

## Mémoire

**Auteur :** Herman, Romain

**Promoteur(s) :** Remacle, Claire

**Faculté :** Faculté des Sciences

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

**Année académique :** 2023-2024

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/20965>

---

### *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

**Analyse de deux facteurs de maturation de  
la machine SUF, HCF101 et NFU1, chez  
la microalgue Chlamydomonas**

Laboratoire de Génétique et Physiologie des microalgues

Professeur C. Remacle

Septembre 2024

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

# 1. Résumé

**Étudiant** : Romain Herman

**Promoteur** : Claire Remacle

**Laboratoire** : Génétique et physiologie des microalgues

**Année académique** : 2023-2024

**Titre**: Analyse de deux facteurs de maturation de la machine SUF, HCF101 et NFU1, chez la microalgue *Chlamydomonas*

**Résumé**: Les centres fer-soufre (Fe-S) sont essentiels à l'activité de certaines protéines en raison de leur capacité à transférer des électrons. Cependant, les mécanismes de synthèse de ces centres Fe-S et leur transport vers les protéines cibles demeurent mal compris chez *C. reinhardtii*. Les connaissances actuelles sur ce sujet proviennent principalement de la plante *Arabidopsis thaliana*. Dans ce contexte, les protéines HCF101 et NFU1, impliquées dans le transfert des centres Fe-S aux protéines cibles du chloroplaste ont été caractérisées. Ce travail poursuit deux objectifs : examiner une éventuelle redondance fonctionnelle entre HCF101 et NFU1 et identifier les partenaires de HCF101. Pour réaliser le premier but, des doubles mutants *hcf101 nfu1* ont été isolés par croisement entre les deux mutants simples et caractérisés. L'analyse de croissance a révélé une différence notable entre les doubles mutants et les mutants simples, que ce soit sous une intensité lumineuse moyenne ou élevée, ainsi qu'à l'obscurité. Les analyses des paramètres photosynthétiques indiquent également une différence significative entre les doubles mutants et les mutants simples. Le deuxième objectif est d'identifier les partenaires ou cibles de HCF101. Pour cela, le gène *HCF101* fusionné à une séquence d'acides aminés correspondant à un peptide 3xFlag a été cloné par clonage modulaire (Moclo) et un transformant exprimant la construction a été isolé. Une expérience de co-immunoprécipitation (Co-IP) en utilisant un lysat chloroplastique réalisé à partir de la souche HCF101-3xFlag a été réalisée à l'aide d'anticorps anti-FLAG, en vue d'une identification des partenaires par spectrométrie de masse. Un WB a validé la présence de la protéine HCF101-3xFlag dans les éluats de la Co-IP. Les résultats de la Co-IP n'ont pas été obtenus avant la rédaction de mon mémoire.

## Remerciements

Premièrement, je souhaite remercier Claire Remacle pour m'avoir accepté afin de réaliser le mémoire et de m'avoir rapidement fait confiance sans bien me connaître.

Pour la bonne réalisation de toute la partie pratique et théorique du mémoire, je souhaite remercier plusieurs personnes sans qui sa réalisation aurait été bien plus complexe. Ainsi, pour les manipulations physiologiques et les connaissances théoriques de *Chlamydomonas*, je souhaite remercier tout particulièrement Claire Remacle et Antoine Kairis pour avoir apporté leurs connaissances/conseils qui constituent l'édifice et le pilier principal de ce mémoire. Pour l'approche génétique pratique et théorique du MoClo appliqué à *Chlamy*, je tiens à remercier Yanis Aoudache sans qui il n'aurait pas été possible de réaliser la technique de clonage. Je suis aussi reconnaissant envers Nadine, Michel et Florent qui ont aidé à maintenir un milieu de travail propre et ordonné pour tous, ce qui a fait gagner beaucoup de temps indirectement. En plus de ceux cités, je remercie Florent Dubois pour ses conseils supplémentaires sur le MoClo et Alain Gervasi pour ses conseils et astuces sur les études des paramètres photosynthétiques.

Pour la partie rédaction, je tiens à remercier Claire Remacle pour ses précieux conseils et la qualité des corrections apportées. Je suis également reconnaissant envers Antoine Kairis pour ses corrections, conseils et figures apportées au mémoire.

En plus des personnes qui ont permis d'effectuer un travail qualitatif, je remercie aussi les autres personnes du laboratoire qui ont maintenu une bonne ambiance dans le labo en gardant le sourire et la bonne humeur. Ainsi, je remercie Paulina, Florent, Yanis, Lindsey, Antoine, Nanou, Stéphanie, Alain et tous les autres personnes du labo qui ont permis de garder une bonne atmosphère de travail.

## Table des matières

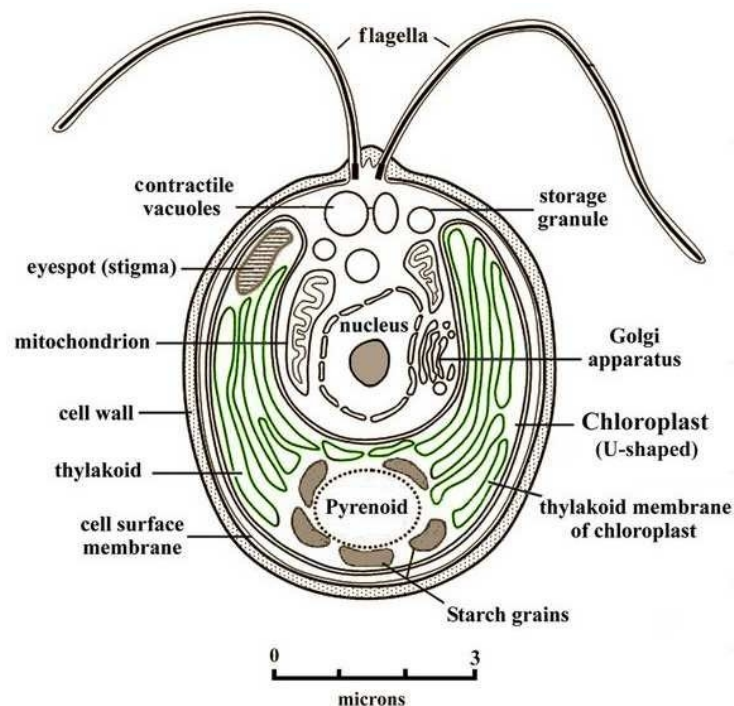
1. Introduction.....	6
1 Présentation de l'organisme modèle <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	6
2 Les centres fer-soufre (Fe-S) .....	9
2A Généralités sur les centres Fe-S.....	9
2B Synthèse des centres Fe-S chloroplastiques chez <i>A. thaliana</i> .....	10
2C Similarités et différences dans la biosynthèse des centres Fe-S entre <i>A. thaliana</i> et <i>C. reinhardtii</i> .....	11
2D La protéine HCF101 (High Chlorophyll Fluorescence 101).....	12
2E Protéines NFU chloroplastiques.....	14
3 Modular Cloning.....	16
2. Objectifs de travail.....	19
3. Matériel et méthodes.....	20
1 Souches utilisées.....	20
2 Extraction protéique totale.....	20
3 Isolement de chloroplastes et purification des protéines chloroplastiques.....	20
4 Détermination de la concentration en chlorophylles.....	21
5 Extraction d'ADN génomique.....	22
6 MoClo.....	22
6A Modules/plasmides utilisés.....	22
6B Construction de niveau 0 par PCR avec la polymérase iProof et purification de l'ADN.....	23
6C PCR sur colonie.....	24
6D Diglig (digestion/ligation).....	25
6E Transformation bactérienne et purification des plasmides.....	25
6F Digestion du plasmide par enzyme de restriction.....	26
6G Transformation <i>C. reinhardtii</i> par électroporation.....	26
7 Détermination du mating type.....	27
8 Western Blot.....	28
9 Mesure de croissance par goutte.....	28
10 Croisement et procédé d'isolement de doubles mutants <i>nfu1 hcf101</i> .....	29
11 Rendement quantique du PSII.....	30
12 Co-immunoprécipitation (Co-IP).....	31
4. Résultats.....	32
1 Étude de la redondance potentielle entre les protéines HCF101 et NFU1 et de leur rôle dans la cellule.....	32
1A. Isolement de mutants affectés dans les gènes <i>HCF101</i> et <i>NFU1</i> par croisement.....	32
A.I. Croisement entre les souches mutantes <i>hcf101</i> et <i>nfu1-1</i> .....	32
A.II Isolement de produits méiotiques affectés dans les gènes <i>HCF101</i> et <i>NFU1</i> par génotypage.....	32
A.III Détermination du mating-type (type sexuel) des doubles mutants <i>hcf101 nfu1</i> .....	34
1B Analyse biochimique des doubles mutants <i>hcf101 nfu1</i> par Western Blot (WB).....	34
B.I Présence/absence des protéines HCF101 et NFU1.....	34
B.II Présence/absence des protéines PsaC et PsaA du photosystème I.....	35
1C Caractérisation physiologique des doubles mutants <i>hcf101 nfu1</i> .....	37
C.I Analyse de croissance des doubles mutants sous différentes conditions de culture.....	37

C.II Étude de paramètres photosynthétiques.....	38
2 Recherche de partenaires de la protéine HCF101.....	40
2A Clonage du gène <i>HCF101-3xFlag</i> par MoClo.....	40
A.I Choix des modules du niveau 0.....	40
A.II Isolement du promoteur+région 5'UTR endogène de <i>HCF101</i> par PCR (module 1)...	42
A.III Construction des différents niveaux du MoClo.....	43
A.IV Sélection des transformants par crible photosynthétique.....	45
A.V Analyse de la présence de la protéine HCF101 chez les transformants sélectionnés...	46
2B Expériences de co-immunoprécipitation en vue de la recherche de partenaires de HCF101 .....	47
5. Discussion.....	50
6. Liste des abréviations.....	55
7. Bibliographie.....	57
8. Annexes.....	63

# 1. Introduction

## 1 Présentation de l'organisme modèle *Chlamydomonas reinhardtii*

*Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii* ou encore *Chlamydomonas*) est une microalgue verte unicellulaire haploïde mesurant entre 5 et 10 µm, fréquemment utilisée comme organisme modèle dans le domaine de la biologie végétale (Harris 2009). Classée parmi les Chlorophyceae, cette algue se distingue par sa capacité à se diviser rapidement, avec un cycle de duplication complet toutes les 6 à 8 heures dans des conditions expérimentales optimales (Harris 2009). Morphologiquement, *C. reinhardtii* présente une structure sphérique à légèrement ovale, est équipée de deux flagelles proéminents, un volumineux chloroplaste, un pyrénoïde (Sasso et al., 2018), ainsi qu'une paroi cellulaire enrichie en polysaccharides et glycoprotéines, mais dépourvue de cellulose (**Fig. 1**) (Imam et al., 1985). Outre sa rapidité de croissance, *C. reinhardtii* offre plusieurs avantages comme modèle de recherche, notamment en raison des caractéristiques de certains de ses organites cellulaires, de sa facilité de manipulation génétique et de son mode de vie aisément contrôlé en laboratoire (Merchant et al., 2007).



**Figure 1.** Représentation simplifiée de *C. reinhardtii*. Extrait de Bodenes, 2017.

Les flagelles de *C. reinhardtii*, essentiels pour la locomotion et la perception sensorielle, présentent une structure composée de microtubules arrangés en configuration "9+2", similaire à celle des cils

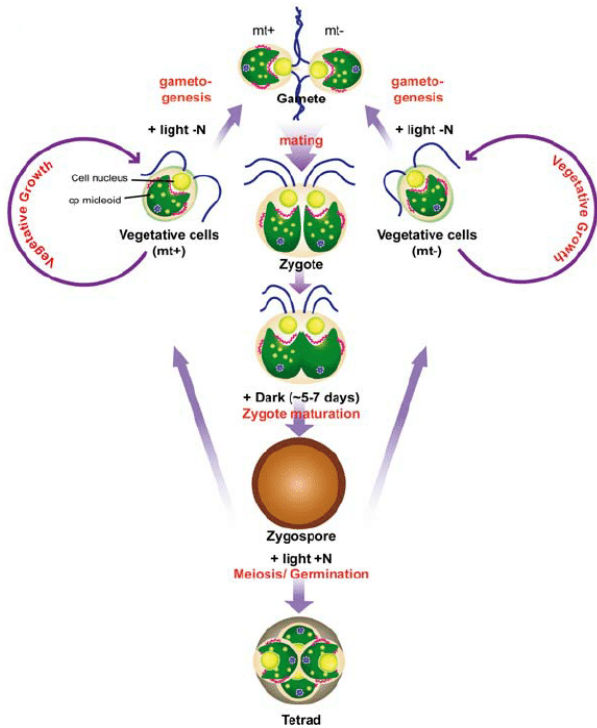
humains. Cette analogie fait de l'algue un modèle de recherche précieux pour l'étude des ciliopathies, des pathologies génétiques qui affectent les cils cellulaires chez l'homme (Pan 2008).

Un autre organite notable est le pyrénôïde, situé au sein du chloroplaste, qui joue un rôle crucial dans la concentration de CO<sub>2</sub> autour de la Rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase), augmentant ainsi l'efficacité de la photosynthèse (Meyer & Griffiths, 2013). Cet organite offre des perspectives de recherche prometteuses pour améliorer le rendement photosynthétique en contexte de concentration accrue de CO<sub>2</sub>, comme cela peut être observé dans les scénarios de changement climatique (He et al., 2023). Le pyrénôïde est également d'un grand intérêt en bio-ingénierie, où il pourrait être transféré à d'autres espèces pour améliorer leur résilience ou même leur productivité (Kumar et al., 2020).

Concernant le mode de vie de *Chlamydomonas*, plusieurs caractéristiques en font un modèle d'étude idéal. Sur le plan métabolique, cette algue est capable de croître en photoautotrophie, en hétérotrophie, ainsi qu'en mixotrophie (Harris 2009). Cette polyvalence nutritionnelle confère une flexibilité accrue aux conditions de culture, permettant une amélioration de l'efficacité énergétique en l'absence de photosynthèse active ou lorsque celle-ci est réduite (Dupuis & Merchant, 2023). En conséquence, *C. reinhardtii* s'avère être un modèle exemplaire pour la culture économique et efficiente en bioréacteur (Zhu et al., 2021). De plus, cette algue représente un excellent système pour l'étude de la photosynthèse, notamment parce que les mutations des gènes impliqués dans ces processus ne sont pas létales pour l'organisme si ce dernier est cultivé en hétérotrophie. Ainsi, afin de garantir la survie de l'algue lorsque la photosynthèse n'est plus suffisante comme source de carbone, de l'acétate est ajouté dans le milieu de culture (Dent et al., 2005).

En ce qui concerne son cycle de vie, *Chlamydomonas* présente des caractéristiques particulièrement avantageuses pour un modèle de recherche. L'algue possède un cycle de vie rapide et haplophasique (**Fig. 2**). En conditions favorables, l'algue se reproduit de manière végétative, maintenant des cellules haploïdes qui portent des types sexuels (-) ou (+), déterminés par le gène *MID* (Ferris & Goodenough, 1997). En revanche, dans des conditions défavorables, notamment en milieu pauvre en azote, les cellules végétatives se différencient en gamètes. Deux gamètes de types sexuels opposés se reconnaissent via des protéines flagellaires et fusionnent pour former un zygote diploïde (Beck & Haring, 1996). Lorsque les conditions redeviennent favorables, le zygote subit la méiose pour produire des cellules végétatives haploïdes. Une fraction de ces zygotes peuvent être maintenus de manière stable sous forme de cellules végétatives diploïdes par division mitotique dans des conditions de culture spécifiques, ce qui permet par exemple la complémentation génétique d'une souche mutante par ajout d'un allèle sauvage (Kariyawasam et al., 2019).





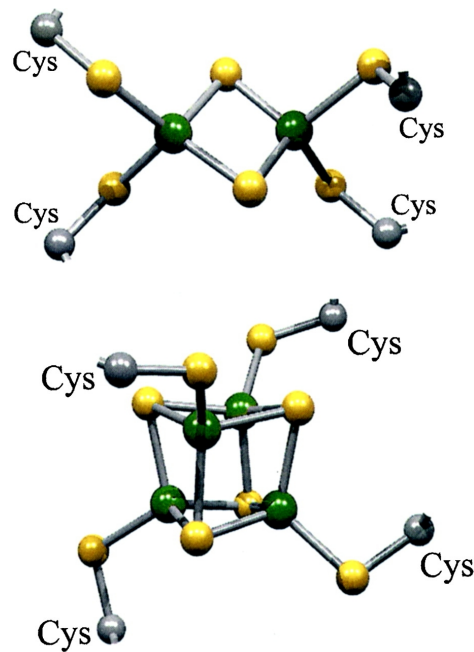
**Figure 2. Représentation simplifiée du cycle de vie de *C. reinhardtii*.** Provient de Nishimura, 2010.

La dernière caractéristique principale de *C. reinhardtii* faisant de cette algue un bon modèle de recherche est sa facilité de manipulation génétique. Effectivement, en plus d'être haploïde et d'avoir un cycle de vie court, ses différents génomes (mitochondrial, chloroplastique et nucléaire) sont entièrement séquencés. Le génome nucléaire, réparti sur 17 chromosomes contient environ 125Mb, pour environ 15000 gènes avec un pourcentage haut en GC (~65 %) (Blaby et al., 2014; Gallaher et al., 2018). L'étude de mutants est simplifiée par l'existence de banque de mutants. Le Chlamydomonas Library Project CLiP étant la plus complète en couvrant environ 83 % du génome nucléaire (Li et al., 2016, 2019). Les éditions spécifiques du génome sont possibles par des méthodes contemporaines telles CRISPR-Cas9 ou TALENs (Dhokane et al., 2023; Jeong et al., 2023). En ce qui concerne l'expression de protéines transgéniques, plusieurs méthodes de clonage sont utilisées et bien établies tel le gibbon assembly, le gateway cloning ou le modular cloning (MoClo) (Crozet et al., 2018; Emrich-Mills et al., 2021). Les techniques de transformation de la microalgue sont aussi bien maîtrisées, les méthodes d'électroporation, d'agitation de billes de verre, ou de biolistique sont toutes des méthodes applicables assez rapides et pour la plupart relativement peu coûteuses, excepté la biolistique (Zhang et al., 2021b). La transformation des plastides est aussi possible et relativement bien documentée (Zhang et al., 2021b).

## 2 Les centres fer-soufre (Fe-S)

### 2A Généralités sur les centres Fe-S

Les centres Fe-S sont cruciaux dans de nombreuses protéines, jouant un rôle essentiel notamment dans les chaînes de transfert des électrons, et donc de la production d'énergie. Ces centres Fe-S possèdent une importance évolutive significative, leur présence dans les premiers stades de la vie suggère un rôle fondamental dans les premières formes de métabolisme et de respiration (Garcia et al., 2022). En tant que cofacteur, ils facilitent le transport d'électrons grâce à leur capacité à osciller entre un état oxydé et réduit ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) de manière stable, sans compromettre la structure protéique (Imsande, 1999). Les atomes de soufre, majoritairement issus de cystéines par l'activité d'enzymes désulfurases, lient les atomes de fer, améliorant l'efficacité du transfert d'électrons. Bien que les centres Fe-S puissent adopter de multiples configurations, les formes [4Fe-4S] et [2Fe-2S] sont les plus communes dans la cellule (**Fig. 3**) (Hidese et al., 2011). Outre leur rôle dans le transport d'électrons, ces cofacteurs peuvent jouer un rôle lors de catalyses enzymatiques et de détection d'agents réducteurs ou oxydants, notamment l'oxygène (Fontecave, 2006). Les centres Fe-S sont notamment présents dans des enzymes impliquées dans la réduction de l'azote, la biosynthèse et la réparation de l'ADN, la réduction du peroxyde d'hydrogène, ou le métabolisme de certains acides aminés (Fontecave, 2006). L'activité de ces enzymes est tributaire de l'état redox des centres Fe-S et donc de l'état redox du milieu environnant, permettant une réponse adaptative aux conditions oxydantes ou réductrices de la cellule (Kobayashi et al., 2014). Un exemple est l'activation de facteurs de transcription de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif sous conditions oxydantes (Kobayashi et al., 2014). Il existe trois systèmes de biosynthèse des centres Fe-S chez les eucaryotes photosynthétiques : le système CIA (Cytoplasm Iron Sulfur Assembly) dans le cytoplasme, le système ISC (Iron Sulfur Cluster) dans les mitochondries, et le système SUF (Sulfur Metabolization) dans les chloroplastes (Vinella et al., 2009).

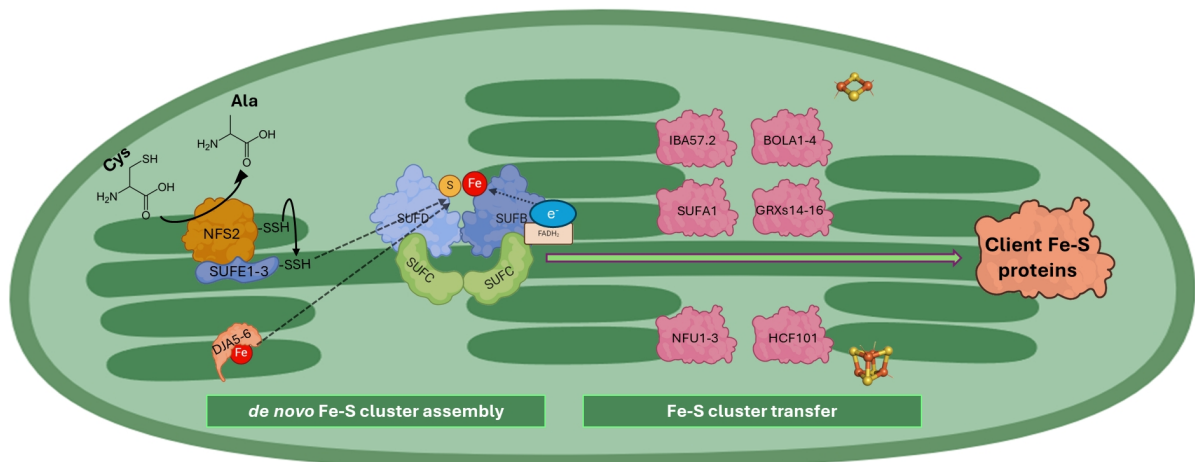


**Figure 3. Structure d'un centre [2Fe-2S] (en bas) et d'un centre [4Fe-4S] (en haut).** Les atomes de soufre sont représentés en jaune, ceux de fer en vert et les carbones des cystéines en gris. Adapté de Frazzon & Dean, 2001.

## 2B Synthèse des centres Fe-S chloroplastiques chez *A. thaliana*

La biosynthèse d'une holoprotéine fonctionnelle contenant un/des centre(s) Fe-S chez *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) peut être décomposée en deux étapes principales : (i) la synthèse *de novo* du cofacteur, après apport du fer et du soufre au un complexe dit "d'échafaudage" et (ii) le transport et l'insertion du centre nouvellement synthétisé vers les protéines cibles. Concernant *A. thaliana*, la source d'électrons et son mécanisme d'apport demeurent incertains bien que le FADH<sub>2</sub> ait été proposé comme source d'électrons (Braymer et al., 2021). Le mécanisme d'apport de fer n'est pas entièrement élucidé, mais 2 protéines de la famille DnaJ, DJA5 et DJA6 ont été proposées comme transporteurs (Zhang et al., 2021a). La mobilisation du soufre pour la biosynthèse des clusters Fe-S est réalisée par une cystéine désulfurase de type II nommée NFS2, qui transfère le soufre à SUFE1-3. SUFE1-3 joue alors un rôle intermédiaire dans le transfert du soufre au complexe SUFBC2D, où le cluster Fe-S est assemblé (Lu 2018). Les L-cystéines présentes dans le chloroplaste sont converties en L-alanine par NFS2, libérant un ion sulfure (S<sup>2-</sup>) (Roret et al., 2014). Une fois que la source de fer, de soufre et d'électrons sont disponibles, le complexe SUFBC<sub>2</sub>D assemblerait le centre Fe-S selon une configuration [2Fe-2S] ou [4Fe-4S], bien que nos connaissances sur ce mécanisme soient encore incomplètes (Przybyla-Toscano et al., 2018). Les sous-unités B et D comprennent le site catalytique tandis que les sous-unités C sont impliquées dans l'hydrolyse de

l'ATP, nécessaire à la formation du centre Fe-S (Przybyla-Toscano et al., 2018). Concernant le transport des centres Fe-S et leur incorporation dans d'autres protéines, chez *A. thaliana*, les protéines HCF101, NFU1-3, SUFA1, ainsi que potentiellement GRXS14/16, IBA57,2 et BOLA1/4 sont impliquées (Przybyla-Toscano et al., 2018). Les protéines HCF101, NFU1 et NFU3 se chargent principalement des centres [4Fe-4S], SUFA1 des centres [2Fe-2S] et NFU2 des deux types de centres (**Fig. 4**) (Berger et al., 2020).



**Figure 4. Biosynthèse des holoprotéines chloroplastiques contenant un/des centre(s) Fe-S chez la plante modèle *A. thaliana*.** Dans la partie gauche du schéma, l'assemblage *de novo* est représenté par les divers facteurs intervenant dans l'apport de fer et de soufre ainsi que dans le complexe d'assemblage des centres Fe-S. On y retrouve NFS2, SUFE1-3 ainsi que les protéines DJAS-6 pour l'apport du soufre et du fer. Les protéines SUFD, SUFB et SUFC forment le complexe d'assemblage SUFB<sub>2</sub>D nécessaire à l'assemblage des centres Fe-S. La partie de droite du schéma se focalise sur les protéines impliquées dans le transfert de ces centres Fe-S auprès des protéines cibles. On y retrouve les protéines IBA57.2, Bola1-4, SUFA1, GRXs14-16 pour le transfert des centres [2Fe-2S] et HCF101, NFU1 et NFU3 pour le transfert des centres [4Fe-4S]. Chez *A. thaliana*, seul NFU2 est bivalent, assurant le transfert de centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S] (Gao et al. 2013). Provient de Kairis, 2023.

## 2C Similarités et différences dans la biosynthèse des centres Fe-S entre *A. thaliana* et *C. reinhardtii*

Bien que la caractérisation *in vivo* et *in vitro* des protéines impliquées dans la biosynthèse des centres Fe-S chez *C. reinhardtii* soit encore limitée, certaines études ont révélé des similarités et des différences avec *A. thaliana*. Des analyses d'alignement de séquences entre *C. reinhardtii* et *A. thaliana* ont été réalisées (Przybyla-Toscano et al., 2021). Ces analyses ont mis en évidence une similitude pour la majorité des composants des deux espèces. Cependant, des différences existent, notamment concernant la NFS2 (cystéine désulfurase), pour laquelle deux protéines orthologues,

SUFS1 et NIFS2, ont été identifiées chez *C. reinhardtii*. De plus, l'orthologue de SUFE2 semble absent chez cette algue (**Tableau. 1**) (Przybyla-Toscano et al., 2021).

Chlamydomonas Gene Names	Accession Numbers	Function(s)	Arabidopsis Orthologs
<i>CSD4, SUFS1</i>	Cre12.g525650	Cysteine desulfurase, sulfur donor	At1g08490 ( <i>NFS2</i> )
<i>CSD2, NIFS2</i>	Cre07.g322000		None
<i>SUFE1</i>	Cre06.g309717	Sulfur relay system from cysteine desulfurase	At4g26500 ( <i>SUFE1</i> )
<i>SUFE3/NIC7</i>	Cre06.g251450	Quinolinate synthetase A	At1g67810 ( <i>SUFE2</i> ) At5g50210 ( <i>SUFE3</i> )
<i>SUFB</i>	Cre15.g643600	Scaffold protein complex	At4g04770 ( <i>SUFB</i> )
<i>SUFC</i>	Cre07.g339700	Scaffold protein complex	At3g10670 ( <i>SUFC</i> )
<i>SUFD</i>	Cre12.g513950	Scaffold protein complex	At1g32500 ( <i>SUFD</i> )
<i>GRX3</i>	Cre07.g325743	Transfer protein, involved in Fe-S cluster trafficking	At3g54900 ( <i>GRXS14</i> )
<i>GRX6</i>	Cre01.g047800		At2g38270 ( <i>GRXS16</i> )
<i>BOL1</i>	Cre03.g180700	Targeting factor, involved in Fe-S cluster trafficking	At1g55805 ( <i>BOLA1</i> )
<i>BOL4</i>	Cre09.g394701		At5g17560 ( <i>BOLA4</i> )
<i>SUFA1</i>	Cre06g299350*	Transfer protein, involved in Fe-S cluster trafficking	At1g10500 ( <i>SUFA1</i> )
<i>IBA57.2/CGL77</i>	Cre12.g552850	Targeting factor, involved in Fe-S cluster trafficking	At1g60990 ( <i>IBA57.2</i> )
<i>NFU1</i>	Cre17.g710800	Transfer protein, involved in Fe-S cluster trafficking	At4g01940 ( <i>NFU1</i> )
<i>NFU2</i>	Cre18.g748447		At5g49940 ( <i>NFU2</i> ) At4g25910 ( <i>NFU3</i> )
<i>HCF101</i>	Cre01.g045902		At3g24430 ( <i>HCF101</i> )

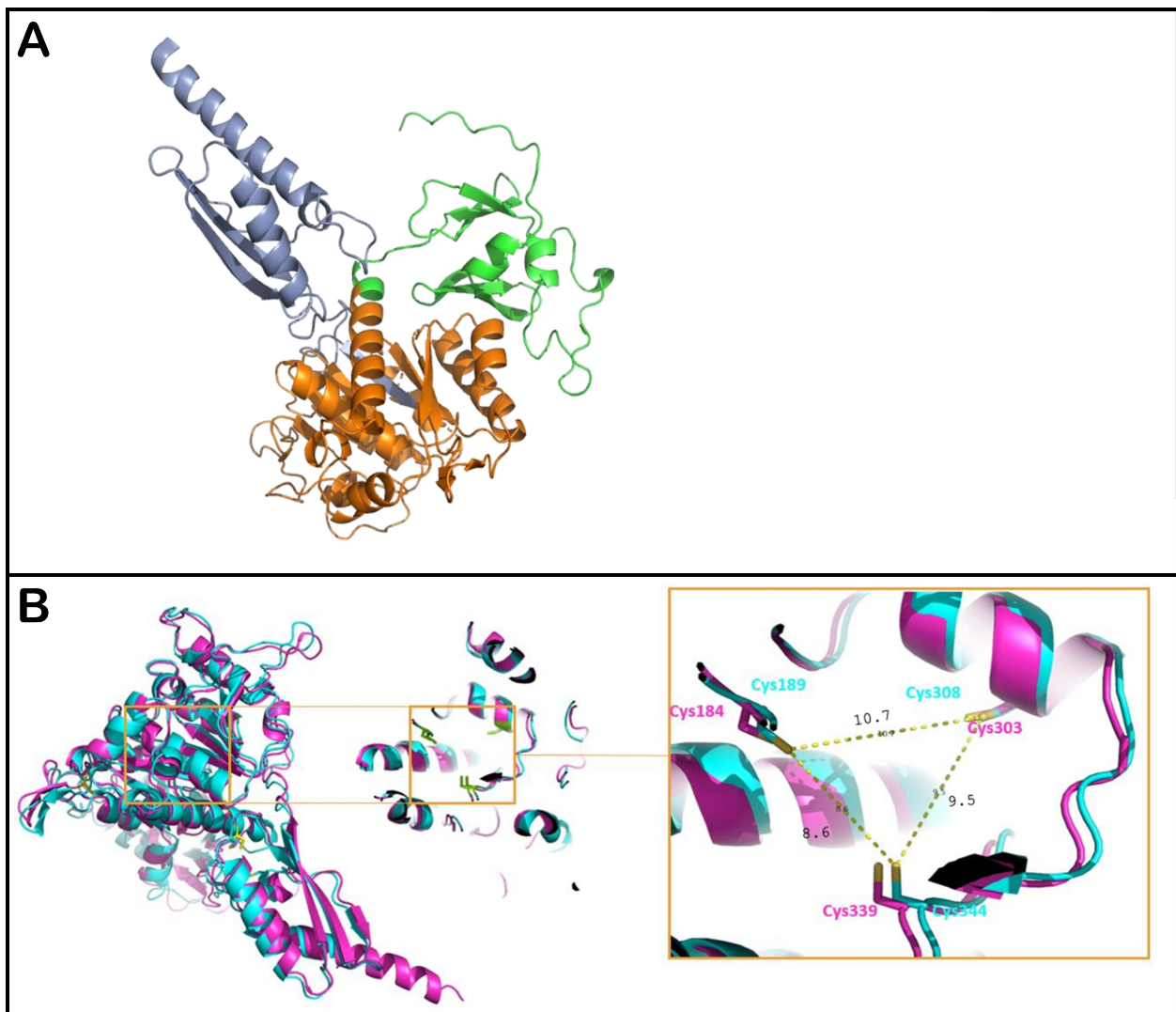
**Tableau 1. Éléments de la voie SUF de *C. reinhardtii*.** Les analyses de *C. reinhardtii* de ce tableau proviennent d'une recherche par BLAST en comparant les séquences des protéines de la voie SUF de *C. reinhardtii* venant de Phytozome (V5.5) avec celles de *A. thaliana*. Proviennent de Przybyla-Toscano et al., 2021.

## 2D La protéine HCF101 (High Chlorophyll Fluorescence 101)

Un mutant *hcf101* a été isolé chez *A. thaliana*, par mutagenèse aléatoire, en sélectionnant des souches présentant une fluorescence anormale, indicatrice d'une altération des pigments photosynthétiques et impacté dans l'intégrité du photosystème I (Meurer et al., 1996). HCF101 est une protéine chloroplastique d'environ 55 kDa sans le peptide signal. Chez *A. thaliana*, cette protéine est monomérique et possède un domaine contenant une boucle P (P-loop), potentiellement capable d'hydrolyser l'ATP, bien que cette activité ATPasique n'ait pas été confirmée (Schwenkert et al., 2010). AtHCF101 présente également deux domaines de fonction inconnue (DUF59 et DUF971) (**Fig. 5A**) (Lezhneva et al., 2004). HCF101 joue un rôle essentiel dans le transfert des

centres [4Fe-4S] aux sous-unités PsaA, PsaB et PsaC du photosystème I (Lezhneva et al., 2004). Les centres Fe-S sont fournis par les protéines NFU2 et NFU3, essentielles pour l'apport de ces centres à HCF101 (Touraine et al., 2019). Ce lien est renforcé par la présence du domaine DUF59, commun à HCF101 et NFU (Kairis et al. 2024)a. L'importance d'HCF101 est démontrée par l'étude de mutants *hcf101*, qui ne sont pas viables sans l'apport de sucrose, soulignant ainsi son rôle indispensable dans la photosynthèse (Lezhneva et al., 2004). Par sa fonction et sa structure, HCF101 est classée dans la famille des P-Loop-NTPase ou MRP (metG-related protein) (Lezhneva et al., 2004).

Chez *C. reinhardtii* (CrHCF101), la protéine conserve le domaine P-loop et les deux domaines DUF, mais diffère par la présence de cystéines alternatives potentiellement responsables de la liaison des centres [4Fe-4S] (Kairis et al., 2024). En effet, deux des cystéines indiquées comme essentielle à la fonction de la protéine, chez *A. thaliana*, ne sont pas conservées dans CrHCF101, remplacées par d'autres cystéines identifiées par simulation AlphaFold (**Fig 5B**)(Kairis et al., 2024). En plus de ces variations dans la liaison des centres [4Fe-4S], d'autres différences notables existent entre ces deux espèces. Une autre différence majeure est la viabilité du mutant *hcf101* de *C. reinhardtii* qui ne nécessite pas de supplément (croissance en milieu minimal), contrairement à celui d'*A. thaliana*, bien que sa croissance et l'efficacité de la photosynthèse soient impactées (Kairis, 2023). Des différences notables sont également observées entre HCF101 et les orthologues de HCF101 présents chez les protistes (Haptista and Cryptista) (Boyd et al., 2008; Bych et al., 2008). Ces orthologues agiraient de manière dimérique avec un motif CXXC pour lier les centres [4Fe-4S], révélant une grande diversité structurelle au sein de la famille des P-Loop-NTPases (Kairis et al., 2024; Pyrih et al., 2021).



**Figure 5. Prédiction de structures de HCF101 générées par AlphaFold (Jumper et al., 2021).** A) Prédiction de la structure de AtHCF101. Le domaine DUF59 est coloré en gris, le domaine DUF971 en vert, et le domaine contenant le P-loop est en orange. B) Superposition des prédictions de structure de AtHCF101 (violet) et CrHCF101 (cyan). Les cystéines candidates pour fixer le centre Fe-S sont en jaune. Provient de Kairis, 2023.

## 2E Protéines NFU chloroplastiques

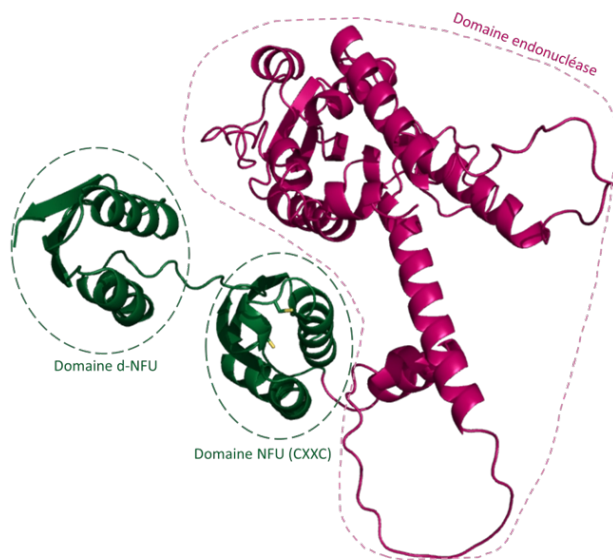
Les protéines chloroplastiques de type NFU sont au nombre de trois chez *A. thaliana* (NFU1, 2 et 3). Transcrites dans le noyau, elles possèdent une séquence d'adressage spécifique vers le chloroplaste. Ces protéines comportent deux domaines conservés de type NFU (NifU-like domain, signifiant Nitrogen fixation Unit, retrouvé chez certaines bactéries), qui donnent leur nom à ces protéines (Gao et al., 2013). L'un de ces domaines NFU, caractérisé par un motif conservé CXXC, présente une activité de fixation de centre Fe-S (Roland et al., 2020). L'autre domaine NFU serait inactif, les cystéines n'étant pas conservées (Satyanarayan et al., 2021). Les trois isoformes sont

capables de lier un centre de type [4Fe-4S], et NFU2, en particulier, serait également capable de lier un centre [2Fe-2S] (Gao et al., 2013; Nath et al., 2016; Roland et al., 2020). Cette capacité de liaison provient des cystéines du domaine actif, qui permettent de se lier aux atomes de fer de ces structures (Satyanarayan et al., 2021). Les protéines NFU posséderaient des rôles redondants, comme en témoigne le fait que les mutants simples *nfu2* et *nfu3* ne sont pas létaux, contrairement aux mutants doubles *nfu2* x *nfu3* (Satyanarayan et al. 2021; Touraine et al., 2019). Cette idée de redondance est également renforcée par les réductions additives de NFU1, NFU2 et NFU3 sur l'activité du PSI, bien que l'impact ne soit pas similaire entre les trois protéines, mais plutôt hiérarchique (Satyanarayan et al., 2021; Touraine et al., 2019). Les protéines NFU interviennent dans le transfert et l'insertion de centres Fe-S aux protéines cibles. Dans leur rôle de maturation, la protéine NFU2 fournirait potentiellement le centre Fe-S aux protéines suivantes : FTR (ferredoxin-thioredoxin reductase), SIR (Sulfite Reductase), GRXS16 (Glutaredoxin S16), APR1 (Adenosine 5'-Phosphosulfate Reductase 1) et DHAD (Dihydroxyacid Dehydratase) (Berger et al., 2020). NFU1, quant à elle, interagirait notamment avec ISPG et THIC (Roland et al., 2020). Concernant leur rôle de protéines de transfert, NFU2 et NFU3 joueraient un rôle dans l'apport de centres [4Fe-4S] à la protéine HCF101, renforçant la redondance entre ces deux protéines (Touraine et al., 2019; Schwenkert et al., 2010).

Chez *C. reinhardtii*, seules deux isoformes de NFU sont présentes. *CrNFU1* est l'orthologue de *AtNFU1*, tandis que *CrNFU2* est l'orthologue de *AtNFU2* et *AtNFU3*, qui résulteraient d'une duplication de gène. Comme mentionné précédemment, l'isoforme NFU3 est absente chez la microalgue. Chez *C. reinhardtii*, la protéine NFU1 est nécessaire à la maturation de certaines protéines actives à l'obscurité, dont la protochlorophyllide oxydoréductase (DPOR), permettant la synthèse de la chlorophylle *a* à l'obscurité (Przybyla-Toscano, non publié). Une autre différence majeure est une structure différente de *CrNFU1* par rapport à *AtNFU1*. Chez l'algue, NFU1 possède un domaine supplémentaire retrouvé dans certaines endonucléases, en plus des deux domaines NFU (Godman & Balk, 2008; Przybyla-Toscano et al., 2021). Ce domaine, de motif GIY-YIG, a été initialement identifié dans des endonucléases de restriction du phage T4 et permettent de cliver l'ADN à certains sites particuliers. Plus tard, ce motif a aussi été identifié dans des transposons non LTR, dans la réparation de l'ADN et aussi dans la recombinaison (Dunin-Horkawicz et al., 2006). La fonction de ce domaine est inconnue au sein de la protéine NFU1 (**Fig. 6**). Initialement, il était supposé que les protéines NFU1 et HCF101 chez *Chlamydomonas* remplissaient des rôles distincts : NFU1 était impliquée dans les réponses à l'obscurité et à l'anoxie, tandis que HCF101 jouait un rôle à la lumière (Kairis, 2023). Cette distinction était soutenue par des données transcriptomiques



montrant que les deux gènes ne sont pas transcrits aux mêmes moments lors d'un cycle lumière-obscurité (Kairis, 2023). Cependant, des recherches récentes ont révélé des résultats inattendus chez les mutants *nfu1* soumis à des conditions d'obscurité et d'anoxie, suggérant une redondance possible entre NFU1 et HCF101. Notamment, la protéine HCF101 a été trouvée en abondance accrue dans ces mutants, indiquant qu'elle pourrait compenser l'absence de NFU1 dans certaines conditions (Kairis, 2023).

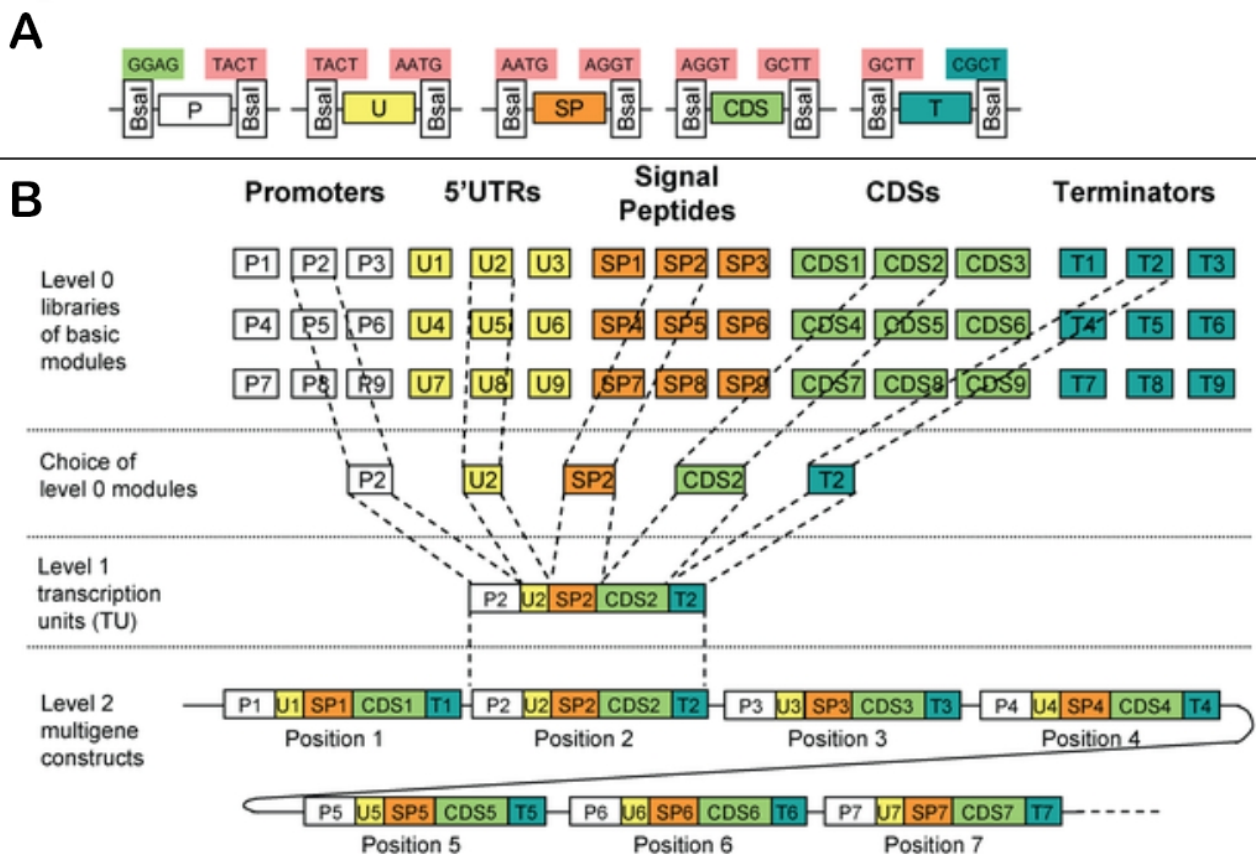


**Figure 6. Prédiction de la structure de la protéine NFU1 de *C. reinhardtii* par AlphaFold (Jumper et al., 2021; Mirdita et al., 2022).** Le domaine de motif GIY-YIG est représenté en rouge. Les deux domaines NFU sont représentés en vert. Adapté de Kairis, 2023.

### 3 Modular Cloning

Basé sur la technique du Golden Gate cloning (Engler et al., 2009), le Modular Cloning (MoClo) a été développé et décrit en 2011 par Ernst Weber et Sylvestre Marillonnet (Weber et al., 2011). Cette méthode représente une amélioration significative par rapport aux techniques de clonage moléculaire antérieures, car elle permet d'assembler plusieurs fragments d'ADN de manière plus précise et plus fiable en une seule réaction. Elle utilise des enzymes de restriction de type IIS qui ont la particularité de couper l'ADN quelques bases au-delà du site de restriction, en laissant des extensions de 4 bases. Cette spécificité permet d'éliminer les sites de restriction dans le produit final, une tâche qui est plus difficilement avec les techniques de clonage classiques. En pratique, chaque fragment d'ADN à assembler est flanqué de chaque côté par un site de restriction de type IIS, tout en rendant les extensions, résultant des coupures de l'enzyme, complémentaires entre les

différents morceaux d'ADN. Grâce à l'appariement de ces extensions complémentaires, il est possible de choisir l'ordre et l'orientation de l'assemblage des fragments (**Fig. 7A**). Une ligase T4 est ensuite utilisée pour catalyser la formation des liaisons phosphodiester nécessaires à la suite des coupures enzymatiques. Les extensions de 4 pb, choisies après action de l'enzyme de restriction, sont sélectionnées selon un modèle prédéfini en fonction de leur rôle ou position dans la construction génétique. Cette standardisation facilite le partage et la réutilisation des composants dans d'autres constructions similaires. Par exemple, chaque promoteur utilisé est flanqué des mêmes séquences cohésives pour faciliter son interchangeabilité. Le système MoClo comprend quatre niveaux d'assemblage : 0, 1, 2, et M. Chaque niveau dispose d'un vecteur accepteur contenant une origine de réplication bactérienne, ce qui permet l'amplification de la construction par des bactéries (**Fig. 7B**). Le niveau 0 regroupe les éléments génétiques de base tels que le promoteur, le CDS et le terminateur. Le niveau 1 permet d'assembler différents éléments du niveau 0 pour former une unité de transcription. Le niveau 2 consiste à combiner plusieurs unités de transcription en assemblant des éléments du niveau 1. L'avantage du niveau M réside dans la possibilité d'assembler plusieurs éléments du niveau 2, permettant l'intégration de systèmes fonctionnels complexes dans diverses espèces (Weber et al., 2011).



**Figure 7. Représentation simplifiée du MoClo.** A) Représentation et organisation des 4 niveaux d'assemblage : 0, 1, 2, M. B) Mécanisme de standardisation imposant des séquences spécifiques aux extensions de 4 bases, permettant l'appariement des extensions complémentaires et donc de choisir l'ordre et l'orientation des fragments résultant de l'action d'une enzyme de restriction de type IIS telle que *BsaI*. Adapté de Weber et al., 2011

Cela ouvre la voie à des applications biotechnologiques avancées pour la biologie synthétique, telles que la production de biocarburants (Choi et al., 2020), la thérapie génétique régulée (Anderson et al., 2006), des biosenseurs environnementaux (Del Valle et al., 2021), ou l'optimisation de la photosynthèse pour l'agriculture (da Fonseca-Pereira et al., 2022). Depuis sa publication initiale, le MoClo a bénéficié de plusieurs améliorations, notamment en termes de standardisation et de flexibilité, avec des kits tels que le MetClo (Lin & O'Callaghan, 2018), MODAL (Casini et al., 2014), PODAC (Van Hove et al., 2017), MoCloFlex (Klein et al., 2019). Le MoClo a aussi bénéficié de l'addition de bibliothèques de modules pour des organismes spécifiques y compris MoClo Plant Parts Kit pour les plantes (Engler et al., 2014), CyanoGate Kit pour les cyanobactéries (Vasudevan et al., 2019), EcoFlex pour *E. coli* (Moore et al., 2016), MoClo-YTK pour *S. cerevisiae* (Lee et al., 2015), pour *C. reinhardtii* (Crozet et al., 2018) et bien d'autres kits pour divers organismes. L'addition de ces banques permet une utilisation plus facile et efficace du MoClo. Ces banques contiennent une série de modules spécifiques à un organisme, tels des promoteurs, des régions non codantes, des CDS, des terminateurs, des peptides signaux, des vecteurs de clonage ou même des outils pour CRISPR-Cas9.

## 2. Objectifs de travail

Ce mémoire a deux objectifs principaux.

Le premier objectif est de vérifier une hypothèse émise dans des travaux précédents, suggérant une redondance possible entre les protéines HCF101 et NFU1. Pour tester cette hypothèse, la première étape a consisté à isoler des doubles mutants affectés dans les gènes *NFU1* et *HCF101*. Une fois ces mutants obtenus, la deuxième étape a consisté à étudier différents paramètres susceptibles de démontrer le phénomène de redondance entre les deux protéines. Les paramètres analysés incluent le phénotype de croissance sous différentes conditions, l'activité photosynthétique mesurée par fluorescence de la chlorophylle *a*, et la présence de certaines protéines cibles connues de HCF101 par Western blot.

Le deuxième objectif est de déterminer les protéines cibles/partenaires de HCF101. Pour ce faire, la première étape a consisté à cloner un gène encodant une protéine HCF101-3xFlag en utilisant la méthode de clonage MoClo. Cette protéine a ensuite été exprimée chez *C. reinhardtii* par transformation génétique. Après avoir vérifié son expression par Western blot, la deuxième étape a consisté à effectuer une co-immunoprécipitation avec des anticorps anti-Flag afin d'isoler HCF101 avec ses partenaires potentiels et de les identifier par spectrométrie de masse.

### 3. Matériel et méthodes

Sauf indication contraire, les produits chimiques proviennent de Sigma-Aldrich et les amorces de Eurogentec (Belgique).

#### 1 Souches utilisées

Les souches de *C. reinhardtii* utilisées sont la souche sauvage (CC-4533 cw15 mt-), le mutant *hfc101* (*HCF101*, Cre01.g045902\_4532.1), ainsi que le mutant *nfu1-1* (*NFU1*, Cre18.g748447\_4532.1). Ces souches proviennent de la banque CLiP (Li et al., 2016). Elles sont maintenues à 25°C en conditions mixotrophes sur milieu Tris-acétate-phosphate (TAP) solide, sous une faible intensité lumineuse constante de 30-50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

#### 2 Extraction protéique totale

Les extraits protéiques totaux proviennent de culture liquide de *C. reinhardtii*. La densité optique (DO) est mesurée telle que 500  $\mu\text{l}$  de cultures sont dilués (1:1) et l'absorbance de l'échantillon est mesurée à 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis LAMBDA™ 265 (PerkinElmer). Pour l'extraction, 1,5 ml de culture non diluée sont centrifugés pendant 2 minutes à 20 000 g. Le surnageant est retiré et le culot est solubilisé dans une solution de lyse (2 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 % de glycérol, 100 mM de dithiothréitol (DTT), et 60 mM de Tris-HCl à pH 6,8). Le volume de solution de lyse ajouté est proportionnel à la DO mesurée selon la relation suivante : volume ( $\mu\text{l}$ ) = 242  $\times$  DO mesurée. Une fois le culot solubilisé, la solution est chauffée pendant 7 minutes à 95°C. Les extraits sont ensuite conservés à -80°C. Avant utilisation, les extraits sont décongelés à température ambiante et centrifugés pendant 5 minutes à 20 000 g.

#### 3 Isolement de chloroplastes et purification des protéines chloroplastiques.

Le protocole est une adaptation de (Mason et al., 2006) et a été optimisé par (Kairis, 2023). À l'exception des étapes de culture, toutes les étapes du protocole jusqu'à l'isolement des chloroplastes se déroulent à 4°C. Les algues sont d'abord cultivées en pré-culture de  $\pm$  60 ml en TAP

(Tris-acétate-phosphate) pH 7 ou TMP (Tris-minimal-phosphate) pH 7, selon les besoins. Lorsque la concentration atteint les  $5 \cdot 10^5$  cellules/ml, la culture est transférée dans 340 ml de milieu frais afin d'atteindre 400 ml. Les cellules sont conservées sous une intensité lumineuse de  $30 \mu\text{mol}$  de photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , avec agitation douce, jusqu'à atteindre une quantité totale en chlorophylle de 5 mg (environ 3-4 jours). Les cultures sont centrifugées pendant 10 minutes à 3000g dans un rotor SLA 3000 (Thermo Scientific). Le culot est mis en suspension dans 100 ml de Hepes-KOH 50 mM pH 7,2. La solution est ensuite centrifugée pendant 10 min à 3000 g. Le culot est repris dans 2 ml d'une solution de Hepes-KOH 50 mM pH 7,2. Ensuite, 8 ml de tampon d'isolement (Sorbitol 300 mM, Hepes-KOH 50 mM pH 7,2, EDTA 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, PMSF 100  $\mu\text{M}$ , cocktail d'inhibiteur de protéase 0,1X) sont ajoutés. Rapidement, la solution contenant les cellules est passée au travers d'une aiguille de seringue gauge 27 avec un débit de 0,1 ml/s afin de lyser les cellules tout en gardant les chloroplastes intacts. Les cellules et les chloroplastes sont récupérés par une centrifugation de 2 min à 1500 g. Le culot est ensuite suspendu dans 2 ml de tampon d'isolement. La solution est ensuite déposée délicatement sur un gradient en 3 phases (20 %, 45 % et 60 %) de Percoll, chaque phase contenant 3 ml de la solution de Percoll. Le gradient de Percoll est ensuite centrifugé pendant 15 min à 4200 g. Les chloroplastes sont isolés entre la phase 45 % et 65 % (représentés par une bande verte) et sont récupérés et mis en solution avec 10 ml de tampon d'isolement. La solution est centrifugée pendant 5 min à 4000 g. Le culot est placé en suspension dans 250  $\mu\text{l}$  de Hepes-KOH 50 mM pH 8, Sorbitol 300 mM.

Afin de précipiter les protéines chloroplastiques, 50  $\mu\text{l}$  de la solution contenant les chloroplastes et le Hepes-KOH sont dilués dans 50  $\mu\text{l}$  d'acide trichloroacétique à 20 % et placés sur glace pendant 20 min. Le précipité est centrifugé pendant 10 min à 21 000 g. Le surnageant est ensuite éliminé et un lavage du culot avec 1 ml d'acétone à 100 % est effectué à froid en vortexant la solution. La solution lavée est ensuite centrifugée à 21 000 g pendant 5 min. Un deuxième lavage est effectué avec 1 ml d'acétone à 80 % à froid. La solution est de nouveau centrifugée et le surnageant est éliminé. L'excédent d'acétone est éliminé par évaporation à  $95^\circ\text{C}$ . Le culot est ensuite solubilisé dans 50  $\mu\text{l}$  d'eau distillée contenant 0,2 % SDS.

#### **4 Détermination de la concentration en chlorophylles**

Un volume de 1 ml de la culture est placé dans un tube de 1,5 ml pour être ensuite centrifugé 3 min à 21000 g. Le surnageant est éliminé et le culot est mis en suspension dans 1 ml de méthanol glacial. Chaque échantillon est ensuite analysé au spectrophotomètre UV/Vis LAMBDA™ 265

(PerkinElmer) à 750 nm, 665,2 nm et 652,4 nm. Les concentrations de chlorophylles sont estimées selon les équations suivantes :  $16,72 * A_{665,2} - 9,16 * A_{652,4} = \text{chl } a$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) et  $34,09 * A_{665,2} - 15,28 * A_{652,4} = \text{chl } b$  ( $\mu\text{g/ml}$ ). La quantité de chlorophylle totale est estimée comme la somme de la quantité de chlorophylle *a* et de chlorophylle *b* dans l'échantillon (en  $\mu\text{g/ml}$ )

## 5 Extraction d'ADN génomique

Le protocole suivi est adapté de Newman et al., 1990.

$3 \times 10^7$  cellules sont récoltées et transférées dans un tube de 1,5 ml contenant 500  $\mu\text{l}$  de TEN (10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl). La solution est agitée puis centrifugée à 1500 g pendant 2 min. Le surnageant est éliminé et le culot est mis en suspension dans 150  $\mu\text{l}$  d'eau froide. Un volume de 300  $\mu\text{l}$  de SDS-EB (2 % SDS, 400 mM NaCl, 40 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8) est ensuite ajouté. Après avoir agité la solution, 350  $\mu\text{l}$  d'une solution de phénol/CIA pH7,2 (1:1) est ajouté. Le mélange est agité au vortex 20-30 secondes et placé sur un agitateur pendant 5 min. Les échantillons sont ensuite centrifugés 5 min à 15000g. La phase aqueuse (420  $\mu\text{l}$ ) est isolée et transférée dans un nouveau tube de 1,5 ml contenant 300  $\mu\text{l}$  d'une solution de CIA (chloroforme 24:1 alcool isoamylique) et l'étape précédente est répétée. Afin de précipiter l'ADN, 750  $\mu\text{l}$  d'éthanol absolu glacé sont ajoutés à la phase aqueuse. Les échantillons sont ensuite agités à faible vitesse jusqu'à la formation des fibres et placé sur glace pendant une nuit à  $-20^\circ\text{C}$ . Les échantillons sont ensuite centrifugés 5 min à 15000 g et le surnageant est éliminé. Un lavage avec 300  $\mu\text{l}$  d'éthanol 70 % (v/v) est ensuite effectué en vortexant brièvement l'échantillon. Après avoir centrifugé 5 min à 15000 g, l'éthanol est retiré avec une micropipette et le surplus est éliminé par évaporation à  $72^\circ\text{C}$ . L'ADN est ensuite solubilisé dans 40  $\mu\text{l}$  d'eau distillée. Une fois le culot solubilisé, la concentration en ADN est estimée au nanodrop (BioTek Synergy MX, Gen5 Take3 Module) et les échantillons sont stockés à  $-20^\circ\text{C}$ .

## 6 MoClo

### 6A Modules/plasmides utilisés

La séquence des plasmides accepteurs utilisés PiCH41295 (module 1 du L0 intégrant région 5'UTR endogène de HCF101), PiCH47742 (L1), pAGM8031 (L2) est trouvable sur « Addgene » via ce [lien](#)

La séquence des plasmides contenant les modules du L0 : soit peptide 3xFlag (pCM0-094), multi-stop (pCM0-101), terminateur+3'UTR de la  $\beta$ -tubuline (pCM0-118) est disponible sur le site « Chlamydomonas Ressource Center » via ce [lien](#)

## 6B Construction de niveau 0 par PCR avec la polymérase iProof et purification de l'ADN

Kit utilisé: iProof™ High-Fidelity PCR Kit (BioRad). Pour une réaction PCR de 20  $\mu$ L:

	Volume ( $\mu$ L)		Volume ( $\mu$ L)
Eau ultrapure	9.7	Amorce 1 (10 $\mu$ M)	1
iProof GC Buffer 5x	4	Amorce 2 (10 $\mu$ M)	1
dNTP (10 mM )	0.4	DNA (>100ng/ml)	1
Formamide (100%)	1	Polymérase iProof (2 U/ $\mu$ L)	0.4
Glycérol (100%)	1.5		

Programme du thermocycleur (Prime Thermal Cyclers, Techne®) :

Etapas	Température (°C)	Temps (secondes)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	98	45	1
Dénaturation	98	10	30
Hybridation	Tm*+3	30	
Extension	72	120/kb à amplifier	
Extension finale	72	300	1

\*Tm correspond à la plus haute température de fusion d'amorce.

Pour purifier le produit PCR, une électrophorèse est réalisée sur gel d'agarose 1 % à 100V pendant 30-45 minutes. La bande d'intérêt est ensuite isolée à l'aide d'un scalpel. Pour purifier l'ADN, le kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) est utilisé selon le protocole recommandé.

Primers :

Reverse: 5'TTG AAG ACT TCA TTT TGT GCT CAC GAC TCT TGC GG 3'

Forward: 5'TTG AAG ACT TGG AGA GCT CGC CTG CGA AAT GGG AT 3'



## 6C PCR sur colonie

Les réactifs proviennent de Promega, USA. Pour 20µL de mélange PCR :

	Volume (µL)		Volume (µL)
Eau ultrapure	8.5	Amorce 1 (10 µM)	2
GoTaq Buffer 5x	4	Amorce 2 (10 µM)	2
dNTP (10 mM)	0.4	DNA (>100ng/ml)	1
DMSO 100%	2	GoTaq polymérase (5U/µl)	0.1

Programme du thermocycleur (Prime Thermal Cyclers, Techne®) :

Etapas	Température (°C)	Temps (secondes)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	300	1
Dénaturation	95	60	30
Hybridation	Tm*-2	30	
Extension	72	120/kb à amplifier	
Extension finale	72	300	1

\*Tm correspond à la plus haute température de fusion d'amorce.

L'électrophorèse est réalisée sur gel d'agarose 1 % à 100V pendant 30-45 minutes.

Primers :

- L0\_for. CGT TAT CCC CTG ATT CTG TGG ATA AC
- L0\_rev. GTC TCA TGA GCG GAT ACA TAT TTG AAT G
- L1\_for. GAA CCC TGT GGT TGG CAT GCA CAT AC
- L1\_rev. CTG GTG GCA GGA TAT ATT GTG GTG
- L2\_for. GTG GTG TAA ACA AAT TCA CGC
- L2\_rev. GGA TAA ACC TTT TCA CGC CC

## 6D Diglig (digestion/ligation)

Les réactifs proviennent de Thermo Scientific™. Pour 15 µL de mélange:

	Volume (µL)		Volume (µL)
T4 DNA Ligase	1	ADN de chaque module (50ng/µl)	1
T4 DNA Ligase Buffer 10x	1.5	BSA (2mg/ml)	1.5
Enzyme de restriction de type IIs : Eco31I (BsaI) (10 U/µL) Ref :ER0291 BpiI (BbsI) (10 U/µL) Ref :ER1011	1	ADN du plasmide receveur (50ng/µl)	1
Eau ultrapure	8		

Programme du thermocycleur (Prime Thermal Cyclers, Techne®) :

Étapes	Température (°C)	Temps (secondes)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	37	300	1
Digestion	37	180	30
Ligation	16	320	
Digestion finale	37	300	1
Stabilisation de la ligation	55	300	1
Inactivation de l'enzyme de restriction	80	300	1

## **6E Transformation bactérienne et purification des plasmides**

200  $\mu\text{L}$  de bactéries compétentes (DH5- $\alpha$ ) sont dégelés sur glace. 5  $\mu\text{L}$  du plasmide purifié sont ajoutés et mélangés brièvement avec les bactéries. Le mélange est ensuite incubé sur glace pendant 30 minutes. Un choc thermique (42°C) est appliqué pendant 30 secondes, puis le mélange est placé à nouveau sur glace pendant 5 minutes. Par la suite, le mélange est maintenu à température ambiante pendant 1 minute et 500  $\mu\text{L}$  de milieu LB liquide y est ajouté. Le produit est ensuite incubé à 37°C sous agitation pendant 1 heure. 100  $\mu\text{L}$  de culture sont étalés sur une boîte de Pétri contenant l'agent sélectif (spectinomycine 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , carbenicilline 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou paramomycine 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et hygromycine 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  selon le niveau du MoClo) et du X-gal 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  comme substrat chromogène. Les 600  $\mu\text{L}$  restants sont centrifugés pendant 1 minute à 21000g. Le culot est ensuite suspendu dans 100  $\mu\text{L}$  de LB et déposé sur une seconde boîte contenant le même substrat chromogène et marqueur sélectif utilisé précédemment. Les deux boîtes de cultures sont incubées sur la nuit à 37°C. Le lendemain, une colonie bleue est sélectionnée pour être remise dans du LB + marqueur de sélection et laissée sur la nuit afin d'amplifier la quantité de transformants. Le plasmide d'intérêt est ensuite purifié en utilisant un kit commercial (PlasmidPrep Mini Spin kit, Cyvia, UK) selon le protocole fourni.

## **6F Digestion du plasmide par enzyme de restriction**

Pour un total de 20  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$  de tampon FastDigest (Thermo Scientific™) sont ajoutés au mélange. À cela, 1  $\mu\text{L}$  de l'enzyme de restriction appropriée (BsaI ou BpiI) (Thermo Scientific™) est ajouté, ainsi que 350 ng du plasmide à digérer, complété avec de l'eau stérile pour atteindre 20  $\mu\text{L}$  au total. La solution est incubée à 37°C pendant une heure, puis déposée sur un gel d'agarose à 1 %. L'ADN est séparé par électrophorèse pendant 45 minutes en appliquant une différence de potentiel de 100 V.

## **6G Transformation *C. reinhardtii* par électroporation**

Le protocole est adapté de Shimogawara et al., 1998.

Les algues sont suspendues dans 100 mL de milieu TAP (Tris-acétate-phosphate) dans une Erlenmeyer de 250 mL jusqu'à atteindre la phase de croissance mid-exponentielle ( $3-6 \cdot 10^6$  cellules/mL). Ensuite, les cellules sont centrifugées à 5000 rpm (Hettich Universal 2) pendant 5 minutes à 25°C, et le surnageant est retiré. Par la suite, les cellules sont placées en solution dans du TAP enrichi en sucrose à 40 mM pour obtenir une concentration de  $10^8$  cellules/mL. 250 µL de la solution à  $10^8$  cellules/mL (soit  $2,5 \cdot 10^7$  cellules par transformation) sont ajoutés à une cuvette d'électroporation stérile de 4 mm de largeur. Environ 500 ng de l'insert sont ajoutés pour chaque transformation. (Bio-Rad) avec les paramètres suivants : 800 V, 800 ohms, 25 µF.

## 7 Détermination du mating type

Le protocole est adapté de Werner & Mergenhagen, 1998 et se base sur la présence du gène *MID* ou *FUS1* (Ferris & Goodenough, 1997) pour l'identification du mating type.

Pour 20µL de mélange PCR :

	Volume (µL)		Volume (µL)
Eau ultrapure	4.5	Amorces up* (10 µM)	2
GoTaq Buffer 5x	4	Amorces low* (10 µM)	2
dNTP (10 mM)	0.4	DNA (>100ng/ml)	1
DMSO 100%	2	GoTaq polymérase (5U/µl)	0.1

\*les amorces du gène *MID* et *FUS1* sont placés dans le même mix PCR

Liste de 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'

Programme du thermocycleur (Prime Thermal Cyclers, Techne®) :

Étapes	Température (°C)	Temps (secondes)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	300	1

Dénaturation	95	60	30
Hybridation	52	30	
Extension	72	90	
Extension finale	72	300	1

## 8 Western Blot

Les extraits protéiques sont mélangés dans un rapport de 4:1 avec le tampon Laemmli (Tris 50 mM, glycérine 10%, SDS 2%, bleu de bromophénol 0,02%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 10%) et chauffés pendant 10 minutes à 95°C, sauf si les échantillons ont déjà été dénaturés. Les extraits sont ensuite déposés sur un gel SDS-PAGE de 1 mm d'épaisseur avec 9 ou 15 puits. La proportion d'acrylamide est de 12, 15 ou 17 % selon la protéine d'intérêt. La migration est réalisée à 4°C sous une tension de 180V pendant 1h30 à 2h30, en fonction du pourcentage en acrylamide, dans un tampon de migration (Tris-HCl 0,25 M pH 8,3, glycine 0,192 M, SDS 0,1 %). Le transfert des protéines est effectué sur une membrane PVDF (Cytiva Amersham Hybond) à une tension de 30V pendant la nuit à 4°C dans un tampon de transfert approprié (Tris 25 mM pH 8,3, NaCl 250 mM, méthanol 20%). La membrane a été activée par immersion, pendant 15s, dans du méthanol puis a été lavée 2 minutes dans de l'eau distillée. Après transfert, la membrane est ensuite incubée dans une solution de TBS (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) contenant 1 % d'agent bloquant (Blocking Reagent 10%, Roche) pendant 2 heures à température ambiante sous agitation légère. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire dans du TBS + 0,5 % d'agent bloquant pendant 1 heure, sous agitation douce, à température ambiante. La membrane a subi deux lavages consécutifs de 15 minutes avec du TBST (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,1 % Tween-20) suivis de deux lavages avec du TBS sous agitation forte, à température ambiante. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire dans du TBS + 0,5 % d'agent bloquant pendant 30 minutes. Ensuite, une série de trois lavages de 10 minutes avec du TBST est réalisée, suivie d'un lavage avec du TBS pour empêcher le détergent d'interférer avec la révélation. La révélation est effectuée avec AgriseraECL Bright (Agrisera) et la lumière émise est détectée par un appareil iBright FL1000 (Invitrogen by ThermoFisher). Les anticorps primaires utilisés sont :  $\alpha$ -PsaC (1:5000, Agrisera AS10 939),  $\alpha$ -PsaA (1:3000, Agrisera AS06 172 ),  $\alpha$ -Flag (1:5000, Sigma, F3165). Les anticorps secondaire utilisés sont :  $\alpha$ -rabbit (1:5000, Agrisera, AS09-602) et  $\alpha$ -mouse (1:5000, Agrisera, AS11 1772)

## 9 Mesure de croissance par goutte

Pour effectuer la mesure de croissance par goutte, des plaques de 13x13 cm (Corning) ont été utilisées. Des cultures liquides de la souche sauvage (WT), du mutant *hcf101*, du mutant *nfu1*, ainsi que des trois doubles mutants *nfu1/hcf101* ont d'abord été ajustées à une densité optique (mesurée à 750 nm avec LAMBDA 265 UV/Vis Spectrophotometer) de 0,4. Les échantillons ont ensuite été dilués à des facteurs de 10 et 100. Un volume de 10  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon (dilutions X1, X10, X100 de chaque souche) a été déposé en triplicata sur la plaque. Les conditions testées incluaient les milieux solides TAP (Tris-acétate-phosphate) ou TMP (Tris-minimal-phosphate) sous cinq intensités lumineuses différentes pour chaque milieu de culture. Les conditions étaient les suivantes : faible intensité continue ( $15 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), intensité lumineuse optimale ( $50 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), haute intensité lumineuse ( $400 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), obscurité, et cycle jour/nuit ( $100 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , cycle de 12h). La croissance a été suivie par des photographies de la plaque prises toutes les 24 heures pendant 7 jours.

## 10 Croisement et procédé d'isolement de doubles mutants *nfu1 hcf101*

Les souches végétatives mutantes *nfu1 mt+* et *hcf101 mt-* sont cultivées sur une boîte de Pétri contenant du milieu TAP. Les cellules sont transférées dans un milieu en absence d'azote. Après 3-4 heures d'incubation, le milieu contenant les zygotes, gamètes et cellules végétatives est étalé sur un milieu solide sans d'azote pour optimiser la production des zygotes. Après 2 à 3 jours d'incubation, les cellules végétatives sont ensuite retirées en éraflant délicatement la surface du milieu avec une lame de rasoir stérile, tandis que les zygotes, plus denses, restent dans le milieu. Environ 50 zygotes sont prélevés avec un scalpel et transférés sur une nouvelle boîte de Pétri contenant du milieu TAP. Pour éliminer les cellules végétatives résiduelles, les boîtes contenant les zygotes sont exposées à des vapeurs de chloroforme pendant 3 minutes. Après 1 jour d'incubation, la méiose des zygotes se déroulent et les produits méiotiques sont étalés sur boîte. Les colonies résultant de la croissance des produits méiotiques qui présentent une croissance réduite ou sont plus pâles (indicateurs potentiels de doubles mutants), sont isolées sur une autre boîte de Pétri. Chaque colonie est numérotée et, après environ 2 jours de croissance, transférée sur un milieu TAP contenant 10 mg/ml de paromomycine pour sélectionner les colonies résistantes à cet antibiotique, les deux souches possédant un gène de résistance à l'antibiotique.

Le génotypage est réalisé par PCR selon ces instructions :

Les réactifs proviennent de Promega, USA. Pour 20µL de mélange PCR :

	Volume (µL)		Volume (µL)
Eau ultrapure	8.5	Amorce 1 (10 µM)	2
GoTaq Buffer 5x	4	Amorce 2 (10 µM)	2
dNTP (10 mM)	0.4	DNA (>100ng/ml)	1
DMSO 100%	2	GoTaq polymérase (5U/µl)	0.1

Programme du thermocycleur (Prime Thermal Cyclers, Techne®) :

Etapas	Température (°C)	Temps (secondes)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	120	1
Dénaturation	95	30	30
Hybridation	Tm*-3	60	
Extension	72	120/kb à amplifier	
Extension finale	72	420	1

\*Tm correspond à la plus haute température de fusion d'amorce.

L'électrophorèse est réalisée sur gel d'agarose 1 % à 100V pendant 30-45 minutes.

Nfu1 Forward: TCT CTA TTG CGC GTT GAA TG

Reverse: ATG GGT TTG AGG TGA AGT GG

HCF101 Forward: GAC GTT ACA GCA CAC CCT TG

Reverse: CGC CAC TGC ACC CTT ACG CTA C

## 11 Rendement quantique du PSII

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un système d'imagerie SpeedZen Beambio (JbeamBio, France) et les données ont été capturées avec une caméra CCD (UI-3240CP-NIR-GL rev.2, IDS, Obersulm, Allemagne). Avant chaque analyse, les souches étudiées sont placées à l'obscurité pendant 10 minutes.

Pour mesurer le rapport  $F_v/F_m$  (où  $F_v = F_m - F_o$ ) et le  $\phi_{PSII}$  ( $= \frac{F_m' - F'}{F_m'}$ ), chaque souche d'intérêt est ajustée à une concentration de 10  $\mu\text{g}$  de chlorophylle par ml. Un volume de 200  $\mu\text{l}$  est ensuite placé dans chaque puits d'une plaque 96 puits en triplicata. Un flash vert de 35  $\mu\text{s}$  est ensuite émis par une LED rouge (660 nm) permettant de mesurer la fluorescence de la chlorophylle a. Pour le rapport  $F_v/F_m$ , la fluorescence est mesurée d'abord après l'obscurité ( $F_o$ ), puis après un flash lumineux saturant ( $F_m$ ) de 200 ms et d'intensité 4100  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  qui réduit les accepteurs du PSII.

Pour calculer le  $\phi_{PSII}$ , la fluorescence  $F'$  est mesurée après 5 minutes sous une lumière d'intensité de 160  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Un second flash lumineux saturant de 200 ms (4100  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) est ensuite appliqué pour mesurer  $F_m'$ .

Pour le criblage des doubles mutants, le  $\phi_{PSII}$  est directement déterminé sur les colonies poussant en milieu solide sur une plaque de 13 x 13 cm. Les contrôles sont placés en triplicata et les colonies transformées résistantes à l'hygromycine B (*hygR*) sont transférées sur cette plaque. Deux jours après le transfert des colonies, la mesure du  $\phi_{PSII}$  est effectuée.

## 12 Co-immunoprécipitation (Co-IP)

Pour la préparation des échantillons, les chloroplastes ont été isolés préalablement (selon la méthode du point 3 du mat&met) et la lyse cellulaire a été effectuée de manière douce à l'aide d'un détergent anionique (Triton 0.1X, 100 $\mu\text{M}$  PMSF) afin de préserver les interactions HCF101-protéines partenaires.

Le protocole a été adapté de celui fourni par le fabricant des billes magnétiques (Thermo Scientific™, réf. A36797). Le tampon de lavage utilisé contient 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ , 25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  et 150 mM NaCl, pH7,5. Un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Thermo Scientific™) ainsi que du PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyle) à une concentration finale de 100  $\mu\text{M}$  ont été ajoutés après la lyse des chloroplastes. Après centrifugation du lysat chloroplastique à 20 000g pendant 20 minutes, 1,5 mg de protéines totales ont été incubées avec les billes magnétique pendant 1h30, à température ambiante. Après 3 étapes de lavage successives, une élution acide (0,1M glycine, pH 2.8) a été réalisée conformément au protocole fourni.



## 4. Résultats

### 1 Étude de la redondance potentielle entre les protéines HCF101 et NFU1 et de leur rôle dans la cellule

#### 1A. Isolement de mutants affectés dans les gènes *HCF101* et *NFU1* par croisement

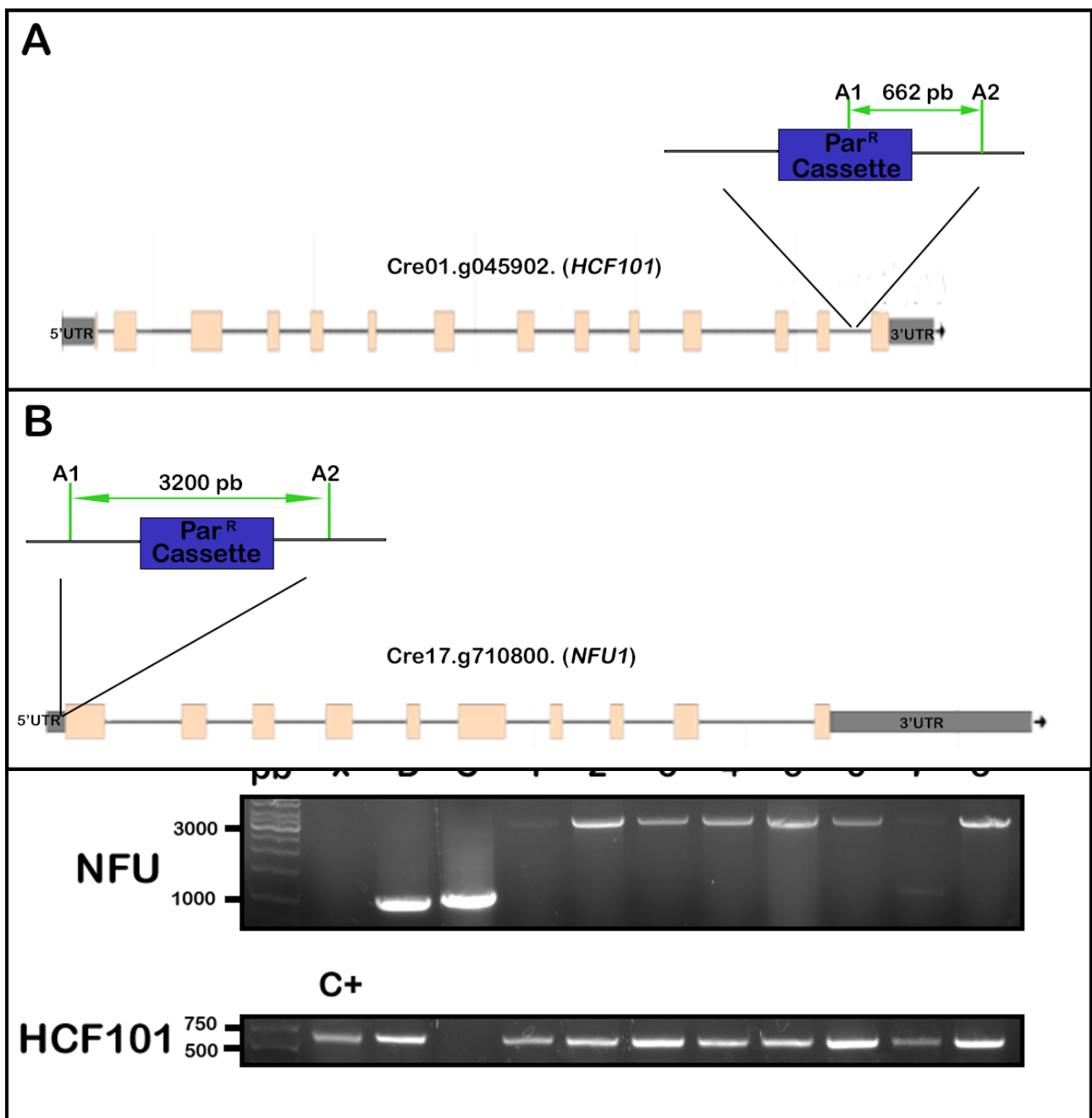
##### A.I. Croisement entre les souches mutantes *hcf101* et *nfu1-1*

Les mutants *hcf101* et *nfu1-1* sont inactivés dans le gène *HCF101* et *NFU1* respectivement, et ont été générés l'intégration aléatoire d'une cassette de résistance à la paromomycine dans ces gènes respectifs (Li et al., 2019). Ces deux mutants ont été caractérisés indépendamment dans des études antérieures (Kairis, 2023). Chez *A. thaliana*, un effet de redondance des protéines NFU2 et 3 a été observé (Touraine et al., 2019). Étant donné que les domaines DUF59 et Nifu-like des protéines HCF101 et NFU, respectivement, partagent des similarités structurales et que ces 2 protéines ont certaines fonctions relativement proches chez *d'A.thaliana*, une hypothèse d'une possible redondance entre les protéines HCF101 et NFU1 chez *Chlamydomonas* a été envisagée (Kairis et al. 2024). Afin de déterminer l'existence d'une redondance fonctionnelle, les souches mutantes *hcf101* et *nfu1* ont été croisées par reproduction sexuée pour isoler des doubles mutants. La génération F1 issue du croisement a été placée sur un milieu sélectif contenant de la paromomycine afin de sélectionner tous les produits méiotiques possédant une simple ou une double mutation grâce à la cassette de résistance des souches parentales. La sélection a permis d'obtenir plus d'une centaine de colonies résistantes à la paromomycine. Étant donné que les protéines HCF101 et potentiellement NFU1 impactent la photosynthèse (Roland et al., 2020; Lezhneva et al., 2004), quarante colonies issues de la germination des produits méiotiques et possédant un phénotype de croissance réduite ont été isolées afin d'augmenter la probabilité d'obtenir des doubles mutants.

##### A.II Isolement de produits méiotiques affectés dans les gènes *HCF101* et *NFU1* par génotypage

Afin de discriminer les doubles mutants *hcf101 nfu1* des simples mutants *hcf101* et *nfu1*, un génotypage basé sur la présence de la cassette de résistance à la paromomycine (~2200 pb) a été effectué par PCR. Pour détecter la présence de la cassette de résistance dans le gène *HCF101*, une

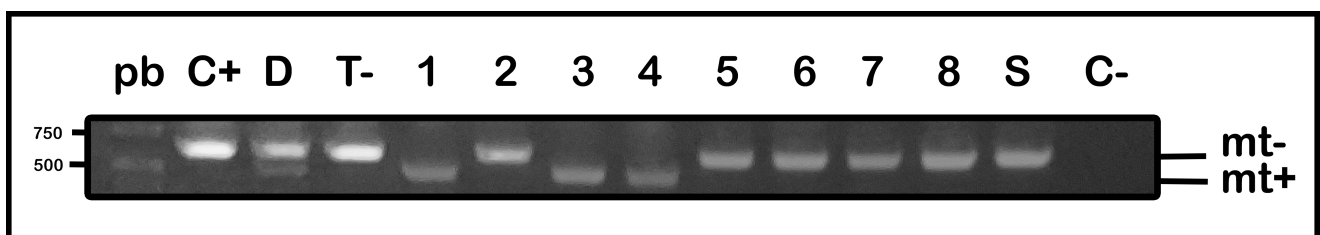
amorce placée au sein de la cassette de résistance et une autre placée dans le gène *HCF101* ont été utilisées. Par conséquent, aucune bande n'est observée en PCR si la mutation n'est pas présente, tandis qu'une bande de 662 pb apparaît si la mutation est présente (**Fig. 8A**). Pour génotyper les mutants *nfu1*, deux amorces flanquant la cassette de résistance ont été utilisées lors de la PCR. En cas d'absence de la cassette, une bande de ~1000 pb est visible après électrophorèse tandis qu'une bande de ~3200 pb sera visible si la mutation est présente (**Fig. 8B**). Un premier screening est effectué sur les quarante colonies. Parmi celles-ci, huit sont positives pour la cassette de résistance associée à *HCF101* et *NFU1*. Un duplicata du génotypage a été réalisé sur les huit colonies d'intérêt pour valider les résultats (**Fig. 8C**). Les résultats confirment que les colonies testées possèdent bien les deux mutations. En effet, une bande de ~3200 pb, caractéristique de la présence de la cassette de résistance à la paromomycine, est visible après PCR en utilisant les primers ciblant le gène *NFU1*. Quant à la PCR permettant de déterminer la présence de la mutation *hcf101*, une bande de 662 pb est également observée chez les souches testées. Ce duplicata confirme le génotype des huit doubles mutants *hcf101 nfu1* présumés.



**Figure 8. Screening des doubles mutants potentiels affectés dans *HCF101* et *NFU1*.** A) Schéma représentant le gène *HCF101* avec la cassette de mutation et les amorces utilisées pour le génotypage. B) Schéma représentant le gène *NFU1* avec la cassette de mutation et les amorces utilisées pour le génotypage. C) Génotypage par PCR des doubles mutants basé sur la présence de la cassette de résistance à la paromomycine. bp = paires de bases, \* = témoin négatif, C+ = mutant *hcf101*, D = souche diploïde (*hcf101/HCF101*), C- = souche sauvage (wild type), 1 → 8 = DM potentiels. A1, A2 = amorces utilisées pour le génotypage.

### A.III Détermination du mating-type (type sexuel) des doubles mutants *hcf101 nfu1*

Bien que le génotypage confirme que les colonies isolées portent la double mutation, il semble que la souche 7 présente les deux bandes caractéristiques du mutant et du non-mutant pour le gène *NFU1* (faibles bandes à ~1000 pb correspondant au génotype sauvage et à ~3200 pb correspondant au génotype mutant). Afin de s'assurer que certaines de ces souches ne sont pas diploïdes, ce qui pourrait expliquer la présence des deux bandes, la détermination du mating-type a été effectuée (**Fig. 9**). De plus, de futurs croisements avec le double mutant *hcf101 nfu1* sont envisagés pour des études ultérieures, ce qui renforce l'intérêt de déterminer le mating-type. La détermination du mating-type repose sur la présence du gène *MID* (mt-, ~600 pb) et du gène *FUS1* (mt+, ~450 pb) pour son identification (Ferris & Goodenough, 1997). Le contrôle positif diploïde complétant le mutant *hcf101* (représenté par D sur la **Fig. 9**) possède bien les deux bandes attendues. Les huit doubles mutants sont soit mt+, soit mt-, excluant ainsi la possibilité d'être diploïdes. Par conséquent, deux souches doubles mutants mt- (souches 1 et 3) et deux doubles mutants mt+ (souches 5 et 8) sont sélectionnées pour les analyses futures.

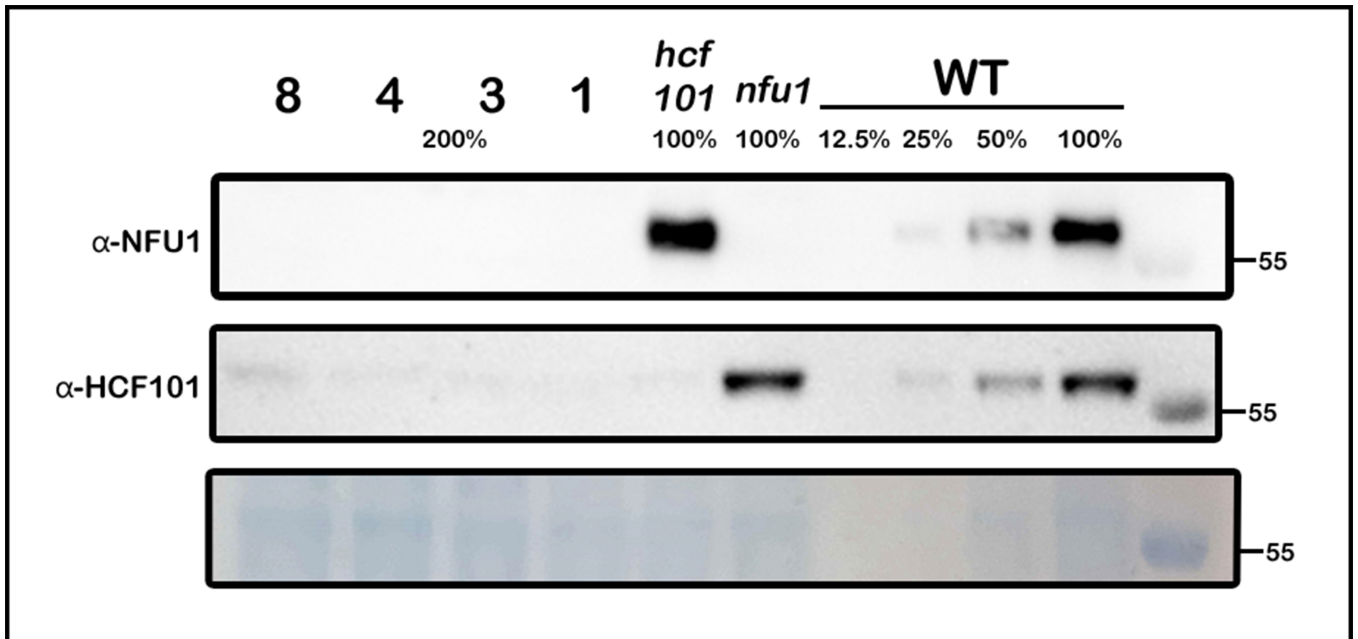


**Figure 9. Détermination du mating-type par PCR.** bp = paires de bases, C+ = mutant *hcf101*, D = souche diploïde (*hcf101/HCF101*), T- = souche sauvage (wild type), 1 → 8 = doubles mutants (DM) potentiels, S = mutant *nfu1-1* mt-.

### 1B Analyse biochimique des doubles mutants *hcf101 nfu1* par Western Blot (WB)

#### B.I Présence/absence des protéines HCF101 et NFU1

La présence des protéines HCF101 et NFU1 dans les mutants simples a déjà été étudiée (Kairis, 2023) : le mutant *nfu1* ne présente pas la protéine NFU1 tandis que HCF101 est détectée faiblement dans le mutant correspondant. Afin d'analyser les doubles mutants, un WB a été effectué (**Fig. 10**) à partir d'extraits protéiques totaux des différentes souches. La protéine NFU1 n'est pas présente chez le mutant *nfu1* ni chez les doubles mutants. Néanmoins, la protéine HCF101 est présente en faible quantité chez le mutant *hcf101* et les doubles mutants. Ces résultats confirment l'étude ultérieure citée précédemment (Kairis, 2023). La faible présence de la protéine HCF101 implique par conséquent que il ne s'agit pas d'un mutant KO.



**Figure 10.** Analyse de l'expression des protéines HCF101 et NFU1 par Western Blot (WB) chez les mutants *hcf101 nfu1*. Le poids moléculaire (à droite de l'image) est exprimé en kDa. 8, 4, 3, 1 = souches DM sélectionnées, *hcf101* = mutant *hcf101*, *nfu1* = mutant *nfu1-1*. WT = souche wild type, 100 % correspond à 10 µl d'extrait protéique total.

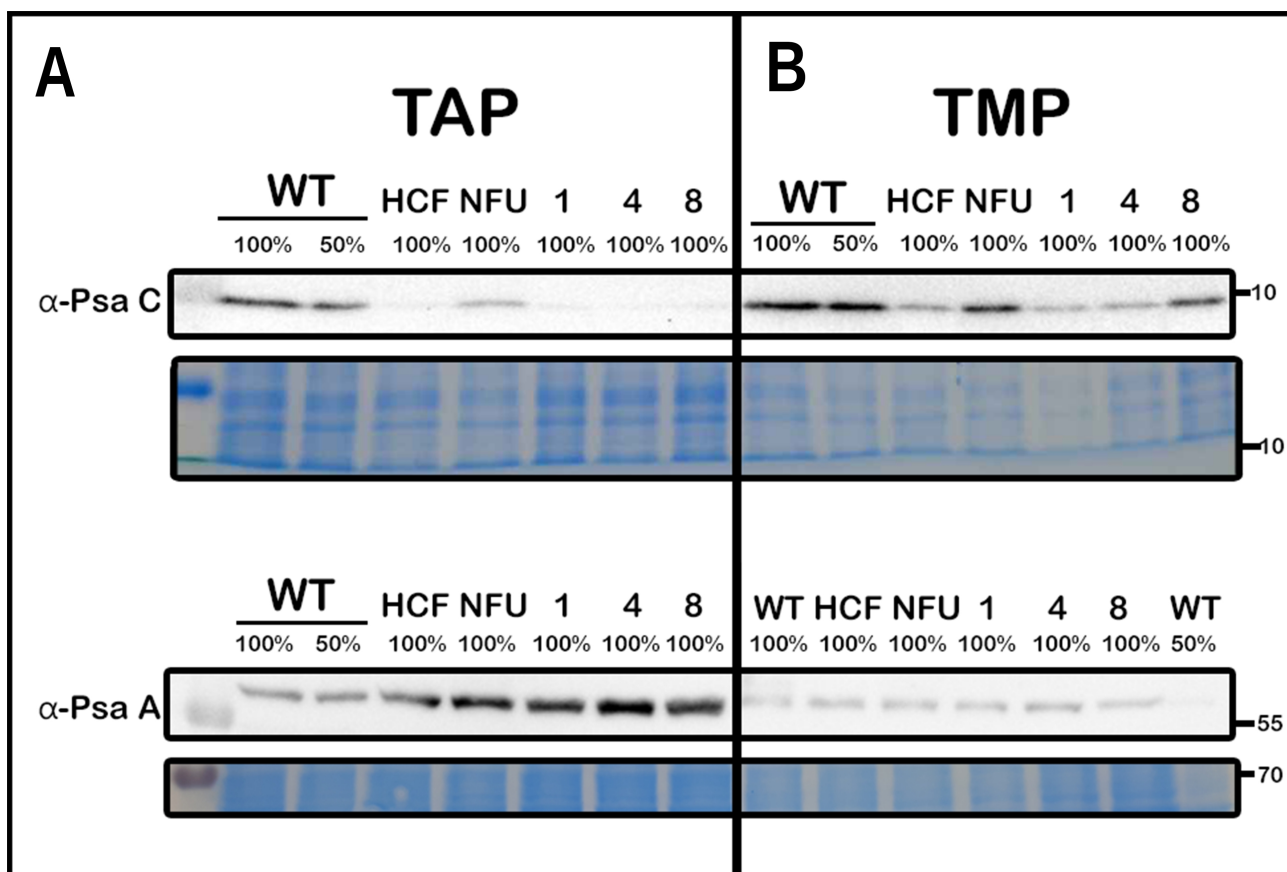
## B.II Présence/absence des protéines PsaC et PsaA du photosystème I

Le mutant *hcf101* présente un niveau réduit de la sous-unité PsaC du PSI (Kairis 2023). Comme indiqué dans l'introduction, cette protéine lie deux centres 4Fe-4S, alors que PsaB et PsaA. Au laboratoire, nous disposons d'un anticorps dirigé contre PsaC (Kairis 2023) mais également contre PsaA en fixe un seul. Des western blots à partir d'extraits totaux des doubles mutants 1, 4 et 8, de la souche sauvage et des souches parentales ont été préparés et analysés pour la présence de ces 2 protéines (**Fig. 11**). L'analyse a été menée en cultivant les souches dans deux types de milieux différents, en présence de lumière. Le premier milieu était supplémenté en acétate (milieu TAP) (conditions mixotrophes) tandis que le second milieu n'en contenait pas (milieu TMP) (conditions

phototrophes). Des différences significatives de charge sont observées dans le gel contrôle de chargement (**Fig. 11**), ce qui ne permet pas de tirer des conclusions quantitatives. De plus, les chargements différentiels de la souche sauvage ne répondent pas comme attendu, particulièrement en conditions mixotrophes, avec l'anticorps dirigé contre la protéine PsaA. Néanmoins, des conclusions qualitatives peuvent être tirées.

Comme attendu, la sous-unité PsaC est extrêmement réduite chez le mutant *hcf101* tout comme chez les doubles mutants. En ce qui concerne PsaA, de manière contre-intuitive, son niveau semble accru chez les doubles mutants et le mutant *nfu1-1* en TAP et identique entre les souches en TMP. Même si ces résultats doivent être répétés, il semble donc que la perte/très forte réduction de HCF101 impacte davantage la sous-unité PsaC que la sous-unité PsaA.

Une explication potentielle pourrait provenir des interactions entre PsaC et PsaA. D'après Takahashi et al., 1991, l'abondance de PsaC diminue si celle de PsaA diminue également ; cependant, la réduction de PsaC n'impacte pas celle de PsaA. À cet égard, les données obtenues sont cohérentes.



**Figure 11.** Analyse de la présence des protéines PsaC et PsaA des doubles mutants *nfu1 hcf101* par WB en milieux TAP et TMP. A) Analyse de la présence de PsaA et C en TAP. B) Analyse de la présence de PsaA et C en TMP. Les poids moléculaires sont indiqués en kDa. WT = type sauvage, HCF = mutant *hcf101*, NFU = mutant *nfu1-1*, et « 1, 4, 8 » représentent trois souches possédant la double mutation *nfu1-1 hcf101*. 100% = 15µl d'extrait protéique total.

L'analyse de PsaC a été réalisée en duplicata, les deux résultats étant très similaires. Le WB révélé avec l'anticorps dirigé contre PsaA a été réalisé une seule fois.

## 1C Caractérisation physiologique des doubles mutants *hcf101 nfu1*

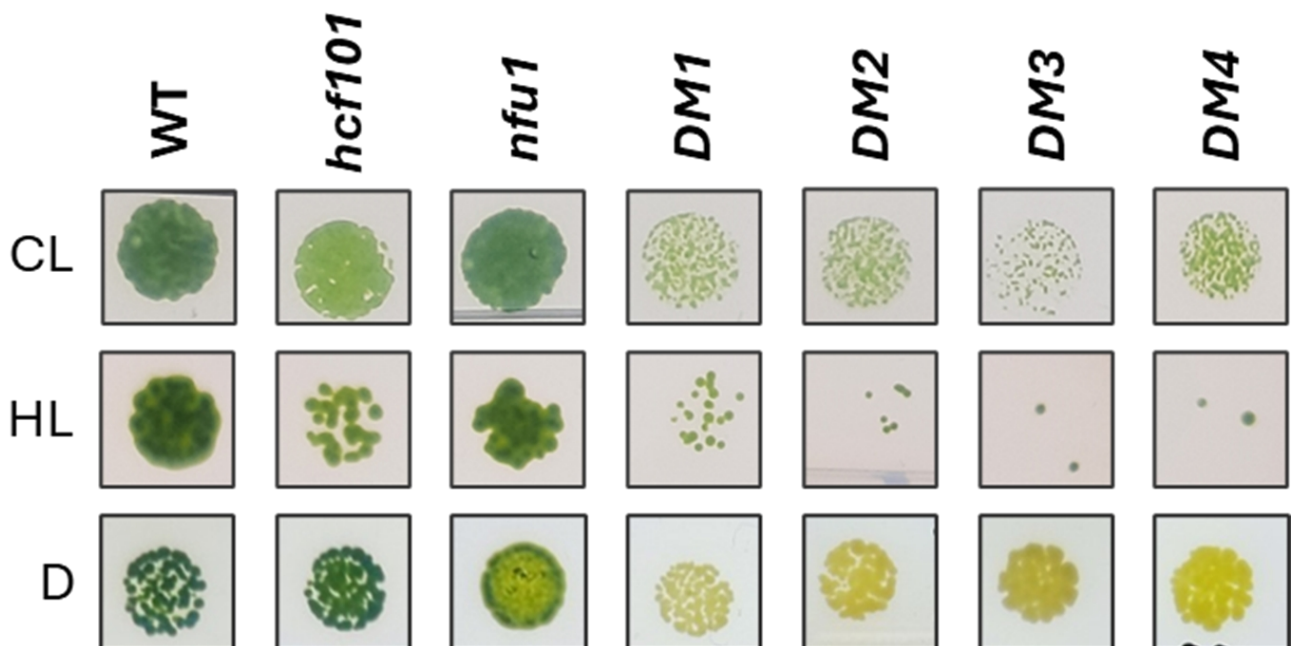
### C.I Analyse de croissance des doubles mutants sous différentes conditions de culture

Afin de caractériser le phénotype de croissance des doubles mutants, une étude a été effectuée par test de gouttes sous cinq conditions de culture différentes avec un milieu TMP ou TAP. Les conditions testées sont : faible intensité continue ( $15 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), intensité lumineuse contrôle (CL) ( $50 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), haute intensité lumineuse (HL) ( $400 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), obscurité (D), ainsi que cycle jour et nuit ( $100 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , cycle de 12h). De plus, pour chacune de ces cinq conditions, le test de croissance est réalisé en TAP et TMP, en triplicata. Par souci de visualisation, seules les conditions de culture produisant des phénotypes distinctifs entre les doubles mutants (DM) et les simples mutants sont montrées (**Fig. 12**). Les résultats présentés en CL et HL proviennent de croissance sur un milieu TMP (phototrophie). Pour la condition obscurité (D), un milieu TAP est utilisé, la photosynthèse y étant absente.

Sous une intensité lumineuse contrôlée (CL) en milieu TMP, le type sauvage (WT) et le mutant *nfu1* ne présentent pas de phénotype distinct, tandis que la croissance du mutant *hcf101* est significativement réduite par rapport au WT, comme attendu (Dubois et Remacle, 2022). Remarquablement, les doubles mutants montrent une croissance encore plus réduite que le mutant *hcf101* seul. Les mêmes observations sont faites en TMP sous haute intensité lumineuse (HL), où les doubles mutants sont à peine viables. En milieu TAP, une tendance similaire est observée, bien que les différences soient moins marquées (résultats non montrés).

En conditions d'obscurité, le mutant *hcf101* présente un phénotype similaire à celui du WT, tandis que le mutant *nfu1* montre un défaut de pigmentation, comme déjà rapporté (Remacle and Rouhier en préparation). Ce défaut de pigmentation est probablement dû à un défaut d'insertion des centres 4Fe-4S dans la DPOR (cf. Introduction). De manière notable, les doubles mutants présentent une coloration jaune plus prononcée que le mutant *nfu1*, similaire à celle observée chez un mutant de l'une des sous-unités de la DPOR (*chlB*) (non montré sur la **Fig. 12**).

La réduction de croissance des doubles mutants sous HL et CL en milieu TMP, ainsi que le jaunissement accru en obscurité, soutiennent l'hypothèse d'une redondance fonctionnelle entre les protéines NFU1 et HCF101 dans certaines conditions.



**Figure 12. Mesure de croissance et phénotypage des doubles mutants *hcf101 nfu1* sous différentes conditions lumineuses.** CL = intensité lumineuse contrôle ( $50 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), HL = haute intensité lumineuse ( $400 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), et D = obscurité. Les souches cultivées en CL et HL le sont en milieu TMP (sans acétate), tandis que celles en obscurité sont cultivées en milieu TAP (avec acétate). DM = souches possédant la double mutation NFU1-1 x HCF101. *hcf101* = mutant *hcf101*, *nfu1* = mutant *nfu1-1*, WT = wild type.

## C.II Étude de paramètres photosynthétiques

À la suite des résultats de l'analyse de croissance des doubles mutants et à l'observation d'une diminution marquée de la croissance en conditions d'intensité lumineuse contrôle (CL) et haute intensité lumineuse (HL), une étude des paramètres photosynthétiques a été effectuée pour déterminer si la différence de croissance entre les DM et les mutants simples provient d'une altération plus prononcée des photosystèmes. Les paramètres étudiés sont le rendement quantique du PSII ( $\phi\text{PSII}$ ) et le rapport  $F_v/F_m$ , basés sur la mesure d'émission de fluorescence de la chlorophylle *a* du PSII. Chaque analyse a été effectuée sur un triplicata biologique en milieu TMP et TAP.

Le premier paramètre analysé est le rapport  $F_v/F_m$ , où  $F_v = F_m - F_o$  et correspond au rendement quantique maximum du PSII. La valeur  $F_m$  est calculée en mesurant la fluorescence de la chlorophylle *a* lorsque tous les centres de réaction du PSII sont fermés, et la valeur  $F_o$  lorsque tous

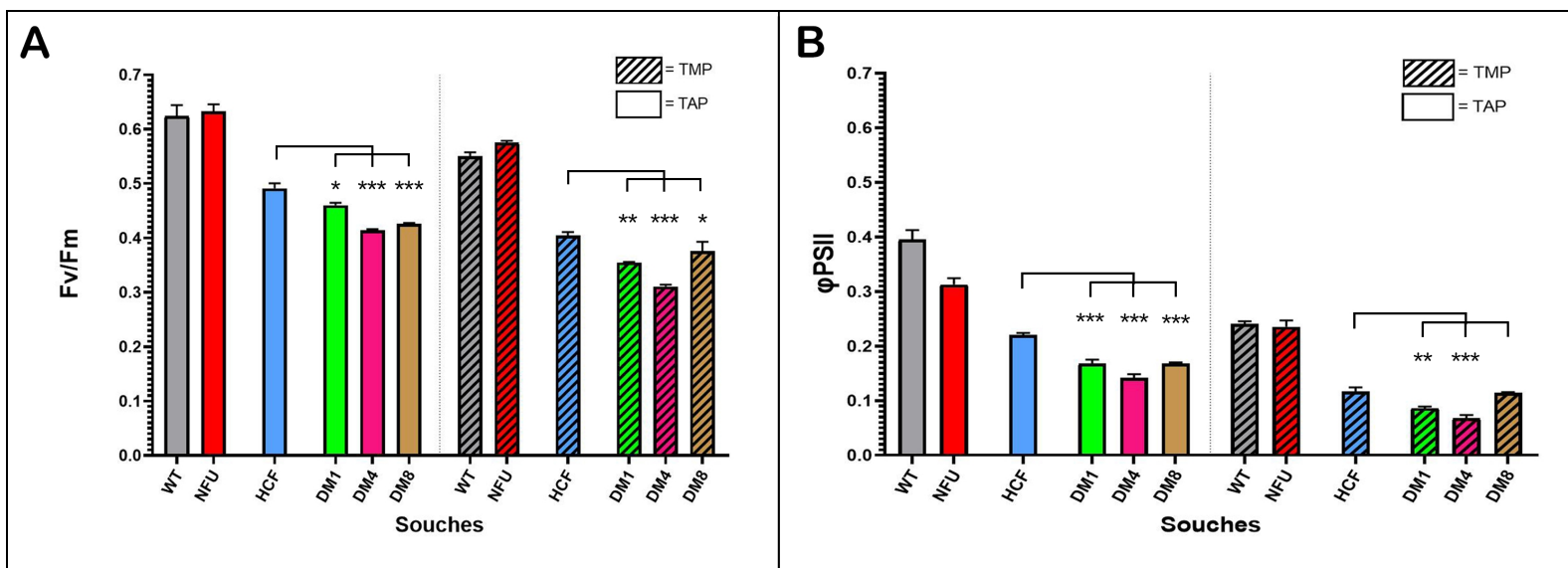
les centres réactionnels sont en conformation ouverte. Les souches sont adaptées 15 minutes à l'obscurité avant la mesure. Un flash de lumière saturante est ensuite appliqué pour obtenir la mesure du Fm.

En milieu TAP (**Fig. 13A**), le rapport Fv/Fm du PSII est similaire pour le mutant *nfu1-1* et le WT. Pour le mutant *hcf101*, la réduction est d'environ 20 %, ce qui est cohérent avec des analyses précédentes (Kairis, 2023). De manière intéressante, les doubles mutants ont un Fv/Fm statistiquement inférieur à celui du mutant *hcf101* de 6 à 15 % en TAP (t-test, p-valeur < 0.007 entre le mutant *hcf101* et DM1, p-valeur < 0,001 entre mutant *hcf101* et DM 4 et 8), ce qui indique que la différence de croissance observée (**Fig. 11**) est due, au moins en partie, à une réduction de l'activité photosynthétique, notamment du PSII. Le mutant *nfu1-1* n'étant pas impacté, cette observation soutient l'hypothèse d'une redondance entre NFU1 et HCF101.

Ensuite, une analyse du  $\phi$ PSII a été réalisée. Cette mesure est calculée selon le rapport  $\frac{Fm' - F'}{Fm'}$ , correspond au rendement quantique effectif du PSII à une intensité lumineuse donnée ( $\phi$ PSII). Dans ce cas, F' est mesuré après une exposition à une lumière actinique continue. Fm' est mesuré de manière similaire à Fm, mais après une exposition continue à la lumière, donnant une valeur différente de Fm.

Concernant le  $\phi$ PSII, en milieu TAP (**Fig. 13B**), le mutant *hcf101* est plus impacté que le WT, avec une réduction de 43 %. On observe également une baisse de ce paramètre pour *nfu1-1* par rapport au WT, ce qui est surprenant car cette différence n'est pas visible dans l'analyse de croissance des souches (**Fig. 12**). On observe aussi que les doubles mutants sont affectés plus sévèrement que les mutants parentaux *nfu1-1* et *hcf101*. Les paramètres  $\phi$ PSII et Fv/Fm en milieu TMP montrent des impacts similaires par rapport au TAP pour chaque souche.





**Figure 13. Étude des paramètres photosynthétiques sur les DM en milieu TAP et TMP.** A) Détermination du rendement quantique maximal du PSII ( Fv/Fm). B) Détermination du rendement quantique effectif du PSII ( $\phi_{PSII}$ ) après 5 minutes d'exposition à  $160 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . WT = souche sauvage, HCF = mutant *hcf101*, NFU = mutant *nfu1-1*, DM1,4,8 = doubles mutants *nfu1-1* x *hcf101*. La significativité des résultats est effectuée par test de student en comparant les doubles mutants avec le mutant *hcf101*. (\*) = p-value < 0,05 ; (\*\*) = p-value < 0,005 ; (\*\*\*) = p-value < 0,001. Les paramètres photosynthétiques ont été mesurés sur des triplicats biologiques en milieux TAP et TMP.

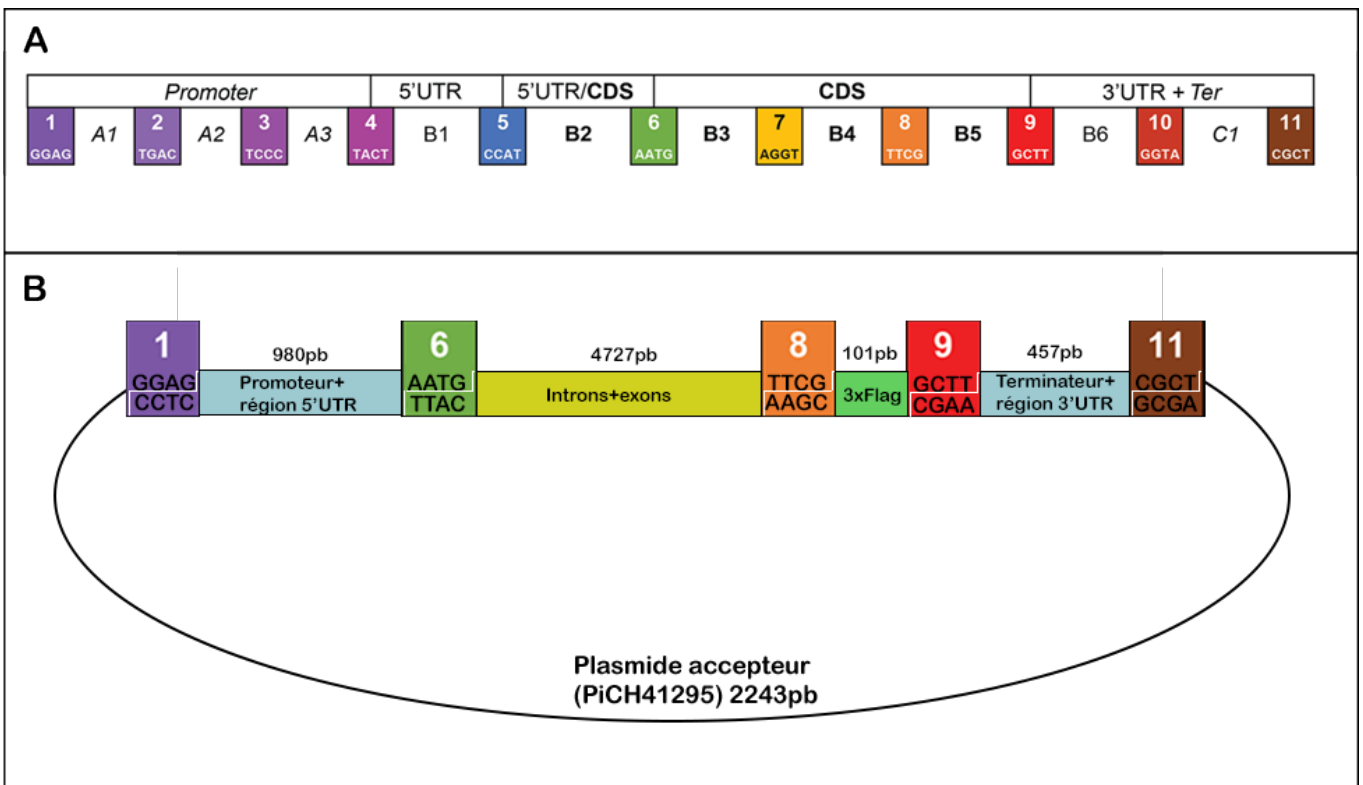
## 2 Recherche de partenaires de la protéine HCF101

### 2A Clonage du gène *HCF101-3xFlag* par MoClo

#### A.I Choix des modules du niveau 0

Pour obtenir une souche de *C. reinhardtii* exprimant la protéine HCF101-3xFlag par MoClo, trois étapes de construction sont nécessaires : la préparation des modules de niveau 0 (L0), l'assemblage de niveau 1 (L1) et l'assemblage de niveau 2 (L2). Tout d'abord, les modules du L0 sont sélectionnés pour former une unité d'expression génétique servant à la construction de l'assemblage L1. Les modules choisis du L0 comprennent : le module 1 contenant le promoteur endogène de *HCF101*, le module 2 comprenant le gène *HCF101* synthétique (décrit ci-dessous), le module 3 codant pour l'étiquette peptidique 3xFlag, et le module 4 contenant la région 3'UTR et le terminateur de la  $\beta$ -tubuline. Les modules possèdent des séquences complémentaires standards, établies selon la syntaxe « MoClo plant » (Patron et al., 2015) (**Fig. 14A**). Le module 1 possède les séquences nucléotidiques 1 et 6, le module 2 est bordé des séquences 6 et 8, le module 3 de 8 et 9,

et le module 4 de 9 et 11 (**Fig. 14B**). L'assemblage de ces modules forme une unité d'expression génétique de niveau L1.



**Figure 14. Représentation schématique de l'unité d'expression génétique de la construction CrHCF101-3xFlag avec les séquences nucléotidiques standardisées.** A) Représentation d'un gène avec la standardisation des extrémités cohésives utilisées pour les différentes régions du gène selon la syntaxe « MoClo plant » (Patron et al., 2015). B) Schéma de la construction *HCF101-3xFlag* intégrée dans le plasmide accepteur requis pour le niveau L2. Les longueurs des modules ne sont pas représentées proportionnellement à leurs tailles réelles.

Le module 1 contient le promoteur et région 5'UTR endogène du gène *HCF101*, ceci afin d'assurer un bon niveau d'expression de ce gène. L'obtention de ce module est décrite dans le prochain résultat (point A1).

Lors de la synthèse du gène *HCF101*, inséré dans le module 2, les introns ont été conservés pour favoriser l'expression de la protéine (Lumbreras et al., 1998). En raison d'une limitation technique, la longueur maximale pouvant être synthétisée est de 5000 bases. Étant donné que la combinaison des introns et des exons de *HCF101* fait 6175 bases, les quatre derniers introns ont été omis. De plus, trois bases ont été modifiées pour supprimer les sites de restriction de *BsaI* et *BpiI* utilisés ultérieurement. Deux bases supplémentaires ont été ajoutées à la fin du dernier exon, en plus des quatre bases standards pour permettre la construction L1, codant pour une glycine et une sérine, fournissant un linker peptidique dynamique entre HCF101 et l'étiquette 3xFlag. La séquence est en annexe (**Fig. S1**).

Le module 3 provient directement d'une banque de modules et contient une séquence codante pour une étiquette peptidique 3xFlag (Crozet et al., 2018). Le motif 3xFlag a été choisi afin de permettre la détection de la protéine par western blot et de réaliser les expériences de co-immunoprécipitation.

Le module 4 (région 3'UTR et terminateur de la  $\beta$ -tubuline) a été sélectionné en raison de sa disponibilité et de sa fonction éprouvée comme terminateur et provient de la même banque que le module 3 (Crozet et al., 2018).

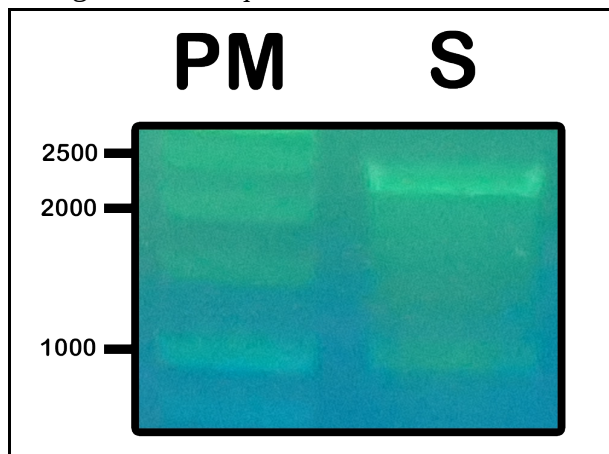
De plus, une construction similaire a été réalisée en remplaçant le module 3 (3xFlag) par un module contenant une séquence multi-stop, permettant d'exprimer la protéine HCF101 sans étiquette peptidique pour d'éventuelles études ultérieures (clonage HCF101-S).

## **AII Isolement du promoteur+région 5'UTR endogène de *HCF101* par PCR (module 1)**

Pour isoler le promoteur et la région 5'UTR, l'ADN de *C. reinhardtii* a été extrait. L'ADN extrait a ensuite été amplifié à l'aide d'une polymérase haute-fidélité (iProof High-Fidelity DNA Polymerase, Biorad). Le design des amorces utilisés lors de la PCR permet l'ajout des sites de restriction de *BsaI* générant ainsi des extrémités cohésives en 5' et 3' de ce module (module 1). Après électrophorèse sur gel d'agarose, la bande d'intérêt de 994 pb a été isolée, purifiée, puis digérée et intégrée au plasmide PiCH41295 grâce à l'enzyme *BsaI*. L'intégration dans le plasmide vise à assurer la stabilité du module et à faciliter son amplification. Ce plasmide possède ainsi deux sites de restriction *BsaI* avec des séquences complémentaires au module 1, permettant la recombinaison homologue.

L'intégration de l'insert dans le plasmide se base sur une sélection bleu/blanc. Cette méthode repose sur la présence du gène *lacZ*, qui code pour la  $\beta$ -galactosidase. Cette enzyme est capable d'hydrolyser le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) en un produit bleu insoluble. Les plasmides utilisés possèdent le gène *lacZ* situé au site d'insertion des fragments d'ADN clonés. Par conséquent, si le fragment d'ADN d'intérêt est intégré au plasmide, le gène *lacZ* est interrompu, empêchant la production de  $\beta$ -galactosidase. Les colonies bactériennes contenant ces plasmides recombinants apparaissent alors blanches, tandis que celles contenant un plasmide non recombinant apparaissent bleues. Ainsi, le plasmide contenant le module 1 (provenant d'une colonie blanche) a ensuite été amplifié dans *Escherichia coli* et purifié. Après purification, une digestion contrôle a été réalisée en utilisant l'enzyme *BsaI* (**Fig. 15**). La présence d'une bande de 980 pb, correspondant à l'insert, et d'une seconde de 2300 pb, correspondant au reste du plasmide,

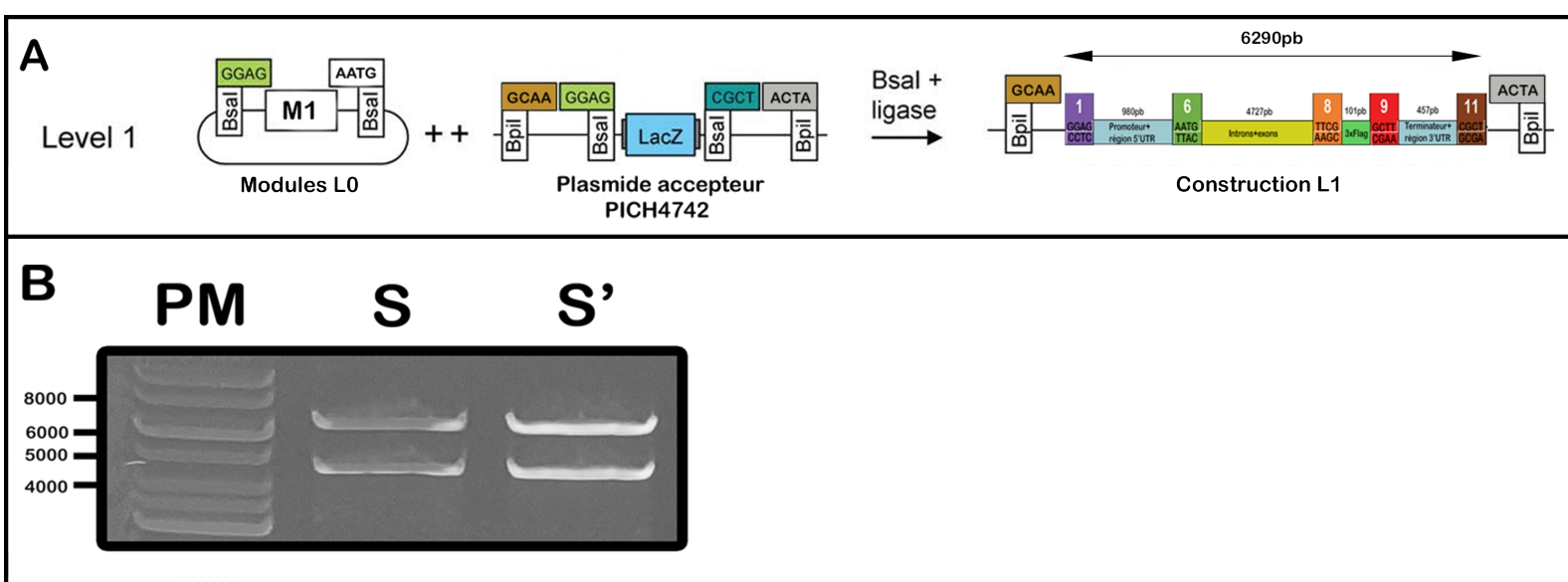
après électrophorèse, ont confirmé que l'insert était correctement intégré. L'insert a alors été amplifié par PCR et séquencé. La construction du niveau 1 (L1) du MoClo a été réalisée une fois l'intégrité de la séquence confirmée.



**Figure 15. Digestion du plasmide contenant le promoteur et la région 5'UTR endogène de *HCF101* par *BsaI*.** PM = marqueur de poids moléculaire. S = plasmide amplifié et digéré par *BsaI* contenant hypothétiquement le module 1. Les valeurs de poids sont exprimées en pb, à gauche de la figure.

### A.III Construction des différents niveaux du MoClo

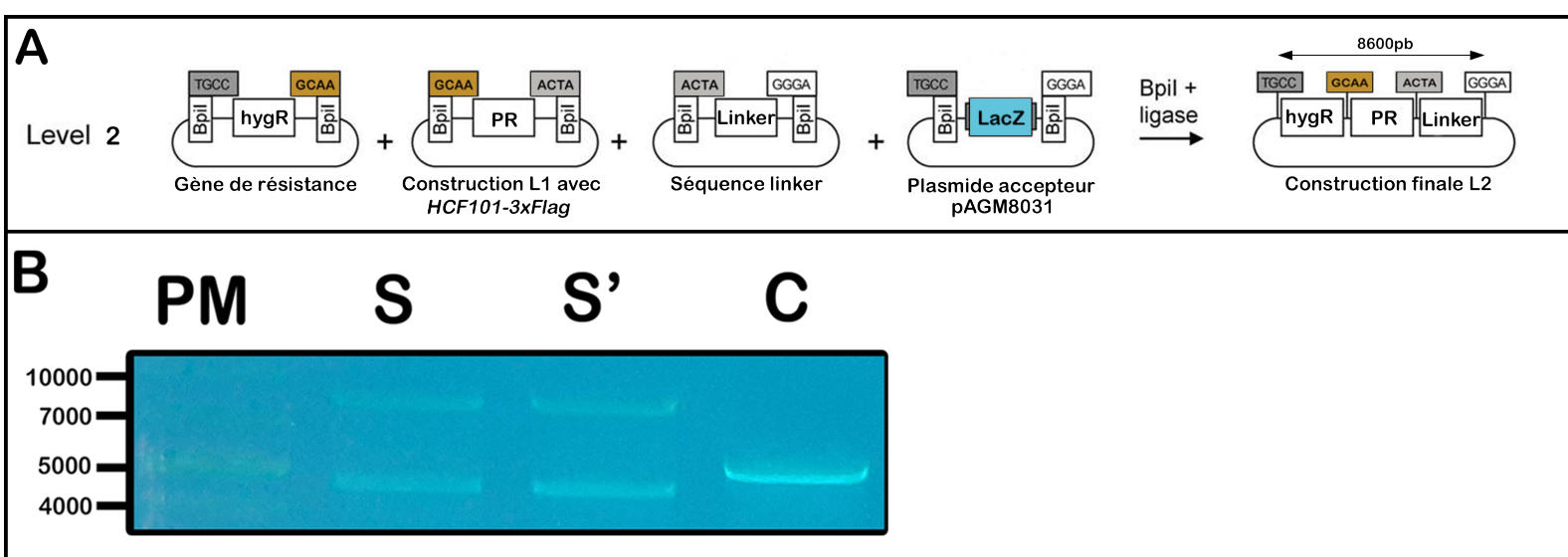
Pour réaliser le niveau 1 du MoClo, les différents modules listés précédemment sont assemblés et insérés dans le plasmide PICH47742 par digestion/ligation à l'aide de l'enzyme *BsaI*. Ce plasmide possède deux sites de restriction *BpiI*, ajoutant ainsi deux extrémités cohésives aux extrémités de l'unité d'expression, nécessaires pour l'assemblage du niveau 2 (**Fig. 16A**). Une digestion par *BpiI* du plasmide PICH47742 contenant les quatre modules formant l'unité d'expression génétique a ensuite été effectuée pour vérifier l'intégrité de l'insert (**Fig. 16B**). Sur gel, une bande de 6290 paires de bases, correspondant à la longueur de l'unité de transcription construite, et une bande de 4345 bases, correspondant au plasmide sans le gène *lacZ*, sont observées. Les résultats confirment que l'unité d'expression codant pour la protéine HCF101-3xFlag est conforme aux attentes théoriques, permettant ainsi de procéder à l'assemblage du niveau 2.



**Figure 16. Assemblage du niveau 1 du MoClo.** A) Schéma de l'assemblage du niveau 1 (L1). Seul le premier module (M1) est montré ; les 3 autres modules sont représentés par « ++ » pour indiquer leur présence dans la construction finale. Adapté de Weber et al., 2011. B) Contrôle de digestion de la construction L1 par *BpiI*. PM = marqueur de poids moléculaire. S = clonage *HCF101-3xFlag* ; S' = clonage *HCF101-S*, où le module 3xFlag a été remplacé par un module à séquence multi-stop. Les valeurs de poids sont exprimées en pb, à gauche de la figure.

La construction de l'assemblage de niveau 2 (L2) du MoClo consiste en l'ajout d'un gène de sélection pour sélection chez *Chlamydomonas*. La construction L2 comprend trois modules et un plasmide accepteur (pAGM8031) (**Fig. 17A**). Le premier module contient le gène de résistance à l'hygromycine (*hygR*), le deuxième module contient la construction *HCF101-3xFlag* (PR), et le troisième module (Linker) assure la connexion entre le deuxième module et le plasmide accepteur.

L'intégrité de la construction a été vérifiée par digestion du plasmide par *BsaI* (**Fig 17B**). Le premier site de restriction de *BsaI* est situé juste avant la séquence cohésive « TGCC », et le second se trouve dans la séquence « Linker ». Une bande de 8600 pb, correspondant à la somme du gène de résistance et du gène *HCF101-3xFlag*, et une bande de 4602 pb, correspondant au reste du vecteur accepteur, sont visibles sur gel. Le contrôle, le plasmide accepteur vide, révèle une seule bande après digestion, confirmant l'absence de la séquence « Linker » et l'absence du deuxième site de restriction. La taille attendue du vecteur est de 5201 pb, avec le gène *lacZ* toujours présent.



**Figure 17. Assemblage du niveau 2 du MoClo.** A) Schéma de l'assemblage du L2, illustrant la construction finale. Adapté de Weber et al., 2011. B) Contrôle de l'intégrité de la construction L2 par digestion avec *BsaI*. PM = marqueur de poids moléculaire. S = plasmide contenant les gènes clonés *HCF101-3xFlag* et *hygR* ; S' = plasmide contenant *HCF101-S* et *hygR* (où le module 3xFlag a été remplacé par un module à séquence multi-stop) ; C = plasmide accepteur pAGM8031. Les poids sont indiqués en pb, à gauche de la figure.

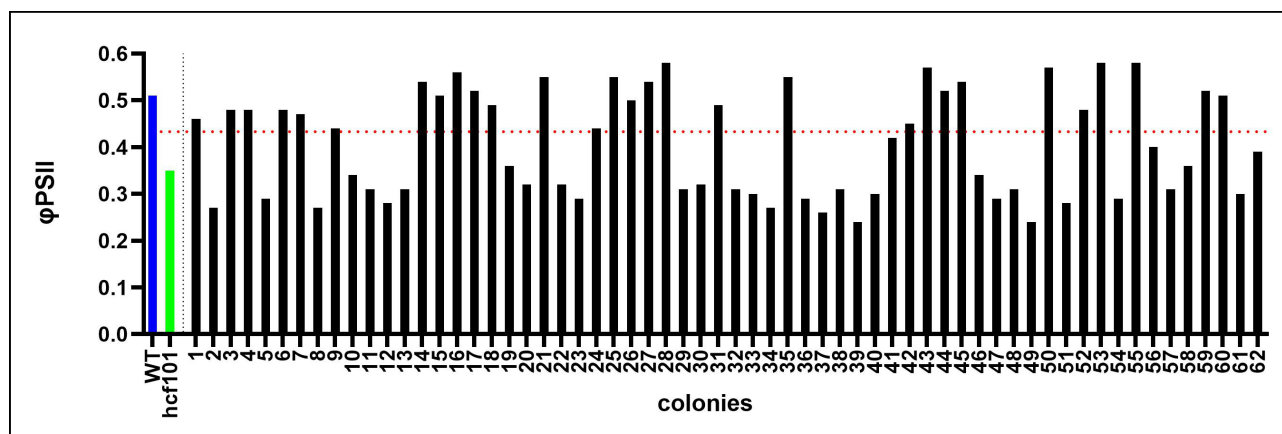
#### A.IV Sélection des transformants par crible photosynthétique

Après confirmation de l'intégrité des constructions par digestion, le plasmide L2 (contenant le gène de sélection *hygR* et le gène *HCF101-3xFlag*) a été amplifié chez *E. coli*. Il a ensuite été utilisé pour la transformation de *C. reinhardtii* par électroporation. La souche mutante *hcf101* a été choisie comme souche réceptrice. Elle présente deux avantages : (i) elle facilite l'identification des souches transformées par complémentation de la mutation et (ii) il n'existe pas de compétition entre *HCF101-3xFlag* et la version endogène.

Une première étape de sélection est effectuée sur milieu solide contenant de l'hygromycine afin d'identifier les souches portant le gène *hygR*. Toutefois, cette résistance ne garantit pas la présence du gène *HCF101-3xFlag*, l'intégration se faisant aléatoirement par recombinaison non homologue. Ainsi, le gène de résistance peut être intégré sans le gène *HCF101-3xFlag*, même si les deux gènes se trouvent sur le même plasmide.

Afin de confirmer la présence de la construction *HCF101-3xFlag*, un criblage de l'activité photosynthétique a été réalisé. Il a été montré, dans des résultats antérieurs à ce travail, que le mutant *hcf101* est impacté au niveau du PSI et que les valeurs de rendement quantique de la photosynthèse ( $\phi$ PSII) sont plus faibles que celles de la souche sauvage (Kairis, 2023). Une mesure

du  $\phi$ PSII permet d'identifier les transformants ayant des valeurs similaires à celle de la souche sauvage, indiquant une complémentation du mutant par HCF101-3xFlag (**Fig. 18**). Parmi les 62 colonies transformantes analysées, 29 colonies possèdent une activité  $\phi$ PSII comparable à celle du sauvage (soit  $> 85\%$  de la valeur  $\phi$ PSII du sauvage, seuil choisi arbitrairement), suggérant une complémentation.



**Figure 18. Criblage des colonies transformées sur base du  $\phi$ PSII.** L'analyse a été effectuée sur des colonies cultivées en milieu solide sur boîte. La lumière actinique émise est de  $220 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  pendant 5 minutes. WT = souche sauvage, hcf101 = mutant *hcf101*, 1 → 62 = colonies résultantes de la transformation avec la construction *HCF101-3xFlag + hygR*. La ligne seuil (rouge) indique 85% de la valeur  $\phi$ PSII du WT. Les souches dont la valeur de  $\phi$ PSII est inférieure à ce seuil sont considérées comme négative au criblage.

## A.V Analyse de la présence de la protéine HCF101 chez les transformants sélectionnés

Dix colonies présentant un phénotype sauvage ont été sélectionnées pour confirmer la présence de HCF101 avec une étiquette 3xFlag par Western blot. Une méthode similaire est utilisée pour isoler des transformants *HCF101-S* (sans la séquence codant pour 3xFLAG).

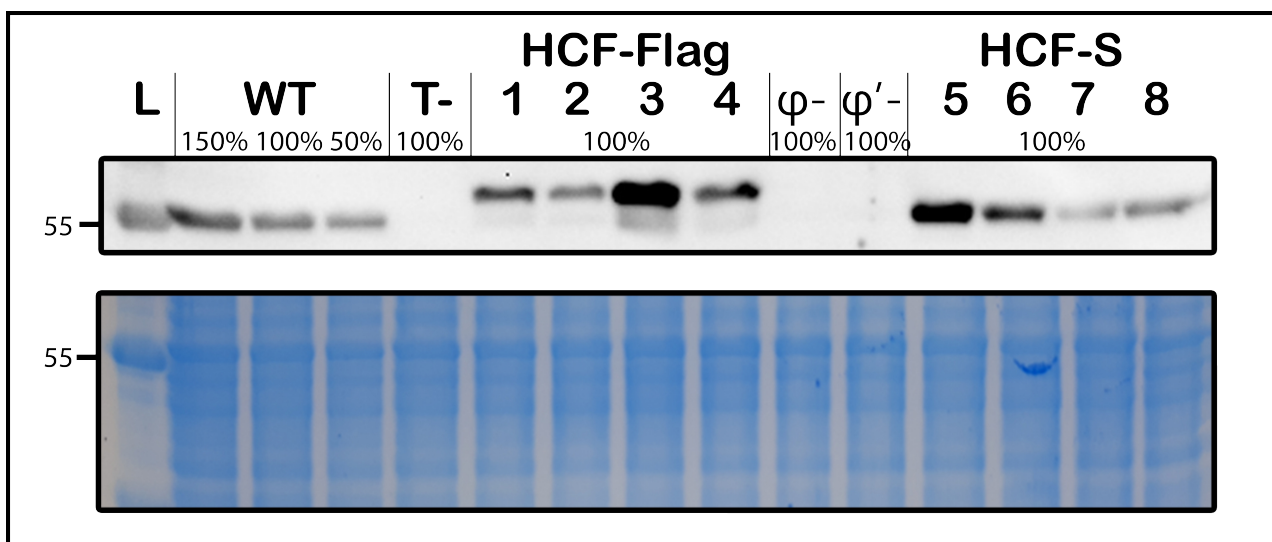
Un premier WB a été réalisé pour un criblage qualitatif des 10 souches pour la présence de HCF101-3xFlag (résultats non montrés). Parmi celles-ci, les 4 souches montrant les plus hauts niveaux de *HCF101-3xFlag* ont été sélectionnées. Étant donné la variabilité du contrôle de charge sur le WB, un second WB a été effectué sur ces 4 souches pour confirmer les résultats (**Fig. 19**). Le même protocole a été appliqué aux colonies transformées avec le gène *HCF101-S*.

Un signal correspondant à la protéine HCF101-3xFlag est présent sur membrane après révélation, confirmant le succès de la transformation (**Fig. 19**). Ce signal correspond à une protéine 2-4 kDa plus lourde que HCF101 endogène. Cette observation est cohérente avec la taille estimée du peptide 3xFlag (2,7 kDa), ce qui suggère sa présence à l'extrémité de la protéine. Une bande de faible intensité est aussi présente au poids moléculaire de HCF101 endogène, suggérant une possible

dégradation partielle du peptide 3xFlag. On observe également une variation du signal entre les transformants, la colonie 3 présentant le signal le plus intense. Par conséquent cette colonie a été choisie pour la co-immunoprécipitation.

Deux colonies négatives au criblage  $\phi$ PSII ( $\phi^-$  et  $\phi'^-$ ) ont également été testées par WB. L'absence de signal dans ces colonies confirme l'efficacité du criblage.

Un signal correspondant à la protéine HCF101-S est aussi bien présent sur la membrane. Comme dans le cas de la révélation de HCF101-3xFlag, ce signal est présent à des intensités différentes dans les 4 transformants analysés.



**Figure 19. Analyse par Western blot de la protéine HCF101 dans les transformants complétant le mutant *hcf101*.** L = Marqueur de poids moléculaire, WT = souche sauvage, T- = mutant *hcf101*, HCF-Flag = colonies transformées avec la construction *HCF101-3xFlag* et positives au criblage  $\phi$ PSII,  $\phi^-$  = colonies résultantes de la transformation avec la construction *HCF101-3xFlag* et négatives au criblage  $\phi$ PSII,  $\phi'^-$  = colonies résultantes de la transformation avec la construction *HCF101-S* et négatives au criblage  $\phi$ PSII, HCF-S = colonies transformées avec la construction *HCF101-S* et positives au criblage  $\phi$ PSII. Les poids moléculaires sont exprimés en kDa.

## 2B Expériences de co-immunoprécipitation en vue de la recherche de partenaires de HCF101

Excepté les protéines du PSI, aucun autre partenaire de HCF101 n'a encore été clairement établi. Afin de découvrir de nouvelles interactions, une expérience de co-immunoprécipitation a été envisagée. La présence du peptide 3xFlag permet à la protéine exprimée chez la souche transformée d'être reconnue par un anticorps anti-Flag et ainsi d'être isolée avec ses partenaires. Les anticorps ont été incubés avec des extraits chloroplastiques lysés du transformant exprimant HCF101-3xFlag décrit précédemment (transformant n° 3 de la Fig. 18). Les complexes protéiques liés aux anticorps

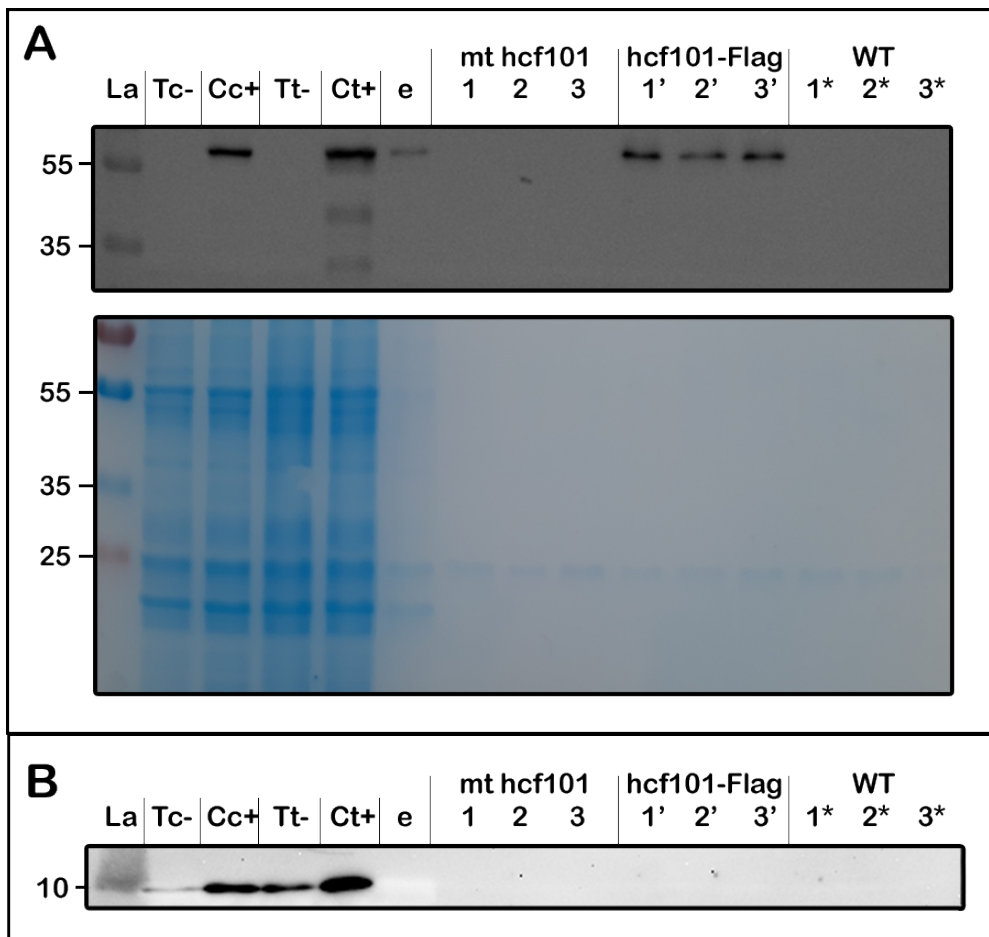


fixés à des billes magnétiques ont été isolés par application d'un champ magnétique. Les chloroplastes ont été isolés préalablement, et la lyse cellulaire a été effectuée de manière douce à l'aide d'un détergent anionique (Triton) afin de préserver les interactions HCF101-protéines partenaires.

Pour distinguer les interactions spécifiques des non-spécifiques, la Co-IP a été réalisée sur des extraits de la souche transformée avec le gène *HCF101-3xFlag*, du mutant *hcf101* et de la souche sauvage en vue d'une comparaison ultérieure par spectrométrie de masse. La Co-IP a été réalisée en triplicata biologique avec 1,5 mg de protéines par expérience. La présence de HCF101-3xFlag dans les fractions éluées a été confirmée par Western blot (WB) avec un anticorps anti-Flag (**Fig. 20A**). La protéine est détectée uniquement dans les fractions éluées de la Co-IP des souches exprimant le gène *HCF101-3xFlag*. Sur le gel de charge, on observe une bande à ~25kDa dans les éluats, signifiant que certaines protéines aspécifiques sont néanmoins présentes (**Fig. 20A**).

En plus des éluats de la Co-IP, des extraits protéiques totaux (Ct+) et chloroplastiques (Cc+) du transformant *HCF101-3xFlag* ont aussi été ajoutés au WB utilisant l'anticorps anti-Flag. Moins de bandes aspécifiques sont visibles dans les extraits chloroplastiques par rapport aux extraits protéiques totaux, soulignant l'intérêt d'avoir effectué la Co-IP sur des extraits chloroplastiques.

La protéine PsaC étant connue pour interagir avec HCF101 chez *A. thaliana* (Lezhneva et al., 2004), sa présence a été évaluée dans les éluats par Western blot (**Fig. 20B**). Cependant, aucun signal n'est visible lors de la révélation. Le signal n'étant pas présent dans le lysat après le passage des billes magnétiques (échantillon « e », **Fig. 20B**), il est possible que l'éluat soit trop dilué pour pouvoir détecter la présence de PsaC. Les échantillons ont été envoyés à nos collaborateurs (Dr D Vertommen, UCLouvain) afin d'être analysés en spectrométrie de masse.



**Figure 20. Analyse de la présence de HCF101-3xFlag et de Psac dans les éluats de la co-immunoprécipitation.** A) Détection du peptide Flag par Western blot (WB) dans les éluats de la Co-IP. La = marqueur de poids moléculaire exprimé en kDa, Tc = extrait chloroplastique du mutant *hcf101*, Cc+ = extrait chloroplastique du transformant exprimant HCF101-3xFlag, Tt- = extrait protéique total du mutant *hcf101*, Ct+ = extrait protéique total du transformant exprimant HCF101-3xFlag, e = fraction de l'extrait chloroplastique du transformant exprimant HCF101-3xFlag après incubation avec les billes magnétiques, mt *hcf101* = éluats en triplicata du mutant *hcf101* issus de la Co-IP, hcf101-Flag = éluats en triplicata du transformant HCF101-3xFlag issus de la Co-IP, WT = éluats en triplicata de la souche sauvage issus de la co-IP. B) Détection de Psac par Western blot (WB) dans les éluats. Les légendes et le contrôle de charge sont identiques à ceux de A).

## 5. Discussion

Les protéines HCF101 et NFU1 d'*A.thaliana* sont impliquées dans l'apport de clusters Fe-S, essentiels pour le fonctionnement de certaines protéines chloroplastiques. Chez *A.thaliana*, les protéines chloroplastiques de type NFU sont au nombre de trois (NFU1, 2 et 3). Les trois isoformes sont capables de lier un centre de type [4Fe-4S], et NFU2, en particulier, serait également capable de lier un centre [2Fe-2S] (Nath et al., 2016; Gao et al., 2013). Les protéines NFU posséderaient des rôles redondants, comme en témoigne le fait que les mutants simples *nfu2* et *nfu3* ne sont pas létaux, contrairement aux mutants doubles *nfu2* x *nfu3* (Satyanarayan et al., 2021; Touraine et al., 2019). Cette idée de redondance est également renforcée par les réductions additives de NFU1, NFU2 et NFU3 sur l'activité du PSI, bien que l'impact ne soit pas similaire entre les trois protéines, mais plutôt hiérarchique (Satyanarayan et al., 2021; Touraine et al., 2019). La protéine HCF101 joue un rôle essentiel dans le transfert des centres [4Fe-4S] aux sous-unités PsaA, PsaB et PsaC du photosystème I (Lezhneva et al., 2004). Les centres Fe-S sont fournis par les protéines NFU2 et NFU3, essentielles pour l'apport de ces centres à HCF101 (Touraine et al., 2019). L'importance d'HCF101 est démontrée par l'étude de mutants *hcf101*, qui ne sont pas viables sans l'apport de sucrose, soulignant ainsi son rôle indispensable dans la photosynthèse (Lezhneva et al., 2004).

Chez *C. reinhardtii*, CrNFU1 est l'orthologue de AtNFU1, tandis que CrNFU2 est l'orthologue de AtNFU2 et AtNFU3 (Przybyla-Toscano et al., 2021). Les protéines montrent des différences structurales, et des similitudes avec celles d'*A. thaliana*. Par exemple, NFU1 possède un domaine supplémentaire de motif GIY-YIG, dont la fonction reste inconnue (Kairis, 2023). Pour HCF101, les cystéines responsables de la fixation des centres Fe-S varient entre les deux espèces, avec des cystéines alternatives pouvant être impliquées dans la liaison des centres [4Fe-4S] chez *C. reinhardtii* (Kairis, 2023). Leurs rôles sont partiellement distincts bien que encore peu connus : CrNFU1 est crucial pour la synthèse de la chlorophylle à l'obscurité, en raison de l'absence d'insertion des centres 4Fe-4S de la Dark-Operative Protochlorophyllide Oxidoreductase (DPOR), ainsi qu'en anoxie, où de nombreuses enzymes à centres 4Fe-4S sont impliquées tandis que HCF101 participerait à la maturation du centre 4Fe-4S de la protéine PsaC du PSI (Kairis, 2023).

Initialement, l'éventuelle redondance entre NFU1 et HCF101 chez *Chlamydomonas* n'était donc pas envisagée puisque ces protéines semblaient avoir des rôles distincts, l'une jouant un rôle à l'obscurité/l'anoxie (NFU1) et l'autre à la lumière (HCF101) comme indiqué ci-dessus. Ces rôles étaient supportés par des données transcriptomiques indiquent effectivement qu'en condition 12h lumière – 12h obscurité, les deux gènes ne sont pas transcrits aux mêmes moments. *NFU1* est majoritairement transcrit lors de la transition nuit-jour et *HCF101* entre 3h et 5h après la transition

en lumière (Kairis, 2023). Cependant, des mutants *nfu1* ont été testés dans une condition "obscurité + anoxie" afin d'exacerber le phénotype de ces mutants. De manière inattendue, certaines des réponses de ce mutant, comme l'absence des protéines HYDA, n'étaient plus observés dans cette condition par WB. Une expérience de protéomique comparative a été menée sur des échantillons dans ladite condition et a révélé un remaniement du protéome du mutant *nfu1* (Kairis, 2023). En effet, l'abondance de certaines protéines Fe-S dépendante impliquées dans les mécanismes de réponse à l'anoxie (HYDA, HYDEF et HYDG) ainsi que dans la machinerie SUF était significativement supérieure à l'abondance des mêmes protéines dans la souche sauvage. De plus, la protéine HCF101 était plus de 2 fois plus abondante chez le mutant *nfu1* dans cette condition particulière. Ce résultat, ainsi que des prédictions structurales (Kairis et al., 2024), indiquent que la protéine HCF101 pourrait être redondante avec la protéine NFU1 sous certaines conditions de culture. Aucune étude sur la redondance de ces protéines n'a jamais été conduite or la compréhension du fonctionnement de la machinerie SUF et du mécanisme de transfert de centres Fe-S pourrait en bénéficier.

Pour identifier une possible redondance fonctionnelle entre les protéines HCF101 et NFU1, des mutants portant la double mutation *nfu1 hcf101* ont été générés par croisement des mutants simples. Ces mutations ont été induites par l'insertion d'une cassette de résistance à la paromomycine dans les gènes respectifs (Li et al., 2016, 2019). Des analyses des mutants simples ont montré un niveau de la protéine HCF101 dans le mutant *hcf101* et une absence de la protéine NFU1 chez le mutant *nfu1* (Kairis, 2023). Le génotypage a confirmé la présence des deux mutations dans les souches doubles mutants. Les analyses par Western blots ont confirmé l'absence de NFU1 et la présence en faible quantité de la protéine HCF101. La quantité de HCF101 dans les mutants doubles est estimée à environ 10 % de celle observée dans le type sauvage (WT) tout comme chez le simple mutant. La faible quantité de HCF101 présente fait que ces mutants sont jugés suffisamment représentatifs pour étudier l'effet des deux mutations.

Les doubles mutants ont ensuite été caractérisés en mesurant le rendement quantique maximal du PSII (Fv/Fm) et le rendement quantique effectif du PSII ( $\phi$ PSII), résumés dans le **tableau 2**. Le mutant simple *hcf101*, déficient dans la synthèse du PSI, présente une diminution de 21 % pour le Fv/Fm et de 46 % pour  $\phi$ PSII par rapport au WT. Le mutant simple *nfu1* montre une réduction de 21 % pour  $\phi$ PSII, sans affectation du rapport Fv/Fm. Pour les deux paramètres analysés, les doubles mutants affichent des valeurs de Fv/Fm et  $\phi$ PSII réduites par rapport aux mutants simples. Notamment, le paramètre Fv/Fm des doubles mutants est réduit de 11 % de plus par rapport au

mutant *hcf101* seul. Cette différence, absente chez le mutant *nfu1*, suggère un effet de redondance entre les deux protéines.

Paramètres photosynthétiques analysés	WT	Mutant <i>hcf101</i>	Mutant <i>nfu1</i>	DM1	DM3	DM4
Fv/Fm	100 %	79 %	101 %	73 %	66 %	68 %
φPSII	100 %	56 %	79 %	42 %	35 %	43 %

**Tableau 2. Tableau résumant l'analyse des paramètres photosynthétiques des doubles mutants.** WT= sauvage, DM1,3,4 = doubles mutants *hcf101 nfu1*. Le pourcentage représenté correspond au pourcentage relatif entre la valeur de chaque souche et le WT pour chaque paramètre photosynthétique. Les paramètres Fv/Fm et φPSII (5 minutes d'exposition à 160 μmol photons·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) sont analysés sur des souches cultivées en TAP.

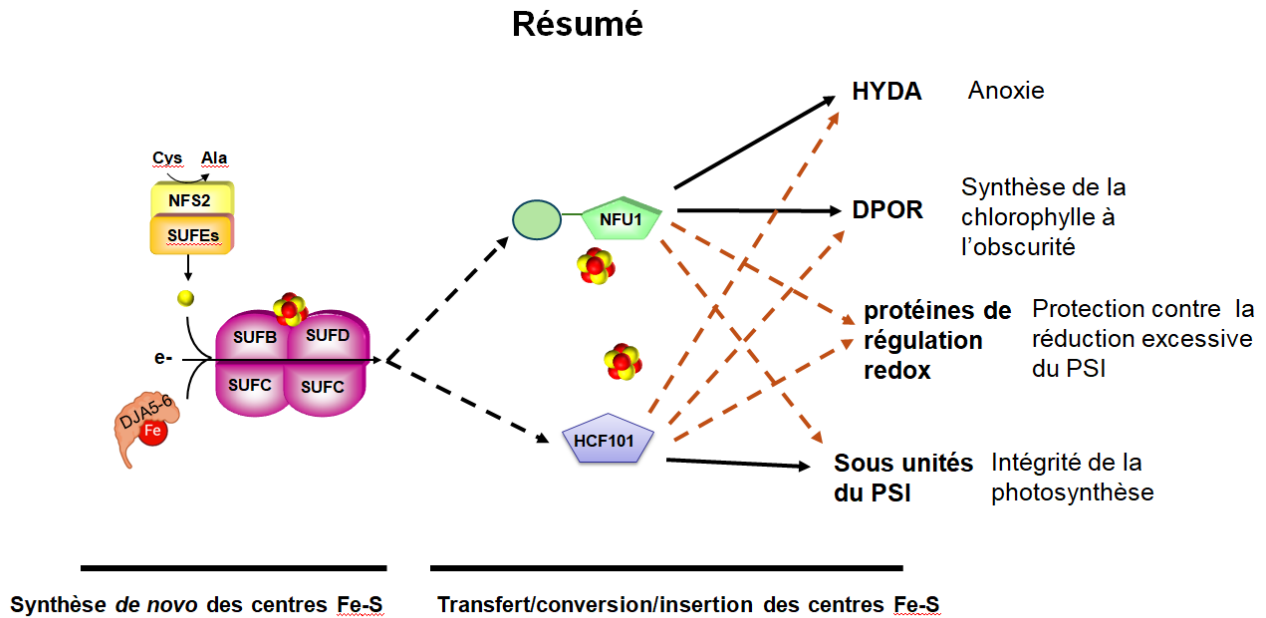
Pour confirmer l'effet de redondance observé dans l'analyse des paramètres photosynthétiques, une étude de la croissance a été réalisée sous différentes conditions lumineuses (**Tableau 3**).

	WT	Mutant <i>hcf101</i>	Mutant <i>nfu1</i>	DM1	DM2	DM3	DM4
CL	++++	+++	++++	++	++	++	++
HL	++++	++	+++ /++++	+	+	+	+
obscurité	vert	vert	jaune/vert	jaune	jaune	jaune	jaune

**Tableau 3. Tableau résumant l'analyse de croissance des doubles mutants *hcf101 nfu1* sous différentes conditions lumineuses.** CL = intensité lumineuse contrôle (50 μmol photons·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>), HL = haute intensité lumineuse (400 μmol photons·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>). Les souches cultivées en CL et HL le sont en milieu TMP (sans acétate), tandis que celles en obscurité sont cultivées en milieu TAP (avec acétate). DM = souches possédant la double mutation NFU1-1 x HCF101. WT = souche sauvage.

Ces résultats mettent en évidence un effet plus prononcé de la mutation double que les mutations simples, perceptible dans certaines conditions de croissance. Le défaut de croissance observé chez les doubles mutants exposés à une forte lumière indique que HCF101 et NFU1 sont toutes deux essentielles à la maturation de l'appareil photosynthétique, en particulier du PSI. Il est important de distinguer deux aspects : d'une part, l'impact sur l'insertion des centres fer-soufre dans les sous-unités du PSI, qui se manifeste surtout lorsque le PSI est sollicité ou endommagé par une forte lumière ; et d'autre part, un possible effet sur d'autres protéines régulatrices du PSI, comme la protéine 'triplet-cysteine repeat' (TCR), une protéine à centre 3Fe-4S impliquée dans le contrôle de l'oxydation du P700 en haute lumière chez *A. thaliana* (Trinh et al., 2021). Le phénotype "jaune à l'obscurité" observé chez les doubles mutants, plus marqué que chez *nfu1* seul, soutient l'idée de la redondance fonctionnelle entre ces deux protéines. En effet, le mutant *hcf101* ne présente pas ce phénotype, et *nfu1* montre un phénotype moins sévère. Le phénotype exacerbé chez les doubles mutants s'explique donc par l'absence simultanée des deux protéines : HCF101 jouerait un rôle

partiel dans la maturation des cibles de NFU1, probablement la principale protéine de transfert pour la maturation du complexe DPOR, essentiel à la conversion de la protochlorophyllide en chlorophyllide *a* à l'obscurité. Un résumé de ces hypothèses dérivant des analyses effectuées est représenté sur la **figure 21**.



**Figure 21. Résumé des Voies de Synthèse des Centres Fe-S : Interactions avec HCF101 et NFU1 et leurs Cibles Associées.** Le système de livraison du soufre (S) est représenté en jaune et orange, le complexe d'assemblage des clusters fer-soufre (Fe-S) en violet. Les flèches en noir représentent les interactions suggérées dans des articles précédents. Les flèches en rouge représentent les interactions redondantes possibles suite aux analyses des paramètres photosynthétiques et l'analyse de croissance. Adapté de N. Rouhier

Le deuxième objectif de cette étude est d'identifier les protéines cibles ou partenaires de HCF101. Chez *A. thaliana*, les cibles connues de HCF101 incluent les sous-unités PsaA, PsaB et PsaC du photosystème I (PSI), ainsi que la ferredoxine-thioredoxine réductase (FTR), qui interagirait avec HCF101 (Lezhneva et al., 2004). En revanche, chez *C. reinhardtii*, les cibles de HCF101 sont encore mal connues et pourraient différer avec celles des plantes à fleur étant donné les différences structurales entre celles-ci (Kairis et al., 2024). Pour identifier de nouvelles cibles potentielles, il a été envisagé de réaliser une expérience de co-immunoprécipitation suivie d'une analyse par spectrométrie de masse, sur des échantillons de chloroplastes isolés. Pour ce faire, le gène *HCF101* a été cloné en utilisant la méthode MoClo, en y ajoutant une séquence en acides aminés correspondant à un épitope 3xFlag nécessaire pour la co-immunoprécipitation (Co-IP). La construction clonée comprend le promoteur, la région 5'UTR, les exons endogènes et les neuf premiers introns de *HCF101*, un tag 3xFlag, ainsi que la région 3'UTR et le terminateur dérivé de la

$\beta$ -tubuline. Un gène de résistance à un antibiotique a également été incorporé pour permettre la sélection des souches transformées. Après vérification de la taille de la construction transgénique par digestion enzymatique, le gène cloné a été introduit dans une souche mutante *hcf101* de *C. reinhardtii*.

La sélection a été réalisée sur un milieu contenant de la hygromycine, permettant d'isoler les transformants ayant intégré le gène de résistance. Étant donné que la transformation se fait par recombinaison non homologe, la présence du gène de résistance ne garantit pas l'intégration effective de la construction *HCF101-3xFlag*. Pour confirmer la présence du gène d'intérêt et évaluer son expression fonctionnelle, un criblage basé sur la mesure du paramètre  $\phi$ PSII a été effectué. Le mutant *hcf101* présente une réduction de 31 % de ce paramètre à une intensité lumineuse de 220  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (**Fig. 18**). Les colonies transformées qui présentent un  $\phi$ PSII similaire à celui du sauvage, indiquent une complémentation efficace du mutant *hcf101*. Le criblage indique que 46 % de colonies transformées restaurent la mutation. Cependant, une variation dans les valeurs de  $\phi$ PSII a été observée en fonction des souches, suggérant que l'expression du gène peut différer selon les transformants.

Parmi les transformants positifs identifiés lors du criblage, dix ont été sélectionnés pour évaluer la présence de la protéine HCF101-3xFlag par Western Blot (WB). Les dix transformants ont montré un signal correspondant à la protéine avec le tag Flag et nous avons retenu celui présentant le signal le plus élevé pour la Co-IP. De plus, une bande de faible intensité correspondant à la protéine HCF101 non marquée est détectée dans les transformants positifs à la complémentation de HCF101, ce qui pourrait indiquer une dégradation partielle de la protéine HCF101-3xFlag.

Pour capturer la protéine recombinante et ses partenaires, une expérience de Co-IP a été réalisée en incubant des extraits chloroplastiques avec des billes magnétiques portant un anticorps contre le peptide Flag. La quantité de protéine HCF101-3xFlag dans les éluats de la Co-IP a été quantifiée par western blot à l'aide d'un anticorps anti-Flag. Après optimisation du protocole de Co-IP, il a été observé qu'un signal n'était détecté que dans les éluats de la souche transformée. Les niveaux de protéine dans les extraits des différentes étapes de la Co-IP étaient significativement plus faibles que ceux observés dans les éluats. Ces résultats confirment ainsi l'efficacité et la spécificité de la Co-IP. Étant donné que la protéine HCF101 est connue pour servir à la maturation du PSI (Leznheva et al., 2004), un western blot supplémentaire utilisant un anticorps anti-PsaC a été réalisé pour détecter la présence de PsaC dans les éluats. Cependant, PsaC n'a pas été détectée dans les éluats ni dans les

extraits des différentes étapes de la Co-IP, suggérant que les concentrations de PsaC dans les éluats pourraient être trop faibles pour être détectées dans ces conditions.

De plus, un contrôle de charge des éluats a révélé une bande non spécifique dans tous les échantillons, ce qui indique la présence de protéines non spécifiques. Bien que l'adoption de conditions d'élution plus strictes puisse réduire la contamination par des protéines non spécifiques, l'absence de détection directe de PsaC a conduit à ne pas ajuster les conditions d'élution, qui risqueraient de conduire à la perte de partenaires. En conséquence, les éluats ont été envoyés à nos partenaires de l'UCL pour une analyse par spectrométrie de masse afin d'identifier les partenaires protéiques potentiels de HCF101.

Si une quantité excessive de protéines non spécifiques est détectée lors de l'analyse par spectrométrie de masse, il pourrait être nécessaire d'adopter des étapes de lavage plus rigoureuses lors de la Co-IP pour réduire la présence de ces protéines non spécifiques. Si la spectrométrie de masse identifie des protéines cibles, il serait pertinent de vérifier expérimentalement si ces protéines sont effectivement des cibles de HCF101. En plus d'approfondir la compréhension du rôle de HCF101, l'analyse par spectrométrie de masse pourrait également offrir des perspectives sur le rôle redondant observé entre les protéines HCF101 et NFU1. Ainsi, l'étude des doubles mutants pourrait fournir des informations cruciales sur les cibles communes entre NFU1 et HCF101, à condition que les cibles de HCF101 soient identifiées.

## 6. Liste des abréviations

### Abréviation Définition

---

<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CLiP	Chlamydomonas Library Project
CRISPR-	
Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats with Cas9 enzyme
TALENs	Transcription Activator-Like Effector Nucleases
MoClo	Modular Cloning
FADH2	Flavin Adenine Dinucleotide Hydroxide
DnaJ	Chaperone protein family
NFS2	Cystéine désulfurase de type II
SUFE1-3	Sulfur Utilization Factor E1-3
SUFBC2D	Système SUFBC2D de biosynthèse des centres Fe-S
HCF101	High Chlorophyll Fluorescence 101



DUF59	Domain of Unknown Function 59
DUF971	Domain of Unknown Function 971
PSI	Photosystème I
NFU	NifU-like domain
NFU1-3	NFU1, NFU2, NFU3 (protéines NFU chez <i>Arabidopsis thaliana</i> )
FTR	Ferredoxin-Thioredoxin Reductase (Ferredoxin-Thioredoxin Réductase)
SIR	Sulfite Reductase
GRXS16	Glutaredoxin S16
APR1	Adenosine 5'-Phosphosulfate Reductase 1
DHAD	Dihydroxyacid Dehydratase
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
GIY-YIG	Motif trouvé dans certaines endonucléases
Fe-S	centre Fer-soufre
Co-IP	Co-immunoprécipitation
WB	Western Blot
3xFlag	3xFlag
L0	Niveau 0 (des modules dans le système MoClo)
L1	Niveau 1 (assemblage des modules dans le système MoClo)
L2	Niveau 2 (assemblage final dans le système MoClo)
5'UTR	5' Untranslated Region
3'UTR	3' Untranslated Region
$\beta$ -tubuline	Beta-tubulin
Bsal	Enzyme de restriction Bsal
Bpil	Enzyme de restriction Bpil
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
[4Fe-4S]	Centre fer-soufre à 4 atomes de fer et soufre
[2Fe-2S]	Centre fer-soufre à 2 atomes de fer et soufre
PsaA, PsaB,	
PsaC	Sous-unités du photosystème I (PSI)
TAP	Milieu de culture Tris-Acetate-Phosphate Medium
TMP	Milieu de culture Tris-minimal-Phosphate (sans acétate)
SUF	Sulfur Utilization Factor
TCR	Triplet-Cysteine Repeat
Rubico	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
CIA	Complexe d'Acquisition du Fer
ISC	Iron-Sulfur Cluster (complexe fer-soufre)
SUFA	Sulfur Utilization Factor A
GRXS14	Glutaredoxin S14
IBA57	IscA-like Fe-S cluster assembly factor
BOLA1	BolA-like 1 (co-chaperone)
BOLA4	BolA-like 4 (co-chaperone)
	metG-related protein
MRP	
Transposons	
non LTR	Transposons sans Long Terminal Repeat
T4	Enzyme de ligation issue du phage T4
FUS1	Gène impliqué dans la détermination du mating-type (type sexuel)
MID	Gène impliqué dans la détermination du mating-type (type sexuel)
KO	Mutant Knock Out
DPOR	Dark-Operative Protochlorophyllide Oxidoreductase

chlB	Chlorophyllase B chlB
φPSII	Rendement quantique effectif du PSII
Fv/Fm	rendement quantique maximal du PSII
	Réactif utilisé pour détecter les clones recombinants contenant le gène
X-gal	LacZ (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside )
hygR	Résistance à l'hygromycine
HYDA	Hydrogénase A
HYDEF	Hydrogénase Déferriprotéine
HYDG	Hydrogénase D
P700	Centre réactionnel du Photosystème I

## 7. Bibliographie

Anderson, J. C., Clarke, E. J., Arkin, A. P., & Voigt, C. A. (2006). Environmentally Controlled Invasion of Cancer Cells by Engineered Bacteria. *J. Mol. Biol.*, 355(4), 619-627.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.10.076>

Beck, C. F., & Haring, M. A. (1996). Gametic Differentiation of *Chlamydomonas*. In K. W. Jeon (Éd.), *International Review of Cytology* (Vol. 168, p. 259-302). Academic Press.  
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60886-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60886-4)

Berger, N., Vignols, F., Przybyla-Toscano, J., Roland, M., Rofidal, V., Touraine, B., Zienkiewicz, K., Couturier, J., Feussner, I., Santoni, V., Rouhier, N., Gaymard, F., & Dubos, C. (2020). Identification of client iron–sulfur proteins of the chloroplastic NFU2 transfer protein in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, 71(14), 4171-4187. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa166>

Blaby, I. K., Blaby-Haas, C. E., Tourasse, N., Hom, E. F. Y., Lopez, D., Aksoy, M., Grossman, A., Umen, J., Dutcher, S., Porter, M., King, S., Witman, G. B., Stanke, M., Harris, E. H., Goodstein, D., Grimwood, J., Schmutz, J., Vallon, O., Merchant, S. S., & Prochnik, S. (2014). The *Chlamydomonas* genome project : A decade on. *Trends Plant Sci.*, 19(10), 672-680.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.05.008>

Bodenes, P. (2017). *Study of the application of pulsed electric fields (PEF) on microalgae for the extraction of neutral lipids.*

Boyd, J. M., Pierik, A. J., Netz, D. J. A., Lill, R., & Downs, D. M. (2008). Bacterial ApbC Can Bind and Effectively Transfer Iron–Sulfur Clusters. *Biochemistry*, 47(31), 8195-8202.  
<https://doi.org/10.1021/bi800551y>

Braymer, J. J., Freibert, S. A., Rakwalska-Bange, M., & Lill, R. (2021). Mechanistic concepts of iron-sulfur protein biogenesis in Biology. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, 1868(1), 118863.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118863>

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. *MBO J.*, 27(12), 1736-1746. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.98>

- Casini, A., MacDonald, J. T., Jonghe, J. D., Christodoulou, G., Freemont, P. S., Baldwin, G. S., & Ellis, T. (2014). One-pot DNA construction for synthetic biology : The Modular Overlap-Directed Assembly with Linkers (MODAL) strategy. *Nucleic Acids Res.*, 42(1), e7.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt915>
- Choi, K. R., Jiao, S., & Lee, S. Y. (2020). Metabolic engineering strategies toward production of biofuels. *Chem. Biol*, 59, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.02.009>
- Crozet, P., Navarro, F. J., Willmund, F., Mehrshahi, P., Bakowski, K., Lauersen, K. J., Pérez-Pérez, M.-E., Auroy, P., Gorchs Rovira, A., Sauret-Gueto, S., Niemeyer, J., Spaniol, B., Theis, J., Trösch, R., Westrich, L.-D., Vavitsas, K., Baier, T., Hübner, W., de Carpentier, F., ... Lemaire, S. D. (2018). Birth of a Photosynthetic Chassis : A MoClo Toolkit Enabling Synthetic Biology in the Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS Synth. Biol.*, 7(9), 2074-2086.  
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00251>
- da Fonseca-Pereira, P., Siqueira, J. A., Monteiro-Batista, R. de C., Vaz, M. G. M. V., Nunes-Nesi, A., & Araújo, W. L. (2022). Using synthetic biology to improve photosynthesis for sustainable food production. *J. Biotechnol.*, 359, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.09.010>
- Del Valle, I., Fulk, E. M., Kalvapalle, P., Silberg, J. J., Masiello, C. A., & Stadler, L. B. (2021). Translating New Synthetic Biology Advances for Biosensing Into the Earth and Environmental Sciences. *Front. Microbiol.*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.618373>
- Dent, R. M., Haglund, C. M., Chin, B. L., Kobayashi, M. C., & Niyogi, K. K. (2005). Functional Genomics of Eukaryotic Photosynthesis Using Insertional Mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*, 137(2), 545-556. <https://doi.org/10.1104/pp.104.055244>
- Dhokane, D., Kancharla, N., Savarimuthu, A., Bhadra, B., Bandyopadhyay, A., & Dasgupta, S. (2023). Genome Editing in *Chlamydomonas reinhardtii* Using Cas9-gRNA Ribonucleoprotein Complex : A Step-by-Step Guide. *Methods Mol. Biol. (Clifton, N.J.)*, 2653, 207-217.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3131-7\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3131-7_14)
- Dubois, F., Remacle, C. Caractérisation de mutants impliqués dans l'assemblage des centres fer-soufre dans le chloroplaste de la microalgue verte *C. reinhardtii*.
- Dunin-Horkawicz, S., Feder, M., & Bujnicki, J. M. (2006). Phylogenomic analysis of the GIY-YIG nuclease superfamily. *BMC Genomics*, 7(1), 98. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-98>
- Dupuis, S., & Merchant, S. S. (2023). *Chlamydomonas reinhardtii* : A model for photosynthesis and so much more. *Nat. Methods*, 20(10), 1441-1442. <https://doi.org/10.1038/s41592-023-02023-6>
- Emrich-Mills, T. Z., Yates, G., Barrett, J., Girr, P., Grouneva, I., Lau, C. S., Walker, C. E., Kwok, T. K., Davey, J. W., Johnson, M. P., & Mackinder, L. C. M. (2021). A recombineering pipeline to clone large and complex genes in *Chlamydomonas*. *Plant Cell*, 33(4), 1161-1181.  
<https://doi.org/10.1093/plcell/koab024>
- Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2009). Golden Gate Shuffling : A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type II Restriction Enzymes. *PLoS ONE*, 4(5), e5553.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005553>

- Engler, C., Youles, M., Gruetzner, R., Ehnert, T.-M., Werner, S., Jones, J. D. G., Patron, N. J., & Marillonnet, S. (2014). A golden gate modular cloning toolbox for plants. *ACS Synth. Biol*, 3(11), 839-843. <https://doi.org/10.1021/sb4001504>
- Ferris, P. J., & Goodenough, U. W. (1997). Mating Type in *Chlamydomonas* Is Specified by Mid, the minus-Dominance Gene. *Genetics*, 146(3), 859-869. <https://doi.org/10.1093/genetics/146.3.859>
- Fontecave, M. (2006). Iron-sulfur clusters : Ever-expanding roles. *Nat. Chem. Biol.*, 2(4), 171-174. <https://doi.org/10.1038/nchembio0406-171>
- Frazzon, J., & Dean, D. R. (2001). Feedback regulation of iron-sulfur cluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(26), 14751-14753. <https://doi.org/10.1073/pnas.011579098>
- Gallaher, S. D., Fitz-Gibbon, S. T., Glaesener, A. G., Pellegrini, M., & Merchant, S. S. (2015). *Chlamydomonas* Genome Resource for Laboratory Strains Reveals a Mosaic of Sequence Variation, Identifies True Strain Histories, and Enables Strain-Specific Studies. *Plant Cell*, 27(9), 2335-2352. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00508>
- Gallaher, S. D., Fitz-Gibbon, S. T., Strenkert, D., Purvine, S. O., Pellegrini, M., & Merchant, S. S. (2018). High-throughput sequencing of the chloroplast and mitochondrion of *Chlamydomonas reinhardtii* to generate improved de novo assemblies, analyze expression patterns and transcript speciation, and evaluate diversity among laboratory strains and wild isolates. *Plant J.*, 93(3), 545-565. <https://doi.org/10.1111/tpj.13788>
- 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(38), 6633-6645. <https://doi.org/10.1021/bi4007622>
- Garcia, P. S., D'Angelo, F., Ollagnier de Choudens, S., Dussouchaud, M., Bouveret, E., Gribaldo, S., & Barras, F. (2022). An early origin of iron–sulfur cluster biosynthesis machineries before Earth oxygenation. *Nat. Ecol. Evol.*, 6(10), 1564-1572. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01857-1>
- Godman, J., & Balk, J. (2008). Genome Analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* Reveals The Existence of Multiple, Compartmentalized Iron–Sulfur Protein Assembly Machineries of Different Evolutionary Origins. *Genetics*, 179(1), 59-68. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.086033>
- Harris, Elizabeth H. 2009. *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use: Volume 1*. Academic Press.
- He, S., Crans, V. L., & Jonikas, M. C. (2023). The pyrenoid : The eukaryotic CO<sub>2</sub>-concentrating organelle. *Plant Cell*, 35(9), 3236-3259. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad157>
- Hidese, R., Mihara, H., & Esaki, N. (2011). Bacterial cysteine desulfurases : Versatile key players in biosynthetic pathways of sulfur-containing biofactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91(1), 47-61. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3336-x>
- 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(4), 1599-1607.

<https://doi.org/10.1083/jcb.101.4.1599>

Imsande, J. (1999). Iron-sulfur clusters : Formation, perturbation, and physiological functions. *Plant Physiol. Biochem.*, 37(2), 87-97. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(99\)80070-9](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(99)80070-9)

Jeong, B., Jang, J., & Jin, E. (2023). Genome engineering via gene editing technologies in microalgae. *Bioresour. Technol.*, 373, 128701. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128701>

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, 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., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

Kairis, A. (2023). *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.* <https://matheo.uliege.be/handle/2268.2/18456>

Kairis, A., Neves, B. D., Couturier, J., Remacle, C., & Rouhier, N. (2024). Iron-sulfur cluster synthesis in plastids by the SUF system : A mechanistic and structural perspective. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 1871(7), 119797. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2024.119797>

Kariyawasam, T., Joo, S., Goodenough, U., Lee, J.-H., Kariyawasam, T., Joo, S., Goodenough, U., & Lee, J.-H. (2019). Novel approaches for generating and manipulating diploid strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algae*, 34(1), 35-43. <https://doi.org/10.4490/algae.2019.34.2.25>

Klein, C. A., Emde, L., Kuijpers, A., & Sobetzko, P. (2019). MoCloFlex : A Modular Yet Flexible Cloning System. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00271>

Kobayashi, K., Fujikawa, M., & Kozawa, T. (2014). Oxidative stress sensing by the iron-sulfur cluster in the transcription factor, SoxR. *J. Inorg. Biochem.*, 133, 87-91. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.11.008>

Kumar, G., Shekh, A., Jakhu, S., Sharma, Y., Kapoor, R., & Sharma, T. R. (2020). Bioengineering of Microalgae : Recent Advances, Perspectives, and Regulatory Challenges for Industrial Application. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00914>

Lee, M. E., DeLoache, W. C., Cervantes, B., & Dueber, J. E. (2015). A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. *ACS Synth. Biol.*, 4(9), 975-986. <https://doi.org/10.1021/sb500366v>

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. *Plant J.*, 37(2), 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(4), 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(2), 367-387. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00465>
- Lin, D., & O'Callaghan, C. A. (2018). MetClo : Methylase-assisted hierarchical DNA assembly using a single type IIS restriction enzyme. *Nucleic Acids Res.*, 46(19), e113. <https://doi.org/10.1093/nar/gky596>
- Lu, Yan. 2018. « Assembly and Transfer of Iron–Sulfur Clusters in the Plastid ». *Front. Plant Sci*, 9:336. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00336>
- Lumbreras, V., Stevens, D. R., & Purton, S. (1998). Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *Plant J.*, 14(4), 441-447. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00145.x>
- 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(5), 2227-2230. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.348>
- 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., ... Grossman, A. R. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5848), 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(3), 385-396. <https://doi.org/10.1007/BF00620055>
- Meyer, M., & Griffiths, H. (2013). Origins and diversity of eukaryotic CO<sub>2</sub>-concentrating mechanisms : Lessons for the future. *J. Exp. Bot.* , 64(3), 769-786. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers390>
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold : Making protein folding accessible to all. *Nat. Methods*, 19(6), 679-682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Moore, S. J., Lai, H.-E., Kelwick, R. J. R., Chee, S. M., Bell, D. J., Polizzi, K. M., & Freemont, P. S. (2016). EcoFlex : A Multifunctional MoClo Kit for *E. coli* Synthetic Biology. *ACS Synth. Biol.*, 5(10), 1059-1069. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00031>
- 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(4), 2459-2470. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01564>
- Nishimura, Y. (2010). Uniparental inheritance of cpDNA and the genetic control of sexual differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Plant Res.*, 123, 149-162.

<https://doi.org/10.1007/s10265-009-0292-y>

Patron, N. J., Orzaez, D., Marillonnet, S., Warzecha, H., Matthewman, C., Youles, M., Raitskin, O., Leveau, A., Farré, G., Rogers, C., Smith, A., Hibberd, J., Webb, A. A. R., Locke, J., Schornack, S., Ajioka, J., Baulcombe, D. C., Zipfel, C., Kamoun, S., ... Haseloff, J. (2015). Standards for plant synthetic biology : A common syntax for exchange of DNA parts. *New Phytol.*, 208(1), 13-19. <https://doi.org/10.1111/nph.13532>

Pan, J. (2008). Cilia and ciliopathies : From Chlamydomonas and beyond. *China Life Sci.*, 51(6), 479-486. <https://doi.org/10.1007/s11427-008-0071-3>

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(6), Article 6. <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. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 23(4), 545-566. <https://doi.org/10.1007/s00775-018-1532-1>

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(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01777-x>

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(6), 1727-1742. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011034>

Roret, T., Pégeot, H., Couturier, J., Mulliert, G., Rouhier, N., & Didierjean, C. (2014). X-ray structures of Nfs2, the plastidial cysteine desulfurase from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.*, 70(Pt 9), 1180-1185. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14017026>

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(1), e00303. <https://doi.org/10.1002/pld3.303>

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(Pt 1), 207-214. <https://doi.org/10.1042/BJ20091290>

Singh, H., Shukla, M. R., Chary, K. V. R., & Rao, B. J. (2014). Acetate and Bicarbonate Assimilation and Metabolite Formation in *Chlamydomonas reinhardtii* : A <sup>13</sup>C-NMR Study. *PLoS ONE*, 9(9), e106457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106457>

- 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(6), 1875-1889. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz050>
- Van Hove, B., Guidi, C., De Wannemaeker, L., Maertens, J., & De Mey, M. (2017). Recursive DNA Assembly Using Protected Oligonucleotide Duplex Assisted Cloning (PODAC). *ACS Synth. Biol.*, 6(6), 943-949. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00017>
- Vasudevan, R., Gale, G. A. R., Schiavon, A. A., Puzorjov, A., Malin, J., Gillespie, M. D., Vavitsas, K., Zulkower, V., Wang, B., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J., & McCormick, A. J. (2019). CyanoGate : A Modular Cloning Suite for Engineering Cyanobacteria Based on the Plant MoClo Syntax. *Plant Physiol.*, 180(1), 39-55. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01401>
- Vinella, D., Brochier-Armanet, C., Loiseau, L., Talla, E., & Barras, F. (2009). Iron-Sulfur (Fe/S) Protein Biogenesis : Phylogenomic and Genetic Studies of A-Type Carriers. *PLoS Genet*, 5(5), e1000497. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000497>
- Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., & Marillonnet, S. (2011). A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. *PLoS ONE*, 6(2), e16765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>
- Werner, R., & Mergenhagen, D. (1998). Mating Type Determination of *Chlamydomonas reinhardtii* by PCR. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 16(4), 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.-D., & Zhang, L. (2021). The DnaJ proteins DJA6 and DJA5 are essential for chloroplast iron-sulfur cluster biogenesis. *EMBO J.*, 40(13), e106742. <https://doi.org/10.15252/embj.2020106742>
- Zhang, M.-P., Wang, M., & Wang, C. (2021). Nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* : A review. *Biochimie*, 181, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.11.016>
- Zhu, Z., Cao, H., Li, X., Rong, J., Cao, X., & Tian, J. (2021). A Carbon Fixation Enhanced *Chlamydomonas reinhardtii* Strain for Achieving the Double-Win Between Growth and Biofuel Production Under Non-stressed Conditions. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.603513>

## 8. Annexes

ggctctcAATGCAAGCCTCCATGATGAAACTCGGGTGGCGACTCCAGATTACTTAGGAAACGTTTCCGGTGATTGGACGTCGCTAAACTGCCTTCTGTCCTGTTGTAAGGCTGTGTACCTGGCGGCTGACTG  
 AATCTACGTTGGCGAGGCTGGCGTGCAGCGCAGCGGGTGCCTGGCGGCGTGGCGCGCACCTTCGCGCGCAGCCAGCCCTCCGGGGCCGCTGCGGCTGCGGCTGCTCGCGGCGT  
 GGCTGCGTGGGTGTCGGGGCTGCCCGCGGACCGCGGCGCCCGCCCGCGGCGGAGCCGCGGAGGAGCGCACGTTGGTACAGGTGAGCGCACAGCCCGCTGCTGAGCGCACAGCCCGGTCCGGAGCGTGG  
 CTGGCGTCCCTGAGCGCTGAGGTGAGGGCTGGTGTGTGTACAAAGGCTGAGTACGGGGGGGAGGACACAGTGGCGTGCTCGCTAGGCGCTGTGCTGCGTACGAGATCCCTTTGAAACAGCAATGAGTTCTGGAC  
 CAGTCAAAGGGCCCGTAAGCTAGGACACTGAGCCCTCCGCCCACTAGCCCTCCGCCGACCGCGCCCTGCCCCTGCGCTGCGCTTCCGCAACAAGCCCTCCTCCTCCTCGAGCAGCCGCAACAGCCACCGCACT  
 CACCCCTGCCCAACCCCTCCTCCTCCCAACCCATCCCTCCTCCTCCCTCCTCACCCTATCCAAACCCCTCCCAACCCCTCCCAACCCCTCCCAACCCCTCCCAACCCCTCCCAACCCCTCCCAACCCCTCCCAACCCCT  
 CGCCACCGCCGCGCGCGCGCACGCGGAGGAGGAGGTGCTGGCCAGCTGCGCAACGTATCGACCCGACTTTGGGAGGACATTGTGGCGTGGCGGCTTCATCAAG  
 GACCTGGCGGTGGATGAGGCGGCGGCGCGGCTGCGCCTTACGCTGGAGCTCACCACGCGCCCTGCCCCGTCAGGAGATGTTCCAGCGCCAGAGCACCGAGTTCGTCA  
 AGTGTGTGTGTGGGGGGGGGGGGGCTGGGTGGGCTGGGGTGGGGTTAACTCTGAACCCATCCATAAGGAAACAGTGTGCTGGGGGGGGGGGGTGTGGCAITCCCAACAAGGAAGAGACAGAGGGGGTGGT  
 GTGGGGAGCAGCACACGGGGCGGTGCACTGTGTGGGTGTGCGGTAGGGAGGAGGGCTGCTGCCCTGCCGCTGCTGTGTGGGGCGTGTCTGCCCTCCGCACTCCCGTCCAATGTGAAGACCGCCCGCC  
 GCCCGCCCGCCCGCTTCTATCCCCACACTGAGGACCCCCGTTCTACCCCCCTCCCGAGGCTCTGCCCTGGGTGGCGGACTGGCGATCAAATGACCAGCCAGCCCGCAAGCC  
 GCTGCTGCCGAGTCAAGGCGCCCGGAGGACTGGCCAAGGTGGGGTTTACGGGGCTGGGGCGTGAGGAAGGGGGCTGGGGGGGGGGCACGGCACGGCACGGCGGCGCACGGCACGGCACGGC  
 ACGGGGTGAGGGGGGCTGTCTGTAACAGACGAAACACAGCAACCGACTGTCCGCACAGCACCGCCCAATTACACGCCCAACCCGTGACACACACACATACACACAAAGCACGCAACACACACA



