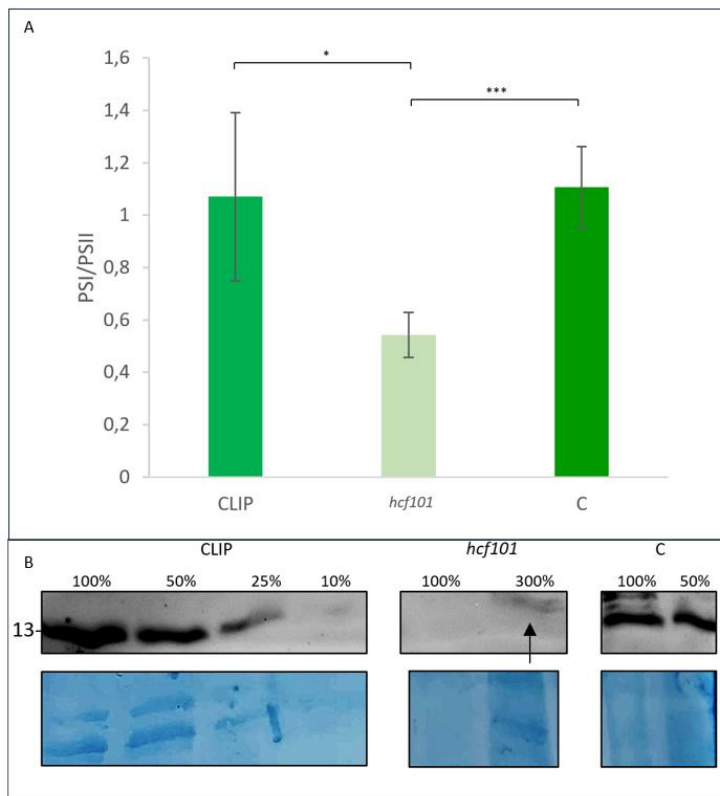


Figure 21. Effets de la mutation *hcf101* sur le PSI. A) Rapport PSI/PSII chez les différentes souches. Les données sont basées sur 5 répliquas biologiques, de deux expériences indépendantes, en utilisant du TAP liquide comme milieu de culture. CLIP = souche sauvage, *hcf101* = souche mutante, C = souche complémentée diploïde. Des tests de Student ont été effectués pour déterminer si les résultats sont significatifs. (*) = p-value < 0,05, (***) à p-value < 0,001. B) Détection de la sous-unité PsaC du PSI chez les différentes souches par western blot. Les extraits protéiques ont été obtenus par précipitation au TCA à partir de chloroplastes isolés. 100% = 20 µg de protéines dans le puits. L'anticorps primaire est dirigé contre PsaC. CLIP = souche sauvage, *hcf101* = souche mutante, C = souche complémentée diploïde. Le poids moléculaire est inscrit à gauche, en kDa. Les membranes ont été colorées au bleu de Coomassie pour servir de témoin de chargement.

Je me suis également demandé si le défaut observé au niveau du PSI pouvait avoir des répercussions sur le fonctionnement des autres complexes photosynthétiques. Deux autres paramètres photosynthétiques ont ainsi été étudiés : le rendement quantique du photosystème II (φ PSII) et la vitesse relative de transfert d'électrons (rETR). Ces deux mesures dérivent de la mesure du quenching de fluorescence de la chlorophylle *a* du PSII.

Le rendement quantique du PSII est réduit significativement de 20 % chez le mutant en milieu TAP et de 12 % en milieu TMP (**Fig. 22A**). De la même manière, le rETR est aussi affecté négativement chez le mutant *bcf101* à toutes les intensités lumineuses et l'effet semble moins marqué en TMP qu'en TAP (**Fig. 22B**). En effet, les rapports de φ PSII entre le mutant *bcf101* et la souche sauvage par exemple aux faibles intensités lumineuses sont nettement plus faibles en TAP qu'en TMP (**Fig. 22C**). La présence d'acétate exacerbe donc le phénotype du mutant *bcf101*, ce qui avait déjà été observé lors des mesures de croissance.

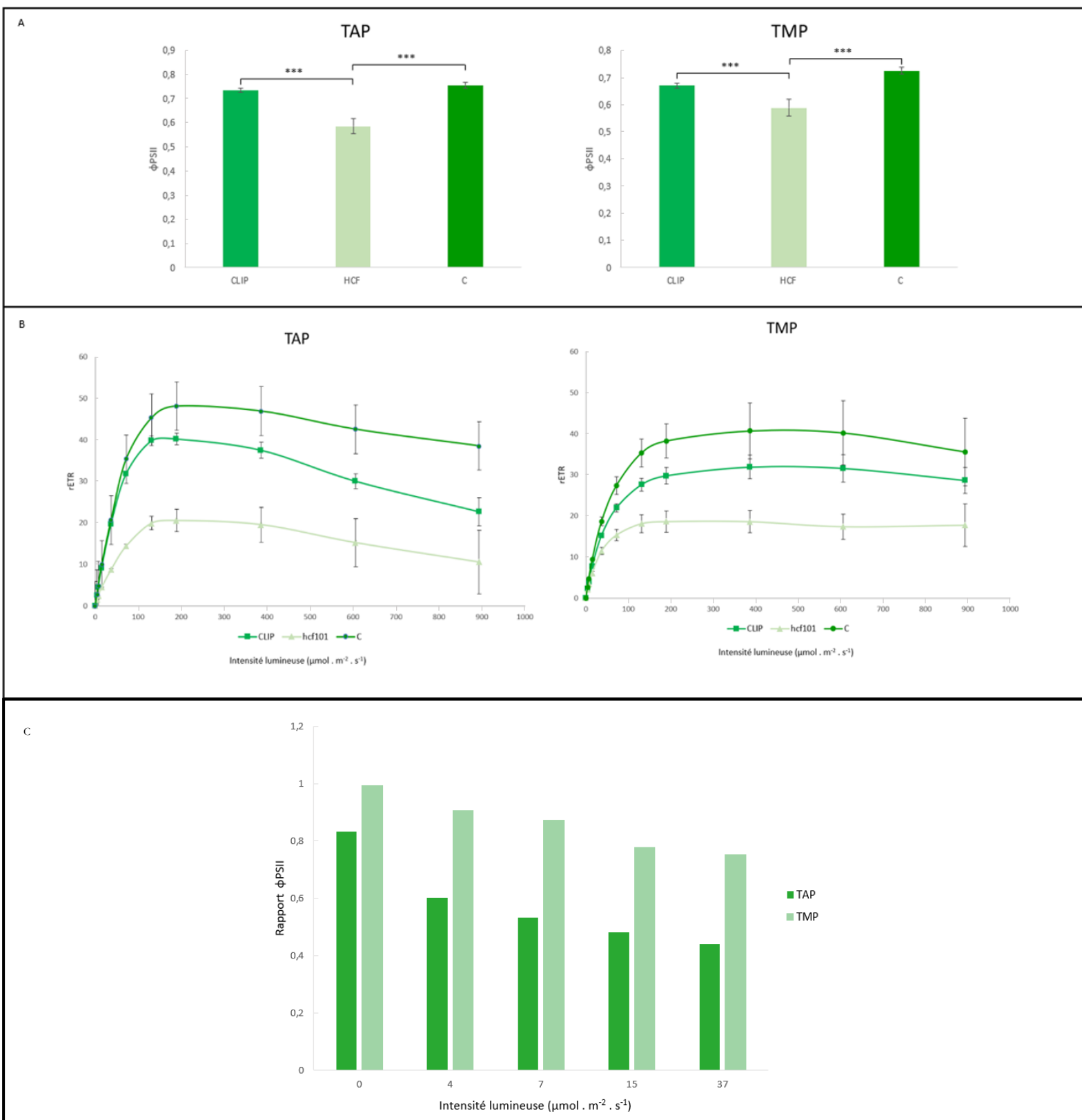


Figure 22. Mesures d'efficacité de la photosynthèse entre les différentes souches en milieu TAP (acétate) et TMP (minimum).
 A) Rendement quantique du photosystème II. Le nombre de cellules a été normalisé en ramenant chaque échantillon à une concentration de 10 μg de chlorophylle/ml. CLIP = souche sauvage, hcf101 = souche mutante, C = complémenté diploïde. Des tests de Student ont été effectués pour déterminer la significativité des résultats. (*) = p-value < 0,05, (***) à = p-value < 0,001.
 B) Mesures de rETR entre les différentes souches. Les abréviations et la normalisation sont identiques à (A). C) Rapports des φPSII entre le mutant hcf101 et le sauvage, en TAP et TMP.

3. Étude de la protéine « NifU-like protein » (NFU1) et de son rôle dans la cellule

En plus d'HCF101, les protéines NFU sont également des protéines de transfert de centres 4Fe-4S au sein du chloroplaste. Si 3 isoformes coexistent au sein de l'organelle chez *A. thaliana*, seules deux isoformes, NFU1 et NFU2, sont présentes dans le chloroplaste chez *C. reinhardtii*. Les protéines NFU fixent le cofacteur métallique au sein de dimères à l'aide d'un couple de cystéines présentes au sein d'un motif CXXC (Roland et al, 2020). L'isoforme NFU1 de *C. reinhardtii* possède cependant un domaine supplémentaire avec un motif GIY-YIG situé à l'extrémité N-terminale et retrouvé dans certaines endonucléases. Cette particularité rend cette protéine particulièrement intéressante à étudier. Des résultats concernant la fonction de cette protéine ont déjà été obtenus au laboratoire (Bruckert, 2021; Pryzbyla-Toscano, 2022, non publié). Ils indiquent que NFU1 est nécessaire pour assurer l'insertion de centres 4Fe-4S vers des protéines actives à l'obscurité (dark protochlorophyllide oxydoréductase, DPOR) ou en anoxie (hydrogénase, par exemple) chez *C. reinhardtii*.

Au cours de ce travail, j'ai caractérisé trois souches pour lesquelles les mutants *nfu1-1* et *nfu1-2* ont été complémentés avec une version tronquée du gène *NFU1*, dépourvue du domaine endonucléase. J'ai également poursuivi les analyses physiologiques de l'ensemble des mutants en conditions de stress.

3A. Caractérisation biochimique et physiologique de mutants *nfu1*

3A.I. Caractérisation de souches complémentées avec une version tronquée de NFU1 en conditions oxiqes et anoxiques

Dans ce travail, deux mutants insertionnels issus de la collection de mutants CLiP (Li et al., 2019) et affectés dans le gène *NFU1* ont été utilisés. Il s'agit de la souche *nfu1-1*, mutée entre la 5'-UTR et le premier exon, et de la souche *nfu1-2*, mutée dans le premier intron (**Fig. 23A**). A partir de ces deux mutants, quatre souches complémentées ont été générées. Il s'agit d'une souche diploïde complémentée par croisement (*nfu1-1C*) à partir du fond génétique *nfu1-1*, qui exprime le gène sauvage. Deux autres souches complémentées ont été obtenues par transformation avec une forme du gène tronquée de sa partie codant pour le domaine endonucléase et sont nommées *nfu1-1C-Endo 1* et *nfu1-1 C-Endo 2*. Dans ce cas, la séquence est exprimée sous contrôle du promoteur, de la région 5'UTR et de la séquence d'adressage de PsaD et du terminateur *FDX1*. Une dernière souche complémentée a été obtenue par transformation du mutant *nfu1-2* avec la même version de *NFU1* dépourvu de la séquence codant le domaine endonucléase et est nommée *nfu1-2C-Endo 1* (Pryzbyla-Toscano et Remacle, non publié) (**Tableau 1**). L'étude de ces lignées doit permettre de comprendre l'importance du domaine endonucléase pour la fonction de NFU1, sachant que celui-ci n'étant pas capable de cliver de l'ADN double brin, testé avec l'ADN du phage lambda, ou des ARN de *Chlamydomonas* (Pryzbyla-Toscano, non publié).

Nom de la souche	Forme de NFU1 présente
CLIP	
<i>nfu1-1C</i>	
<i>nfu1-1</i>	/
<i>nfu1-1C-Endo 1</i>	
<i>nfu1-1C-Endo 2</i>	
<i>nfu1-2</i>	/
<i>nfu1-2C-Endo 1</i>	

Tableau 1. Liste des souches de *C. reinhardtii* disponibles pour étudier la fonction de NFU1. En jaune, domaine NFU fonctionnel ; en orange, domaine NFU dégénéré ; en vert, domaine endonucléase à motif GIY-YIG de fonction inconnue.

La première étape a été de vérifier l'adressage chloroplastique de la version tronquée de NFU1 (poids moléculaire théorique de 13 kDa) chez les mutants complémentés. L'analyse par western blot de fractions chloroplastiques a confirmé la présence d'une bande à 13 kDa, qui n'est pas visible dans les extraits chloroplastiques des souches mutantes ou sauvage (**Fig. 23B**). Il est à noter que la bande correspondant à la protéine NFU1 pleine longueur est bien visible à 55 kDa chez la souche sauvage mais pas chez les souches mutantes.

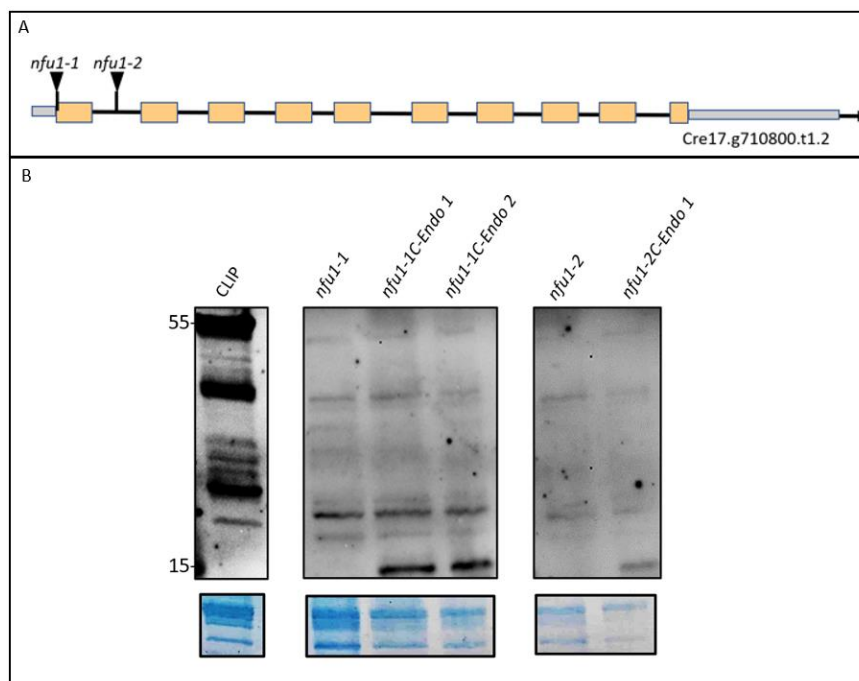


Figure 23. Présence de la protéine NFU1 sous sa forme tronquée dans le chloroplaste des transformants possédant la version tronquée de la protéine A) Représentation schématique du gène codant pour NFU1. Les flèches indiquent les positions des cassettes d'insertion. B) Présence de la protéine NFU1 sous sa forme tronquée dans le chloroplaste des différentes souches (*nfu1-1C-Endo 1*, *nfu1-1C-Endo 2*, *nfu1-2C-Endo 1*). 15 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits. Les anticorps étaient dirigés contre la protéine NFU1. Les membranes ont été exposées 80 sec de façon à détecter le signal à 13 kDa.

Ainsi, les mutants complémentés ont pu être utilisés pour des analyses physiologiques plus poussées. Dans un premier, j'ai étudié les souches mutantes affectés dans le gène *NFU1* (*nfu1-1* et *nfu1-2*), la souche complémentée (*nfu1-1C*) et les transformants exprimant la forme tronquée de la protéine dans des conditions de croissance en anoxie, afin d'induire les voies métaboliques de fermentation. Pour ce faire, les souches cultivées à la lumière en milieu TAP (acétate) en phase exponentielle ont été placées en boîte à gants et à l'obscurité et le niveau d'O₂ a été abaissé à 3% (contre 21% en conditions oxygènes). Après 1 heure, les cellules ont été lysées et les extraits protéiques analysés par western blot. On constate que les signaux correspondant aux protéines HYDA1 (47 kDa) et PFR1 (130 kDa) sont absents ou très faiblement détectés chez les mutants *nfu1-1* et *nfu1-2*, tandis que des signaux d'intensité équivalente à ceux présents chez la souche sauvage ont été détectés chez la souche complémentée (*nfu1-1C*) (**Fig. 24A**). Le signal correspondant à HYDA1 est absent chez les transformants complémentés avec une version tronquée (**Fig. 24B**). Les tentatives de détection de PFR1 chez ces souches n'ont pas abouti. Ces résultats indiquent que la présence d'une forme tronquée de la protéine NFU1 ne rétablit pas le phénotype sauvage. Le domaine endonucléase semblerait donc requis pour la fonction de transfert de centre Fe-S, en particulier vers HYDA1.

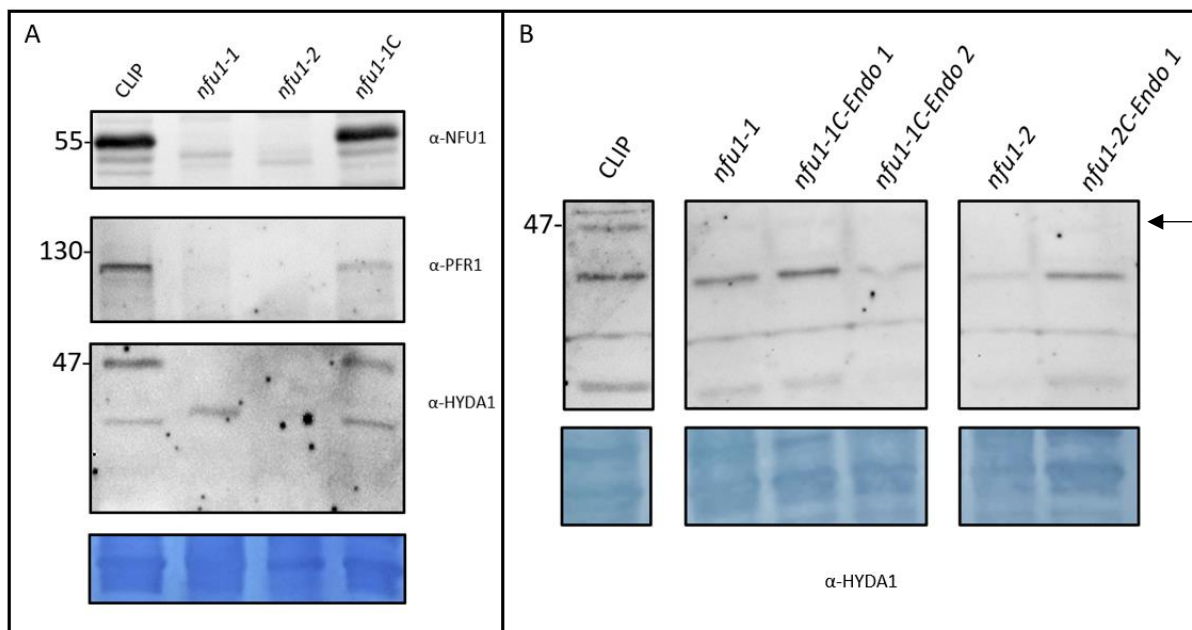


Figure 24. Effet de la mutation dans le gène *NFU1* sur les protéines du métabolisme fermentatif. A) Western blots sur les souches sauvage, mutantes et complémentées. CLIP = sauvage, *nfu1-1/2* = mutants, *nfu1-1C* = souche complémentée diploïde dans le fond génétique *nfu1-1*. B) Western blots sur les souches sauvage, mutantes et transformées, exprimant la version courte de *NFU1*. Même abréviation et *nfu1-1/2C-Endo* = transformants exprimant la forme tronquée de *NFU1* dans les fonds génétiques *nfu1-1* et *nfu1-2*. Les poids moléculaires sont inscrits à gauche, en kDa. Les anticorps utilisés sont notés près de leur figure respective. Les membranes ont été colorées au bleu de Coomassie et servent de témoin de chargement.

3A.II. Étude des mutants *nfu1* après une période de de croissance à l'obscurité en hétérotrophie suivie d'une période d'anoxie

Des données antérieures ayant montré que la perte de NFU1 impacte l'algue en conditions d'anoxie ou de croissance à l'obscurité en conditions oxiqes (hétérotrophie), ces deux conditions ont été combinées. Les algues (CLiP, *nfu1-1* et *nfu1-1C*) ont été cultivées 7 jours à l'obscurité et l'anoxie a ensuite été induite pendant 1h (3% d'O₂). Les cellules ont été récoltées puis lysées pour des analyses de protéomiques quantitatives effectuées dans le laboratoire du Dr. Vertommen (UCLouvain). La méthode utilisée dite du Tandem Mass Tag labelling ("TMT labelling") permet d'étudier l'abondance relative de protéines entre différents échantillons en fixant de manière covalente une molécule rapportrice. L'abondance des protéines a été analysée de cette façon en comparant 1 à 1 les trois souches. Un total de 5465 protéines ont été détectées dans les différents extraits (**Fig. 25**). Pour considérer une variation d'abondance de protéine comme significativement différente, un log₂FC supérieur ou inférieur à 1 et une padj value <0,05 ont été considérés. Avec ces critères, il n'y a pas de différence entre la souche complémentée diploïde et la souche sauvage, ce qui confirme bien la complémentation totale (**Fig. 25**). Par contre, on constate que l'abondance de 11% des protéines est modifiée (en augmentation pour 100 protéines et en diminution pour 497 protéines) dans le mutant *nfu1-1* par rapport à la souche sauvage. Lorsque l'on compare la souche mutante et la souche complémentée, c'est près de 20% des protéines dont l'abondance change significativement (augmentation : 376, diminution : 695).

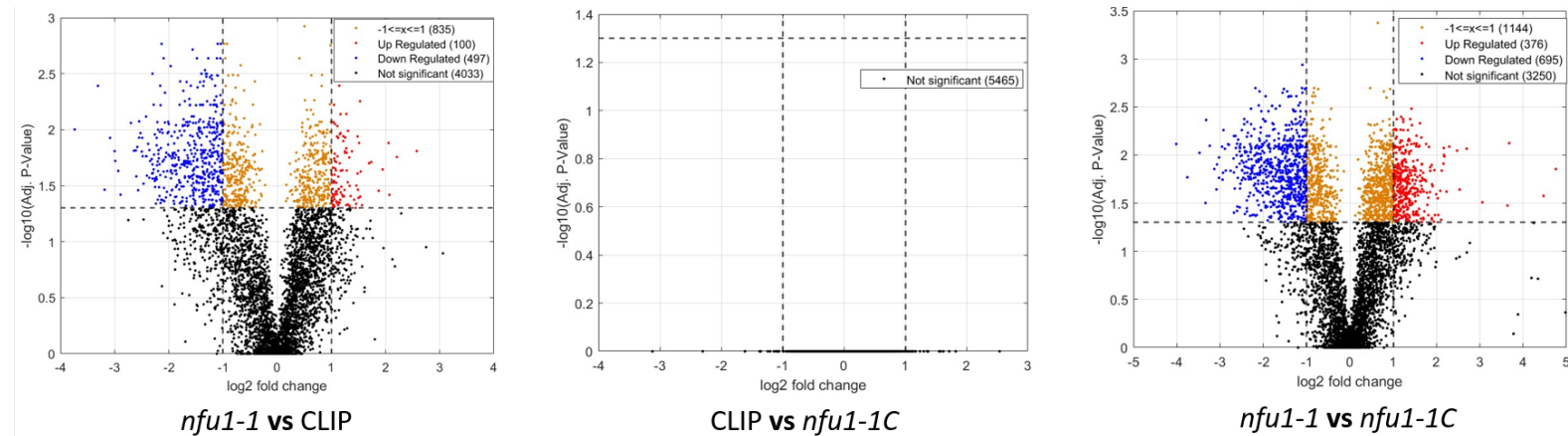


Figure 25. L'abondance de certaines protéines varie dans les conditions de culture "obscurité + anoxie" chez le mutant *nfu1-1*. Volcano plots comparant l'abondance relative des protéines entre les différentes souches. En bleu, protéines dont l'abondance relative est diminuée ($\log_2FC < -1$, $padj\ value < 0,05$); en rouge, protéines dont l'abondance relative est augmentée ($\log_2FC > 1$, $padj\ value < 0,05$); en jaune, protéines dont le \log_2FC est compris entre -1 et +1 ($padj\ value < 0,05$); en noir, non significatif. CLiP = sauvage, *nfu1-1* = mutant, *nfu1-1C* = complémenté.

Parmi les protéines dont l'abondance varie, on observe une augmentation significative de l'abondance de certaines protéines de la machinerie SUF ainsi que du métabolisme fermentatif (HYDA/EF/G) chez le mutant *nfu1-1* (**Fig. 26**). Ainsi, l'abondance des protéines HYDA1, HYDEF, de SUFB et de HCF101 est augmentée d'un facteur 2 dans le mutant, comparé au sauvage ($\log_2FC = 1,22/1,08/1,12/1,25$, $padj\ value = 0,011/0,036/0,026/0,016$, respectivement). De la même façon, la quantité de NFU2 et de SUFE est 1,6 fois plus grande dans le sauvage ($\log_2FC = 0,86/0,77$, $padj\ value = 0,124/0,038$, respectivement).

Finalement, l'abondance des protéines SUFD et HYDG est 1,3 plus importante dans le mutant que dans le sauvage ($\log_2FC = 0,57/ 0,48$, $padj\ value = 0,042/0,035$) (**Fig. 26**). De manière surprenante, on remarque également qu'il resterait environ 30% de NFU1 chez le mutant *nfu1-1*. Notons toutefois que cette valeur est à la limite du seuil statistique ($padj\ value = 0,053$).

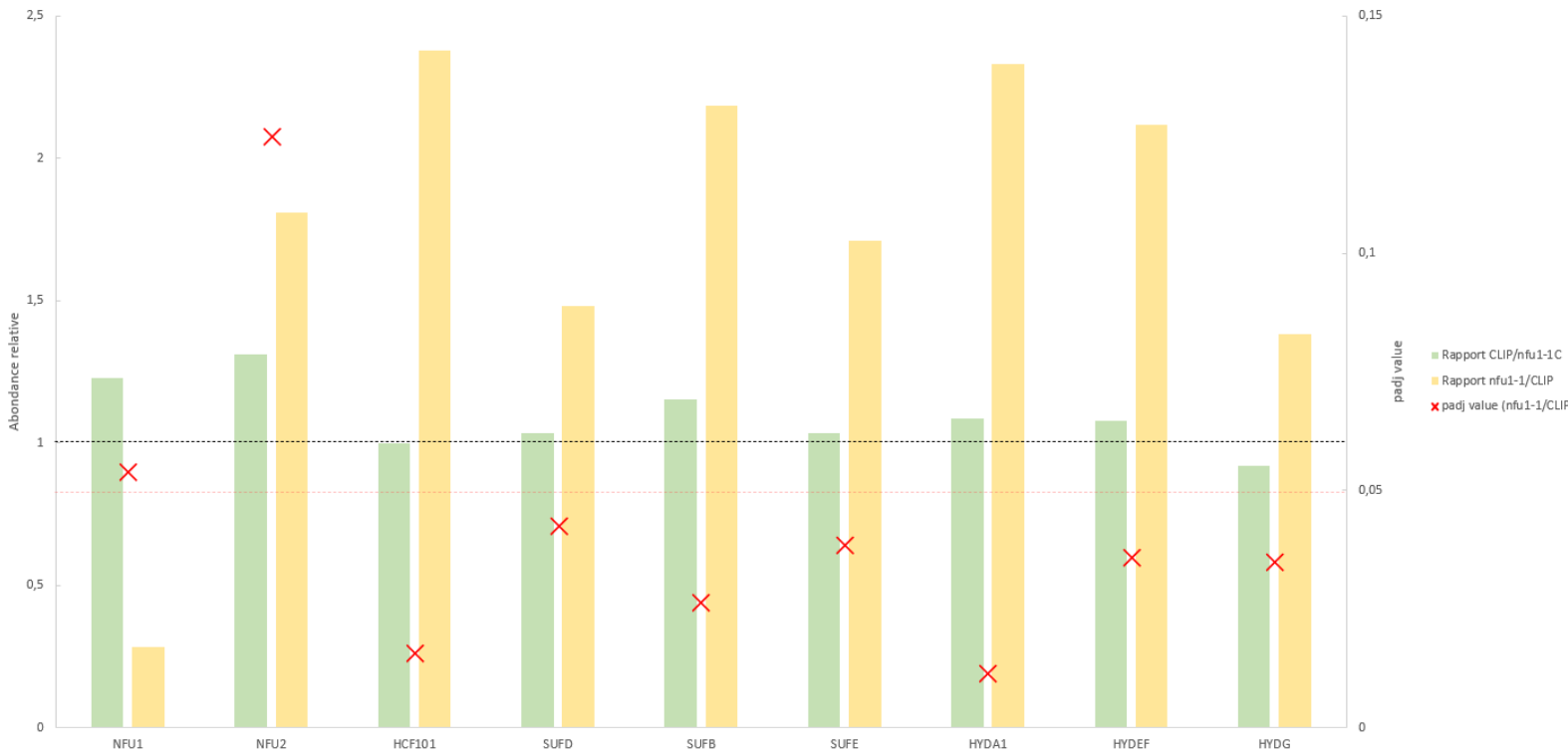


Figure 26. Abondance relative des protéines de la machinerie SUF et de protéines impliquées dans la fermentation comparées à la souche sauvage. En jaune, rapport mutant versus sauvage et en vert le rapport sauvage versus complémenté. CLIP = sauvage, *nfu1* = mutant, *nfu1-1C* = complémenté. La barre noire représente un rapport égal à 1. La barre rouge représente le seuil de signification statistique (0,05). Les croix représentent les valeurs *p* ajustées (*padj value*) pour le rapport *nfu1/CLIP*. L'axe de gauche représente les valeurs d'abondances relatives et celui de droite les *padj value*.

3A.II.1. Investigation de la présence de la protéine NFU1 chez les mutants

Même si la détection de NFU1 par 'TMT labelling' est la limite du seuil statistique (**Fig. 26**), il a été décidé de réinvestiguer sa présence chez les mutants car la quantité trouvée chez *nfu1-1* (30% de la souche sauvage) est non négligeable et surprenante compte-tenu des résultats de western blot (**Fig. 23**) et de l'emplacement de la cassette d'insertion dans le gène (**Fig. 22A**).

Dans un premier temps, la localisation chloroplastique de la protéine NFU1 a été vérifiée par western blots à partir de fractions enrichies en chloroplastes ou en mitochondries identiques à celles utilisées pour détecter HCF101. Les marqueurs chloroplastique et mitochondrial (FNR et AOX) donnent donc les mêmes signaux et indications. Avec l'anticorps anti-NFU1, un signal intense à 55 kDa est détecté dans la fraction chloroplastique et absent de la fraction mitochondriale (**Fig. 27**), confirmant la présence de NFU1 uniquement dans le chloroplaste de la microalgue.

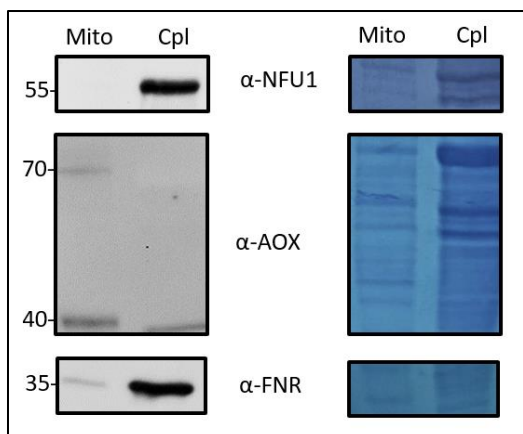


Figure 27. La protéine NFU1 est localisée dans le chloroplaste. 20 μ g de protéines de la souche sauvage ont été déposés dans chaque puits. Les anticorps utilisés sont indiqués au centre de la figure : AOX = oxydase alternative, FNR = ferrédoxine-NADP⁺-oxydoréductase, Mito = mitochondries, Cpl = chloroplastes.

Afin de comparer l'abondance de la protéine NFU1 dans les différentes souches, une série de dilution d'un échantillon de chloroplastes de la souche sauvage a été analysée par western blot. Des extraits chloroplastiques de souches mutantes ont aussi été analysés, en déposant des quantités correspondant à 100% et 200% de celle du sauvage. Chez la souche sauvage (CLiP), le signal NFU1 décroît en fonction de la quantité déposée, comme attendu (Fig. 28). L'intensité du signal dans les mutants *nfu1-1* et *nfu1-2* baisse considérablement comparée au sauvage : il est absent chez *nfu1-1* et apparaît avec moins de 10% d'intensité comparé au sauvage chez *nfu1-2* (Fig. 28).

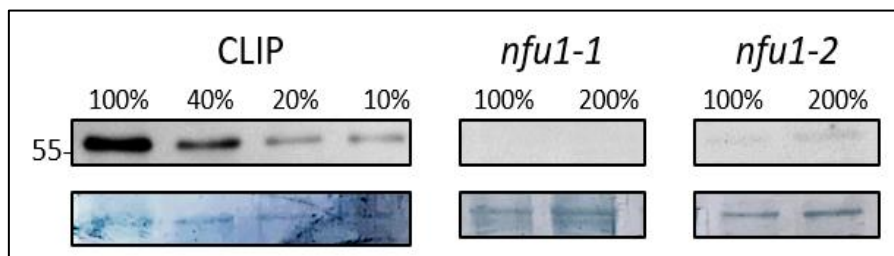


Figure 28. Abondance de la protéine NFU1 chez les souches sauvage et mutantes. A) Détermination de la présence et du niveau relatif de protéine NFU1 chez les différentes souches mutantes versus celui du sauvage. 100% = 5 μ g de protéines chloroplastique, CLiP = souche sauvage, *nfu1-1* et *nfu1-2* = souches mutantes pour NFU1. Les poids moléculaires sont indiqués en kDa. La membrane a été colorée au bleu de Coomassie comme contrôle de chargement.

Puisque l'isolement de chloroplastes nécessite de grandes quantités de cellules, il faut noter que les analyses présentées ci-dessus ont été réalisées à partir de fractions chloroplastiques isolées de cellules cultivées en milieu TAP et à la lumière, alors que les analyses par 'TMT labelling' ont été réalisées à partir de cultures à l'obscurité ayant subi un transfert en anoxie. Néanmoins, la détection NFU1 par l'analyse de 'TMT labelling' chez les mutants reste difficile à comprendre, et des analyses par western blot devront également être réalisées dans les mêmes conditions.

3A.II.2. Activité hydrogénase chez le mutant *nfu1-1* après une période de croissance à l'obscurité suivie d'une période d'anoxie

Du fait de la discordance entre les analyses en 'TMT labelling' et les analyses en western blots pour la protéine NFU1, j'ai d'abord cherché à vérifier la présence de la protéine HYDA1 par western blot en cultivant les souches une semaine à l'obscurité puis en les soumettant à une heure d'anoxie (**Fig. 29A**). Dans ces conditions, la protéine HYDA1 est détectée à des niveaux équivalents dans le mutant *nfu1-1* et dans la souche sauvage. Combiné à l'absence d'HYDA1 en conditions d'anoxie à la lumière (**Fig. 24**), ces résultats suggèrent que la phase de croissance à l'obscurité a permis l'expression d'HYDA1. Par contre, cela ne permet pas de savoir si la protéine est active et possède son centre Fe-S. Ainsi, la production d'hydrogène a ensuite été mesurée chez les souches sauvage et mutante *nfu1-1* dans les mêmes conditions.

Dans ce cas, l'anoxie a été induite en utilisant un système catalase (CAT)/glucose oxydase (GOX)/glucose. La GOX catalyse l'oxydation du glucose (β -D-glucose) en D-glucono- δ -lactone puis en acide gluconique, en consommant l'oxygène du milieu. La présence de catalase permet d'éliminer le peroxyde d'hydrogène produit lors de la réaction. C'est une méthode de mise en anoxie plus rapide que celle utilisant la boîte à gants. Pour la mesure de l'activité hydrogénase, les algues sont lysées et mises en présence de méthyle viologène et de dithionite de sodium qui servent de donneur d'électrons aux hydrogénases. Dans ces conditions, la production d'hydrogène des cellules mutantes *nfu1-1* représente 42% de celle de la souche sauvage (**Fig. 29B**).

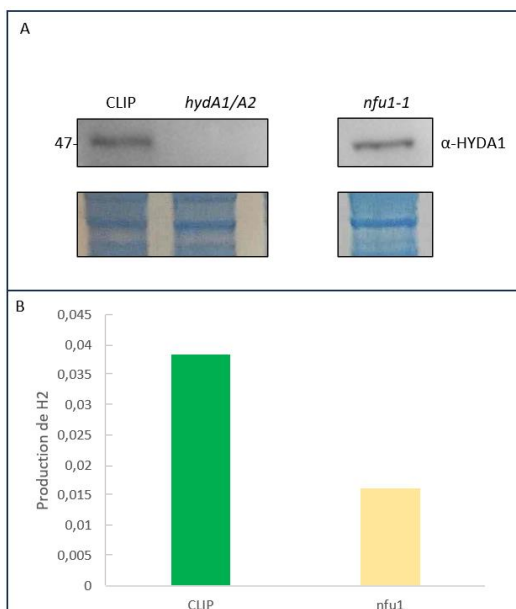


Figure 29. HYDA1 est encore présente et active dans le mutant *nfu1-1*, dans les conditions "obscurité + anoxie". A) Présence de HYDA1 dans le mutant *nfu1-1* dans les conditions de culture obscurité/anoxie. CLIP = sauvage, *nfu1-1* = mutant affecté dans le gène NFU1, *hydA1/A2* = mutant affecté dans les deux hydrogénases. Le poids moléculaire est inscrit à gauche, en kDa. Les anticorps utilisés sont notés à droite de la figure. B) Production d'hydrogène en nmol de H₂* μ g de chlorophylle⁻¹*min⁻¹, valeurs obtenues sur 1 expérience.

L'activité hydrogénase étant faible et l'expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois, il sera nécessaire de répéter ces analyses.

3A.II.3. Étude de l'enzyme DPOR chez les mutants *nfu1* après culture d'une semaine à l'obscurité

La DPOR est une enzyme hétéro-octamérique catalysant la réduction d'une double liaison de la molécule de protochlorophyllide *a* en chlorophyllide *a*, précurseur de la chlorophylle *a* (Nomata et al, 2014). Cette réaction dépend notamment de la présence de 4 centres 4Fe-4S au sein du complexe : 2 fixés par des hétérodimères ChlB-ChlN et 2 fixés par des dimères de ChlL (Muraki et al., 2010). Les données préalables ont montré que les mutants *nfu1-1* et *nfu1-2* sont jaunes à l'obscurité et accumulent la protochlorophyllide *a*, le substrat de la DPOR, indiquant que la DPOR n'est pas fonctionnelle en absence de NFU1 (Pryzbyla-Toscano, non publié ; Remacle, non publié).

L'analyse en 'TMT labelling' a montré que les sous-unités de la ChlB et ChlN de la DPOR sont présentes dans le mutant *nfu1-1* sans modification significative (**Fig. 30**) mais aucun peptide provenant de ChlL n'a été détecté. Or, c'est cette sous-unité qui est absente chez la plupart des mutants « jaunes à l'obscurité » de *Chlamydomonas* caractérisés jusqu'à présent (Cahoon and Timko, 2000). Des anticorps dirigés contre la sous-unité ChlL de *Leptolyngbya boryana* (anticorps fourni par le Prof. Y. Fujita, Japon) ont donc été utilisés pour des analyses par western blot sur des extraits protéiques provenant d'algues cultivées à l'obscurité pendant 1 semaine. Un signal à 32 kDa (poids moléculaire théorique de ChlL) a été détecté pour tous les échantillons, autant ceux ayant une copie sauvage de *NFU1* que ceux des souches mutantes, sauf pour le mutant *chlB*, muté dans le gène chloroplastique codant pour la protéine ChlB (**Fig. 30**).

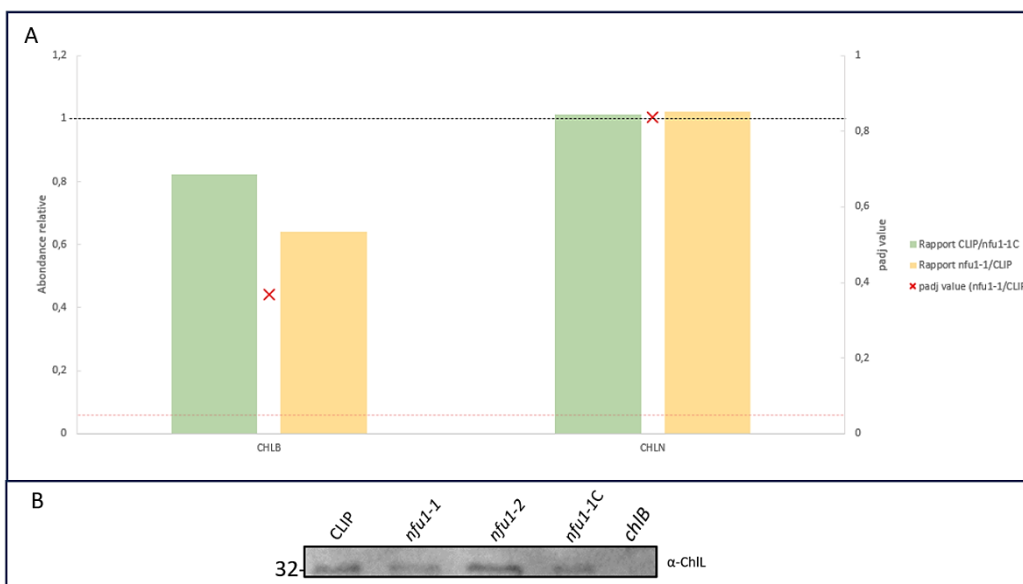


Figure 30. Détermination de la présence des sous-unités de la DPOR chez les différentes souches. A) Abondance relative des sous-unités N et B de la DPOR comparées au sauvage. En jaune, rapport mutant versus sauvage et en vert le rapport complété versus sauvage. La barre noire représente un rapport égal à 1. La barre rouge représente le seuil de signification statistique (0,05). Les croix représentent les valeurs *p* ajustées (*padj value*) pour le rapport *nfu1*/CLIP. L'axe de gauche représente les valeurs d'abondances relatives et celui de droite les *padj value*. B) Western blot. Présence de la sous-unité ChlL de la DPOR chez les différentes souches. CLIP = sauvage, *nfu1-1/2* = mutants, *nfu1-1C* = souche complétée diploïde, *chlB* = mutant dans le gène CHLB.

Dès lors, il semblerait que les différentes sous-unités de la DPOR s'accumulent à des niveaux équivalents chez les souches mutantes pour NFU1 et sauvage. Il est possible que l'absence de centre Fe-S ne conduise pas à une déstabilisation et donc à une dégradation de ces protéines, lorsqu'elles sont sous forme apo-protéines. Pour appuyer cette conclusion, il sera néanmoins nécessaire de vérifier l'activité de la DPOR dans ces conditions (obscurité + anoxie) en mesurant l'accumulation de la protochlorophyllide *a*.

6. Discussion

Une phase préparatoire de ce travail a été consacrée à l'optimisation d'un protocole d'isolement des chloroplastes chez *C. reinhardtii*. Se basant sur la méthode préalablement établie par Mason et al., 2006, l'incorporation d'inhibiteurs de protéases a permis une amélioration nette de la qualité des échantillons, en éliminant le clivage de protéines, détecté dans le cas de NFU1.

L'objectif de ce travail consistait à élucider les fonctions attribuées aux protéines à centres 4Fe-4S HCF101 et NFU1 chez la microalgue verte, par l'étude de mutants affectés dans les gènes correspondants.

Précédemment, HCF101 avait été identifiée comme la protéine responsable du transfert des centres Fe-S vers le photosystème I (PSI), interagissant spécifiquement avec PsaC (Lezhneva et al, 2004). Des expériences de mutagenèse dirigée avaient révélé l'importance de trois cystéines dans la liaison des centres Fe-S chez *A. thaliana*. Parmi ces cystéines, une seule était conservée chez *C. reinhardtii*. Pour éclaircir cette divergence, j'ai prédit la structure de la protéine HCF101 chez l'algue verte et l'ai comparée à celle de la plante terrestre. Cette analyse a mis en évidence une séparation spatiale des résidus proposés chez *A. thaliana* et la proximité d'autres cystéines, pouvant potentiellement accueillir un centre Fe-S. Cette hypothèse a été renforcée par la constatation que, après un alignement de séquences multiples, les cystéines identifiées comme pouvant coordonner un centre Fe-S étaient conservées chez d'autres organismes de la lignée. Le même alignement de séquences a aussi révélé des différences entre les groupes phylogénétiques. Par exemple, des cystéines très proches exclusivement présentes chez les Colpodellida (C284 et C281 chez *C. velia* ; C300 et C297 chez *V. brassicaformis*), compensent probablement la perte d'autres cystéines qui sont conservées dans la lignée verte.

La protéine HCF101 est conservée dans la plupart des organismes photosynthétiques. C'est une P-loop NTPase et des protéines de la même classe sont aussi retrouvées dans la machinerie cytoplasmique et mitochondriale de synthèse de centre Fe-S ainsi que chez les bactéries et les archées. Elles sont également capables de lier des centres Fe-S (Bych et al., 2008; Leipe et al., 2002; Pandey et al., 2019). Parmi ces protéines, les protéines de la machinerie cytoplasmique nucleotide-binding protein 35 (NBP35) et Cytosolic Fe-S cluster assembly factor (Cfd1) forment un hétéro-dimère de ~600 acides aminés chez la levure capable de coordonner un centre Fe-S et d'hydrolyser l'ATP ; la fixation du nucléotide triphosphate serait nécessaire à la fixation d'un centre Fe-S par le complexe, Cfd1 étant la sous-unité capable de lier un premier centre Fe-S avant qu'un second puisse se fixer à NBP35 (Camire et al., 2015; Grossman et al., 2019b, 2019a). La présence de ces P-loop ATPases à centres Fe-S a été analysée chez différentes lignées eucaryotes et leur adressage intracellulaire a été étudié par le biais de leur séquence (Pyrih et al., 2021). En grande majorité, celles de la machinerie cytoplasmique sont conservées. Par contre des différences apparaissent pour la protéine de la machinerie mitochondriale (Ind1) qui est absente chez toutes les algues à plastes complexes (Pyrih et al., 2021). Le gène codant pour la protéine HCF101 a, quant à lui, été retrouvé chez tous les eucaryotes photosynthétiques mais aussi chez les organismes non-photosynthétiques comme les

apicomplexes (Pyrih et al., 2021). Encore plus étonnant, chez une partie des organismes ne possédant pas Ind1, une seconde version de HCF101 a été retrouvée comme étant adressée dans la mitochondrie chez les Straménopiles, les Alvéolates, les Rhyzidiates, les Cryptistes et les Haptistes ; les gènes codants pour ces protéines seraient des paralogues qui auraient évolué depuis un gène ancestral obtenu à partir d'un transfert de gène latéral depuis une bactérie plutôt que par transfert de gène endosymbiotique (Pyrih et al., 2021). Afin de compléter les analyses *in silico* de mon travail, il serait pertinent de générer un alignement de séquences multiples qui reprendrait les protéines NBP35-like cytoplasmiques, mitochondriales et chloroplastiques afin de déterminer la conservation des différents domaines de ces protéines, notamment le domaine P-loop ATPase. La protéine HCF101 possédant des domaines supplémentaires à Ind1, NBP35 et Cfd1, il serait intéressant de comparer ces domaines entre les formes mitochondriales et chloroplastiques de cette protéine ainsi que de comparer les prédictions de structures; AlphaFold (Jumper et al., 2021) pourrait être utilisé à cet effet. En fonction des résultats de ces analyses *in silico*, l'hypothèse selon laquelle HCF101 pourrait dimériser, comme semble le suggérer les résultats, devrait être investiguée de façon plus approfondie. De la même façon, comme pour l'hétérodimère NBP35-Cdf1 (Camire et al., 2015), la capacité de HCF101 à hydrolyser l'ATP devrait être étudiée.

De plus, en utilisant les données transcriptomiques générées lors de cycles jour/nuit (Strenkert et al., 2019), le schéma de coexpression du gène *HCF101* avec divers gènes encodant des protéines contenant des centres Fe-S a été mis en évidence. Notamment, les gènes codant pour les sous-unités du PSI étaient exprimés de manière concomitante avec *HCF101*, environ 3 heures après la transition de l'obscurité à la lumière. Des analyses comparatives d'expression génique ont révélé que le phénomène de coexpression s'étendait au-delà des gènes liés au PSI. Par exemple, les gènes tels que *DNJ14*, *HDS1*, *IDS1*, *TCR* et *THIC* présentaient des pics d'expression à 3 heures après l'exposition à la lumière. Cela suggère une localisation potentielle simultanée des produits protéiques dans le même compartiment cellulaire. Étant donné leur dépendance aux centres Fe-S, il est plausible que HCF101 facilite le transfert de centres Fe-S vers ces protéines. D'autres gènes ont posé des défis plus complexes pour l'analyse. Notamment, le gène codant pour la ferrédoxine-thiorédoxine réductase (*FTR*), malgré les suggestions que la protéine soit une cible de HCF101 (Leznheva et al., 2004), affichait un pic d'expression après 5 heures d'exposition à la lumière (**Fig. 31**). Néanmoins, il convient de noter que le pic d'expression du gène *FTR* à la transition J/N coïncide avec celui de *NFU1* (**Fig. 31**).

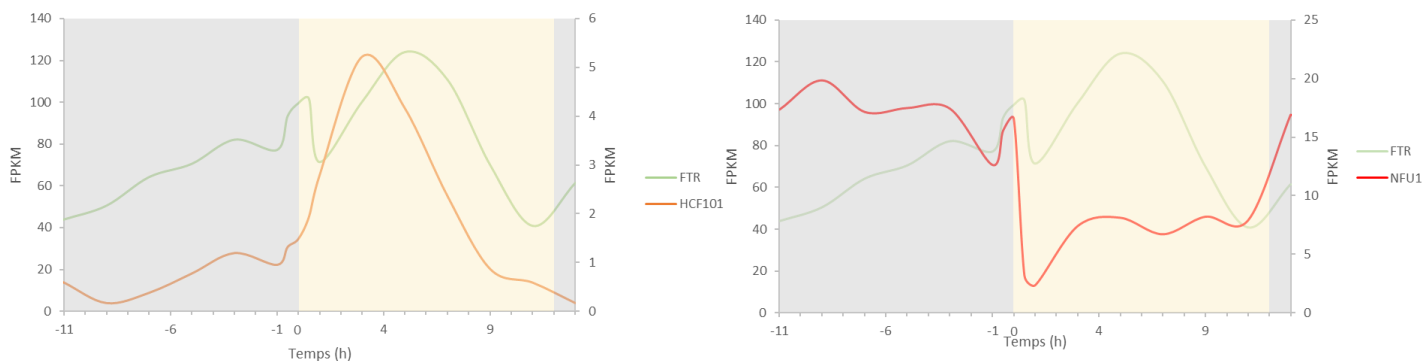


Figure 31. FTR est coexprimé avec les gènes codant pour différentes protéines de transfert de centre Fe-S en conditions de cycle jour-nuit. Le temps, en heure, est séparé en 2 phases : en gris en période d'obscurité et en jaune en période de lumière. Les ordonnées sont en "Fragments Per Kilobase Million", celle de gauche correspond aux mesures de FTR, celle de droite correspond aux mesures de HCF101 (orange) ou NFU1 (en rouge).

À la suite de ces premières constatations, une approche expérimentale *in vitro* a été initiée pour étudier HCF101. Cette approche visait à produire des anticorps purifiés nécessaires pour étudier le mutant *hcf101* et pour mener des expériences de capture de partenaires potentiels de la protéine HCF101. La production de la protéine recombinante a eu lieu dans un système hétérologue, *E. coli*, dans le laboratoire du Professeur Rouhier (Université de Lorraine) dans lequel j'ai passé 15 jours en juin. La protéine purifiée sous sa forme apo a été attachée de manière covalente à une colonne CN-Br sépharose puis un lysat cellulaire a été déposé sur la colonne. Cependant, les tentatives d'établir des interactions protéine-protéine ont rencontré des obstacles. Les protéines partenaires devaient se lier à la protéine HCF101 immobilisée tandis que d'autres allaient se fixer de manière aspécifique aux billes de sépharose ; la colonne à vide devait permettre de discriminer les protéines qui se liaient de façon aspécifique. Une augmentation de la concentration en sel a permis d'éluer ces protéines. Les protéines éluées pour des concentrations de sel équivalentes ont été comparées entre deux types de colonnes générées : l'une avec la protéine HCF101 attachée et l'autre saturée avec un tampon Tris à 30 mM, pH 8. Les protéines apparaissant exclusivement dans les fractions de la colonne liée à HCF101 étaient potentiellement considérées comme des candidats partenaires. Néanmoins, le nombre élevé de protéines éluées suggère qu'il n'y a pas eu d'interaction spécifique. Il est en effet improbable que HCF101 puisse interagir avec plus de 500 protéines, dont certaines ne sont pas chloroplastiques. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce résultat : les concentrations de sel choisies (200 mM et 1 M) pourraient être trop élevées pour l'interaction entre HCF101 et ses partenaires. Il a également été démontré que de telles expériences sont plus efficaces lorsque la protéine transférant le centre Fe-S était sous sa forme holo (Carter et al., 2021), alors que je n'avais accès qu'à la forme apo de HCF101. En effet, une expérience de capture de partenaires entre la protéine d'*Escherichia coli* SufA et le complexe d'échafaudage SufBC₂D a montré que les partenaires interagissaient plus fortement si l'un était sous-forme holo : la protéine apo-SufA, protéine cible, était fixée sur une colonne d'affinité (IMAC), tandis que le complexe sous forme holo, capable de transférer son centre Fe-S, servait de proie ; cette méthode a permis de montrer l'interaction de SufA avec le complexe d'échafaudage (Chahal et al., 2009). Ainsi, diverses approches sont envisageables pour

reproduire cette expérience de capture de partenaire. Une gamme plus large de concentrations de sel pourrait permettre de distinguer les interactions directes avec la colonne de celles avec la protéine. Travailler dans des conditions anaérobies pourrait également être essentiel pour maintenir la forme holo de HCF101, une fois que celle-ci serait purifiée, sur la colonne CN-Br sépharose, favorisant ainsi les interactions avec ses partenaires. Une fois que les partenaires potentiels seront identifiés, d'autres expériences d'interactomique, telles que le test du double hybride en levure (Y2H), la complémentation bimoléculaire par fluorescence (BiFC) et l'analyse d'interaction *in vitro* avec des protéines recombinantes, pourraient être entreprises pour valider ces interactions.

Un mutant, désigné *bef101*, était disponible au sein du laboratoire. Chez *A. thaliana*, un mutant *bef101* nul n'est pas capable de croître à moins d'être cultivé sur un milieu additionné de sucrose. Cette condition ne suffit pas à supprimer un retard de croissance du mutant qui affichera aussi un phénotype chlorotique (Lezhneva et al., 2004). Chez la microalgue, le mutant *bef101* est viable, qu'il soit cultivé en présence d'acétate ou sur milieu minimal (Dubois and Remacle, 2022). Comme la cassette d'insertion se trouve au sein du dernier intron de *HCF101*, la traduction partielle de la protéine n'est pas à exclure. J'ai d'abord confirmé que la protéine était localisée au niveau du chloroplaste de la microalgue. Ensuite, j'ai montré par western blot que le mutant présentait des niveaux très réduits de la protéine. Une étude du niveau de transcription du gène serait intéressante : le gène étant transcrit en dépit de la mutation, le dysfonctionnement pourrait résider dans l'épissage du dernier intron, conduisant à une synthèse protéique limitée. Une hypothèse alternative serait que la protéine soit traduite sous forme légèrement tronquée, potentiellement affectant sa stabilité intracellulaire, en raison de la présence d'un codon STOP prématuré. Une analyse fine de la taille de la protéine pourrait être envisagée, par exemple en utilisant une concentration d'acrylamide de 10% et une migration plus longue, de façon à mieux séparer les protéines. Il serait aussi intéressant d'obtenir un autre mutant, soit par la méthode de CRISPR/Cas9 (Shin et al., 2016a) soit par la technique de RNA interference.

Une souche complétementée a été obtenue, la vitesse de croissance a été mesurée entre les différentes souches, mutante, sauvage et complétementée, dans deux conditions de culture : l'une contenant de l'acétate, et l'autre dans des conditions minimales. Les résultats ont révélé une altération de la vitesse de croissance en présence d'acétate chez le mutant *bef101*. En revanche, aucune variation significative n'a été observée en conditions minimales, où la croissance repose exclusivement sur la photosynthèse. En tenant compte de résultats réalisés chez *A. thaliana* (Lezhneva et al., 2004), le rapport entre les complexes PSI et PSII a été quantifié pour chaque souche. Le rapport demeurait semblable aux valeurs de référence (~1,1) (Polle et al., 2000) dans les souches sauvage et complétementée et diminuait de moitié chez le mutant, signalant un impact sur le PSI. Les analyses de western blots sur des échantillons de chloroplastes ont concordé avec ces observations en montrant une réduction notable de la sous-unité Psac du PSI chez le mutant. De cette concordance découle l'hypothèse plausible que la protéine HCF101 assure la fonction de transfert des centres Fe-S aux sous-unités du PSI, comme chez *A. thaliana*. La comparaison des vitesses de croissance pourra être effectuée

dans d'autres conditions de culture, par exemple en lumière forte, qui prend tout son sens quand on sait qu'il a déjà été montré que des gènes codants pour des protéines de la machinerie de synthèse de centre Fe-S peuvent être up-régulés en conditions de stress abiotique (Liang et al., 2014), mais aussi en cycle jour/nuit, dans du milieu suppléé en acétate ou non.

Considérant que la mutation impacte le PSI, des paramètres additionnels liés à la photosynthèse ont été évalués au niveau du PSII. Le rendement photosynthétique, traduisant l'efficacité de la conversion de l'énergie lumineuse, ainsi que la vitesse relative de transfert d'électrons dans la chaîne photosynthétique, ont été quantifiés. Les résultats ont indiqué de manière concluante que le mutant *hcf101* était désavantagé tant en présence d'acétate qu'en conditions minimales. Toutefois, il est à noter que cet effet était exacerbé en présence d'acétate. En utilisant les données relatives à la vitesse de transfert d'électrons (rETR), le rendement quantique de la photosynthèse à faibles intensités lumineuses a également été calculé, démontrant une intensification du phénotype mutant en présence d'acétate. Cette observation semble contre-intuitive. Sachant que HCF101 joue un rôle, a priori, central dans la maturation des sous-unités du PSI, on aurait pu s'attendre à ce que la présence d'acétate réduise l'écart entre le phénotype mutant et la souche sauvage. Une hypothèse pourrait être que l'algue mutante, en présence d'acétate, subit moins de stress, puisqu'une source de carbone organique est présente, ce qui diminue la pression sur le PSI. En revanche, en milieu minimal, la photosynthèse est essentielle. Il sera donc utile de mesurer le rapport PSI/PSII en conditions minimales. Dans cette optique, une surabondance des sous-unités du PSI ainsi que des protéines de transfert de centres 4Fe-4S, NFU1 et NFU2, pourrait être mise en place en milieu minimal, comme observé dans le cas du mutant *nfu1* pour les protéines de la machinerie SUF et de certaines enzymes de la fermentation en cas de culture prolongée en conditions hétérotrophes. Bien que la spécificité des interactions puisse être moindre comparée à celle avec HCF101, l'augmentation de la quantité des acteurs impliqués pourrait favoriser les échanges, potentiellement limitant le phénotype mutant, sans toutefois le restaurer complètement. Pour approfondir cette hypothèse, une expérience de TMT-labelling permettant la comparaison entre les deux conditions de culture (TAP et TMP) pourrait apporter des données en termes d'abondance protéique.

Les protéines NFU chez *C. reinhardtii* montrent des points communs et des différences avec celles de *A. thaliana*. La plante à fleurs possède 3 isoformes chloroplastiques : le simple mutant *nfu1* ne montre pas de phénotype marqué et un double mutant *nfu2/nfu3* est létal (Touraine et al, 2019). Chez *C. reinhardtii*, seules deux isoformes sont présentes dans le chloroplaste. L'isoforme NFU1 de *C. reinhardtii* possède un domaine endonucléase en N terminal, non retrouvé chez les plantes à fleurs et de fonction inconnue. NFU1 ne semble pas posséder un rôle essentiel dans la cellule : cela se reflète dans l'observation que les mutants *nfu1-1* et *nfu1-2* n'affichent ni retard de croissance ni défaut de photosynthèse dans des conditions de culture classiques (Ragnoli, 2022). Cependant, en conditions de croissance à l'obscurité (hétérotrophie), ces mutants sont jaunes contrairement à la souche sauvage qui reste verte. Cette absence de pigmentation est liée à un défaut dans la conversion de la protochlorophyllide *a* (Pchl *a*) en chlorophyllide *a* (Chl *a*), réaction catalysée par l'enzyme DPOR, qui réduit une double liaison carbone-carbone de la Pchl *a* (Scrutton et al.,

2012). La protéine NFU1 participe donc à la maturation des centres Fe-S de l'enzyme DPOR 1. Les mutants *nfu1-1* et *nfu1-2* présentent également un défaut dans le métabolisme de fermentation, illustré par une réduction/absence de protéines telles que HYDA1 et PFR1, des protéines incorporant des centres Fe-S, lorsque l'anoxie est induite après une croissance en lumière continue (Pryzbyla-Toscano, non publié).

Durant mon travail, les mutants *nfu1-1* et *nfu1-2* et des mutants complétés avec une version tronquée de NFU1, délétée du domaine endonucléasique ont été caractérisés. L'analyse a débuté par la vérification de la localisation chloroplastiques des protéines tronquées. Ces souches ont ensuite été soumises à des conditions d'anoxie après culture à la lumière. La présence de la protéine HYDA1 a été évaluée dans ces conditions, elle n'est pas détectée chez ces souches à version tronquée, tout comme chez les mutants complets correspondants *nfu1-1* et *nfu1-2*. Cette observation suggère que le domaine endonucléasique pourrait être impliqué dans le transfert des centres Fe-S par NFU1, expliquant ainsi l'absence de la protéine HYDA1. Le rôle du domaine à motif endonucléasique est probablement indirect dans cette fonction de transfert (stabilité de la protéine, interaction avec des partenaires) étant donné qu'il ne possède pas de site de liaison de centres Fe-S. Chez *A. thaliana*, la glutathion S-transferase S16 possède ce même domaine mais celui-ci est capable de cliver de l'ADN *in vitro* (Liu et al., 2013) et pourrait jouer un rôle dans la réparation de l'ADN (Kwon et al., 2010). Cependant, NFU1 ne possède pas les acides aminés qui ont été déterminés comme étant essentiels à la fonction endonucléase du domaine (Liu et al., 2013) ce qui suggère que le domaine a plutôt un rôle structural ou d'interaction avec des partenaires protéiques. Afin de tester cette hypothèse, des expériences de pull-down, *in vitro*, pourraient être effectuées en utilisant le domaine purifié comme appât.

Le mutant *nfu1-1* et les souches contrôles sauvage et complétée avec la version entière de *NFU1* ont été cultivés en conditions hétérotrophes pendant sept jours avant d'être soumis à l'anoxie, et une analyse de protéomique comparative par TMT-labelling a été réalisée. Cette approche a révélé que HYDA1 et ses facteurs d'assemblage (HYDG, HYDEF), ainsi que certains composants de la machinerie SUF, dont les protéines de transfert NFU2 et HCF101 étaient plus abondants chez le mutant *nfu1-1* en comparaison avec les niveaux des souches sauvage et complétée. Cette observation suggère une forme de compensation qui permet la maturation des protéines Fe-S nécessaires à la survie des algues, dans des contextes stressants et prolongés (croissance hétérotrophe suivie de l'anoxie). Ce type de mécanisme a déjà été renseigné : l'absence chez un mutant d'une protéase chloroplastique, DEG1C, peut induire des mécanismes de réponse aux stress qui compense naturellement la mutation (Theis et al., 2019). Au vu de ce résultat, j'ai mesuré l'activité hydrogénase dans ces conditions : la production d'hydrogène restait inférieure chez le mutant par rapport à la souche sauvage. Cette compensation demeure donc incomplète, les protéines de transfert NFU2 et HCF101 ne permettant probablement qu'un transfert partiel du centre 4Fe-4S à l'hydrogénase. Les mesures de production d'hydrogène devront être répétées car basées sur une seule expérience. Il est intéressant de noter que HYDA1 est trouvée en très faible quantité quand l'anoxie est induite après culture à la lumière, ce qui suggère que ce mécanisme de compensation n'a pas lieu dans ces conditions d'induction de l'anoxie. De la même façon, (Berger et al., 2020) n'ont pas trouvé d'augmentation de l'abondance de

protéines de transfert (NFU1, HCF101) ni de cibles, dans un mutant *nfu3* d'*A. thaliana* cultivé dans des conditions de culture standard.

L'analyse par TMT-labelling a également révélé une présence résiduelle de la protéine NFU1 (30 %) chez le mutant mais ce résultat dépassait le seuil statistique de significativité, permettant de le remettre en doute. Des immunoblots ont confirmé que cette présence résiduelle était nettement plus réduite (moins de 10 % par rapport à la souche sauvage) et donc que la détection de 30% était probablement un artefact lié à la technique. Ce point devra être investigué par exemple en examinant la présence de NFU1 chez les mutants dans les conditions où l'analyse par TMT labelling a été réalisée ou en utilisant une autre technique de protéomique comparative, par exemple basée sur la quantification des peptides sans marquage (Neilson et al., 2011).

En condition de croissance à l'obscurité, la respiration n'est pas à son maximum, et les voies de fermentation sont engagées pour gérer la balance rédox de la cellule (Strenkert et al., 2019). L'hétérotrophie ainsi que l'adaptation à l'anoxie sont donc des mécanismes liés qui proviennent probablement du mode de vie de *C. reinhardtii* : les cellules peuvent se retrouver en conditions d'anoxie en l'absence de lumière à cause de protistes ou des bactéries hétérotrophes, consommant l'oxygène rapidement. Face à ces conditions, *Chlamydomonas* a conservé un mécanisme de fermentation activé à l'obscurité. Ce travail a approfondi le rôle de la protéine NFU1 qui semble liée à ces conditions mais aussi celui de HCF101 tout en mettant en évidence des fonctions complexes et interconnectées pour ces protéines dans la maturation des protéines Fe-S.

Bibliographie

- Adair, W.S., 1985. Characterization of *Chlamydomonas* Sexual Agglutinins. *J. Cell Sci.* 1985, 233–260. https://doi.org/10.1242/jcs.1985.Supplement_2.13
- Almagro Armenteros, J.J., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., Von Heijne, G., Elofsson, A., Nielsen, H., 2019. Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Sci. Alliance* 2, e201900429. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900429>
- Bailleul, B., Cardol, P., Breyton, C., Finazzi, G., 2010. Electrochromism: a useful probe to study algal photosynthesis. *Photosynth. Res.* 106, 179–189. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9579-z>
- Balk, J., Schaedler, T.A., 2014. Iron Cofactor Assembly in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 125–153. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035759>
- Barrett, J., Girr, P., Mackinder, L.C.M., 2021. Pyrenoids: CO₂-fixing phase separated liquid organelles. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1868, 118949. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.118949>
- Belfort, M., 1997. Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Res.* 25, 3379–3388. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3379>
- Berger, N., Vignols, F., Touraine, B., Taupin-Broggini, M., Rofidal, V., Demolombe, V., Santoni, V., Rouhier, N., Gaymard, F., Dubos, C., 2020. A Global Proteomic Approach Sheds New Light on Potential Iron-Sulfur Client Proteins of the Chloroplastic Maturation Factor NFU3. *Int. J. Mol. Sci.* 21, E8121. <https://doi.org/10.3390/ijms21218121>
- Berthold, P., Schmitt, R., Mages, W., 2002. An Engineered *Streptomyces hygrosopicus* aph 7th Gene Mediates Dominant Resistance against Hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist* 153, 401–412. <https://doi.org/10.1078/14344610260450136>
- Boncella, A.E., Sabo, E.T., Santore, R.M., Carter, J., Whalen, J., Hudspeth, J.D., Morrison, C.N., 2022. The expanding utility of iron-sulfur clusters: Their functional roles in biology, synthetic small molecules, maquettes and artificial proteins, biomimetic materials, and therapeutic strategies. *Coord. Chem. Rev.* 453, 214229. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214229>
- Britt, R.D., Rao, G., Tao, L., 2020. Biosynthesis of the catalytic H-cluster of [FeFe] hydrogenase: the roles of the Fe–S maturase proteins HydE, HydF, and HydG. *Chem. Sci.* 11, 10313–10323. <https://doi.org/10.1039/D0SC04216A>
- Bruckert, V., Rémacle, C., Hehn, A., n.d. Spécialité Biotechnologies, amélioration du végétal.
- Bych, K., Kerscher, S., Netz, D.J.A., Pierik, A.J., Zwicker, K., Huynen, M.A., Lill, R., Brandt, U., Balk, J., 2008. The iron-sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. *EMBO J.* 27, 1736–1746. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.98>
- Cahoon, A.B., Timko, M.P., 2000. Yellow-in-the-dark mutants of *Chlamydomonas* lack the CHLL subunit of light-independent protochlorophyllide reductase. *Plant Cell* 12, 559–568. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.4.559>
- Camire, E.J., Grossman, J.D., Thole, G.J., Fleischman, N.M., Perlstein, D.L., 2015. The Yeast Nbp35-Cfd1 Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Scaffold Is an ATPase. *J. Biol. Chem.* 290, 23793–23802. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.667022>
- Catalanotti, C., Yang, W., Posewitz, M.C., Grossman, A.R., 2013. Fermentation metabolism and its evolution in algae. *Front. Plant Sci.* 4, 150. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00150>
- Chahal, H.K., Dai, Y., Saini, A., Ayala-Castro, C., Outten, F.W., 2009. The SufBCD Fe-S scaffold complex interacts with SufA for Fe-S cluster transfer. *Biochemistry* 48, 10644–10653. <https://doi.org/10.1021/bi901518y>
- Cook, W.B., Miles, D., 1990. Anomalous electron transport activity in a Photosystem I-deficient maize mutant. *Photosynth. Res.* 24, 81–88. <https://doi.org/10.1007/BF00032647>

- Corless, E.I., Mettert, E.L., Kiley, P.J., Antony, E., 2020. Elevated Expression of a Functional Suf Pathway in *Escherichia coli* BL21(DE3) Enhances Recombinant Production of an Iron-Sulfur Cluster-Containing Protein. *J. Bacteriol.* 202, e00496-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00496-19>
- Couturier, J., Touraine, B., Briat, J.-F., Gaymard, F., Rouhier, N., 2013. The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions. *Front. Plant Sci.* 4, 259. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00259>
- De Vienne, D.M., 2016. Lifemap: Exploring the Entire Tree of Life. *PLOS Biol.* 14, e2001624. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001624>
- Dubois, F., Remacle, C., n.d. Caractérisation de mutants impliqués dans l'assemblage des centres fer-soufre dans le chloroplaste de la microalgue verte *C. reinhardtii*.
- Emonds-Alt, B., 2017. Identification de mutants affectés dans le transport d'électrons photosynthétique en anoxie chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. Université de Liège.
- Erickson, E., Wakao, S., Niyogi, K.K., 2015. Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 82, 449–465. <https://doi.org/10.1111/tpj.12825>
- Ferris, P.J., Goodenough, U.W., 1997. Mating Type in *Chlamydomonas* Is Specified by *mid*, the Minus-Dominance Gene. *Genetics* 146, 859–869. <https://doi.org/10.1093/genetics/146.3.859>
- Gao, H., Subramanian, S., Couturier, J., Naik, S.G., Kim, S.-K., Leustek, T., Knaff, D.B., Wu, H.-C., Vignols, F., Huynh, B.H., Rouhier, N., Johnson, M.K., 2013. *Arabidopsis thaliana* Nfu2 accommodates [2Fe-2S] or [4Fe-4S] clusters and is competent for in vitro maturation of chloroplast [2Fe-2S] and [4Fe-4S] cluster-containing proteins. *Biochemistry* 52, 6633–6645. <https://doi.org/10.1021/bi4007622>
- Goodenough, U. (Ed.), 2023. The *chlamydomonas* sourcebook. Volume 1: Introduction to *chlamydomonas* and its laboratory use / edited by Ursula Goodenough, Department of Biology, Washington University, St. Louis, MO, United States, Third edition. ed. Academic Press, An imprint of Elsevier, London, UK San Diego, CA Cambridge, MA Oxford, UK.
- Goodenough, U., Lin, H., Lee, J.-H., 2007. Sex determination in *Chlamydomonas*. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18, 350–361. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.02.006>
- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., Lopez, R., 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 38, W695–W699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq313>
- Grossman, J.D., Camire, E.J., Glynn, C.A., Neil, C.M., Seguinot, B.O., Perlstein, D.L., 2019a. The Cfd1 Subunit of the Nbp35-Cfd1 Iron Sulfur Cluster Scaffolding Complex Controls Nucleotide Binding. *Biochemistry* 58, 1587–1595. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00798>
- Grossman, J.D., Gay, K.A., Camire, E.J., Walden, W.E., Perlstein, D.L., 2019b. Coupling Nucleotide Binding and Hydrolysis to Iron–Sulfur Cluster Acquisition and Transfer Revealed through Genetic Dissection of the Nbp35 ATPase Site. *Biochemistry* 58, 2017–2027. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00737>
- Harris, E.H., 2001. CHLAMYDOMONAS AS A MODEL ORGANISM. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 363–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.363>
- Harris, E.H., 1989. The *Chlamydomonas* Sourcebook. Academic Press, Inc., New York. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02778-0>
- Hemschemeier, A., Posewitz, M.C., Happe, T., 2023. Chapter 10 - Hydrogenases and hydrogen production, in: Grossman, A.R., Wollman, F.-A. (Eds.), *The Chlamydomonas Sourcebook (Third Edition)*. Academic Press, London, pp. 343–367. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821430-5.00008-0>
- Hinchliffe, P., Sazanov, L.A., 2005. Organization of Iron-Sulfur Clusters in Respiratory Complex I. *Science* 309, 771–774. <https://doi.org/10.1126/science.1113988>
- Hirabayashi, K., Yuda, E., Tanaka, N., Katayama, S., Iwasaki, K., Matsumoto, T., Kurisu, G., Outten, F.W., Fukuyama, K., Takahashi, Y., Wada, K., 2015. Functional Dynamics Revealed by the Structure of

- the SufBCD Complex, a Novel ATP-binding Cassette (ABC) Protein That Serves as a Scaffold for Iron-Sulfur Cluster Biogenesis. *J. Biol. Chem.* 290, 29717–29731. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680934>
- Hunsperger, H.M., Randhawa, T., Cattolico, R.A., 2015. Extensive horizontal gene transfer, duplication, and loss of chlorophyll synthesis genes in the algae. *BMC Evol. Biol.* 15, 16. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0286-4>
- Ibrahim, I.M., Wu, H., Ezhov, R., Kayanja, G.E., Zakharov, S.D., Du, Y., Tao, W.A., Pushkar, Y., Cramer, W.A., Puthiyaveetil, S., 2020. An evolutionarily conserved iron-sulfur cluster underlies redox sensory function of the Chloroplast Sensor Kinase. *Commun. Biol.* 3, 13. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0728-4>
- Imam, S.H., Buchanan, M.J., Shin, H.C., Snell, W.J., 1985. The Chlamydomonas cell wall: characterization of the wall framework. *J. Cell Biol.* 101, 1599–1607. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.4.1599>
- Jordan, S.F., Ioannou, I., Rammu, H., Halpern, A., Bogart, L.K., Ahn, M., Vasiliadou, R., Christodoulou, J., Maréchal, A., Lane, N., 2021. Spontaneous assembly of redox-active iron-sulfur clusters at low concentrations of cysteine. *Nat. Commun.* 12, 5925. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26158-2>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kindle, K.L., 1990. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 1228–1232. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.3.1228>
- Kindle, K.L., Schnell, R.A., Fernández, E., Lefebvre, P.A., 1989. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J. Cell Biol.* 109, 2589–2601. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.6.2589>
- Kwon, T., Huq, E., Herrin, D.L., 2010. Microhomology-mediated and nonhomologous repair of a double-strand break in the chloroplast genome of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 13954–13959. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004326107>
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Leipe, D.D., Koonin, E.V., Aravind, L., 2003. Evolution and Classification of P-loop Kinases and Related Proteins. *J. Mol. Biol.* 333, 781–815. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.08.040>
- Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., Aravind, L., 2002. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J. Mol. Biol.* 317, 41–72. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5378>
- Lezhneva, L., Amann, K., Meurer, J., 2004. The universally conserved HCF101 protein is involved in assembly of [4Fe-4S]-cluster-containing complexes in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: [4Fe-4S] cluster assembly. *Plant J.* 37, 174–185. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01952.x>
- Li, X., Patena, W., Fauser, F., Jinkerson, R.E., Saroussi, S., Meyer, M.T., Ivanova, N., Robertson, J.M., Yue, R., Zhang, R., Vilarrasa-Blasi, J., Wittkopp, T.M., Ramundo, S., Blum, S.R., Goh, A., Laudon, M., Srikumar, T., Lefebvre, P.A., Grossman, A.R., Jonikas, M.C., 2019. A genome-wide algal mutant library and functional screen identifies genes required for eukaryotic photosynthesis. *Nat. Genet.* 51, 627–635. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0370-6>
- Li, X., Zhang, R., Patena, W., Gang, S.S., Blum, S.R., Ivanova, N., Yue, R., Robertson, J.M., Lefebvre, P.A., Fitz-Gibbon, S.T., Grossman, A.R., Jonikas, M.C., 2016. An Indexed, Mapped Mutant Library

- Enables Reverse Genetics Studies of Biological Processes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 28, 367–387. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00465>
- Liang, X., Qin, L., Liu, P., Wang, M., Ye, H., 2014. Genes for iron-sulphur cluster assembly are targets of abiotic stress in rice, *Oryza sativa*: Rice iron homeostasis and abiotic stress response. *Plant Cell Environ.* 37, 780–794. <https://doi.org/10.1111/pce.12198>
- Liu, X., Liu, S., Feng, Y., Liu, J.-Z., Chen, Y., Pham, K., Deng, H., Hirschi, K.D., Wang, X., Cheng, N., 2013. Structural insights into the N-terminal GIY–YIG endonuclease activity of *Arabidopsis* glutaredoxin AtGRXS16 in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 9565–9570. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306899110>
- Lukianova, O.A., David, S.S., 2005. A role for iron–sulfur clusters in DNA repair. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.02.006>
- Luu Trinh, M.D., Miyazaki, D., Ono, S., Nomata, J., Kono, M., Mino, H., Niwa, T., Okegawa, Y., Motohashi, K., Taguchi, H., Hisabori, T., Masuda, S., 2021. The evolutionary conserved iron-sulfur protein TCR controls P700 oxidation in photosystem I. *iScience* 24, 102059. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102059>
- Mason, C.B., Bricker, T.M., Moroney, J.V., 2006. A rapid method for chloroplast isolation from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nat. Protoc.* 1, 2227–2230. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.348>
- Matagne, R.F., 1978. Fine structure of the arg-7 cistron in *Chlamydomonas reinhardtii*: Complementation between arg-7 mutants defective in argininosuccinate lyase. *Mol. Gen. Genet.* MGG 160, 95–99. <https://doi.org/10.1007/BF00275124>
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P., Lopez, R., 2013. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 41, W597–W600. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt376>
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W.F., Qu, L.-H., Nelson, D.R., Sanderfoot, A.A., Spalding, M.H., Kapitonov, V.V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S.M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C.-L., Cognat, V., Croft, M.T., Dent, R., Dutcher, S., Fernández, E., Fukuzawa, H., González-Ballester, D., González-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P.A., Lemaire, S.D., Lobanov, A.V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J.V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A.M., Niyogi, K., Novoselov, S.V., Paulsen, I.T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J.-P., Riaño-Pachón, D.M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schroda, M., Stern, D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S.L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C.-J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M.R., Ledford, H., Long, J.C., Minagawa, J., Page, M.D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A.M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C.L., Gladyshev, V.N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R.T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Hornick, L., Huang, Y.W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martínez, D., Ngau, W.C.A., Otiillar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szajkowski, L., Werner, G., Zhou, K., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S., Grossman, A.R., 2007. The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science* 318, 245–250. <https://doi.org/10.1126/science.1143609>
- Meurer, J., Meierhoff, K., Westhoff, P., 1996. Isolation of high-chlorophyll-fluorescence mutants of *Arabidopsis thaliana* and their characterisation by spectroscopy, immunoblotting and Northern hybridisation. *Planta* 198, 385–396. <https://doi.org/10.1007/BF00620055>
- Meuser, J.E., D’Adamo, S., Jinkerson, R.E., Mus, F., Yang, W., Ghirardi, M.L., Seibert, M., Grossman, A.R., Posewitz, M.C., 2012. Genetic disruption of both *Chlamydomonas reinhardtii* [FeFe]-hydrogenases: Insight into the role of HYDA2 in H₂ production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 704–709. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.002>

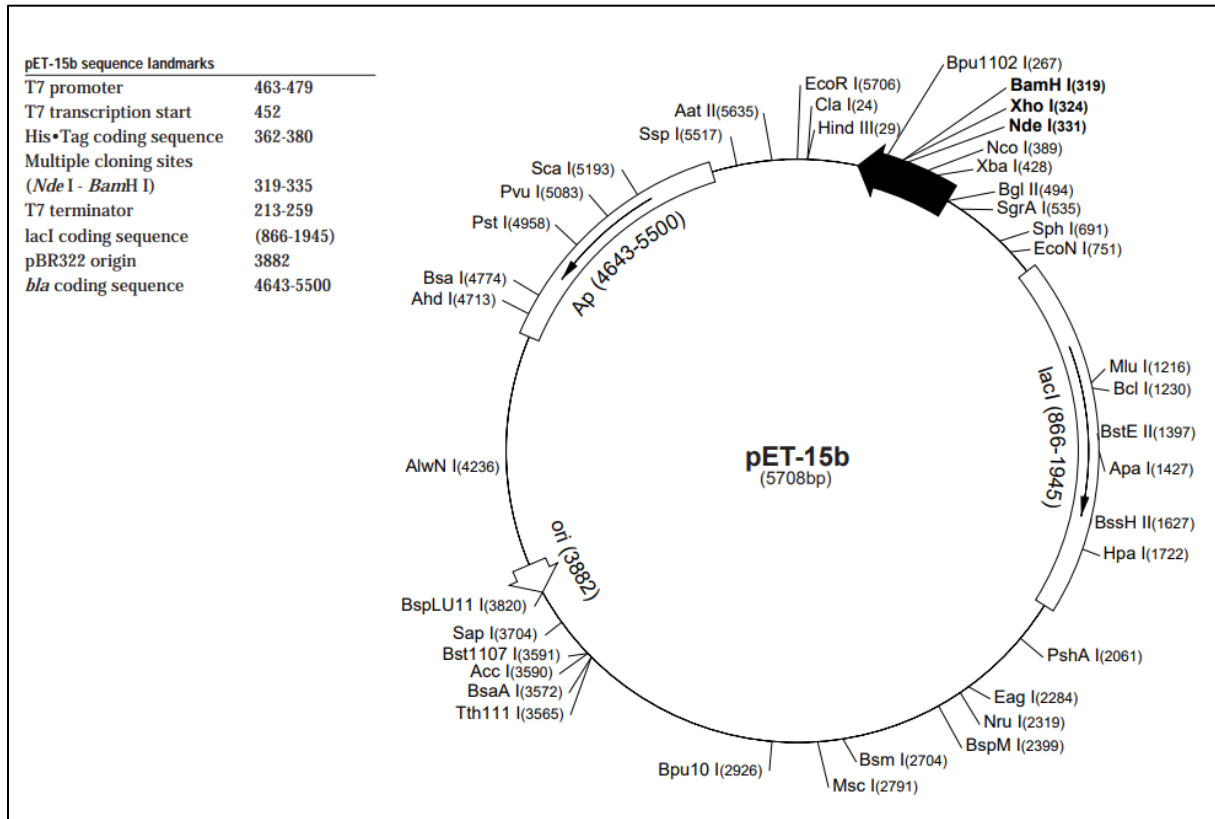
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., Steinegger, M., 2022. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Methods* 19, 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Misamore, M.J., Gupta, S., Snell, W.J., 2003. The *Chlamydomonas* Fus1 Protein Is Present on the Mating Type *plus* Fusion Organelle and Required for a Critical Membrane Adhesion Event during Fusion with *minus* Gametes. *Mol. Biol. Cell* 14, 2530–2542. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-12-0790>
- Moser, J., Lange, C., Krausze, J., Rebelein, J., Schubert, W.-D., Ribbe, M.W., Heinz, D.W., Jahn, D., 2013. Structure of ADP-aluminium fluoride-stabilized protochlorophyllide oxidoreductase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 2094–2098. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218303110>
- Moulin, M., Nguyen, G.T.D.T., Scaife, M.A., Smith, A.G., Fitzpatrick, T.B., 2013. Analysis of *Chlamydomonas* thiamin metabolism in vivo reveals riboswitch plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 14622–14627. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307741110>
- Muraki, N., Nomata, J., Ebata, K., Mizoguchi, T., Shiba, T., Tamiaki, H., Kurisu, G., Fujita, Y., 2010. X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase. *Nature* 465, 110–114. <https://doi.org/10.1038/nature08950>
- Mus, F., Dubini, A., Seibert, M., Posewitz, M.C., Grossman, A.R., 2007. Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*: Anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways. *J. Biol. Chem.* 282, 25475–25486. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701415200>
- Nath, K., Wessendorf, R.L., Lu, Y., 2016. A Nitrogen-Fixing Subunit Essential for Accumulating 4Fe-4S-Containing Photosystem I Core Proteins. *Plant Physiol.* 172, 2459–2470. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01564>
- Neilson, K.A., Ali, N.A., Muralidharan, S., Mirzaei, M., Mariani, M., Assadourian, G., Lee, A., Van Sluyter, S.C., Haynes, P.A., 2011. Less label, more free: Approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *PROTEOMICS* 11, 535–553. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000553>
- Nomata, J., Kitashima, M., Inoue, K., Fujita, Y., 2006. Nitrogenase Fe protein-like Fe-S cluster is conserved in L-protein (BchL) of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Lett.* 580, 6151–6154. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.014>
- Nomata, J., Kondo, T., Mizoguchi, T., Tamiaki, H., Itoh, S., Fujita, Y., 2014. Dark-operative protochlorophyllide oxidoreductase generates substrate radicals by an iron-sulphur cluster in bacteriochlorophyll biosynthesis. *Sci. Rep.* 4, 5455. <https://doi.org/10.1038/srep05455>
- Nomata, J., Ogawa, T., Kitashima, M., Inoue, K., Fujita, Y., 2008. NB-protein (BchN-BchB) of dark-operative protochlorophyllide reductase is the catalytic component containing oxygen-tolerant Fe-S clusters. *FEBS Lett.* 582, 1346–1350. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.03.018>
- Noth, J., Krawietz, D., Hemschemeier, A., Happe, T., 2013. Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is coupled to light-independent hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 288, 4368–4377. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.429985>
- Pandey, A.K., Pain, J., Dancis, A., Pain, D., 2019. Mitochondria export iron–sulfur and sulfur intermediates to the cytoplasm for iron–sulfur cluster assembly and tRNA thiolation in yeast. *J. Biol. Chem.* 294, 9489–9502. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008600>
- Peters, J.W., Schut, G.J., Boyd, E.S., Mulder, D.W., Shepard, E.M., Broderick, J.B., King, P.W., Adams, M.W.W., 2015. [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1853, 1350–1369. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.021>
- Polle, J.E.W., Benemann, J.R., Tanaka, A., Melis, A., 2000. Photosynthetic apparatus organization and function in the wild type and a chlorophyll b-less mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. Dependence on carbon source. *Planta* 211, 335–344. <https://doi.org/10.1007/s004250000279>
- Posewitz, M.C., Atteia, A., Hemschemeier, A., Happe, T., Grossman, A.R., 2023. Chapter 9 - Metabolic networks during dark anoxia, in: Grossman, A.R., Wollman, F.-A. (Eds.), *The Chlamydomonas*

- Sourcebook (Third Edition). Academic Press, London, pp. 317–341. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821430-5.00019-5>
- Posewitz, M.C., King, P.W., Smolinski, S.L., Zhang, L., Seibert, M., Ghirardi, M.L., 2004. Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. *J. Biol. Chem.* 279, 25711–25720. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403206200>
- Pozuelo, M., Merchán, F., Macías, M.I., Beck, C.F., Galván, A., Fernández, E., 2000. The negative effect of nitrate on gametogenesis is independent of nitrate assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 211, 287–292. <https://doi.org/10.1007/s004250000291>
- Przybyla-Toscano, J., Couturier, J., Remacle, C., Rouhier, N., 2021. Occurrence, Evolution and Specificities of Iron-Sulfur Proteins and Maturation Factors in Chloroplasts from Algae. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3175. <https://doi.org/10.3390/ijms22063175>
- Przybyla-Toscano, J., Roland, M., Gaymard, F., Couturier, J., Rouhier, N., 2018. Roles and maturation of iron-sulfur proteins in plastids. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 23, 545–566. <https://doi.org/10.1007/s00775-018-1532-1>
- Pulich, W.M., Ward, C.H., 1973. Physiology and Ultrastructure of an Oxygen-resistant *Chlorella* Mutant under Heterotrophic Conditions. *Plant Physiol.* 51, 337–344. <https://doi.org/10.1104/pp.51.2.337>
- Pyrih, J., Žárský, V., Fellows, J.D., Grosche, C., Wloga, D., Striepen, B., Maier, U.G., Tachezy, J., 2021. The iron-sulfur scaffold protein HCF101 unveils the complexity of organellar evolution in SAR, Haptista and Cryptista. *BMC Ecol. Evol.* 21, 46. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01777-x>
- Ragnoli, I., 2022. Physiological and molecular characterization of *nfu1* and *hcf101* mutants in *Chlamydomonas reinhardtii* (Master thesis). Université de Liège.
- Ragsdale, S.W., 2003. Pyruvate Ferredoxin Oxidoreductase and Its Radical Intermediate. *Chem. Rev.* 103, 2333–2346. <https://doi.org/10.1021/cr020423e>
- Reinbothe, C., Bakkouri, M.E., Buhr, F., Muraki, N., Nomata, J., Kurisu, G., Fujita, Y., Reinbothe, S., 2010. Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. *Trends Plant Sci.* 15, 614–624. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.07.002>
- Remacle, C., Cline, S., Boutaffala, L., Gabilly, S., Larosa, V., Barbieri, M.R., Coosemans, N., Hamel, P.P., 2009. The *ARG9* Gene Encodes the Plastid-Resident *N*-Acetyl Ornithine Aminotransferase in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 8, 1460–1463. <https://doi.org/10.1128/EC.00108-09>
- Rockwell, N.C., Lagarias, J.C., Bhattacharya, D., 2014. Primary endosymbiosis and the evolution of light and oxygen sensing in photosynthetic eukaryotes. *Front. Ecol. Evol.* 2. <https://doi.org/10.3389/fevo.2014.00066>
- Roland, M., Przybyla-Toscano, J., Vignols, F., Berger, N., Azam, T., Christ, L., Santoni, V., Wu, H.-C., Dhalleine, T., Johnson, M.K., Dubos, C., Couturier, J., Rouhier, N., 2020. The plastidial *Arabidopsis thaliana* NFU1 protein binds and delivers [4Fe-4S] clusters to specific client proteins. *J. Biol. Chem.* 295, 1727–1742. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011034>
- Sasso, S., Stibor, H., Mittag, M., Grossman, A.R., 2018. From molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. *eLife* 7, e39233. <https://doi.org/10.7554/eLife.39233>
- Satyanarayan, M.B., Zhao, J., Zhang, J., Yu, F., Lu, Y., 2021. Functional relationships of three NFU proteins in the biogenesis of chloroplastic iron-sulfur clusters. *Plant Direct* 5. <https://doi.org/10.1002/pld3.303>
- Sawyer, A., Bai, Y., Lu, Y., Hemschemeier, A., Happe, T., 2017. Compartmentalisation of [FeFe]-hydrogenase maturation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 90, 1134–1143. <https://doi.org/10.1111/tbj.13535>

- Schwenkert, S., Netz, D.J.A., Frazzon, J., Pierik, A.J., Bill, E., Gross, J., Lill, R., Meurer, J., 2010. Chloroplast HCF101 is a scaffold protein for [4Fe-4S] cluster assembly. *Biochem. J.* 425, 207–218. <https://doi.org/10.1042/BJ20091290>
- Scrutton, N.S., Louise Groot, M., Heyes, D.J., 2012. Excited state dynamics and catalytic mechanism of the light-driven enzyme protochlorophyllide oxidoreductase. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 8818. <https://doi.org/10.1039/c2cp23789j>
- Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A., Usuda, H., 1998. High-Efficiency Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by Electroporation. *Genetics* 148, 1821–1828. <https://doi.org/10.1093/genetics/148.4.1821>
- Shin, S.-E., Lim, J.-M., Koh, H.G., Kim, E.K., Kang, N.K., Jeon, S., Kwon, S., Shin, W.-S., Lee, B., Hwangbo, K., Kim, J., Ye, S.H., Yun, J.-Y., Seo, H., Oh, H.-M., Kim, K.-J., Kim, J.-S., Jeong, W.-J., Chang, Y.K., Jeong, B., 2016a. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Rep.* 6, 27810. <https://doi.org/10.1038/srep27810>
- Shisler, K.A., Hutcheson, R.U., Horitani, M., Duschene, K.S., Crain, A.V., Byer, A.S., Shepard, E.M., Rasmussen, A., Yang, J., Broderick, W.E., Vey, J.L., Drennan, C.L., Hoffman, B.M., Broderick, J.B., 2017. Monovalent Cation Activation of the Radical SAM Enzyme Pyruvate Formate-Lyase Activating Enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* 139, 11803–11813. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b04883>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7, 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Sticht, H., Rösch, P., 1998. The structure of iron–sulfur proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 70, 95–136. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(98\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(98)00027-3)
- Stöckel, J., Oelmüller, R., 2004. A novel protein for photosystem I biogenesis. *J. Biol. Chem.* 279, 10243–10251. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309246200>
- Strenkert, D., Schmollinger, S., Gallaher, S.D., Salomé, P.A., Purvine, S.O., Nicora, C.D., Mettler-Altmann, T., Soubeyrand, E., Weber, A.P.M., Lipton, M.S., Basset, G.J., Merchant, S.S., 2019. Multiomics resolution of molecular events during a day in the life of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 2374–2383. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815238116>
- Sytina, O.A., Heyes, D.J., Hunter, C.N., Alexandre, M.T., Van Stokkum, I.H.M., Van Grondelle, R., Groot, M.L., 2008. Conformational changes in an ultrafast light-driven enzyme determine catalytic activity. *Nature* 456, 1001–1004. <https://doi.org/10.1038/nature07354>
- Tardif, M., Atteia, A., Specht, M., Cogne, G., Rolland, N., Brugière, S., Hippler, M., Ferro, M., Bruley, C., Peltier, G., Vallon, O., Cournac, L., 2012. PredAlgo: A New Subcellular Localization Prediction Tool Dedicated to Green Algae. *Mol. Biol. Evol.* 29, 3625–3639. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss178>
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC., n.d.
- Theis, J., Lang, J., Spaniol, B., Ferté, S., Niemeyer, J., Sommer, F., Zimmer, D., Venn, B., Mehr, S.F., Mühlhaus, T., Wollman, F.-A., Schroda, M., 2019. The *Chlamydomonas deg1c* Mutant Accumulates Proteins Involved in High Light Acclimation. *Plant Physiol.* 181, 1480–1497. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01052>
- Touraine, B., Vignols, F., Przybyla-Toscano, J., Ischebeck, T., Dhalleine, T., Wu, H.-C., Magno, C., Berger, N., Couturier, J., Dubos, C., Feussner, I., Caffarri, S., Havaux, M., Rouhier, N., Gaymard, F., 2019. Iron–sulfur protein NFU2 is required for branched-chain amino acid synthesis in Arabidopsis roots. *J. Exp. Bot.* 70, 1875–1889. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz050>
- Treier, U., Fuchs, S., Weber, M., Wakarchuk, W.W., Beck, C.F., 1989. Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*: light dependence and gene expression patterns. *Arch. Microbiol.* 152, 572–577. <https://doi.org/10.1007/BF00425489>

- van Lis, R., Brugière, S., Baffert, C., Couté, Y., Nitschke, W., Atteia, A., 2020. Hybrid cluster proteins in a photosynthetic microalga. *FEBS J.* 287, 721–735. <https://doi.org/10.1111/febs.15025>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., Cowie, A., Hobbs, N., Kohli, P., Kleywegt, G., Birney, E., Hassabis, D., Velankar, S., 2022. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* 50, D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Wang, K., 2000. Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1529, 33–48. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00136-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00136-0)
- Werner, R., Mergenhagen, D., 1998. Mating Type Determination of *Chlamydomonas reinhardtii* by PCR. *Plant Mol. Biol. Report.* 16, 295–299. <https://doi.org/10.1023/A:1007583508766>
- Zhang, J., Bai, Z., Ouyang, M., Xu, X., Xiong, H., Wang, Q., Grimm, B., Rochaix, J., Zhang, L., 2021. The DnaJ proteins DJA6 and DJA5 are essential for chloroplast iron–sulfur cluster biogenesis. *EMBO J.* 40. <https://doi.org/10.15252/embj.2020106742>

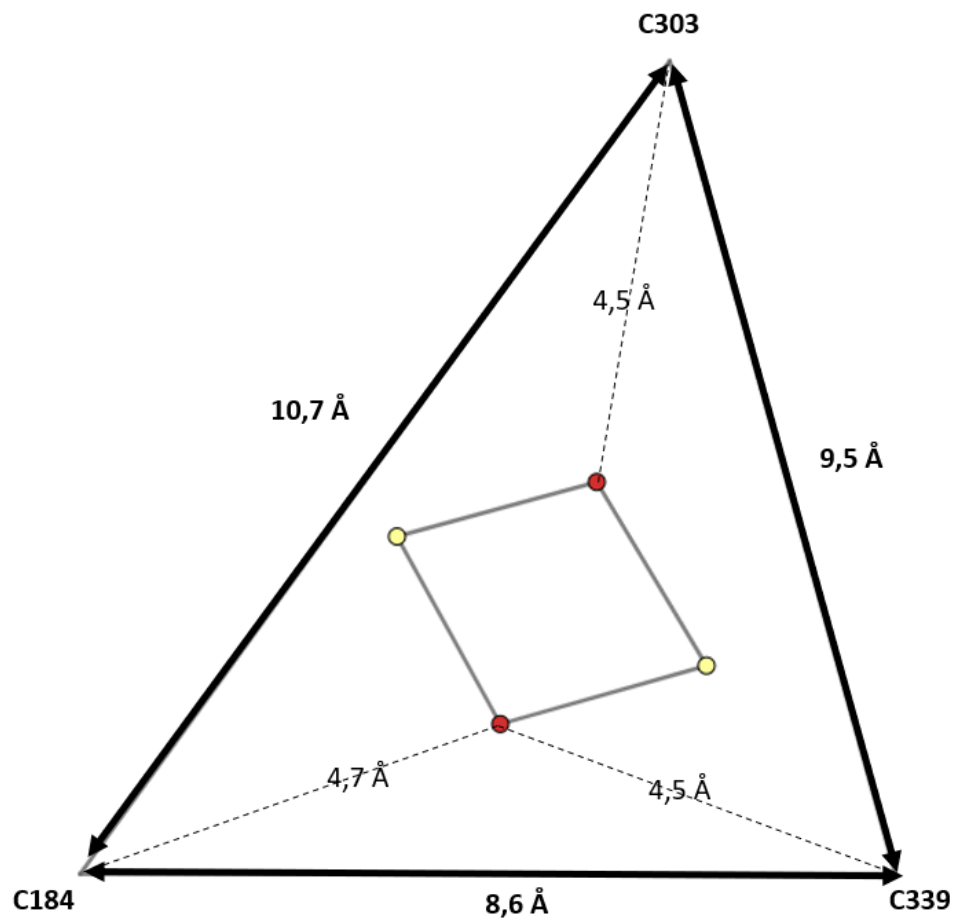
7. Annexes



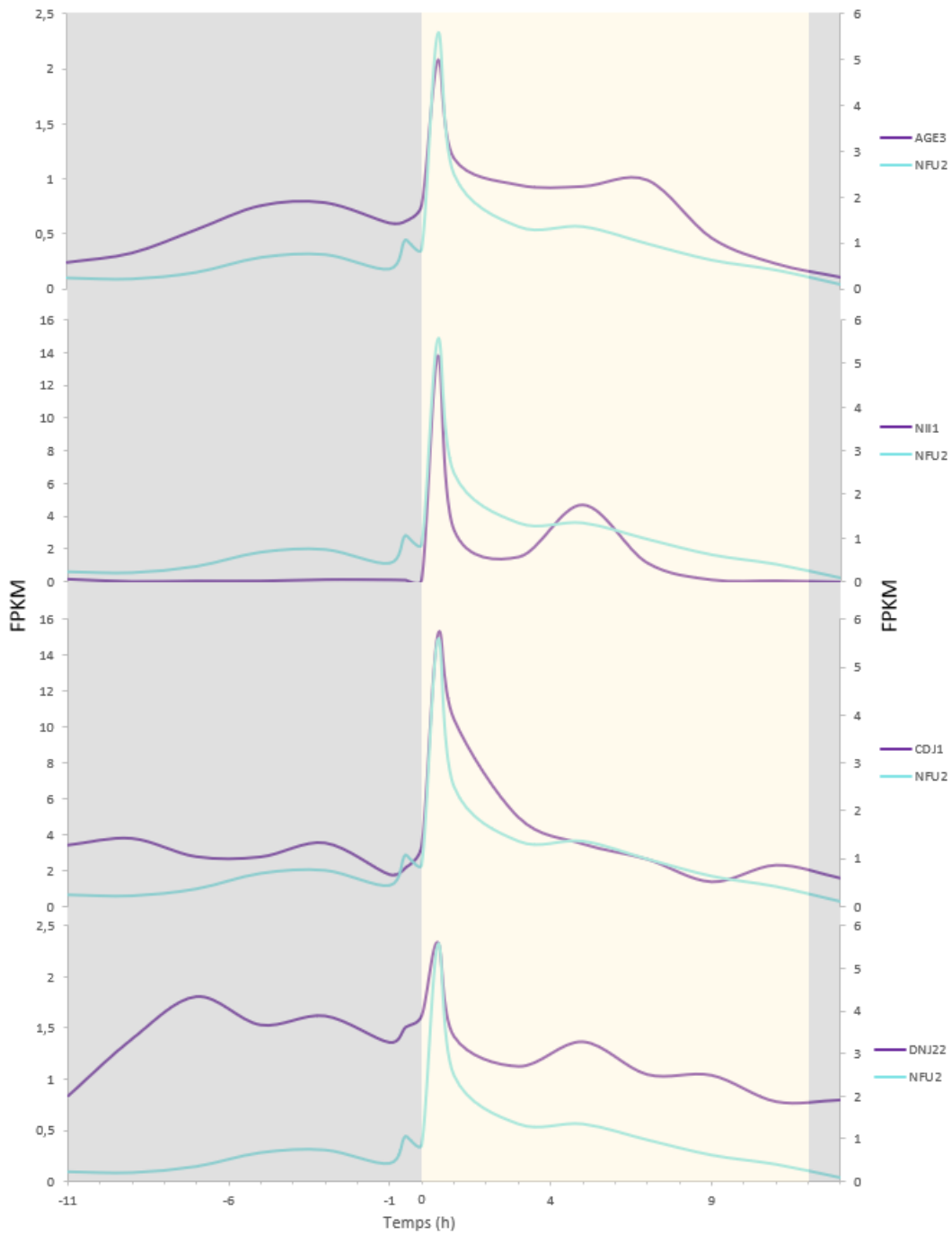
>HCF101 recombinante

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMAAPPAVATAAAPRTREEEVLQQLRNVIDPDFGEDIVACGFIKDLAVD
 EAAGAVAFTLELTTPACPVKEMFQRQSTEFVKALPWVRDVAIKMTSQPAKPLLPESGRPGGLAKV
 RHI IAVSSCKGGVVGKSTVSVNLAYTLAQMGAKVGI F DADVYGPSLPLMVDPEVKVLEMDPATKAI
 YPTQYEGVKVVSFGYAGQGS AIMRGPMVSGLI QQMLTTADWGELDYLVVDFPPGTGDIQLTLCQT
 VAFSAAVIVTTPQKMAFIDVAKGIRMFARLVVPCVAVVENMSYFDGEDGKRYFFPGQSGGERIQR
 DFGLPNLIRFPIVPDL SAAGDGRPLVVSSPASATASTFMDLGAAVVREVAKMGAAGRAPRQTAH
 FDQEQDAIVVALPGEPEFLLPPGVVRANDTSATS IDEWTGQRKREEAPADARPVAVNPLGN YAVQ
 ITWSDGFNQVASYELLDELKSYAVPRRPVSGGSASNGSVSTSLPGGMQAQAQLA*

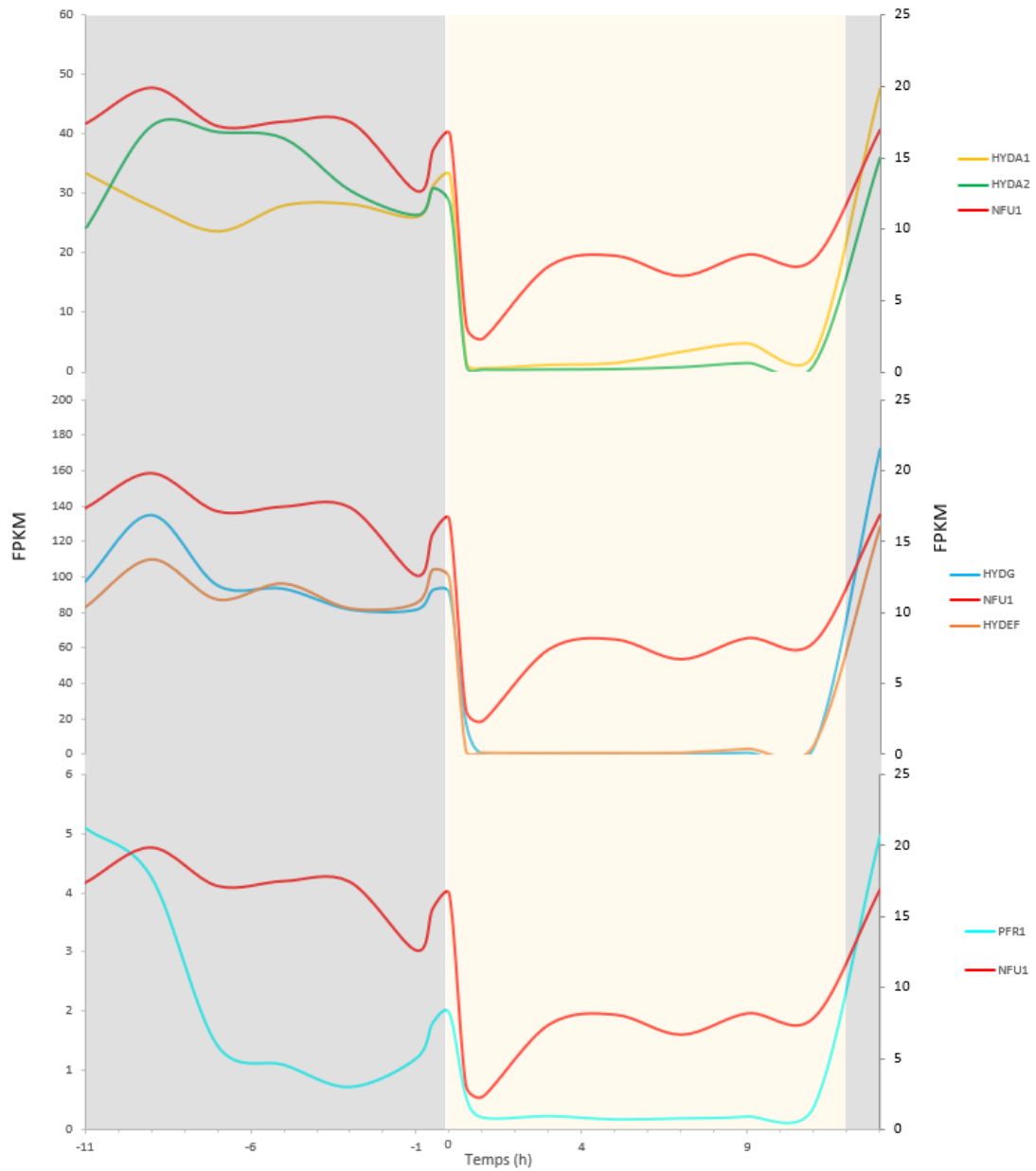
Annexe 1. Vecteur d'expression bactérien et séquence de la protéine recombinante pour purification. A) Schéma du vecteur bactérien pET-15b utilisé. B) Séquence d'acides aminés de la protéine recombinante HCF101. Le His-tag ajouté en N-terminal est représenté en rouge.



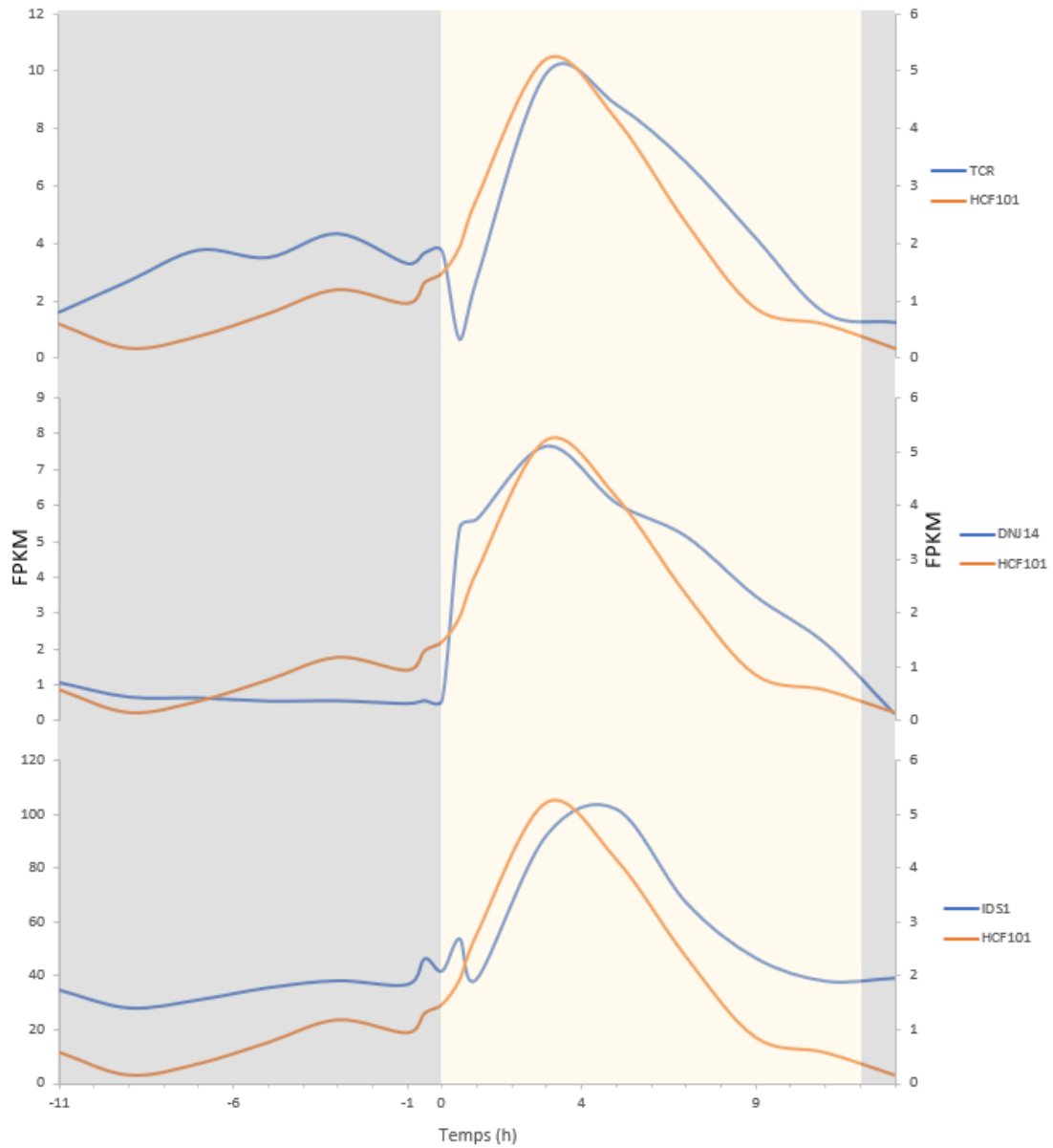
Annexe 2. Représentation schématique du centre Fe-S inséré dans le site potentiel de HCF101. A) Les distances entre les atomes de Fe (en rouge) et de soufre (en jaune) ont été reprises de (Sticht and Rösch, 1998).



Annexe 3. Coexpression de gènes avec NFU2 en conditions de cycle jour-nuit. Le temps, en heure, est séparé en 2 phases : en gris en période d'obscurité et en jaune en période de lumière. Les ordonnées sont en "Fragments Per Kilobase Million", celle de gauche correspond aux mesures des protéines cibles (mauve), celle de droite correspond aux mesures de NFU2 (turquoise). AGE3 = A/G-spécifique adénine glycosylase/endonucléase III, CDJ1 = protéine "DnaJ -like" chloroplastique 1, DNJ22 = protéine "DnaJ -like" chloroplastique 22, NII1 = nitrite réductase.



Annexe 4. Coexpression de gènes avec NFU1 en conditions de cycle jour-nuit. Le temps, en heure, est séparé en 2 phases : en gris en période d'obscurité et en jaune en période de lumière. Les ordonnées sont en "Fragments Per Kilobase Million", celle de gauche correspond aux mesures des protéines cibles (cyan), celle de droite correspond aux mesures de NFU1 (rouge).



Annexe 5. Coexpression de gènes avec HCF101 en conditions de cycle jour-nuit. Le temps, en heure, est séparé en 2 phases : en gris en période d'obscurité et en jaune en période de lumière. Les ordonnées sont en "Fragments Per Kilobase Million", celle de gauche correspond aux mesures des protéines cibles (bleu), celle de droite correspond aux mesures de HCF101 (orange).