

Mémoire

Auteur : Schutz, Lindsey

Promoteur(s) : Cardol, Pierre

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/2268.2/21012>

Avertissement à l'attention des usagers :

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

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

UNIVERSITÉ DE LIÈGE

FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

**Caractérisation des mutants knock-out de la
protéine CP29 du photosystème II et des
enzymes DVR et CAO impliquées dans la voie
de biosynthèse de la chlorophylle chez
*Euglena gracilis***

Présenté par : Lindsey Schutz
Année académique : 2023-2024



Mémoire de master 2 réalisé sous la direction de Pierre Cardol
En vue de l'obtention du titre de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire,
à finalité approfondie

Membre du jury :
Stéphanie Gérin
Marc Hanikenne
Anthony Fratamico



REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux personnes suivantes pour leur aide dans la réalisation de ce mémoire :

Un grand merci à mon promoteur, Pierre Cardol, pour le temps précieux qu'il a consacré à ce mémoire. Sa disponibilité, son engagement, ses relectures minutieuses et ses conseils éclairés ont été d'une aide précieuse pour affiner mon apprentissage. Son soutien et sa bonne humeur m'ont permis de mener à bien ce travail.

Merci à Hadrien Forêt pour m'avoir accueilli avec bienveillance au sein du laboratoire et, surtout, pour m'avoir inclus dans son projet de thèse. J'ai pu participer activement à des expériences enrichissantes, apprenant de précieuses pratiques, notamment pour la réalisation des gels natifs. Son soutien, sa patience ont été d'une grande aide tout au long de ce parcours.

Je remercie également Alain Gervasi pour ses nombreux conseils avisés et pour m'avoir transmis son savoir concernant le fonctionnement des machines du laboratoire, ainsi que pour son aide dans l'apprentissage de Python.

Merci à Florent Dubois et Romain Herman, mes collègues de mémoire, pour leur bonne humeur communicative et leur soutien constant. Leur présence a rendu ce parcours plus agréable et motivant. Un merci particulier à Céline, mon amie depuis le début du master.

Enfin je remercie ma famille et mes amis pour leurs encouragements constant et leur confiance en moi tout au long de mon parcours scolaire.

TABLE DES ABRÉVIATIONS

C1	: Monomère ou dimère incomplet du centre réactionnel
C2	: Dimère du centre réactionnel
Chl a	: Chlorophylle a
Chl b	: Chlorophylle b
DCMU	: 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée
DVchl a	: Divinyl chlorophylle a
DVR	: Divinyl protochlorophyllide réductase
Fm	: Fluorescence maximale
Fv	: Fluorescence variable
hrCN-PAGE	: Gel de polyacrylamide native claire à haute résolution
HPLC	: Chromatographie liquide haute performance (High Performance Liquid Chromatography)
LHC	: Complexes de capture de la lumière (Light Harvesting Complexes)
LHCE	: Complexe de capture de lumière chez <i>Euglena gracilis</i>
LHCII	: Complexe de capture de lumière du photosystème II
MS	: Spectrométrie de masse
Mvchl a	: Monovinyl chlorophylle a
NPQ	: Quenching non photochimique (Non-Photochemical Quenching)
PSI	: Photosystème I
PSII	: Photosystème II
rETR	: Taux de transport d'électrons relatif
RT	: Température ambiante (Room Temperature)
SC-PSI	: Supercomplexe du photosystème I
SC-PSII	: Supercomplexe du photosystème II

RÉSUMÉ

Ce mémoire a été réalisé sous la supervision de Pierre Cardol au Laboratoire de Génétique et Physiologie des Microalgues à l'Université de Liège. L'objectif principal de cette étude était d'élucider les rôles de la chlorophylle b et de la protéine CP29 dans l'organisation, la structure et la fonction de l'appareil photosynthétique de l'eucaryote photosynthétique *Euglena gracilis*. Nous avons caractérisé des souches mutantes knock-out (KO) générées par CRISPR-Cas9, déficientes pour la protéine d'antenne CP29 du photosystème II, ainsi que pour les enzymes chlorophyllide a oxygénase (CAO) et divinyl réductase (DVR), qui jouent un rôle clé dans la voie de biosynthèse de la chlorophylle. Pour ce faire, une série d'expériences a été réalisée, incluant des tests de croissance de mutants sous diverses conditions lumineuses, afin d'évaluer spécifiquement leur tolérance à ces variations. Les résultats ont révélé que les mutants CP29 KO n'ont montré aucun défaut de croissance significatif, tandis que les mutants CAO KO et DVR KO ont été sévèrement affectés sous des conditions de lumière intense ($475 \mu\text{mol}_{\text{photon}}\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). L'analyse de la composition des pigments par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a confirmé l'inactivité des enzymes ciblées, entraînant une réduction marquée de la chlorophylle b et une diminution de la néoxanthine dans les souches CAO KO et DVR KO, ainsi que la présence exclusive de la divinyle chlorophylle a dans la souche DVR KO. De plus, l'analyse par spectrométrie de masse a confirmé l'absence de la protéine CP29 dans les mutants CP29 KO.

Une analyse biochimique supplémentaire, utilisant l'électrophorèse sur gel natif à haute résolution (hrCN-PAGE), a révélé des différences structurelles substantielles dans les photosystèmes des mutants. Dans les trois types de mutants, les bandes correspondant aux supercomplexes du PSII (SC-PSII) étaient absentes, et dans les mutants CAO KO et DVR KO, une perte spécifique des trimères LHCII₃ a été observée. Ces altérations structurelles ont été corroborées par des analyses spectroscopiques in vivo, incluant la fluorescence à température ambiante et à 77K. De plus, les mutants CAO KO et DVR KO ont montré une diminution de l'efficacité des mécanismes de photoprotection (qT), tandis qu'une réduction du taux de transport d'électrons relatif (rETR) a été observée exclusivement chez les mutants DVR KO.

Dans l'ensemble, cette étude apporte des informations cruciales sur le rôle de la chlorophylle b et de la protéine CP29 dans l'intégrité structurelle et fonctionnelle de l'appareil photosynthétique d'*Euglena gracilis*, soulignant l'impact de ces composants sur l'efficacité de la collecte de lumière et la photoprotection.

This dissertation was conducted under the supervision of Pierre Cardol at the Laboratory of Genetics and Physiology of Microalgae at the University of Liège. The primary objective of this study was to elucidate the roles of chlorophyll b and the CP29 protein in the organization, structure, and function of the photosynthetic apparatus of the photosynthetic eukaryote *Euglena gracilis*. We characterized CRISPR-Cas9 knock-out (KO) mutant strains deficient for the antenna protein CP29 of photosystem II, as well as the enzymes chlorophyllide a oxygenase (CAO) and divinyl reductase (DVR), which are key players in the chlorophyll biosynthesis pathway. To achieve this, a series of experiments were carried out, including growth tests under varying light conditions to assess the mutants' tolerance to light intensity. The results revealed that the CP29 KO mutants exhibited no significant growth defects, whereas the CAO KO and DVR KO mutants were severely affected under very high light conditions ($475 \mu\text{mol}_{\text{photon}}\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Pigment composition analysis via high-performance liquid chromatography (HPLC) confirmed the inactivity of the targeted enzymes, leading to a marked reduction in chlorophyll b and a decrease in neoxanthin in both CAO KO and DVR KO strains, and the exclusive presence of divinyl chlorophyll a in the DVR KO strain. Additionally, mass spectrometry analysis confirmed the absence of the CP29 protein in the CP29 KO mutants.

Further biochemical investigation, using high-resolution native gel electrophoresis (hrCN-PAGE), revealed substantial structural differences in the photosystems of the mutants. In all three mutant types, the bands corresponding to the PSII supercomplexes (SC-PSII) were missing, and in the CAO KO and DVR KO mutants, a specific loss of LHCII trimers was observed. These structural alterations were corroborated by in vivo spectroscopic analyses, including fluorescence at room temperature and 77K. Moreover, the CAO KO and DVR KO mutants exhibited a decline in the efficiency of photoprotection mechanisms (qT), while a reduction in relative electron transport rate (rETR) was observed exclusively in the DVR KO mutants.

Overall, this study provides critical insights into the role of chlorophyll b and CP29 in the structural and functional integrity of the photosynthetic apparatus in *Euglena gracilis*, highlighting the impacts of these components on light-harvesting efficiency and photoprotection.

TABLE DES MATIÈRES

1	INTRODUCTION À LA PROBLÉMATIQUE GÉNÉRALE	8
2	RELEVÉ DE LA LITTÉRATURE	8
2.1	DIVERSITÉ ET ÉVOLUTION DE LA PHOTOSYNTÈSE CHEZ LES EUCARYOTES.....	8
2.1.1	<i>La photosynthèse</i>	8
2.1.2	<i>Origine évolutive</i>	9
2.1.3	<i>Organisme étudié : Euglena gracilis</i>	10
3	LES CHLOROPHYLLES	12
3.1	TRANSFERT D'ÉNERGIE.....	12
3.2	STRUCTURE DES CHLOROPHYLLES.....	13
3.3	VOIE DE BIOSYNTÈSE DE LA CHLOROPHYLLE A ET B.....	14
3.3.1	<i>Du précurseur à la chlorophylle a</i>	14
3.3.2	<i>La conversion de la chlorophylle a en chlorophylle b</i>	15
4	LES PHOTOSYSTÈMES:	16
4.1	FONCTION ET STRUCTURE DU PHOTOSYSTÈME II (PSII).....	16
4.2	FONCTION ET STRUCTURE PHOTOSYSTÈME I (PSI).....	17
4.3	LES COMPLEXES D'ANTENNES PÉRIPHÉRIQUES (LHCs) ET SA PARTICULARITÉ CHEZ <i>E. GRACILIS</i>	17
4.4	STRUCTURE ET INTERACTION DES LHCs DANS LE PHOTOSYSTÈME I ET II.....	19
4.4.1	<i>Supercomplexe du PSII</i>	19
4.4.2	<i>Supercomplexe PSI</i>	19
5	LA PHOTOPROTECTION	21
6	MATÉRIELS ET MÉTHODES:	23
6.1	SOUCHES ET CONDITIONS DE CROISSANCE.....	23
6.2	MESURE DE CROISSANCE.....	23
6.3	MESURE DE MOTILITÉ.....	24
6.4	CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (HPLC).....	24
6.5	ISOLEMENT DES COMPLEXES MEMBRANAIRES, ÉLECTROPHORÈSE SUR HRCN-PAGE.....	25
6.5.1	<i>Isolement des complexes membranaires</i>	25
6.5.2	<i>Electrophorèse sur hrCN-PAGE</i>	25
6.5.3	<i>Dosage protéique (méthode Bradford)</i>	25
6.6	ANALYSES BIOPHYSIQUES.....	26
6.6.1	<i>Absorbance et fluorescence (RT et 77K)</i>	26
6.6.2	<i>Tailles des antennes du PSII et rETR</i>	26

6.6.3	Mesure de la NPQ.....	26
6.7	SPECTROMÉTRIE DE MASSE (LC-IMS-QTOF-MS).....	27
7	RÉSULTATS	29
7.1	COMPOSITION PIGMENTAIRE DES TROIS SOUCHES.....	29
7.2	INFLUENCE DES MUTATIONS CP29, CAO, ET DVR SUR LA CROISSANCE ET LA MOTILITÉ	30
7.3	ANALYSE ET COMPOSITION PROTÉIQUE DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHÉTIQUE CHEZ LES MUTANTS.....	32
7.4	IMPACT DES MUTATIONS SUR LES PROPRIÉTÉS BIOPHYSIQUES CHEZ LES DIFFÉRENTES SOUCHES.....	37
8	DISCUSSION.....	42
8.1	LA PERTE DE CP29 DÉSTABILISE LE SUPERCOMPLEXE PSII IN VITRO MAIS PAS IN VIVO CHEZ <i>EUGLENA GRACILIS</i>	42
8.2	LES MUTANTS CAO KO ET DVR KO DÉPOURVUS DE LHCl ₃ MONTRENT UNE SENSIBILITÉ ACCRUE À FORTE LUMIÈRE	43
9	ANNEXES	46
9.1	FIGURE A : SPECTRE D'ÉLUTION DES PIGMENTS D' <i>EUGLENA GRACILIS</i> (HPLC)	46
9.2	FIGURE B : ANALYSE SPECTROSCOPIQUE DES BANDES B1' ET B7' CHEZ LE CTRL.....	46
9.3	FIGURE C : COMPARAISON DES SPECTRES DE FLUORESCENCE À 77K CHEZ <i>E. GRACILIS</i> ET <i>C. REINHARDTII</i>	47
10	BIBLIOGRAPHIE	48

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : EVOLUTION DES DIFFÉRENTES LIGNÉES.....	9
FIGURE 2 : IMAGE DE MICROSCOPIE OPTIQUE DE E. GRACILIS.....	11
FIGURE 3 : STRUCTURE DE LA CHLOROPHYLLE A ET B ET SPECTRES D'ABSORPTION DES DIFFÉRENTS PIGMENTS CHEZ EUGLENA GRACILIS.	13
FIGURE 4 : VOIE DE BIOSYNTHÈSE DE LA PROTOPORPHYRIN IX (PROTO IX) À LA CHLOROPHYLLE A.	14
FIGURE 5 : VOIE DE BIOSYNTHÈSE DE LA MONOVINYL CHLOROPHYLLIDE A VERS LA CHLOROPHYLLE B	15
FIGURE 6 : COMPARAISON SCHÉMATIQUE DES SUPERCOMPLEXES C2S2M2N2 ET PS-8LHC ENTRE E.GRACILIS ET C.REINHARDTII	20
FIGURE 7 : COMPARAISON DES COMPOSANTES NPQ CHEZ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII ET EUGLENA GRACILIS.....	22
FIGURE 8 : PROFIL PIGMENTAIRE DES DIFFÉRENTES SOUCHES PAR HPLC.....	29
FIGURE 9 : CROISSANCE DES SOUCHES CTRL, CP29 KO, CAO KO ET DVR KO SUR GÉLOSE (TAP OU TMP) SOUS DIFFÉRENTES INTENSITÉS LUMINEUSES	30
FIGURE 10 : CROISSANCE DES SOUCHES CTRL, CP29 KO, CAO KO ET DVR KO EN MILIEU LIQUIDE TMP, SOUS UNE INTENSITÉ LUMINEUSE DE $50 \text{ UMOL}_{\text{PHOTON}}\text{M}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$	31
FIGURE 11 : VITESSE DE NAGE DES SOUCHES CTRL, CP29 KO, CAO KO ET DVR KO EN OBSCURITÉ ET SOUS LUMIÈRE, EN FONCTION DU TEMPS	32
FIGURE 12 : SÉPARATION DES COMPLEXES PIGMENT-PROTÉINES MEMBRANAIRES CHEZ E. GRACILIS	33
FIGURE 13: ANALYSE SPECTROSCOPIQUE DES BANDES (B1, B2 ET B3) DU HRCN-PAGE CHEZ LE CTRL ET LES MUTANTS	34
FIGURE 14 : ANALYSE SPECTROSCOPIQUE DES BANDES (B4 ET B5) DU HRCN-PAGE CHEZ LE CTRL ET LES MUTANTS.....	35
FIGURE 15 : ANALYSE SPECTROSCOPIQUE DES BANDES (B6 ET B7) DU HRCN-PAGE CHEZ LE CTRL ET LES MUTANTS.....	36
FIGURE 16 : ANALYSE DE SPECTROMÉTRIE DE MASSE DU MUTANT CP29.....	37
FIGURE 17 : ANALYSE SPECTROSCOPIQUE IN VIVO EN TAP ET TMP CHEZ LE CTRL ET LES MUTANTS	38
FIGURE 18 : PARAMÈTRES BIOPHYSIQUES CHEZ LE CTRL ET LES MUTANTS EN MILIEU TAP ET TMP.....	39
FIGURE 19 : QUANTIFICATION DE LA TRANSITION D'ÉTAT CHEZ LE CTRL ET LES MUTANTS SOUS CONDITIONS TAP (ROSE) ET TMP (BLEU).	40

1 Introduction à la problématique générale

Ce mémoire porte sur la caractérisation de souches mutantes knock-out CRISPR-Cas9 déficientes pour la protéine antennaire CP29 du photosystème II, et des enzymes CAO et DVR impliquées dans la voie de biosynthèse des chlorophylles. Ces mutants ont été isolés par l'équipe du Dr Masami Nakazaka (Osaka). L'objectif principal est de comprendre le rôle spécifique de la chlorophylle b et de la protéine CP29 dans l'organisation, la structure et le fonctionnement de l'appareil photosynthétique.

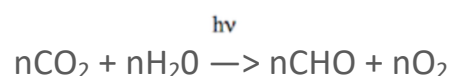
Pour évaluer l'impact des mutations sur la tolérance à la lumière, des analyses de la croissance des différentes souches ont été menées sous différentes intensités lumineuses. Des techniques biophysiques, telle que la fluorescence résolue dans le temps, ont été employées pour caractériser les activités des photosystèmes des souches mutantes *in vivo* (tailles d'antennes, rETR). Ensuite, des techniques biochimiques, notamment la préparation de membranes et l'électrophorèse de protéines en conditions natives, ont été appliquées pour séparer les photosystèmes I et II, ainsi que les complexes d'antennes collectrices de lumière (LHCs). Les propriétés spectrales de chaque complexe protéique ont ensuite été analysées par des méthodes spectrofluorométriques. Enfin, une étude des capacités de photoprotection des souches mutantes a été réalisée.

2 Relevé de la littérature

2.1 DIVERSITÉ ET ÉVOLUTION DE LA PHOTOSYNTHÈSE CHEZ LES EUCARYOTES

2.1.1 LA PHOTOSYNTHÈSE

La photosynthèse constitue un mécanisme biologique essentiel qui a façonné l'écosystème terrestre en permettant aux organismes phototrophes, tels que les plantes, les algues, et certaines bactéries, de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique. Ce processus bioénergétique transforme le dioxyde de carbone (CO₂) et l'eau (H₂O) en glucides (C₆H₁₂O₆), tout en libérant de l'oxygène (O₂) comme sous-produit indispensable à la vie aérobie. L'équation chimique générale de la photosynthèse s'écrit comme étant ¹:



2.1.2 ORIGINE ÉVOLUTIVE

L'acquisition de la photosynthèse chez les eucaryotes résulte d'un événement d'endosymbiose. Selon la théorie proposée initialement par Konstantin Mereschkowsky au début du XXe siècle, un premier événement d'endosymbiose (dit « primaire ») s'est produit il y a environ 1,5 milliard d'années lorsque un ancêtre eucaryote non photosynthétique a englobé une cyanobactérie². Cette intégration a donné naissance aux chloroplastes, organelles dédiées à la photosynthèse dans les cellules modernes des eucaryotes. Les premiers chloroplastes issus de cet événement d'endosymbiose primaire ont mené à l'émergence des lignées majeures telles que les Rhodophytes (algues rouges), les Glaucophytes (algues bleu-vert) et les Chloroplastida (qui incluent les plantes vertes).

Les innovations évolutives ne se sont pas arrêtées à l'endosymbiose primaire. L'endosymbiose secondaire a engendré deux lignées majeures grâce à l'assimilation d'algues vertes et rouges. L'intégration d'algues vertes avec un ancêtre eucaryote a créé les Chlorarachniophytes ainsi que les Euglenophytes. Parallèlement, les algues secondaires rouges telles que les cryptophytes, résultant potentiellement d'un événement unique d'endosymbiose secondaire, ont engendré des lignées complexes impliquées dans des endosymbioses tertiaires et quaternaires avec divers hôtes comme les haptophytes ou les dinoflagellates³ (Figure 1).

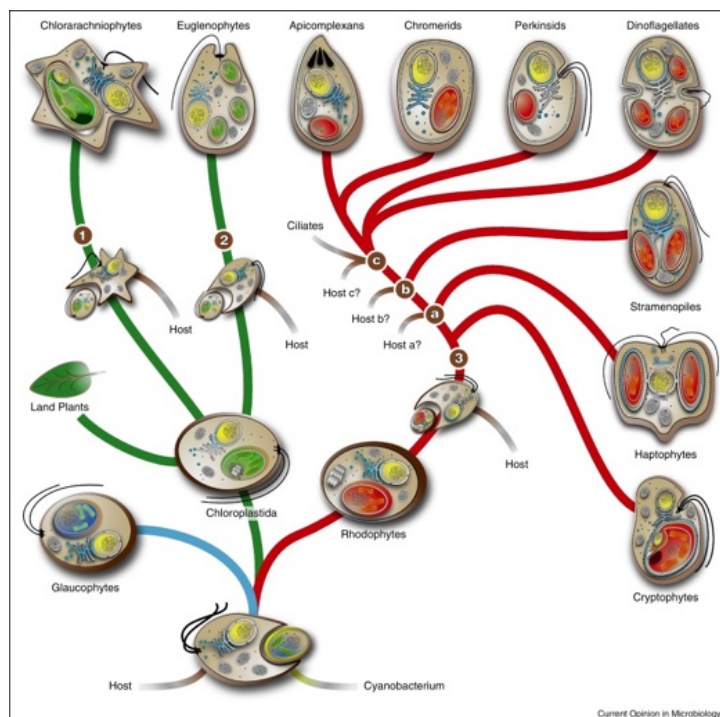


Figure 1 : Evolution des différentes lignées. 1) Une endosymbiose secondaire qui a donné naissance aux Chlorarachniophytes ; 2) Une endosymbiose secondaire qui a donné naissance aux Euglenophytes ; 3) Une endosymbiose secondaire qui a donné naissance aux lignées rouges, avec des événements supplémentaires d'endosymbiose (a, b et c)³.

2.1.3 ORGANISME ÉTUDIÉ : *EUGLENA GRACILIS*

Euglena gracilis représente un cas d'endosymbiose secondaire. Cet organisme provient d'une symbiose entre un ancêtre phagotrophe des Euglenozoa et une algue verte unicellulaire de type prasinophyte. Elle est classifiée dans le groupe des Euglenozoa, qui se situe dans le super-groupe des Excavata (classe des Euglenophyceae, ordre des Euglenales, famille des Euglenaceae). Contrairement aux organismes issus d'une endosymbiose primaire, dont les chloroplastes sont entourés de deux membranes, ceux d'*Euglena gracilis* sont caractérisés par trois membranes, illustrant ainsi la complexité de son évolution symbiotique.

Euglena gracilis se rencontre principalement en eaux douces et démontre une adaptabilité remarquable à divers milieux où la température et le pH varient considérablement⁴. Elle adopte une nutrition mixotrophe, combinant photosynthèse et absorption de composés organiques tels que l'acétate, le lactate ou encore le glucose. Par ailleurs, l'osmotrophie lui permet d'assimiler des vitamines B12 et B1, indispensables à sa croissance⁵. Toutefois, une concentration excessive en carbone organique peut réduire ou même supprimer temporairement la synthèse des chlorophylles, entraînant ainsi une baisse de la photosynthèse⁶. Son mode de reproduction est de type asexué.

Cette micro-algue présente des formes variables selon la luminosité : elle est majoritairement sphérique (20 µm de diamètre) en période d'obscurité, et principalement fusiforme (100 µm de longueur sur 20 µm de largeur) pendant les phases de croissance sous forte lumière⁷. Elle possède une pellicule fine de 240 nm qui lui confère des propriétés de déformations contrôlées, adaptatives à son environnement. Elle se déplace par un mouvement caractéristique, « euglénoïde », suivant une trajectoire hélicoïdale. Cette locomotion est rendue possible par la présence d'un long flagelle dorsal moteur. Un second flagelle, plus court et ventral, reste confiné dans la poche flagellaire (Figure 2)⁵.

Au niveau de cette poche, se trouve un stigmat riche en caroténoïdes, qui module l'excitation de l'appareil paraflagellaire (PFB) composé de flavoprotéines. Cet appareil présente une activité adényl-cyclase sensible à la lumière bleue, permettant à *Euglena* de contrôler la phototaxie positive ou négative en fonction de différentes intensités lumineuses⁹. En général, elle se déplace avec un battement d'une fréquence de 40 Hz et à une vitesse variant entre 50 et 100 µm/s^{10,11}.

Dans les cellules d'*Euglena gracilis*, les seuls types de chlorophylle présents sont les chlorophylles a et b, avec une quantité de chlorophylle b inférieure à celle de la chlorophylle a. Les caroténoïdes principaux identifiés incluent la diadinoxanthine, la diatoxanthine, le β-carotène et la néoxanthine¹². Les pigments diadinoxanthine et diatoxanthine appartiennent au cycle des xanthophylles. Par ailleurs, cette algue ne contient pas de lutéine, de fucoxanthine, ni de pigments associés au cycle de la violaxanthine^{13,14}.

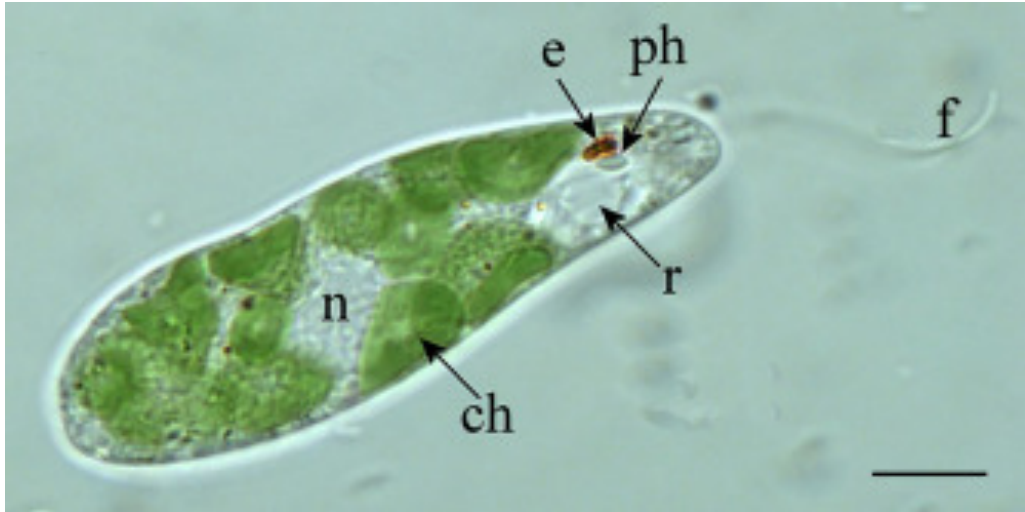


Figure 2 : Image de microscopie optique d'*E. gracilis*⁵. ch, chloroplaste; e, stigma; f, flagelle; n, noyau; ph, photorécepteur; r, réservoir. Échelle : 10 μ m.

3 Les chlorophylles

3.1 TRANSFERT D'ÉNERGIE

Les chlorophylles captent la lumière, surtout dans le bleu et le rouge. La faible absorption dans le vert donne aux organismes photosynthétiques leur couleur verte distinctive. Cette absorption initie la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique, stockée sous forme de NADPH et ATP ¹⁵. La majorité des chlorophylles sont intégrées au sein de complexes de collecte de lumière (LHC, Light-harvesting complexes). Ces complexes optimisent le transfert d'énergie lumineuse entre chlorophylles adjacentes, permettant ainsi une transmission efficace de l'énergie solaire capturée. Lorsqu'un photon dont l'énergie correspond aux différences d'énergie entre les orbitales π et π^* frappe la chlorophylle, son énergie est absorbée, amenant ainsi son électron à un niveau d'énergie supérieur correspondant à l'orbitale π^* (état singulet excité). Ce pigment transfère son énergie au pigment adjacent et permet au pigment excité de revenir à son état fondamental non excité. Ce mécanisme transfère l'énergie séquentiellement de molécule à molécule jusqu'au centre réactionnel ¹⁵. À ce stade, l'excitation est captée par une paire spécifique de chlorophylles a redox-actives permettant la séparation de charge (chlorophylle a P680 pour le PSII et chlorophylle a P700 pour le PSI) ^{16,17}. Bien que chimiquement similaire à la chlorophylle a trouvée dans les antennes collectrices, ces paires spécifiques présentent des propriétés uniques en raison de leur environnement protéique spécifique. Selon le modèle de l'entonnoir, ces deux chromophores présentent des niveaux d'énergie excités légèrement inférieurs, en raison de pertes minimales d'énergie sous forme de chaleur à chaque transition, rendant également ce processus irréversible. Le transfert d'énergie entre ces molécules proches se fait sans émission de lumière, grâce au principe de la résonance de Förster (FRET), qui permet une efficacité quantique supérieure à 90%. Ce mécanisme de transfert d'énergie repose sur des interactions coulombiennes dipôle-dipôle, influencées par l'orientation relative des molécules et le chevauchement de leurs spectres d'émission et d'absorption, efficaces sur de courtes distances ¹⁸.

Il est essentiel de souligner que les complexes photosynthétiques incluent aussi une variété de pigments accessoires structurés en réseaux. Ces pigments captent des longueurs d'onde que la chlorophylle ne peut pas absorber, augmentant ainsi le spectre d'absorption du complexe. L'énergie excédentaire qui n'est pas directement utilisée est généralement dissipée par transfert vers les pigments associés, comme les caroténoïdes. Ces derniers neutralisent les états triplet de la chlorophylle par quenching et dissipe cette énergie sous forme de chaleur, ce qui empêche la formation d'oxygène singulet ¹⁹.

3.2 STRUCTURE DES CHLOROPHYLLES

Les chlorophylles partagent une structure de base commune, composée de quatre anneaux pyrrole (A à D) formant un macrocycle tétrapyrrolique. Pour faciliter la compréhension le système de numérotation de 1 à 24 établi par IUPAC-IUB est utilisé ²⁰.

Ce dernier subit la réduction d'une des liaisons doubles des anneaux pyrrole, formant la chlorine. Un cinquième anneau pyrrole (E) vient également s'attacher au niveau de l'anneau (C). Au centre du macrocycle, un atome de magnésium (Mg^{2+}) est présent. Les différents types de chlorophylles (a, b, c1, c2, c3, d, et f) se différencient par leurs groupes fonctionnels spécifiques (méthyle, éthyle, vinyle, formyle, etc). Elles possèdent également une longue queue phytol estérifiée à l'anneau D via un groupe carboxyle. Cette chaîne est hydrophobe et aide à ancrer la molécule de chlorophylle dans les membranes thylakoïdiennes facilitant ainsi l'assemblage des complexes photosynthétiques²¹ (Figure 3).

La chlorophylle a est la plus abondante chez les organismes photosynthétiques. Elle se différencie de la chlorophylle b par la présence d'un groupement méthyle au niveau du carbone C(7) au lieu d'un groupement formyle (Figure 3). Cette différence structurale mineure entraîne une légère variation dans les longueurs d'onde absorbées. La chlorophylle b se retrouve exclusivement dans les complexes d'antennes, contrairement à la chlorophylle a, présente également dans les centres réactionnels ²².

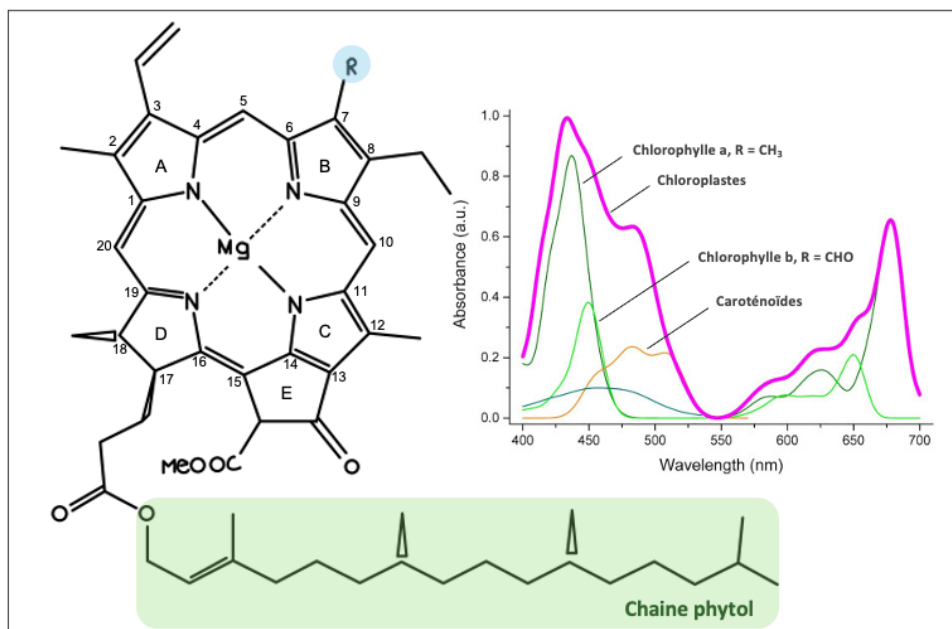


Figure 3 : Structure de la chlorophylle a et b et spectres d'absorption des différents pigments chez *Euglena gracilis*. Structure de la Chl a ($R = CH_3$) et Chl b ($R = CHO$) basée sur la nomenclature IUPAC-IUB²⁰ (Moss 1988) et spectre d'absorption d'un chloroplaste d'*Euglena gracilis* (rose) ; chlorophylle a (vert foncé) ; chlorophylle b (vert clair) et caroténoïdes (orange) d'après Barsanti et Gualtieri (2020) ⁵.

3.3 VOIE DE BIOSYNTÈSE DE LA CHLOROPHYLLE A ET B

3.3.1 DU PRÉCURSEUR À LA CHLOROPHYLLE A

Le précurseur de tous les tétrapyrroles est l'ALA (Acide 5-Aminolévulinique) qui pour la chlorophylle sera converti en porphobilinogène par l'enzyme ALA déshydratase. L'uroporphyrinogène III est le résultat de la cyclisation de quatre molécules de porphobilinogène qui par la suite sera transformé en protoporphyrinogène IX. Par une oxydation de ce dernier, il y a formation de premier précurseur direct de la chlorophylle, la protoporphyrine IX.

L'ajout de magnésium forme la magnésium-protoporphyrine IX. La magnésium-protoporphyrine IX [3,8-DV]-Mg-protoporphyrine IX ([3,8-DV]-Mg-Proto) subit plusieurs modifications du type oxydative pour former finalement le [3,8-divinyl]-protochlorophyllide a ([3,8-DV]-Pchlide a)²³.

La NADPH:Pchlde oxydoréductase (POR) réduit le cycle D pour former du [3,8-divinyl]-chlorophyllide a (DV Chlide a) à partir du [3,8-divinyl]-protochlorophyllide a (DV Pchlde a).

Ensuite, la divinyl protochlorophyllide réductase (DVR) dépendante du NADPH réduit la DV Chlide a en substituant le groupe 8-vinyle par un groupe éthyle pour former la [3-MV]-chlorophyllide a ([3-MV]-Chlide a)^{24,25}. Il est intéressant de noter que certains organismes ne possèdent pas le gène codant pour la DVR, ce qui entraîne l'accumulation de chlorophylles divnyliques a et b au lieu des pigments monovinyls²⁶ (Figure 4).

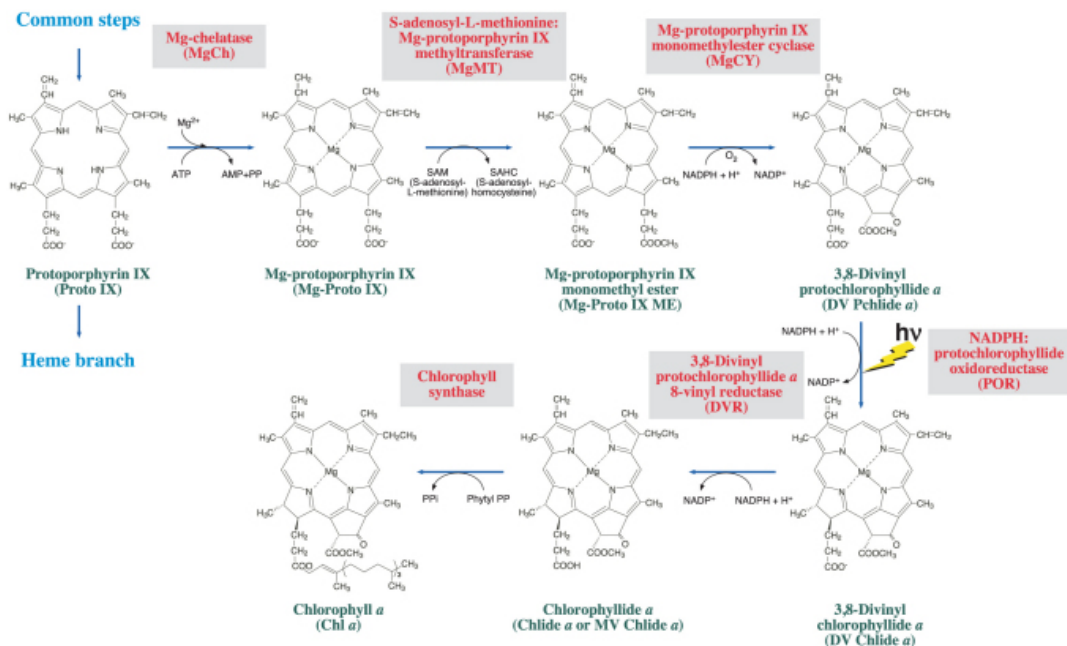


Figure 4: Voie de biosynthèse de la protoporphyrine IX (Proto IX) à la chlorophylle a²⁴.

3.3.2 LA CONVERSION DE LA CHLOROPHYLLE A EN CHLOROPHYLLE B

La chlorophylle b constitue entre 15 et 25 % de la chlorophylle totale dans les plantes et les algues vertes. Des mutants viables dans la voie de biosynthèse de la chlorophylle b montrent qu'elle n'est pas indispensable à la photosynthèse, mais qu'elle aide à stabiliser les complexes et à augmenter la gamme de longueurs d'ondes que les organismes peuvent utiliser (425 à 475 nm). Ce qui est particulièrement avantageux dans les habitats ombragés où la lumière est diffusée et moins intense.

On observe également que le rapport entre la chlorophylle a et b est plus élevé sous une forte luminosité, alors qu'il diminue sous une faible luminosité, ce qui entraîne des complexes d'antennes plus grands.

L'enzyme chlorophyllide a oxygénase (CAO) joue un rôle crucial dans cette adaptation en convertissant la chlorophyllide a en chlorophyllide b par transformation du groupe méthyle en un groupe formyle. Pour la formation de la chlorophylle b, c'est l'activité de la chlorophylle synthase (CHLG) qui catalyse l'estérification, permettant l'ajout de la chaîne phytol (mécanisme similaire pour la formation de la chlorophylle a à partir de la chlorophyllide a) (Figure 5)^{26 27}.

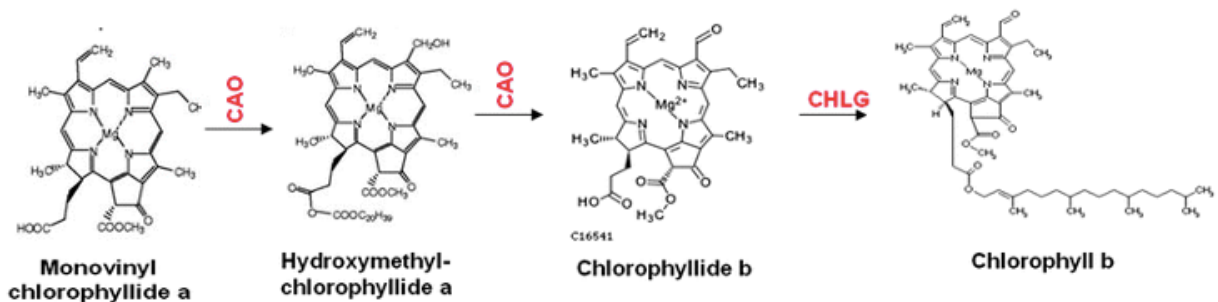


Figure 5 : Voie de biosynthèse de la monovinyl chlorophyllide a vers la chlorophylle b. Schéma adapté de Tripathy, BC, Pattanayak, GK (2012)²⁷.

4 Les photosystèmes:

Les photosystèmes sont des structures protéines-pigments fondamentales pour la photosynthèse. Ils s'intègrent directement dans les membranes des thylakoïdes des plantes vertes, des algues et des cyanobactéries. Ces complexes jouent un rôle essentiel dans la capture de l'énergie lumineuse et sa conversion en énergie chimique.

4.1 FONCTION ET STRUCTURE DU PHOTOSYSTÈME II (PSII)

Le photosystème II (PSII) assure principalement la réduction des plastoquinones et l'oxydation de l'eau. Ce complexe, composé de sous-unités protéiques et de divers pigments, se divise en trois parties : une partie centrale avec le centre réactionnel et les antennes internes, conservée structurellement et catalytiquement, et une partie périphérique, plus diversifiée entre les organismes photosynthétiques.

Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, le centre réactionnel du PSII est composé d'un hétérodimère D1/D2 (6 chlorophylles a et 2 phéophytines) (protéines d'environ 30 kDa, codées par les gènes chloroplastiques psbA et psbD) et du cytochrome b559 (sous-unités α et β , codées par psbE et psbF). Les antennes internes CP43 et CP47 (codées par psbB et psbC) entourent ce noyau et facilitent le transfert d'électrons vers la paire de chlorophylles a du centre réactionnel, avec un pic d'absorption maximale à 680 nm. Ces antennes sont composées de six hélices α transmembranaires, et lient uniquement des molécules de chlorophylle a, ainsi que des molécules de trans- β -carotène ²⁸.

Les protéines extrinsèques du PSII montrent une grande variabilité entre les organismes. Contrairement aux plantes vertes, les protéines codées par le génome nucléaire situées du côté luminal (PsbO, PsbP, PsbQ et PsbR) possèdent chacune leur propre site de liaison au PSII, stabilisant la structure de l'OEC ($\text{CaMn}_4\text{O}_5^+$), essentielle à la production d'oxygène ²⁹.

Les gènes chloroplastiques codant pour les protéines intrinsèques sont PsbH, PsbI, PsbJ, PsbK, PsbL, PsbM, PsbT, PsbZ et Psb30, tandis que ceux du génome nucléaire sont PsbW, PsbX et PsbY. Chez *E. gracilis*, on retrouve une majorité des gènes semblable à *C. reinhardtii* sauf les gènes psbX, psbY et ycf39, ce dernier étant un facteur d'assemblage (Figure 6) ^{30,31}.

4.2 FONCTION ET STRUCTURE PHOTOSYSTÈME I (PSI)

Avec un rendement quantique proche de 1, le photosystème I (PSI) est considéré comme le système photosynthétique le plus efficace. Sa fonction principale est de réduire la ferrédoxine (côté stromal). C'est un complexe généralement monomérique membranaire composé de deux unités fonctionnelles : un centre réactionnel et un complexe de collecte de lumière (LHCI) ³².

Le PSI de *C. reinhardtii* est constitué de plusieurs polypeptides, dont cinq sont codés par des gènes chloroplastiques : PsaA, PsaB, PsaC, PsaJ, Ycf3 et Ycf4. Le centre réactionnel est composé des protéines PsaA et PsaB, qui interagissent avec une paire spéciale de chlorophylles avec un pic d'absorption maximal à 700 nm. Il comprend également d'autres sous-unités protéiques telles que PsaD, PsaE, PsaF, PsaG, PsaI, PsaK, PsaL, PsaN, PsaO codées par le génome nucléaire.

Le super complexe du PSI d'*Euglena* présente une composition et une structure différente. *Euglena* manque de plusieurs petites sous-unités centrales telles que PsaI, PsaK et PsaL. De plus, le gène Ycf3, est codé par le génome nucléaire (Figure 6) ³⁰.

4.3 LES COMPLEXES D'ANTENNES PÉRIPHÉRIQUES (LHCs) ET SA PARTICULARITÉ CHEZ *E. GRACILIS*

Un système périphérique d'antennes protéiques/pigments, appelé LHC (Light Harvesting Complexes), améliore l'efficacité de la capture des électrons. Les LHCs, protéines transmembranaires, comprennent les LHCs du PSI (Lhca) et ceux du PSII (Lhcb) chez les plantes vertes et les algues, liant la chlorophylle a/b et les caroténoïdes.

Au niveau du PSII, on distingue deux types d'antennes : les antennes mineures, CP29 (Lhcb4), CP26 (Lhcb5) et CP24 (Lhcb6), présentes sous forme monomérique, et les antennes majeures, LHCII. Les LHCII sont constituées d'apoprotéines Lhcb1-3 chez les plantes vasculaires et LhcbM chez les algues et les plantes non vasculaires, qui s'organisent en homo- ou hétérotrimères ³³.

E. gracilis et *C. reinhardtii* ne possèdent pas les gènes codant pour CP24. De plus, le gène codant pour CP26 semble également manquer chez *Euglena* ³⁴. En revanche, la protéine CP29 est bien présente et joue vraisemblablement un rôle central en tant que canal énergétique et de site d'ancrage pour les trimères de LhcbM. La structure de CP29 est similaire à celle d'un monomère de LHCII, mais elle se distingue par la présence de 13 molécules de chlorophylle : huit Chl a, quatre Chl b, et un site de liaison mixte Chl a/b.

Elle contient également trois molécules de caroténoïdes. Le rapport Chl a/b y est plus élevé que dans LHCI, qui contient huit Chl a et six Chl b, et CP29 possède un caroténoïde en moins^{35,36}. Concernant les antennes majeures, *Euglena* présente huit groupes de LhcbM (LhcbM I à VIII) contrairement à *Chlamydomonas* qui en possède neuf (LhcbM1-M9).

Pour les antennes du PSI, *C. reinhardtii* possède neuf protéines Lhca différentes, allant de Lhca1 à Lhca9. Chez *E. gracilis*, des études phylogénomiques ont montré que les Lhcb sont apparentés aux LHCI des eucaryotes verts primaires, tandis que les Lhca canoniques sont absents. Cependant, les Lhca d'*E. gracilis* appartiennent à une nouvelle famille de protéines LHC désignée sous le nom de LHCE, liant uniquement de la chlorophylle a et de la diadinoxanthine^{34,37}.

Au cours d'études antérieures menées par le laboratoire de génétique et physiologie des micro-algues de Liège, les complexes photosynthétiques d'*Euglena* ont été séparés par électrophorèse sur gel natif, révélant un complexe de 250 kDa plus important sous faible intensité lumineuse. L'analyse par spectrométrie de masse a montré que le complexe est constitué exclusivement de monomères de LHCE, appartenant aux types E1, E2, E3, E4 et E12. Les spectres d'absorption (maximum à 690 nm), de fluorescence à température ambiante (maximum à 700 nm) et d'émission de fluorescence à 77K (maximum à 710 nm) des LHCEs sont décalés vers le rouge en comparaison avec ceux des trimères des LHCI₃.

Des mesures de fluorescence du PSII à température ambiante ont révélé que la différence entre les spectres de fluorescence des cellules d'*E. gracilis* en état II (où les complexes d'antennes sont préférentiellement attachés au PSI) et en état I (où les complexes d'antennes sont préférentiellement attachés au PSII) est très similaire à ceux du complexe d'antenne LHCE isolé (émission à 699 nm), suggérant que le complexe LHCE pourrait se lier au PSII.

Contrairement aux LHCs de la plupart des eucaryotes, les LHCs d'*Euglena* sont traduits à partir de grands ARNm nucléaires produisant des précurseurs de polyprotéines. Ces précurseurs sont dirigés vers les chloroplastes par des séquences N-terminales spécifiques, où ils sont clivés en unités individuelles. Seuls deux transcrits, Lhcb4 (CP29) et Lhca3 (LHCE12), ne sont pas codés en polyprotéines³⁷.

4.4 STRUCTURE ET INTERACTION DES LHCs DANS LE PHOTOSYSTÈME I ET II

4.4.1 SUPERCOMPLEXE DU PSII

Plusieurs études semblent montrer que les trimères de Lhcb se fixent au centre réactionnel via les protéines d'antenne monomériques Lhcb4 (CP29) et Lhcb5 (CP26)³⁸⁻⁴¹. Historiquement appelés trimères S, M et L en fonction de leur affinité pour le PSII, ils se lient respectivement de manière forte, modérée et faible. Les monomères de LHCII s'assemblent entre eux grâce à un motif amino-terminal conservé, ainsi qu'à des molécules lipidiques et pigmentaires interfaciales, incluant la chlorophylle a et la chlorophylle b.

Il a été rapporté que *Chlamydomonas* cultivée sous une faible intensité lumineuse présente des supercomplexes complets nommés C2S2M2N2, dans lesquels les trimères L sont remplacés par des trimères N (pour 'nu'), ainsi appelés car ils se fixent sur le PSII sans l'intermédiaire de l'antenne monomérique CP24. Cette caractéristique diffère de celle des plantes vertes, où la CP24 est indispensable pour la fixation des trimères au PSII. La protéine CP29 semble être essentielle à la fixation des trimères M-LHCII et L-LHCII. La région N-terminale de CP29 forme des liaisons hydrogène et des ponts salins à l'interface entre M-LHCII et L-LHCII, tandis que sa région C-terminale contribue à l'assemblage via la Chl b 605 du monomère 2 du L-LHCII (Figure 6)³⁹.

Lors d'une étude menée par le laboratoire d'accueil, les complexes protéiques d'*Euglena gracilis* ont été séparés par électrophorèse sur gel natif (hrCN-PAGE). Le plus grand supercomplexe du PSII (1,5 MDa) a été isolé et analysé par microscopie électronique à particule unique et spectrométrie de masse MS/MS. Bien que les protéines CP24 et CP26 soient absentes, ce supercomplexe peut lier trois trimères de LHC par centre réactionnel, formant ainsi un supercomplexe de type C2S2M2N2, similaire à celui identifié chez *C. reinhardtii* (Figure 6).

4.4.2 SUPERCOMPLEXE PSI

Concernant le PSI, *C. reinhardtii* possède neuf protéines Lhca (Lhca1 à Lhca9). Diverses études ont révélé une grande variabilité dans le nombre de complexes LHCI associés au PSI. La structure la plus récente d'un supercomplexe PSI-8LHC montre que les Lhca sont organisées en deux demi-anneaux du côté de PsaF et PsaJ. L'anneau interne comprend Lhca1, Lhca8, Lhca7, et Lhca3, tandis que l'anneau externe est constitué de Lhca1out, Lhca4, Lhca6 et Lhca5⁴². Il a également été démontré que deux autres antennes, Lhca2 et Lhca9, peuvent se fixer avec une affinité plus faible à proximité de PsaH/PsaL⁴³. De plus, il a été prouvé que PsaG et PsaK sont impliquées dans l'intégration efficace des LHCI au complexe central PSI⁴⁴. Les Lhca lient en moyenne 14 à 17 molécules de chlorophylle.

D'après des analyses cristallographiques réalisées par le laboratoire PhytoSYSTEMS de l'ULiège, la structure du complexe PSI-LHC d'*E.gracilis* diffère notablement de celle de *Chlamydomonas*, principalement en raison de l'absence de l'organisation typique en anneaux du côté de PsaF et PsaJ. Au lieu de cela, la majorité des LHCEs se localisent du côté de PsaM, où ils forment principalement des dimères (LHCE5/6, LHCE5/7) et un monomère (LHCE8). Du côté de PsaF et PsaJ, un seul dimère (LHCE10/11) est présent. Par ailleurs, les protéines PsaG, PsaH, PsaN et PsaO sont absentes. Les LhcbM se trouvent du côté de PsaF et PsaJ, avec LhcbM4 attaché à PsaB, tandis que LhcbM2 et LhcbM8 sont directement associés à psaF et psaJ (Figure 6).

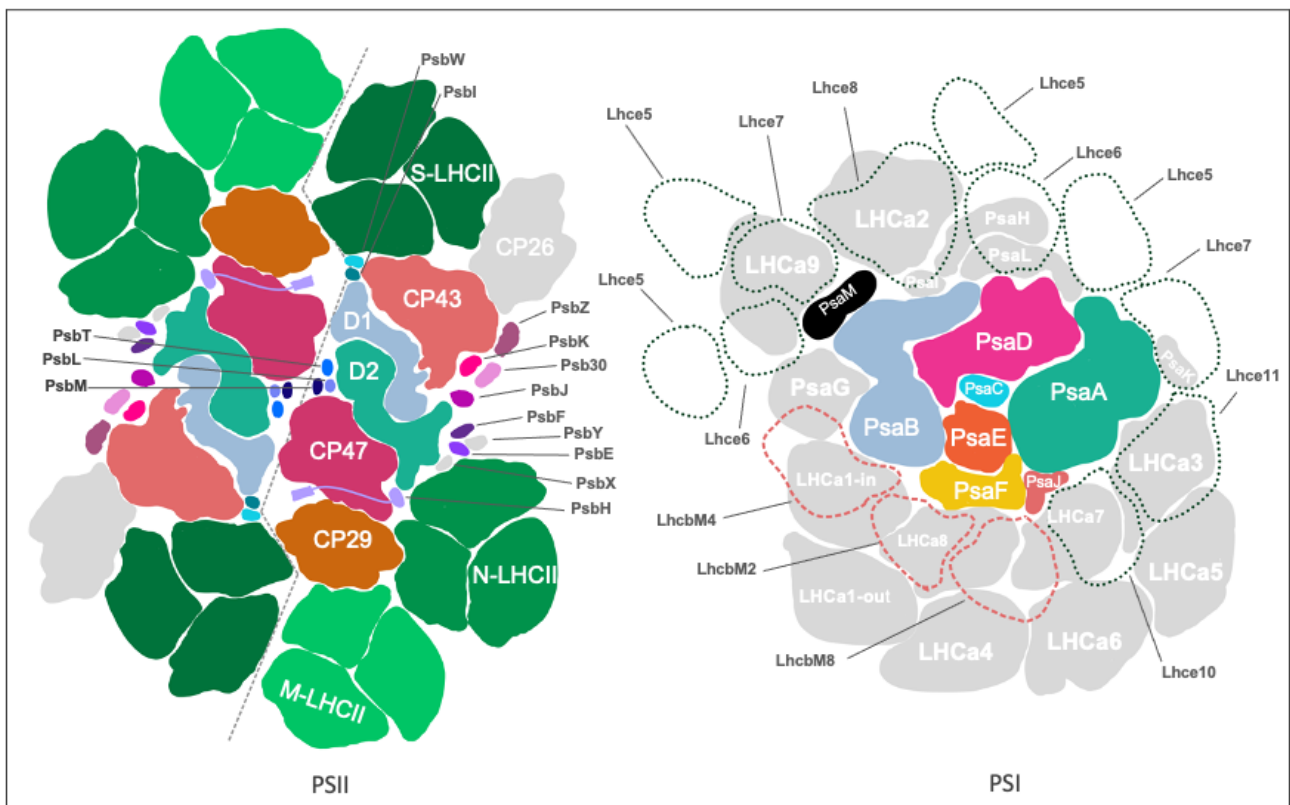


Figure 6 : Comparaison schématique des supercomplexes C2S2M2N2 et PS-8LHC entre *E. gracilis* et *C. reinhardtii*. Schéma basé sur des structures cristallographiques (C2S2M2N2 : Shen et al., 2019 ; PSI-8LHC : Gerle et al., 2023). Les protéines en couleur sont communes aux deux organismes, celles en gris sont spécifiques à *Chlamydomonas*. Les antennes LHCE d'*Euglena* sont en pointillés noirs, les antennes LHCBM en tirets rouges. PsaM est absent dans le PSI-8LHC de *Chlamydomonas* ⁴⁵.

5 La photoprotection

Bien que la lumière soit essentielle à la photosynthèse, un excès peut générer des espèces réactives de l'oxygène, comme les radicaux libres et les peroxydes, endommageant les protéines et les lipides cellulaires. Ces dommages photo-oxydatifs réduisent l'efficacité de la photosynthèse et peuvent entraîner la mort de l'organisme. En réponse à la variabilité de la lumière dans l'environnement, les organismes ont développé des mécanismes pour réguler l'absorption lumineuse. La lumière absorbée par les chlorophylles peut être utilisée pour la photochimie (qP), émise sous forme de fluorescence, ou dissipée sous forme de chaleur par extinction non photochimique (NPQ).

Les plantes et les algues ont évolué pour optimiser ces mécanismes de protection. Par exemple, la NPQ (Non-Photochemical Quenching) est un processus crucial qui permet de dissiper l'excès d'énergie sous une autre forme que la photochimie. La NPQ comprend plusieurs mécanismes : qE (extinction énergétique), qT (transition d'état), qZ (quenching de la zéaxanthine) et qI (extinction induite par les photoinhibition), chacun caractérisé par une cinétique de relaxation (de la plus rapide, à la plus lente).

La composante qE est celle qui se met le plus rapidement en place. Lorsqu'une excitation lumineuse excessive se produit, un gradient de potentiel électrochimique ($\Delta \mu H^+$) se forme à travers la membrane des thylakoïdes. La protéine LHCSR (Light-Harvesting Complex Stress-Related), liée au PSII, détecte cette forte concentration de protons, change de conformation et dissipe l'excès de photons sous forme de chaleur (qE). Dans un second temps, on observe que les antennes du complexe photosynthétique se détachent et migrent vers le photosystème I en réponse à l'activation de la kinase STT7, qui phosphoryle les complexes LHCII. Ce processus entraîne une réduction de la quantité de photons absorbés par le PSII. L'activité de la kinase est régulée par l'état rédox du pool de plastoquinones. Par exemple, l'état 2 est induit lors d'une excitation excessive du PSII, par des longueurs d'onde comprises entre 470 et 660 nm, provoquant la réduction du pool de plastoquinones et activant la kinase STT7. Cela conduit à la phosphorylation des LHCII et au déplacement des antennes du PSII vers le PSI. À l'inverse, l'état 1 correspond à l'oxydation du pool de plastoquinones, favorisée par une lumière excédant 700 nm qui stimule préférentiellement le PSI. Dans cet état, les antennes reviennent vers le PSII, rétablissant ainsi l'équilibre de la distribution de l'énergie lumineuse entre les deux complexes photosynthétiques. L'excès de lumière active également la violaxanthine dé-époxydase (VDE), convertissant la violaxanthine en zéaxanthine (qZ), qui dissipe l'énergie sous forme de chaleur. Lorsque l'énergie absorbée dépasse la capacité des mécanismes de photochimie et de photoprotection, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) se forment, ce qui expose le PSII à un risque

accru de dommages. Le PSII, étant particulièrement sensible aux ROS, subit des altérations qui peuvent endommager ses protéines essentielles et conduire à leur dégradation (qI) ⁴⁶.

Chez *C. reinhardtii*, toutes les composantes de la NPQ sont présentes, tandis que chez *E. gracilis*, les composantes qE et qZ sont absentes ¹⁴. Les composantes peuvent être calculées à l'aide de techniques de fluorescence. Pour ce faire, une période d'acclimatation à l'obscurité de 5 minutes est réalisée, suivie de la première détection, donnant F0 (fluorescence minimale). Un pulse saturant est ensuite émis, et une détection est effectuée immédiatement après, fournissant Fm1 (fluorescence maximale). Ensuite, une exposition à la lumière rouge lointaine pendant 10 minutes induit la transition des antennes collectrices du PSI vers le PSII, aboutissant à un Fm plus élevé (Fm2). Cela permet de calculer une amplitude de la transition d'état avec la formule $(Fm2 - Fm1) / Fm2$. Ensuite, une lumière actinique est activée pendant 10 minutes. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, une diminution rapide de la fluorescence est observée, due à l'activation des mécanismes de dissipation non photochimique (NPQ), contrairement à *E. gracilis* qui présente une cinétique plus lente en raison de l'absence de qE et qZ. Enfin, une lumière rouge lointaine est réappliquée. Le premier pic de récupération de fluorescence (Fm4) correspond au qE, un mécanisme rapide dépendant du pH chez *C. reinhardtii*, calculable comme $(Fm4 - Fm3) / Fm4$. La dernière détection de Fm (Fm5) permet de calculer le qI, correspondant à la fluorescence non récupérée, donc à la photoinhibition, calculée comme $(Fm2 - Fm5) / Fm2$ (Figure 7).

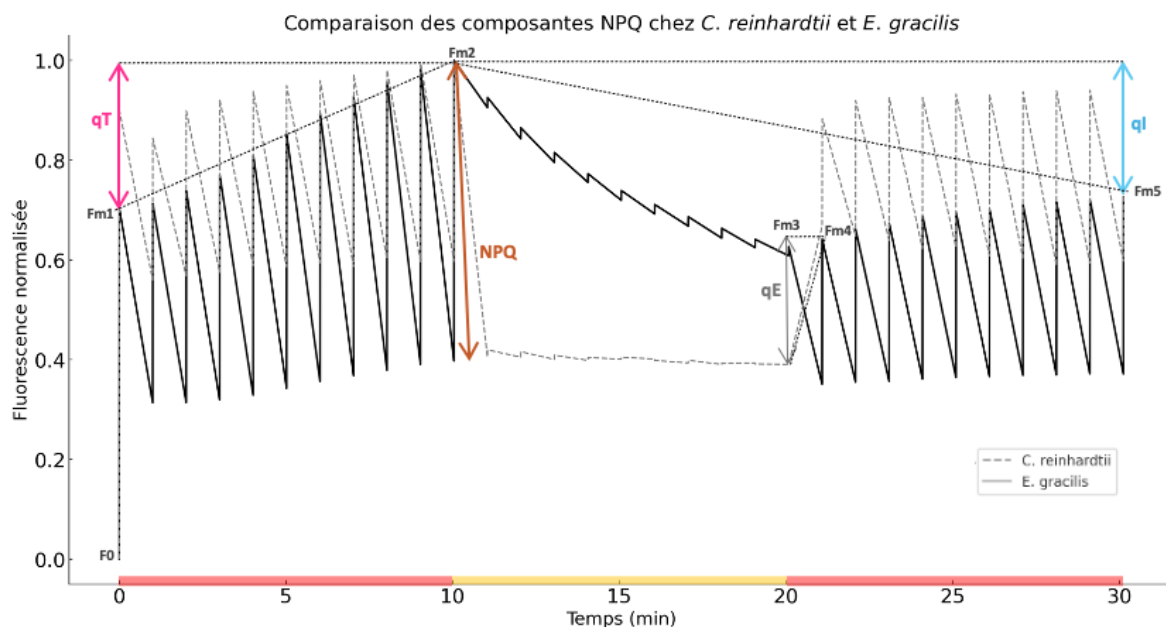


Figure 7 : Comparaison des composantes NPQ chez *Chlamydomonas reinhardtii* et *Euglena gracilis*. La bande rouge représente le traitement à la lumière rouge lointaine et la bande jaune la lumière actinique. La courbe en pointillés représente *C. reinhardtii* et la courbe en ligne continue *E. gracilis*. Les différentes composantes du NPQ (qT, qE, et qI) sont également affichées

6 Matériels et méthodes:

6.1 SOUCHES ET CONDITIONS DE CROISSANCE

Toutes les souches utilisées dans ce travail ont été fournies par le laboratoire de Dr Masami Nakazaka (Osaka) y compris leur souche de référence (collection SAG 1224-5/25) dénommée « ctrl ». Leur souche contrôle diffère de celle conservée au laboratoire de l'ULiege, présentant notamment une taille plus petite et une croissance différente sur milieu gélosé. Ces variations sont probablement dues à des mutations spontanées ayant entraîné une dérive génétique, modifiant ainsi certains traits phénotypiques spécifiques à leurs conditions environnementales. Les mutants utilisés sont des knock-out (KO) obtenus par CRISPR-Cas9; CP29 KO (mutant delta Cp29 KO#1), CP29 KO (mutant delta CP29 KO#4), CAO KO (mutant Chlorophyll a Oxygenase) et DVR KO (mutant DVR). Les cellules ont été cultivées sous agitation (110 RPM, Unimax shaker) sous un éclairage continu ($30 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) fourni par des LED blanches (400-700 nm) à une température de 23°C. Les cultures mères ont été réalisées dans un milieu Tris-Acetate-Phosphate (TAP) avec ajout d'un mélange de vitamines comprenant la biotine (10^{-7} % p/v), la vitamine B12 (10^{-7} % p/v) et la vitamine B1 (2×10^{-5} % p/v).

Les cultures expérimentales pour analyses biochimique et biophysiques ont étéensemencées à 1.25×10^8 cellules/L dans 20mL de liquide Tris-Minimum Phosphate (TMP) ou de Tris-Acetate-Phosphate (TAP) avec vitamines. ⁴⁷.

6.2 MESURE DE CROISSANCE

Les cultures ont étéensemencées à une densité de 1.25×10^8 cellules/L dans 75 mL de liquide Tris-Minimum Phosphate (TMP). Les cultures ont été incubées dans un Multi-Cultivator MC 1000-OD sous un éclairage continu avec une intensité de $30 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Les mesures de la densité optique (DO) ont été effectuées quotidiennement à une longueur d'onde de 730 nm. Des analyses de la croissance ont également été effectuées en boîtes de culture contenant les milieux TAP ou TMP gélosés avec vitamines, avec une densité cellulaire initiale de 1.25×10^5 cellules/mL. Ces expériences ont été conduites sous divers régimes lumineux : très faible lumière (VLL : $8 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), faible lumière (LL : $30 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), très forte lumière (VHL : $450 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) fournies par des LED blanches (400-700 nm), rouge lointain (Fr : $30 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) émise par une source lumineuse rouge (700 nm), et un témoin dans l'obscurité (DK).

6.3 MESURE DE MOTILITÉ

Les mesures de nage ont été effectuées à l'aide d'un microscope autonome développé au laboratoire phytoSYSTEMS⁴⁸. La capture vidéo s'est réalisée à une cadence de 30 images par seconde, en utilisant un capteur Sony IMX179 et un objectif varifocal offrant un grossissement de 50X. Une goutte de 70 μL de l'échantillon a été déposée dans le porte-échantillon, puis placée dans le trajet optique de la LED RGB-W-IR du microscope. Les organismes ont été observés pendant 10 minutes dans l'obscurité (850 nm), suivies de 10 minutes sous une lumière blanche de $100 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en capturant successivement des séquences vidéos de 10 secondes. L'analyse du mouvement a ensuite été réalisée à l'aide d'un logiciel de computer vision développé en Python, utilisant la bibliothèque OpenCV. L'algorithme de Farneback a été employé pour calculer le flux optique, permettant ainsi de déterminer la vitesse et la direction de nage des cellules⁴⁹. La vitesse moyenne de chaque séquence vidéo de 10 secondes a été mesurée et le signal d'évolution de la vitesse de nage en fonction du temps a été filtré à l'aide de l'algorithme de Savitzky–Golay⁵⁰.

6.4 CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

Une extraction des pigments au méthanol (MeOH) sur une culture de J3 en TAP a été réalisée, puis filtrée sur un filtre Acrodisc de 13 mm avec une membrane PTFE de 0,2 μm (PALL Corporation, USA). Les extraits de pigments ont été chargés pour une analyse HPLC en phase inverse (Prominence UFLC, Shimadzu, Kyoto, Japon). L'appareil est muni d'une pompe LC-20AT, d'un échantillonneur automatique SIL-20AC, d'une unité de dégazage DGU-20A5R, d'un four à colonne CTO-10AS VP et d'un détecteur à réseau de photodiodes en ligne SPD-M20A. Le volume d'injection est de 70 μL . La séparation est effectuée sur une colonne Nova Pak C18 (Waters, USA) (150 x 3,9 mm, taille des billes de silice de 4 μm , porosité de 60 Å) par élution en gradient linéaire : 0,5 min de 100 % de solvant A (80 % méthanol + 100 mM acétate d'ammonium), 0,6 min à 100 % de solvant B (90 % acétonitrile), 5 min de 90 % solvant B et 10 % solvant C (100 % acétate d'éthyle), 5,4 min de 65 % B et 35 % C, 3,5 min de 40 % B et 60 % C, et 2 min de 100 % C. Le système est ensuite ramené aux conditions initiales (100 % A) pendant 8 minutes. L'absorption est mesurée à 430 nm pour le chromatogramme. Pour chaque pigment, un spectre d'absorption complet a été enregistré. Après identification des pics en fonction de leurs spectres d'absorption complets, la surface de chaque pic sur le chromatogramme a été calculée et convertie en pourcentage de la surface totale, permettant de quantifier la concentration relative de chaque pigment dans l'échantillon⁵³.

6.5 ISOLEMENT DES COMPLEXES MEMBRANAIRES, ÉLECTROPHORÈSE SUR HRCN-PAGE

6.5.1 ISOLEMENT DES COMPLEXES MEMBRANAIRES

Les cellules en phase stationnaire ont été centrifugées à 500 g pendant 10 minutes pour obtenir un culot de 1 à 2 millions de cellules. Le culot cellulaire a été re suspendu dans 10 mL de tampon SHE-Buffer (250 mM de saccharose, 1 mM d'EDTA, 10 mM de HEPES, 0,4 % de BSA, 1 mM de PMSF (phénylméthylsulfonyl) et 50 µg/mL de TLCK (tosyl-lysyl chlorométhyl cétone), pH 7,3). Les cellules ont été lysées trois fois pendant 10 secondes avec une sonde de 3 mm à 30 % de la puissance maximale (sonicateur Fisherbrand™ FB505), avec 60 secondes de repos entre chaque sonication, puis diluées 3 fois dans du tampon SHE sans BSA (pH 7,3). Ensuite, les cellules ont été centrifugées à 600 g pendant 10 minutes à 4 °C (centrifugeuse Rotina 420R, Allemagne). Le surnageant a été récupéré et centrifugé à 17000 g pendant 15 minutes à 4 °C (Sorvall RC 6+, Fisher Scientific, USA). Le culot a été re suspendu dans 50 µL de tampon saccharose (300 mM saccharose, 4 nM EDTA, 20 mM Tris, inhibiteur de protéase cOmplete EDTA-free, Roche, pH 7,2). 300 µg de protéines (dosées par Bradford) ont été centrifugées à 17000 g pendant 10 minutes à 4 °C (centrifugeuse 5424 R, Eppendorf, Allemagne). Le culot a été solubilisé dans un tampon SB (50 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgSO₄, 100 mM NaCl, 10 % glycérol, inhibiteur de protéase cOmplete EDTA-free, pH 8,4) et 4 g d' α-DDM (2 % par g de protéine). Le mélange a été incubé à 4 °C sous agitation douce pendant 30 minutes, puis centrifugé à 21130 g pendant 20 minutes (centrifugeuse 5424 R, Eppendorf, Allemagne) ⁵³.

6.5.2 ELECTROPHORÈSE SUR HRCN-PAGE

120 µg de surnageant ont été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide native claire à haute résolution (hrCN-PAGE) avec un gradient d'acrylamide de 4 % à 12 % ⁵¹. Le tampon anodique était du Bis-Tris 5 mM à pH 7, et le tampon cathodique était composé de Tricine 5 mM, Bis-Tris 1,5 mM, 0,05 % de désoxycholate de sodium et 0,02 % d'α-DDM à pH 7. La migration a été réalisée dans l'obscurité pendant 12 à 14 heures à 70 mV ⁵³.

6.5.3 DOSAGE PROTÉIQUE (MÉTHODE BRADFORD)

Le dosage a été réalisé avec 5 µL d'échantillon (dilué entre 200 et 1 400 µg/mL), 50 µL de solution NaOH Triton X-100 et 500 µL de réactif bleu brillant de Coomassie G-250 dilué 5x (BioRad, USA). L'absorbance à 595 nm a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Lambda 265 UV/VIS (PerkinElmer, USA). Une courbe étalon avec l'albumine sérique bovine a permis de déterminer la concentration protéique des échantillons.

6.6 ANALYSES BIOPHYSIQUES

Des analyses biophysiques ont été réalisées sur les cultures in vivo (jours 3 de croissance en TAP et jours 5 en TMP) ainsi que sur les différentes bandes extraites du gel (B1-B7 et B1',B7').

6.6.1 ABSORBANCE ET FLUORESCENCE (RT ET 77K)

Les spectres des bandes ont été réalisés avec un spectromètre BLUE-Wave Miniature Spectrometer (StellarNet Inc., Tampa, FL USA) équipé d'une lampe halogène au tungstène SL1 (350-2500 nm) et d'une lampe SL1-BLUE (470 nm). Les spectres de fluorescence à température ambiante (RT = 23°C) et à 77 K (excitation $\lambda = 470$ nm) ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre USB2000+ Ocean Optics (Ocean Optics Inc., Dunedin, FL USA) couplé à une LightBox CCD (Beambio, France)⁵³.

6.6.2 TAILLES DES ANTENNES DU PSII ET RETR

La cinétique de fluorescence a été mesurée à l'aide du spectromètre JTS-10. Les suspensions cellulaires ont été adaptées à l'obscurité pendant 5 minutes, et 50 μM de DCMU ont été ajoutés. La lumière blanche des LEDs de détection a été filtrée à travers un filtre de 440 nm avec une FWHM (Full Width at Half Maximum) de 10 nm. Un autre filtre passe haut de 685 nm a également été posé devant le détecteur. Une première détection a été réalisée pour obtenir F_0 . Une lumière actinique est envoyée durant 3s, soit à 630nm ($8,3 \mu\text{mol}_{\text{photon}}\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) soit à 660nm ($14,8 \mu\text{mol}_{\text{photon}}\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Ensuite, un pulse de lumière saturante de 660 nm est envoyé pour vérifier que le rendement maximal de fluorescence (F_m) est bien atteint et que le DCMU est saturant. Les tailles d'antennes ont été mesurées avec la relation $\ln(2)/T_{1/2}$ où $T_{1/2}$ correspond au temps nécessaire pour atteindre 50 % de ($F_m - F_0$). Des mesures identiques ont été réalisées sans DCMU pour calculer le taux de transport d'électrons relatif (rETR) dépendant de l'intensité lumineuse ($\Phi_{II} * I$)⁵².

6.6.3 MESURE DE LA NPQ

La fluorescence de la chlorophylle est mesurée à l'aide du SpeedZenn (BeamBio/API, France). La détection se fait à l'aide d'une lumière bleue (450-470 nm) pendant 400 μs . Un filtre rouge passe haut (680 nm) est placé devant la caméra. Après 5 minutes d'obscurité pour obtenir F_0 (PSII ouvert), un flash de lumière actinique saturante ($3000 \mu\text{mol}_{\text{photon}}\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) permet de mesurer le F_m (PSII fermé). Une lumière rouge lointain est appliquée pendant 10 minutes pour forcer la transition des antennes du PSI vers le PSII (état 1), suivie de 10 minutes de lumière actinique de 660 nm ($850 \mu\text{mol}_{\text{photon}}\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) et de 10 minutes de rouge lointain. Plusieurs paramètres de fluorescence sont calculés à partir de cette séquence .

6.7 SPECTROMÉTRIE DE MASSE (LC-IMS-QTOF-MS).

La spectrométrie de masse a été réalisée au laboratoire du Professeur Pierre Morsomme à l'Université Catholique de Louvain. Les bandes du gel ont été transférées dans des tubes Eppendorf contenant 200 µL d'eau ultra-pure. L'eau a ensuite été retirée, et les bandes de gel ont été traitées avec 200 µL d'une solution de carbonate d'ammonium (50 mM, pH 8) contenant 50 % d'acétonitrile. Cette solution a été éliminée, et les bandes de gel ont été traitées avec 200 µL d'acétonitrile à 10 %, puis séchées sous vide à l'aide d'un concentrateur Savant Speed Vac. Pour la digestion enzymatique, 20 µL d'une solution tampon de TEAB (100 mM, pH 8) contenant 0,5 µg de trypsine ont été ajoutés aux bandes de gel pour les réhydrater, suivie d'une incubation à 37 °C pendant toute la nuit. La réaction de digestion a été interrompue par l'ajout de 10 µL de TFA à 1 %. Les surnageants ont été récupérés et transférés dans de nouveaux tubes Eppendorf, suivis d'une extraction des peptides des bandes de gel avec 50 µL d'une solution d'acétonitrile à 50 % et de TFA à 0,1 %. Après une incubation de 5 minutes, les extraits ont été combinés avec le surnageant initial. Une deuxième extraction avec 50 µL d'acétonitrile pur a été réalisée pendant 5 minutes, puis les extraits combinés ont été séchés sous vide et dissous dans 20 µL d'une solution d'acide formique à 0,1 % et d'acétonitrile à 2 %⁵³.

Le mélange de peptides a été séparé en utilisant une chromatographie en phase inverse sur un système NanoACQUITY UPLC MClass (Waters) contrôlé par le logiciel MassLynx V4.1 (Waters). Une injection de 5 µL a été effectuée sur une colonne de pré-concentration C18 (100Å, 5 µm, 180 µm x 20 mm, Waters) et les peptides ont été dessalés sous des conditions isocratiques à un débit de 15 µL/min avec une solution composée de 99 % d'acide formique et 1 % (v/v) de tampon ACN pendant 3 minutes. Les protéines ont ensuite été séparées par chromatographie en phase inverse sur une colonne PepMap C18 (100 Å, 1,8 µm, 75 µm x 150 mm, Waters) pendant 35 minutes à une température de 35 °C et à un débit de 300 nL/min. La séparation a été réalisée en deux phases linéaires : d'abord avec un gradient de 1 % (v/v) ACN et 0,1 % d'acide formique jusqu'à 40 % (v/v) ACN et 0,1 % d'acide formique sur 15 minutes, puis de 40 % (v/v) ACN et 0,1 % d'acide formique jusqu'à 85 % (v/v) ACN et 0,1 % d'acide formique sur 10 minutes. La colonne a été rééquilibrée dans ses conditions initiales après un lavage de 30 minutes avec 85 % (v/v) ACN et 0,1 % d'acide formique à un débit de 300 nL/min. Pour l'analyse LC-MS en ligne, le système nanoUPLC était couplé à un spectromètre de masse par une source d'ionisation par nano-électrospray (nanoESI)⁵³.

Les analyses par séparation de mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse à haute définition (LC-IMS-QTOF-MS) ont été conduites sur un appareil SYNAPT G2-Si (Waters) équipé d'une source d'ions à double nanoélectrospray NanoLockSpray (Waters). Pour les échantillons, des émetteurs PicoTipR en silice fondue (360 µm de diamètre extérieur, 20 µm de diamètre intérieur, pointe de 10

µm et longueur de 2,5 pouces) ont été utilisés, tandis que pour la solution de verrouillage de masse, des émetteurs TicoTipR de même dimension ont été employés. L'éluant a été ionisé sous une tension de 2,4 kV avec une tension de cône d'échantillonnage de 25 V et un décalage de la source de 30 V. La température de la source a été maintenue à 80 °C. Les données ont été collectées en mode HDMSE en résolution, de 2 à 35 minutes après l'injection, couvrant une plage de m/z de 50 à 2000 avec un temps de balayage de 1 seconde. La rampe d'énergie de collision allait de 20 eV à 110 eV dans le bac de mobilité ionique. Pour le mode MS à faible énergie, l'énergie de collision a été fixée à 4 eV. La correction de masse post-acquisition a été réalisée en utilisant l'ion monoisotopique doublement chargé de [Glu¹]-fibrinopeptide B à une concentration de 100 fmol/µL, introduit par le pulvérisateur de référence de la source nanoESI avec une fréquence de 30 secondes à un débit de 0,5 µL/min⁵³.

Les données HDMSE ont été traitées à l'aide du logiciel Progenesis QI (Nonlinear Dynamics, Waters) en utilisant une base de données de séquences protéiques. Le propionamide a été sélectionné comme modification fixe pour la cystéine, l'oxydation comme modification variable pour la méthionine, et la trypsine comme enzyme de digestion, avec une tolérance pour un clivage manqué⁵³.

Pour chaque échantillon de centre réactionnel des mutants CP29 KO et des échantillons contrôles (bandes B4, C2, et B5, C1), l'abondance relative des protéines identifiées dans le centre réactionnel (CP47, CP43, D1, D2, PsaM, CP29, LHCBM1-3, LHCE9-3) a été calculée. Cette abondance a été déterminée en utilisant la formule suivante : le nombre de PSMs (Peptide Spectrum Matches) de la protéine X dans l'échantillon Y / moyenne de l'abondance des 8 protéines dans l'échantillon Y. Ensuite, cette valeur a été normalisée par rapport à l'un des deux échantillons contrôles (Ctrl C2), en calculant par exemple : la valeur de CP47 dans l'échantillon Z / valeur de CP47 dans l'échantillon Ctrl C2. Cette méthode de double normalisation permet de corriger les artefacts potentiels liés à la digestion et à l'ionisation lors de la spectrométrie de masse, assurant ainsi une meilleure comparaison entre les échantillons.

7 Résultats

7.1 COMPOSITION PIGMENTAIRE DES TROIS SOUCHES

En tout premier lieu, afin de confirmer que les activités divinyl reductase (DVR) et chlorophyllide a oxygénase (CAO) sont bien absentes chez les souches DVR KO et CAO KO, respectivement, nous avons procédé à une analyse du contenu pigmentaire par HPLC. Cette analyse permettra également de déterminer l'impact de la perte de chl b ou de la protéines CP29 sur le contenu pigmentaire. Au total, six pigments sont identifiés chez *Euglena gracilis* : la chlorophylle a, la chlorophylle b, le bêta-carotène, deux xanthophylles (la diadinoxanthine et sa forme désépoxydée, la diatoxanthine), ainsi que la néoxanthine (annexes, Figure A). Le mutant CP29 KO présente la même proportion de pigments que le Ctrl. Comme attendu, les mutants CAO KO et DVR KO présentent moins de 0,1% de chlorophylle b. On observe également une diminution de la néoxanthine dans ces mutants. La néoxanthine est un caroténoïde produit notamment en réponse à un stimulus de stress, comme la lumière, et joue un rôle photoprotecteur en captant l'excès d'énergie ⁵⁴

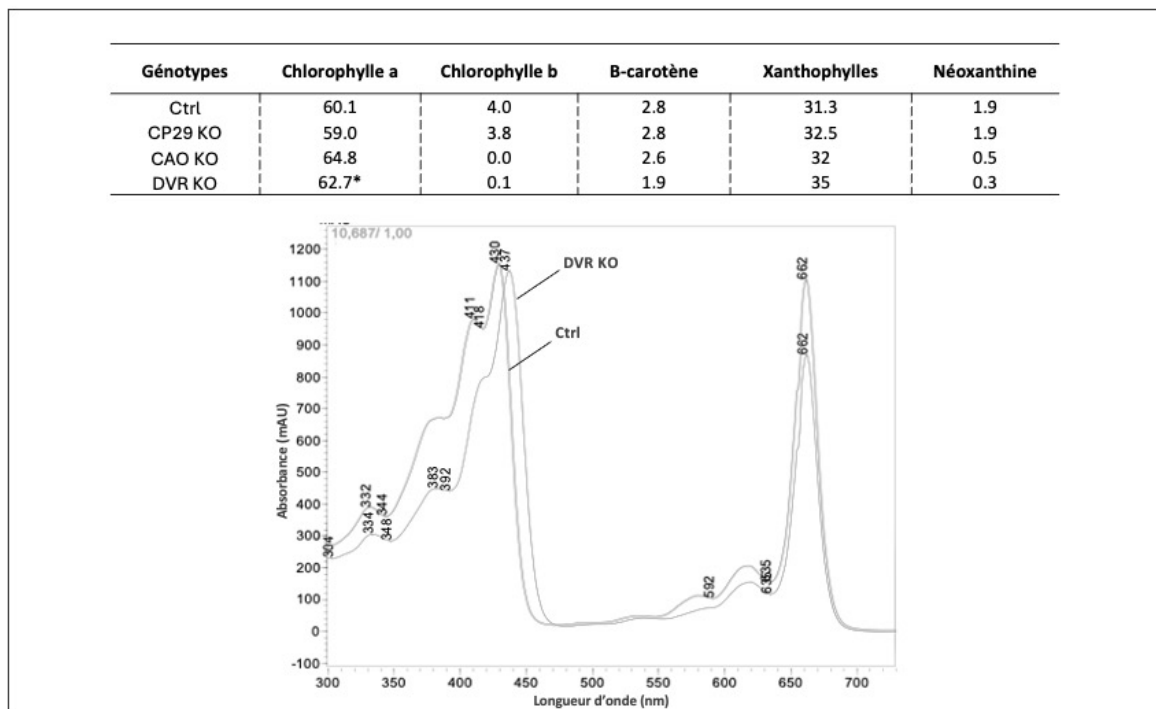


Figure 8 : Profil pigmentaire des différentes souches par HPLC. Le tableau présente les pourcentages relatifs des différents pigments chez les différents mutants (chlorophylle a, chlorophylle b, bêta-carotène, xanthophylles (diadinoxanthine et diatoxanthine), néoxanthine) déterminés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) à partir de leurs spectres d'absorbance à 430 nm. Le graphique montre la superposition des spectres complets d'absorbances des souches ctrl et DVR KO au temps de rétention de 10,6 min

En comparant les spectres d'absorption au temps d'élution de 10,6 minutes, on observe que chez le mutant DVR KO, le pic maximum à 430 nm (bande de Soret) correspondant à la chlorophylle a du Ctrl est décalé de 7 nm vers le rouge (Figure 8). Selon la littérature⁵⁵, ce pigment serait un précurseur de la chlorophylle, la divinyl chlorophylle a, qui se caractérise par un décalage de la bande de Soret de 7 à 10 nm vers le rouge par rapport à la chlorophylle a normale (MV-Chl a)⁵⁵. Cette observation confirme bien celle attendue suite à la perte de la DVR.

7.2 INFLUENCE DES MUTATIONS CP29, CAO, ET DVR SUR LA CROISSANCE ET LA MOTILITÉ

Nous avons ensuite testé la croissance des souches déficientes pour la protéine CP29 du PSII ainsi que celles déficientes pour les enzymes CAO et DVR de la voie de biosynthèse de la chlorophylle en conditions phototrophes (milieu TMP) et mixotrophes (milieu TAP, présence d'acétate) sous différents régimes d'intensités lumineuses. Ces tests permettent d'évaluer comment les mutations affectent la capacité des souches à croître et à s'adapter à des environnements lumineux variés.

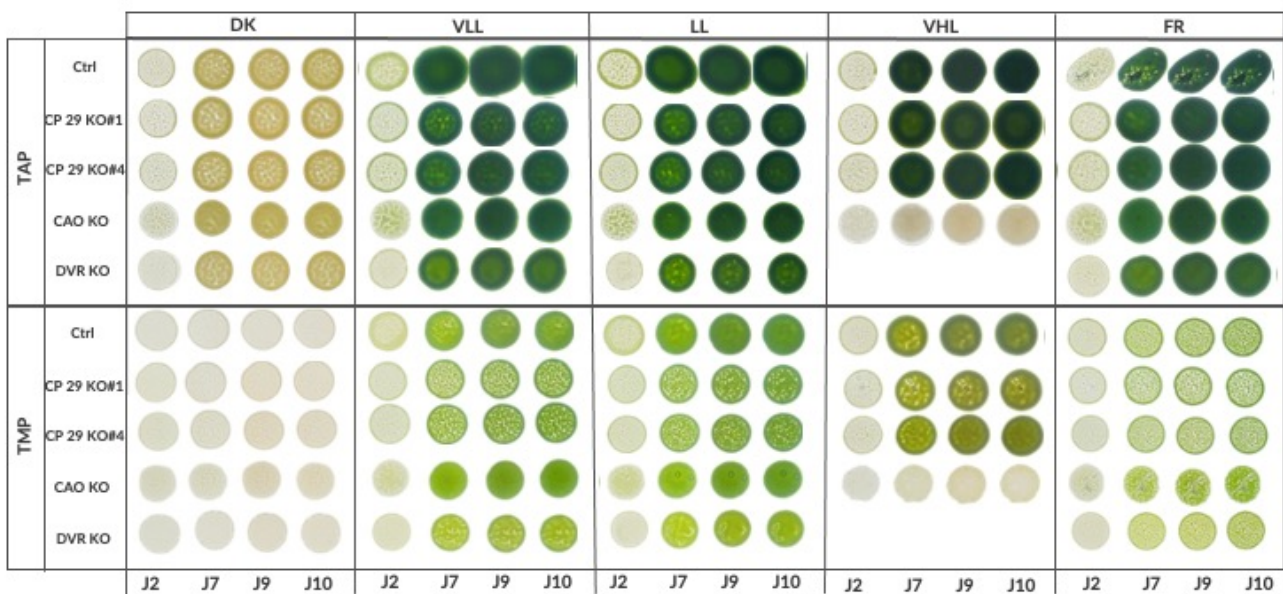


Figure 9: Croissance des souches Ctrl, CP29 KO, CAO KO et DVR KO sur gélose (TAP ou TMP) sous différentes intensités lumineuses. Obscurité (DK), très faible lumière (VLL = $15 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), faible lumière (LL = $50 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), très forte lumière (VHL = $475 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) et lumière rouge lointain (FR = $30 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ à 730 nm). La concentration initiale en cellules était de $1,25 \times 10^5$ cellules/mL. (n=2).

Les deux mutants CP29 KO ne montrent aucun défaut de croissance sous lumière faible (VLL et LL), forte lumière (VHL), ou lumière rouge lointaine (FR). Par la suite, et par soucis de clarté dans les figures, seuls les résultats du mutant CP29 KO#1 seront présentés.

Les deux mutants CP29 ont en effet des phénotypes identiques entre eux pour tous les autres paramètres testés (voir par exemple Figure 11). Sous forte lumière, la souche CAO KO blanchit et la souche DVR KO ne montre aucune croissance (Figure 9).

En revanche, ces deux souches n'ont pas de phénotype de croissance aux autres intensités. Afin de confirmer l'absence de phénotype de croissance sous lumière faible, un test en culture liquide en conditions phototrophes (milieu TMP) à une intensité de $50 \mu\text{mol}_{\text{photon}}\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (LL) a été entrepris.

Le mutant CP29 KO a un temps de doublement proche de celui de la souche sauvage (129 h pour le Ctrl et 120 h pour le mutant CP29 KO). En revanche, les cultures des mutants CAO KO et DVR KO sont plus pâles en phase exponentielle (J7, Figure 10), avec des temps de doublement supérieurs (150 h pour le CAO KO et 208 h pour le DVR KO) à ceux des deux autres souches (Figure 10).

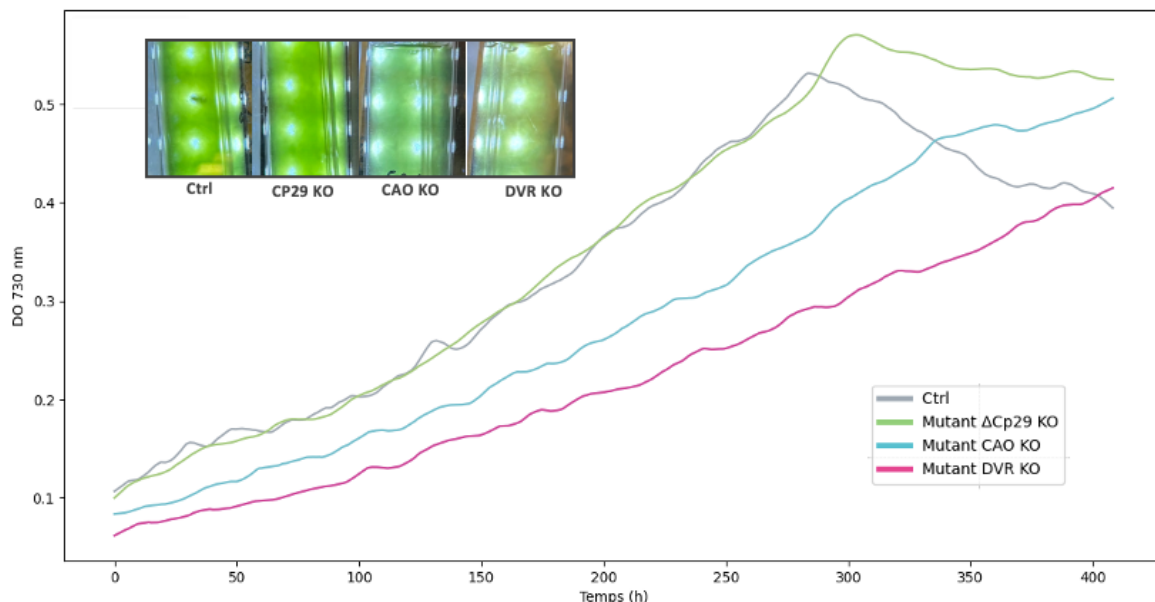


Figure 10 : Croissance des souches Ctrl, CP29 KO, CAO KO et DVR KO en milieu liquide TMP, sous une intensité lumineuse de $50 \mu\text{mol}_{\text{photon}}\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La croissance est mesurée à 730 nm. La concentration initiale était de $1,25 \times 10^5$ cellules/mL. La photo illustre la couleur des cultures au jour 7 (168 heures). (n=1).

Bien que réalisée une seule fois, cette expérience confirme les observations menées sur base des tests de croissance sur milieu solide. Nous avons ensuite entrepris des tests pour examiner si la motilité des cellules était impactée chez les mutants. Bien qu'une grande variabilité dans la vitesse nage soit observée au début de la période d'obscurité, les vitesses se stabilisent après quelques minutes et les moyennes des vitesses de nage calculées entre 400 et 600 secondes sont similaires pour toutes les souches. De même, à la lumière, la vitesse moyenne de nage des différentes souches reste constante, autour de $80 \mu\text{m}/\text{s}$ (Figure 11).

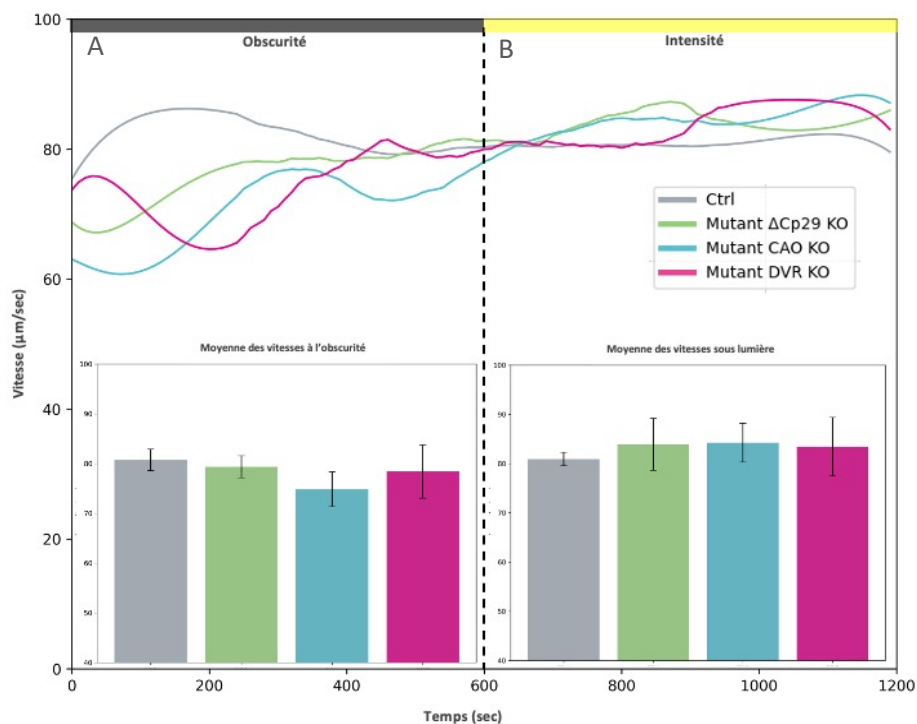


Figure 11 : Vitesse de nage des souches Ctrl, CP29 KO, CAO KO et DVR KO en obscurité et sous lumière, en fonction du temps. Le graphique principal présente la vitesse moyenne de nage des algues mesurée sur 10 secondes de vidéo, sur une période totale de 10 minutes à l'obscurité (observation à l'aide d'une LED émettant à 850 nm), suivie de 10 minutes sous lumière blanche ($100 \mu\text{mol}_{\text{photon}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). A) Vitesse moyenne en obscurité (de 400 à 600 sec) avec écart-type. B) Vitesse moyenne sous lumière avec écart-type (n=6000).

7.3 ANALYSE ET COMPOSITION PROTÉIQUE DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHÉTIQUE CHEZ LES MUTANTS.

Afin de déterminer l'impact de la perte de la chl b (mutants CAO KO et DVR KO), ou de la perte de CP29 (mutants CP29 KO) sur l'organisation de la chaîne photosynthétique, nous avons d'abord préparé un extrait membranaire contenant des thylakoïdes, puis solubilisé et séparé les complexes protéines-pigments de la chaîne photosynthétique par électrophorèse sur un gradient de polyacrylamide en conditions non dénaturantes à haute résolution (hrCN-PAGE). Cette méthode, qui emploie des détergents doux non ioniques comme l'alpha-DDM et des tampons presque neutres (BIS-TRIS), permet de préserver les interactions protéines-pigments et de maintenir les complexes multiprotéiques au maximum dans leur structure native. L'ajout de désoxycholate, qui charge négativement la surface des protéines, permet d'augmenter la résolution et d'améliorer la séparation des complexes en fonction de leur poids et de leur charge. Les complexes protéiques deviennent visibles à l'œil nu sans coloration, apparaissant sous forme de bandes vertes selon leur teneur en chlorophylle.

Chez le témoin, sept bandes distinctes déjà caractérisées par le laboratoire d'accueil, comprises entre 110 et 1500 kDa, sont observables de manière répétée sur les gels (bandes B1 à B7). La bande B1, de 1500 kDa, correspond à un supercomplexe du photosystème 2 de type C2S2M2N2, tandis que la bande B2, de 1300 kDa, correspond à un supercomplexe de type C2S2M2, caractérisé par l'absence des trimères de type N. La bande B3 représente un supercomplexe du PSI (SC-PSI). Les deux bandes suivantes se distinguent principalement via leurs poids moléculaires : la bande B4, de 470 kDa, correspond à une forme dimérique du centre réactionnel (C2), tandis que la bande B5, de 310 kDa, correspond à un monomère ou à un dimère incomplet (C1). Enfin, la bande B6, de 180 kDa, correspond à la LHCE, et la bande B7 de 110 kDa, aux trimères LHCII libres (LHCII₃) (Figure 12).

Des différences notables sont observées chez les mutants, notamment une disparition des bandes correspondants au SC-PSII (B1 et B2) chez toutes les souches mutantes. La bande principale du SC-PSI (B3) est toujours présente mais moins bien résolue ou moins abondante. En ce qui concerne la bande correspondant aux trimères de LHCII libre (B7), elle est absente chez les mutants CAO KO et DVR KO (Figure 12).

Dans certains gels, nous avons observé des bandes supplémentaires, notamment chez la souche Ctrl, CP29 KO et DVR KO du gel B, notée B1', ainsi que chez la souches Ctrl et CP29 dans les gels A et C, entre les bandes B6 et B7, notée B7' (Figure 12).

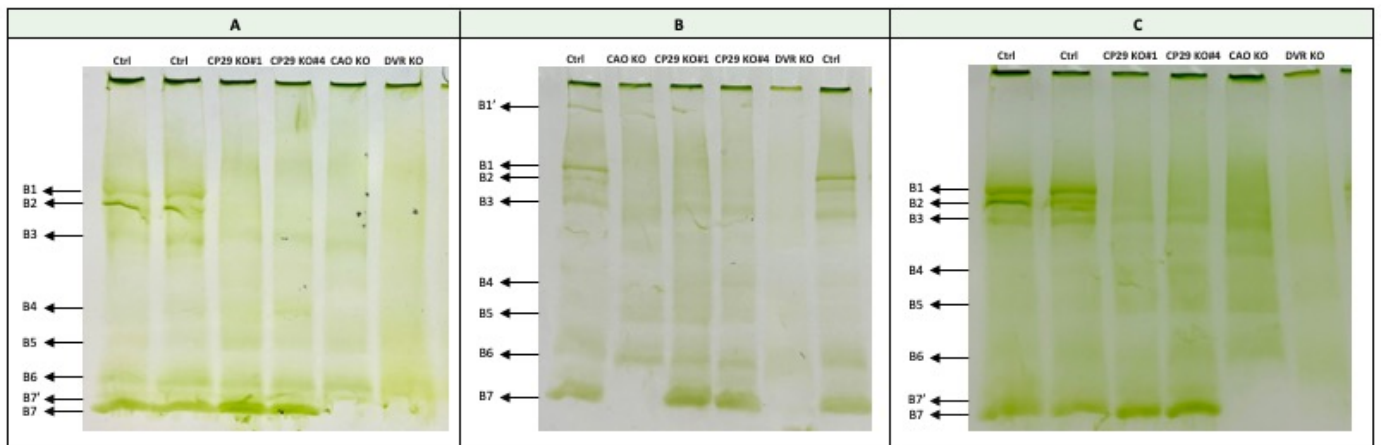


Figure 12 : Séparation des complexes pigment-protéines membranaires chez *E. gracilis*. Les protéines des thylakoïdes (120 µg par puits) des souches Ctrl et mutants (CP29 KO#1, CP29 KO#4, CAO KO, DVR KO) ont été solubilisées avec 4 g d' α -DDM/g de protéine (2% w/V) et séparées sur un gel hrCN-PAGE à gradient de 4-12%. Sept bandes visibles sont notées de B1 à B7 dont deux supplémentaires notée B1' et B7'. Les gels ont été réalisés en triplicats (A,B et C).

Nous avons extrait les bandes du gel à la main et nous les avons analysées par spectrophotométrie d'absorption et spectrofluorimétrie. Les spectres d'absorption et de fluorescence, à température ambiante (RT) et à 77 K, permettent d'identifier les complexes pigment-protéine isolés grâce à leur profil caractéristique.

Chez la souche témoin, les supercomplexes du PSII (SC-PSII), représentés par les bandes B1 et B2, présentent des pics de fluorescence caractéristiques autour de 685 nm, correspondant aux antennes du centre réactionnel PSII (CP43 et CP47). De plus, un large pic entre 695 et 725 nm à 77K est attribué à CP47 et aux complexes LHCII ^{56,57}. En revanche, le supercomplexe du PSI (SC-PSI, bande B3) se distingue par un pic prédominant à 730 nm, avec de faibles contributions des centres réactionnels à 685 nm et 695 nm. Quant aux spectres d'absorption du SC-PSI, ils révèlent un élargissement notable de la courbe autour de 700 nm, contrairement à ceux du SC-PSII (bandes B1 et B2). En ce qui concerne les spectres de fluorescence à température ambiante (RT), les SC-PSII montrent un pic caractéristique à 685 nm, tandis que les SC-PSI présentent un pic similaire avec l'ajout d'une composante à 700 nm ¹⁴ (Figure 13).

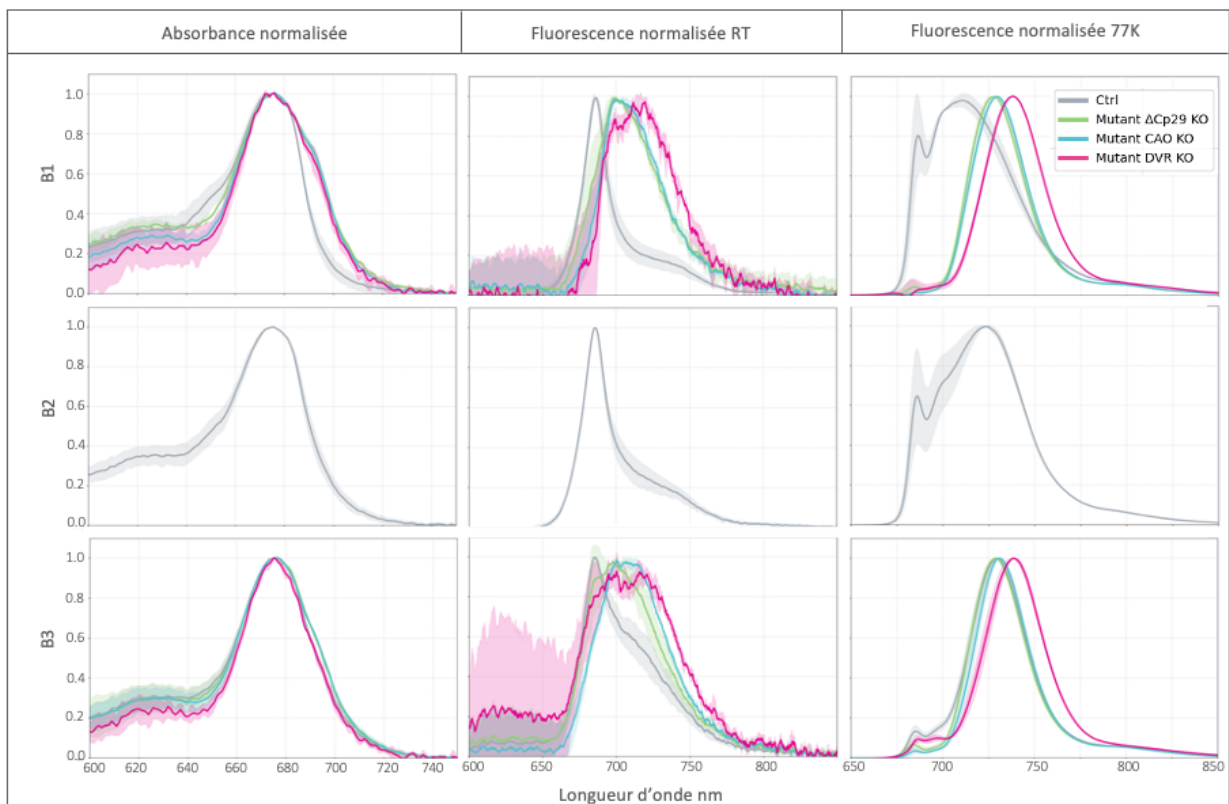


Figure 13 : Analyse spectroscopique des bandes (B1, B2 et B3) du hrCN-PAGE chez le Ctrl et les mutants. De gauche à droite, on a les spectres d'absorption à température ambiante (RT), les spectres de fluorescence à température ambiante (RT) et les spectres de fluorescence à basse température (77K). Les spectres d'absorption sont normalisés à 680 nm (absorbance de 1) et 730 nm (absorbance de 0), et les spectres de fluorescence sont normalisés à leur maximum. Les écarts-types issus de triplicats (n=3) sont représentés en surbrillance et de la même couleur que les échantillons.

Bien que les bandes correspondantes à B1 soient absentes chez les mutants, une analyse de cette région a révélé des caractéristiques typiques d'un supercomplexe du PSI (SC-PSI), similaires à celles observées pour la bande B3 de la souche contrôle (Figure 13).

Les bandes B3 des mutants montrent également des caractéristiques identiques à celles de la souche Ctrl, confirmant qu'elles correspondent également à des SC-PSI. En revanche, aucune bande des mutants n'a pu être identifiée comme un SC-PSII. Concernant l'absorbance, la bande B1 des mutants présente un épaulement à 690 nm, similaire à la bande B3 du Ctrl, correspondant probablement aux antennes collectrices LHCEs (Figure 13). Le mutant DVR KO montre des spectres décalés de 10 nm à 77K.

Les bandes B4 (C2) et B5 (C1) des mutants sont similaires au Ctrl et sont identifiées comme des centres réactionnels du PSII, caractérisées par des pics de fluorescence plus importants à 715 nm et deux autres maxima moins importants à 685 nm et 695 nm à 77 K, ainsi que des pics à RT à 686 nm et 698 nm. Le pic à 715 nm à 77 K correspond uniquement à des agrégats LHCS. A 77K, les spectres des bandes du mutant DVR KO présentent toujours un décalage de 10 nm vers le rouge (Figure 14)⁵⁶.

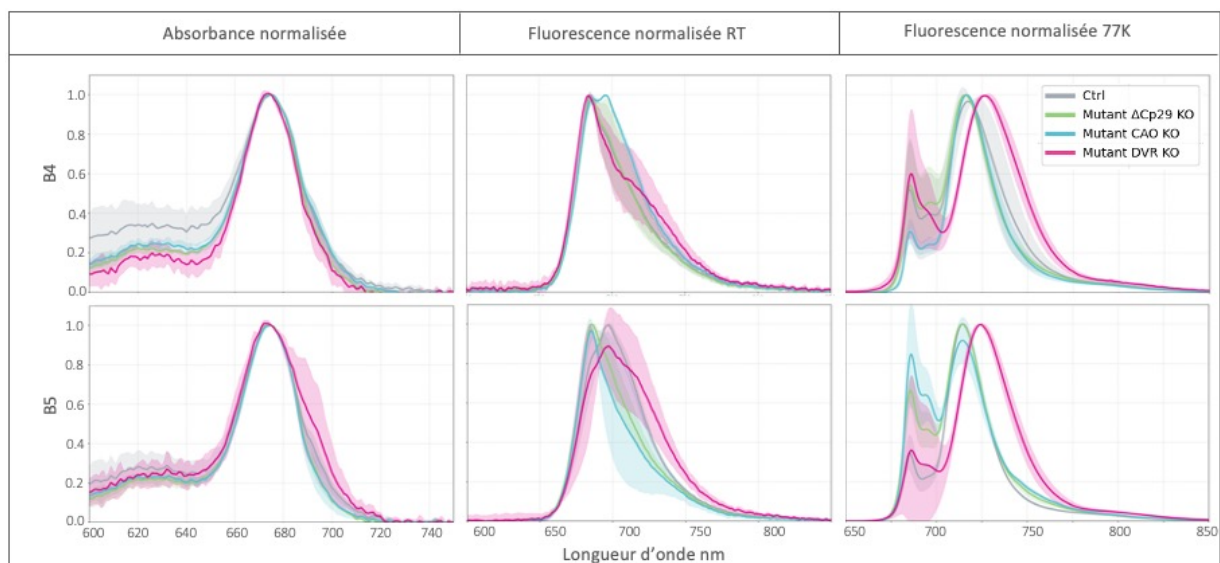


Figure 14 : Analyse spectroscopique des bandes (B4 et B5) du hrCN-PAGE chez le Ctrl et les mutants. De gauche à droite, on a les spectres d'absorption à température ambiante (RT), les spectres de fluorescence à température ambiante (RT) et les spectres de fluorescence à basse température (77K). Les spectres d'absorption sont normalisés à 680 nm (absorbance de 1) et 730 nm (absorbance de 0), et les spectres de fluorescence sont normalisés à leur maximum. Les écarts-types issus de triplicats (n=3) sont représentés en surbrillance et de la même couleur que les échantillons.

La bande B6, de 180 kDa, est présente chez tous les mutants et est identique à celle de la souche contrôle. Elle correspond à un complexe d'antennes de type LHCE. Son spectre d'absorption montre un pic à 675 nm avec un épaulement caractéristique à 690 nm, et est confirmé par un pic à 715 nm à 77K (toujours décalé de 10 nm pour le mutant DVR KO). Un faible pic à 684 nm, caractéristique des LHCII, est présent chez le Ctrl et le mutant CP29 KO, mais absent chez les mutants CAO KO et DVR KO. La bande B7, présente uniquement chez le mutant CP29 KO, est caractéristique des trimères LHCII libre avec des pics à 684 nm à 77K et à 686 nm en RT, identique à la souche Ctrl (Figure 15)^{14,56}.

Les bandes supplémentaires B1' ont été identifiées comme des supercomplexes du PSI de plus haut poids moléculaire (SC-PSI) par un pic prédominant à 730 nm, avec une plus forte contribution des centres réactionnels à 685 nm. La bande B7' correspond soit à un complexe d'antennes LHCE de poids moléculaire inférieur dans la mesure où il est présent aussi chez le mutant CAO dépourvu de LHCII₃. Cependant ses spectres de fluorescence à RT ou à 77K ressembler davantage à ceux des trimères de LHCII. (Figure 15) (Annexes, Figure B).

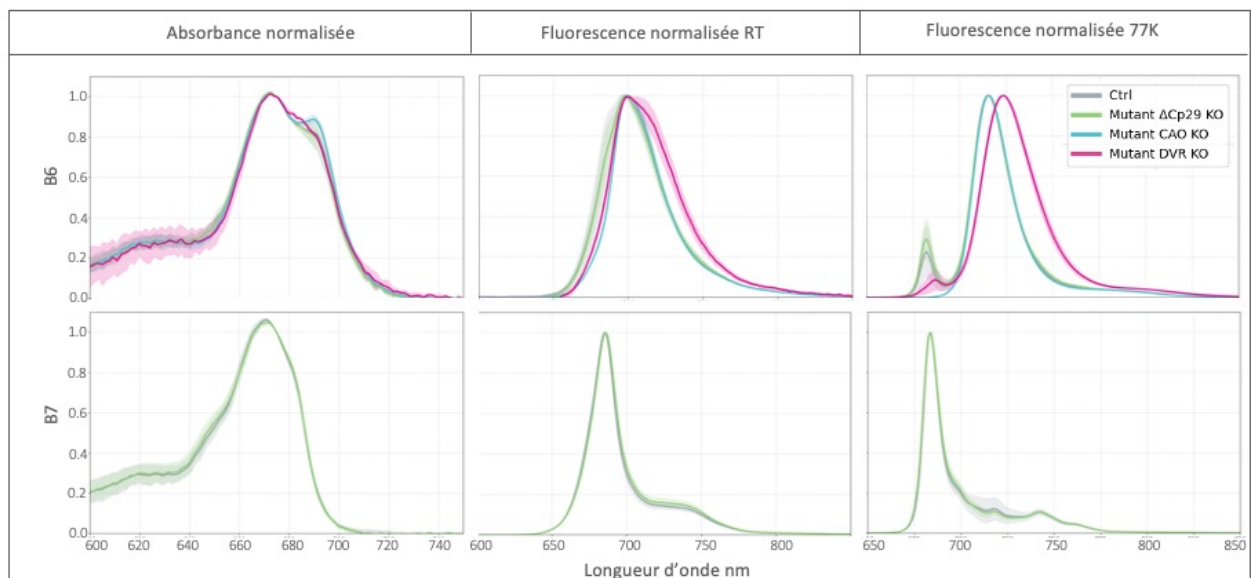


Figure 15 : Analyse spectroscopique des bandes (B6 et B7) du hrCN-PAGE chez le Ctrl et les mutants. De gauche à droite, on a les spectres d'absorption à température ambiante (RT), les spectres de fluorescence à température ambiante (RT) et les spectres de fluorescence à basse température (77K). Les spectres d'absorption sont normalisés à 680 nm (absorbance de 1) et 730 nm (absorbance de 0), et les spectres de fluorescence sont normalisés à leur maximum. Les écarts-types issus de triplicats (n=3) sont représentés en surbrillance et de la même couleur que les échantillons.

Une analyse du contenu protéique a été réalisée par spectrométrie de masse afin de vérifier spécifiquement si l'absence de la protéine CP29 dans les mutants CP29 KO induit d'autres changements dans les centres réactionnels extraits des gels hrCN-PAGE (bandes B4 et B5, respectivement C2 et C1).

L'analyse une abondance relative inférieure à 16 % pour CP29 (Figure 16) dans les centres réactionnels des mutants CP29 KO. En spectrométrie de masse, une telle valeur peut être considérée comme négligeable. Ainsi, ces résultats suggèrent que la protéine CP29 est effectivement absente, mais surtout que les centres réactionnels C2 et C1 semblent rester intacts en l'absence de CP29 dans les deux mutants KO#1 et KO#4 (Figure 16). Conformément aux études menées dans le laboratoire d'accueil, la protéine LHCE9-3 a été retrouvée de manière constante et abondante dans les centres réactionnels des souches contrôles et des mutants CP29.

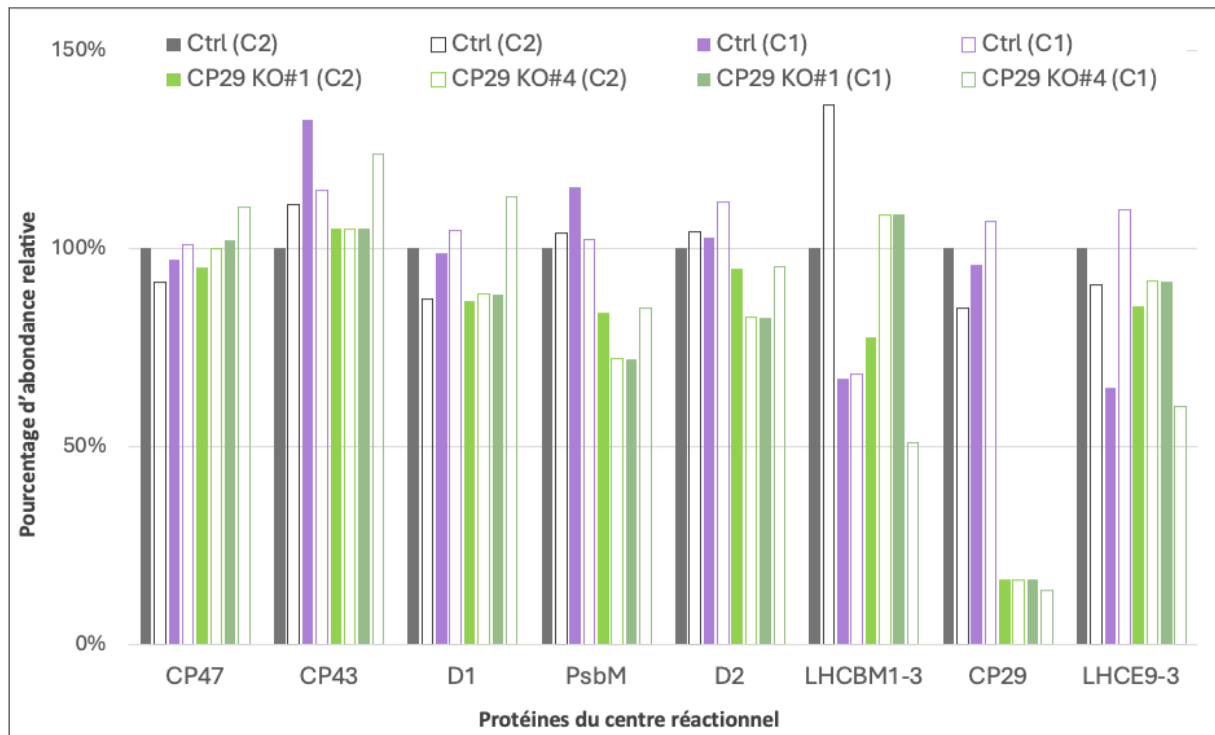


Figure 16: Analyse de la spectrométrie de masse des centres réactionnels (C2 et C1) des mutants CP29 KO. Le tableau présente le pourcentage d'abondance relative des protéines (CP47, CP43, D1, PsbM, D2, LHCBM1-3, CP29, LHCE9-3) identifiées dans les bandes des centres réactionnels (C2 et C1) issues du hrCN-PAGE, comparant la souche contrôle et les deux mutants CP29 KO (n=2).

7.4 IMPACT DES MUTATIONS SUR LES PROPRIÉTÉS BIOPHYSIQUES CHEZ LES DIFFÉRENTES SOUCHES

Le spectre d'émission de fluorescence à 77K des cellules de la souche sauvage est très différent de celui des plantes vertes et des algues vertes (annexe, Figure C). Il se caractérise par deux pics majeurs : un pic d'émission à 722 nm, provenant principalement du PSI, et un épaulement mineur autour de 683 nm, provenant du PSII.

La dérivée seconde améliore la visibilité des pics et des creux, : une faible émission des LHClI est détectable à 683 nm, avec un épaulement vers 695 nm correspondant probablement au centre réactionnel du PSII, et un pic d'émission du PSI dans la région 713–715 nm, possiblement confondu avec des LHCEs dont le pic caractéristique est à 715 nm. Les spectres à température ambiante montrent uniquement le PSII, caractérisé par un pic unique à environ 700 nm. Lorsqu'on calcule la dérivée seconde, on observe un pic majeur à 685 nm et un pic secondaire à 699 nm, correspondant probablement respectivement aux LHClI et au centre réactionnel du PSII (Figure 17) ^{14,58}.

Les spectres d'émission de fluorescence des mutants CAO KO et DVR KO ont montré des changements considérables par rapport au spectre du type sauvage. À 77 K, que ce soit en TAP ou en TMP, on remarque une disparition du pic de la dérivée seconde à 683 nm, qui correspond au LHClI₃, ainsi qu'une diminution de l'épaulement à 695 nm, correspondant au centre réactionnel du PSII. Cela est également corroboré par les spectres à température ambiante, qui montrent une diminution marquée du pic à 685 nm correspondant au LHClI₃. Cependant, on observe seulement une légère diminution du pic à 699 nm chez le mutant CAO KO comparé au type sauvage, ce pic étant associé au centre réactionnel du PSII. Quant au mutant CP29, on ne remarque pas de différence notable avec le Ctrl (Figure 17).

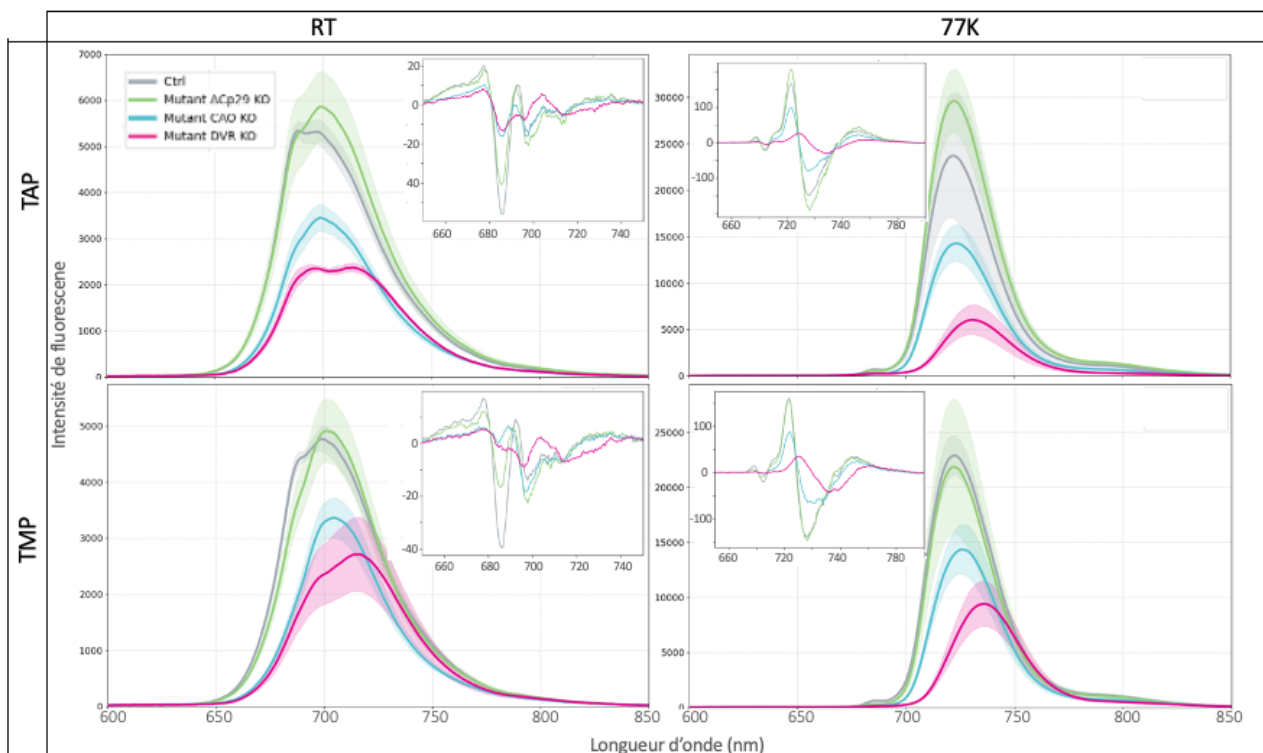


Figure 17: Analyse spectroscopique IN VIVO en TAP et TMP chez le Ctrl et les mutants. Spectres de fluorescence (excitation $\lambda = 470$ nm) à température ambiante (RT = 23°C) et à 77 K en TAP (3ème jour de culture) et en TMP (5ème jour de culture). Les écarts-types issus de triplicats (n=3) sont représentés en surbrillance et de la même couleur que les échantillons. Les dérivées secondes basées sur les moyennes ($d^2F/d^2\lambda$) sont présentées dans le coin supérieur droit.

La perte des LHCII₃ (mutants CAO KO et DVR KO), la déstabilisation du complexe PSII-SC (chez tous les mutants) in vitro et la diminution de la fluorescence correspondant au photosystème II dans les spectres in vivo (mutants CAO KO et DVR KO), sont vraisemblablement associés à des changements dans la capacité de la chaîne photosynthétique à capter la lumière. Par conséquent, des mesures de la taille des antennes et du taux de transport d'électrons photosynthétique (relatif, rETR) ont été effectuées.

Pour évaluer la taille d'antenne, nous utilisons le DCMU (3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée), une molécule qui inhibe spécifiquement le transfert d'électrons dans le PSII. Lors d'une illumination, la fermeture des centres réactionnels du PSII en présence de DCMU s'accompagne d'une montée de fluorescence de forme sigmoïdale depuis une valeur basale (F₀) jusqu'à une valeur maximale (F_m). La vitesse de montée de fluorescence entre F₀ et F_m est proportionnelle à l'intensité lumineuse et à la taille de l'antenne fonctionnelle des PSII. Une façon d'estimer la taille d'antenne consiste à calculer le temps nécessaire pour atteindre (F_m – F₀)/2 (valeur notée T_{1/2}). Plus la valeur de T_{1/2} est faible, plus la taille d'antenne est grande⁵⁹. Deux lumières actiniques de 630 et 660 nm ont été employées pour exciter préférentiellement la chlorophylle b, et la chlorophylle a, respectivement. Les expériences ont été à nouveau menées sur des cellules cultivées en milieu TAP ou TMP.

Les résultats obtenus montrent des différences significatives dans les tailles d'antennes chez les différentes souches en fonction des conditions d'illumination et des milieux de croissance. En milieu TAP, seul le mutant CAO KO, lorsqu'il est exposé à une lumière actinique de 660 nm, se distingue de manière significative du témoin par une antenne légèrement réduite (p-value < 0,05) (Figure 18).

Génotypes	630 nm		660 nm		Fv/Fm
	rETR	Taille antenne relative (s ⁻¹)	rETR	Taille antenne relative (s ⁻¹)	
TAP					
Ctrl	4,1 +/- 0,2	16 +/- 2	7 +/- 0,2	29 +/- 4	0,5 +/- 0,025
CP29 KO	4,4 +/- 0,06	13 +/- 0,9	7,4 +/- 0,1	23 +/- 3	0,5 +/- 0,012
CAO KO	4,2 +/- 0,01	12 +/- 0,7	7,2 +/- 0,2	20 +/- 0,9	0,5 +/- 0,006
DVR KO	0,4 +/- 0,2	ND	0,7 +/- 0,3	ND	0,09 +/- 0,02
TMP					
Ctrl	3,8 +/- 0,25	11 +/- 0,8	6,9 +/- 0,6	22 +/- 3	0,5 +/- 0,02
CP29 KO	4 +/- 0,15	12 +/- 0,9	7,1 +/- 0,4	18 +/- 1	0,5 +/- 0,03
CAO KO	4,1 +/- 0,12	8 +/- 0,7	7,3 +/- 0,3	13 +/- 2	0,5 +/- 0,01
DVR KO	2,4 +/- 0,02	8 +/- 0,8	4,5 +/- 0,2	13 +/- 1	0,3 +/- 0,02

Figure 18: Paramètres biophysiques chez le Ctrl et les mutants en milieu TAP et TMP. Les paramètres incluent le taux de transport d'électrons relatif (rETR) et les tailles d'antennes (s⁻¹) de 630 nm et 660 nm, ainsi que la fluorescence variable Fv/Fm sous conditions TAP et TMP. Les mesures sont basées sur des triplicats avec leurs écarts-types.

En milieu TMP, les souches CAO KO et DVR KO montrent des tailles d'antennes significativement plus petites (p -value < 0,05) comparées à celles du témoin et de la souche CP29 KO, mesurées à 630 et 660 nm (Figure 18). Dans les deux conditions lumineuses et dans les deux conditions de culture, le rETR des mutants CP29 KO et CAO KO sont identiques à celui de la souche Ctrl (p -value < 0,05). Cependant, pour le mutant DVR KO, le rETR est extrêmement faible en TAP et environ deux fois plus faible en TMP (Figure 18). Le mutant DVR KO, en milieu TAP, affiche un Fv/Fm très bas, de l'ordre de 0,09, comparé aux trois autres souches qui présentent un Fv/Fm d'environ 0,5. Ce Fv/Fm faible indique une inefficacité du PSII et empêche la mesure adéquate de la montée de fluorescence. Par conséquent, les valeurs de rETR sont très faibles chez le mutant DVR KO et les tailles d'antennes ne peuvent être mesurées (cf : chapitre 6.6.2) (Figure 18).

Étant donné l'impact des mutations observées sur la taille des antennes, il est intéressant de déterminer si ces modifications sont également reflétées dans le mécanisme de transition d'état (qT). L'excitation préférentielle du PSI par la lumière rouge lointaine accélère la réoxydation du pool de plastoquinones, favorisant ainsi la réouverture des centres réactionnels du PSII. Ce processus entraîne une relocalisation de complexes collecteurs de lumière (LHCs) du PSI vers le PSII, appelées transition de l'état 2 à l'état 1. Cette transition se manifeste par une augmentation de Fo (fluorescence minimale) et de Fm (fluorescence maximale). La différence entre Fm en condition d'acclimatation à l'obscurité et Fm après traitement par lumière rouge lointaine permet de quantifier l'amplitude de la transition d'état (cf : chapitre 5).

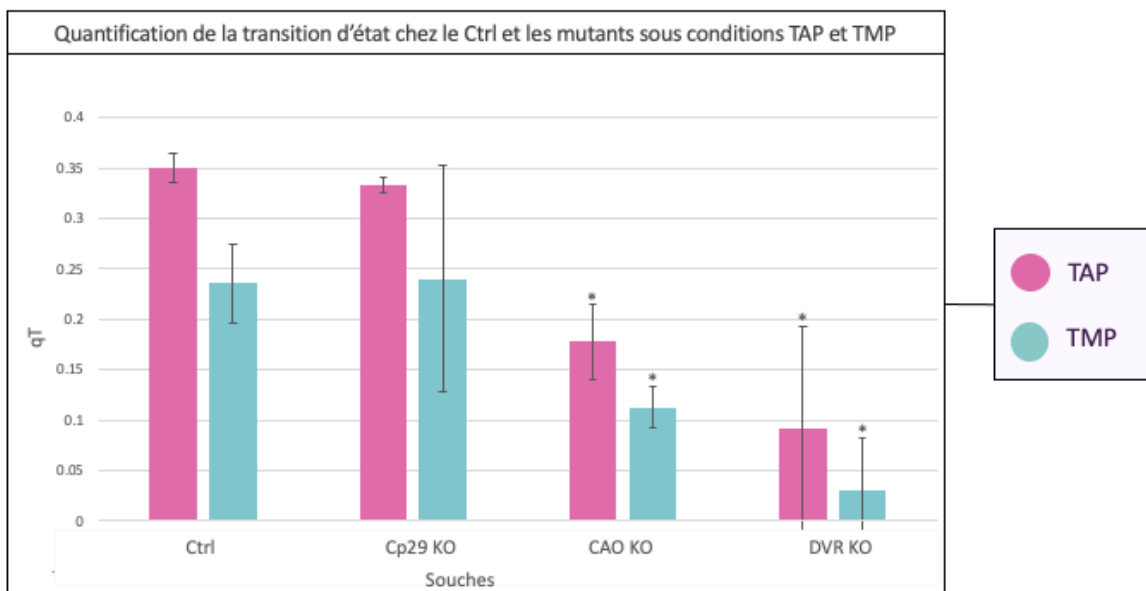


Figure 19 : Quantification de la transition d'état chez le Ctrl et les mutants sous conditions TAP (rose) et TMP (bleu). Les barres-plots représentent la moyenne des valeurs de qT pour chaque souche, avec les écarts-types issus de triplicats (n=3). Les astérisques indiquent les souches significativement différentes du Ctrl dans leurs conditions respectives (basé sur un test de Student, p -value < 0,05).

Dans les deux conditions de culture (TAP et TMP), les mutants CP29 KO ne montrent aucune différence dans l'amplitude de la transition d'état par rapport à la souche Ctrl (p -value $< 0,05$). En revanche, le mutant CAO KO présente une transition d'état réduite de près de 50 %, et le mutant DVR KO montre une diminution de plus de 75 % (p -value $< 0,05$) (Figure 19).

8 Discussion

8.1 LA PERTE DE CP29 DÉSTABILISE LE SUPERCOMPLEXE PSII IN VITRO MAIS PAS IN VIVO CHEZ *EUGLENA GRACILIS*

Dans cette étude, nous avons mis en lumière le rôle de la protéine CP29 dans la stabilisation du supercomplexe PSII-LHCII chez *Euglena gracilis*. L'analyse par électrophorèse Clear-Native PAGE a révélé que les souches knock-out pour CP29 présentaient une absence de supercomplexes PSII-LHCII, avec uniquement des centres réactionnels de PSII et des trimères LHCII₃ libres détectés (Figure 12). Ces observations suggèrent que CP29 est indispensable pour maintenir l'intégrité structurale du supercomplexe PSII-LHCII in vitro, une hypothèse renforcée par des études comparatives menées sur *Arabidopsis thaliana*⁶⁰, où les mutants CP29 ont également montré une incapacité à isoler ce supercomplexe.

Cependant, un résultat surprenant de notre étude est que, malgré l'absence apparente des supercomplexes PSII-LHCII, les souches CP29 KO n'ont montré aucun déficit significatif en termes de croissance (Figure 9) ou de photosynthèse, mesuré par rETR et Fv/Fm (Figure 18), que ce soit sous faible ou forte intensité lumineuse.

De plus, bien que CP29 soit connue pour être essentielle dans les transitions d'état chez *Chlamydomonas reinhardtii*⁶¹, nos résultats indiquent que ni la taille de l'antenne du PSII ni l'amplitude des transitions d'état ne semblent être altérées chez les mutants CP29 d'*Euglena gracilis* par rapport à la souche contrôle (Figure 18, Figure 19). Cela suggère que les LHCII₃ peuvent interagir avec le PSII via des mécanismes alternatifs en l'absence de CP29. Ces observations laissent penser que, bien que CP29 soit essentielle pour la stabilisation des supercomplexes PSII-LHCII in vitro, sa fonction in vivo, tant sur le plan structurel que photosynthétique, pourrait être compensée par d'autres protéines. À ce titre, la protéine LHCE9-3, unique à *Euglena gracilis* et identifiée par spectrométrie de masse dans toutes les bandes du PSII (Figure 16), pourrait jouer ce rôle compensatoire.

8.2 LES MUTANTS CAO KO ET DVR KO DÉPOURVUS DE LHCl₃ MONTRENT UNE SENSIBILITÉ ACCRUE À FORTE LUMIÈRE

Nos mutants CAO KO et DVR KO d'*Euglena gracilis*, dépourvus de chlorophylle b (Figure 8), montrent une sensibilité accrue à la lumière intense (Figure 9), associée à l'absence du complexe LHCl₃, et donc du supercomplexe PSII-LHCII (Figure 12). Cette observation, bien documentée chez les mutants CAO KO d'*Arabidopsis thaliana*⁶², se retrouve également chez les mutants DVR des cyanobactéries et d'*Arabidopsis*⁶³, qui accumulent de la DVChl a au lieu de la MVChl a. Bien que ces mutants puissent maintenir une croissance sous faible lumière, ils subissent des photoinhibitions sévères lorsqu'ils sont exposés à une lumière intense. Ce comportement rappelle celui d'organismes naturellement pourvus de DVChl, tels que *Prochlorococcus*⁶⁴, qui sont adaptés aux environnements aquatiques profonds où la lumière est principalement bleue, mais deviennent vulnérables sous des conditions de lumière plus intense.

La teinte vert pâle des cultures résulte d'une croissance cellulaire plus lente sous faible lumière (Figure 10), probablement due à la taille réduite des antennes du PSII (en raison de l'absence de chlorophylle b)(Figure 18) et à des défauts d'assemblage des PSII (Figure 12), aussi en raison de la substitution de la chlorophylle a par la DVChl a chez le mutants DVR KO (Figure 8). La faible teneur en néoxanthine (Figure 8), un caroténoïde clé dans la réponse au stress lumineux et la photoprotection⁵⁴, pourrait également expliquer en partie cette diminution de la tolérance à la lumière intense chez nos mutants. De plus, nos mutants CAO et DVR montrent une réduction de l'amplitude de la transition d'état (qT), un mécanisme crucial pour la photoprotection (Figure 19). La diminution du qT, qui entraîne une redistribution inefficace de l'énergie entre les photosystèmes, exacerbe la sensibilité des mutants à la lumière intense, conduisant à une croissance réduite sous ces conditions. Cette diminution du qT pourrait être liée à la perte des LHCl₃, observée dans d'autres mutants, comme les mutants sans LHCl₃ de l'orge et les doubles mutants d'*Arabidopsis*^{65,66}. Il est intéressant de noter que la perte de la transition d'état n'est pas complète, ce qui suggère que, malgré la disparition des LHCl₃, un autre mécanisme pourrait compenser cette transition, tel que le complexe antennaire LHCE (Figure 19). La perte des trimères LHCl₃ observée chez nos mutants CAO et DVR s'aligne avec ce qui a été rapporté chez d'autres organismes dépourvus de chlorophylle b, tels que le riz, *Arabidopsis*, et *Chlamydomonas reinhardtii*^{62,67,68}. Bien que la biosynthèse des sous-unités des trimères LHCl₃ ne soit pas affectée, leur stabilisation et leur assemblage dans les thylakoïdes dépendent directement de la présence de chlorophylle b⁶⁹. Cette perte a été confirmée par des analyses sur gel natif (Figure 12) et par la disparition des pics caractéristiques à 683 nm à température ambiante et à 685 nm à 77K dans les spectres in vivo (Figure 17).

La déstabilisation des supercomplexes du PSII observée sur le gel natif n'est pas surprenante, étant donné que les antennes majeures sont également déstabilisées (Figure 12) (Figure 13). La perte de LHCl₃ s'est également traduite par une réduction de la taille des antennes, affectant l'efficacité de la photosynthèse, comme le montrent les valeurs réduites de Fv/Fm et de rETR chez le mutant DVR (Figure 18). Cependant, le mutant CAO, malgré ses antennes plus petites, présente des valeurs de rETR et de Fv/Fm similaires à celles de la souche contrôle. Il est important de noter que le rETR est une mesure relative qui ne prend en compte ni le nombre de PSII ni la taille des antennes, contrairement à l'ETR absolu. La perte des bandes B1 et B2 (SC-PSII) (Figure 13) ne semble pas être compensée par une augmentation du nombre de centres réactionnels du PSII (B4 et B5, Figure 14) Il semble y avoir très peu de centres réactionnels fonctionnels et probablement un réarrangement dans la membrane des thylakoïdes, facilitant un changement dans le transfert d'électrons comme démontré chez le mutant de chlorophylle b chez le riz⁷⁰.

A température ambiante, les chlorophylles, une fois excitées, interagissent activement avec leur environnement, y compris avec les caroténoïdes et les lipides. Ces interactions permettent aux pigments de maintenir un équilibre entre plusieurs sous-niveaux d'énergie. En raison des interactions thermiques, la fluorescence observée est une moyenne de ces états, ce qui atténue les différences subtiles entre eux. Cependant, à 77K, l'énergie thermique est insuffisante pour permettre ces transitions, donc les pigments sont figés dans une configuration précise, favorisant un état électronique spécifique⁷¹, ceci expliquant en partie le décalage de 10 nm observé dans les spectres de fluorescence à 77K chez les mutants DVR. De plus, un décalage vers le rouge semble être unique à *Euglena gracilis* en raison de la présence d'antennes LHCE (décalage vers le rouge avec un maximum à environ 700 nm). Un effet additionnel, dû à l'association de la divinyl chlorophylle a avec l'antenne LHCE (composée uniquement de chlorophylle a), pourrait en partie expliquer ce décalage important du spectre vers des longueurs d'onde plus grandes à 77K^{72,73}.

Pour conclure, bien que l'absence de CP29 entraîne la déstabilisation des supercomplexes PSII-LHCl₃ in vitro, les souches knock-out n'ont pas montré de déficit apparent de la photosynthèse in vivo, ce qui suggère l'existence de mécanismes compensatoires. Parallèlement, les mutants CAO KO et DVR KO, dépourvus de chlorophylle b, montrent une sensibilité accrue à la lumière intense, due à la perte de LHCl₃, affectant ainsi la transition d'état. Pour approfondir ces observations, il serait pertinent de déterminer si des protéines alternatives, telles que LHCE9-3, peuvent compenser l'absence de CP29. Cette hypothèse pourrait être validée par cryo-microscopie électronique (Cryo-EM), une méthode permettant de visualiser les structures dans un état quasi-natif. Par ailleurs, l'effet de l'absence de chlorophylle b et de la substitution de la chlorophylle a par de la divinyl chlorophylle a chez les mutants CAO KO et DVR KO pourrait aussi être étudié par Cryo-EM. L'exploration par microscopie électronique

sur les mutants chlorophylle pourrait révéler une réorganisation de l'appareil photosynthétique, notamment des changements tels que le gonflement des membranes thylakoïdiennes ou un empilement atypique des granas. En complément, les techniques d'immunolocalisation offriraient une cartographie précise des photosystèmes au sein de ces membranes, facilitant ainsi une analyse détaillée des changements ultrastructurels.

9 Annexes

9.1 FIGURE A : SPECTRE D'ÉLUTION DES PIGMENTS D'*EUGLENA GRACILIS* (HPLC)

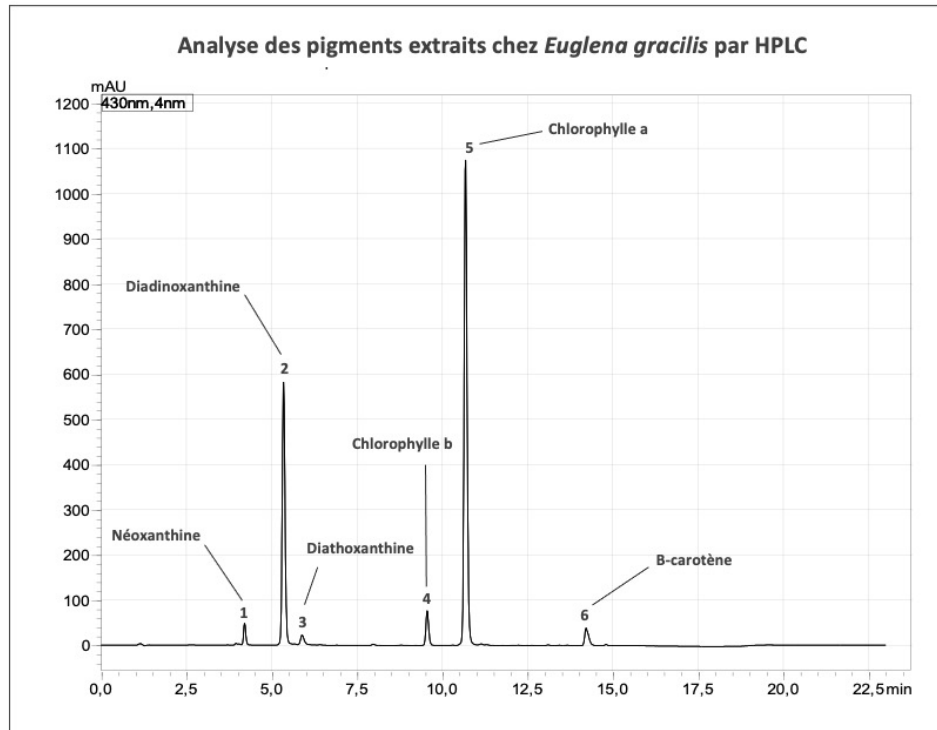


Figure A: Analyse des pigments extraits chez *E.gracilis* (Ctrl) par HPLC. Représentation d'un chromatogramme (430 nm) d'élution issu d'un extrait pigmentaire d'*E.gracilis*. Les pics identifiés sont notés de 1 à 6.

9.2 FIGURE B : ANALYSE SPECTROSCOPIQUE DES BANDES B1' ET B7' CHEZ LE CTRL

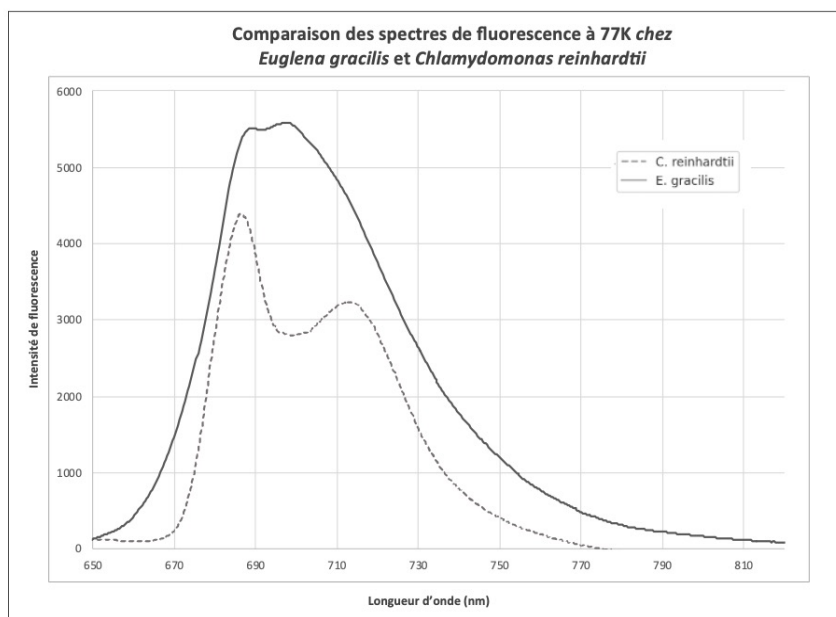


Figure B: Comparaison des spectres de fluorescence à 77K chez *E.gracilis* (Ctrl) et *C.reinhardtii*. Spectres de fluorescence (excitation $\lambda = 470$ nm) à 77 K en TMP (5ème jour de culture).(n=1).

9.3 FIGURE C : COMPARAISON DES SPECTRES DE FLUORESCENCE À 77K CHEZ *E. GRACILIS* ET *C. REINHARDTII*

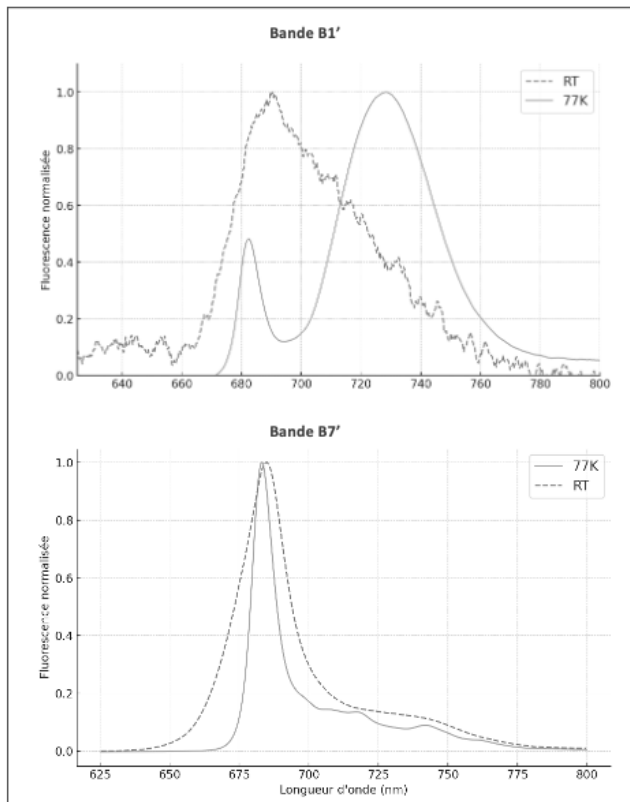


Figure C : Analyse spectroscopique des bandes B1' et B7' du hrCN-PAGE chez le témoin (Ctrl). Le graphique supérieur montre les spectres de la bande B1', et le graphique inférieur, ceux de la bande B7'. Les spectres de fluorescence à température ambiante (RT) sont en pointillé, et ceux à 77K en ligne continue. Les spectres d'absorption sont normalisés à 680 nm (absorbance de 1) et 730 nm (absorbance de 0), tandis que les spectres de fluorescence sont normalisés à leur maximum. (n=1).

10 Bibliographie

1. Hall DO, Rao K. *Photosynthesis*. Cambridge University Press; 1999.
2. Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ. Ancient Invasions: From Endosymbionts to Organelles. *Science*. 2004;304(5668):253-257. doi:10.1126/science.1094884
3. Zimorski V, Ku C, Martin WF, Gould SB. Endosymbiotic theory for organelle origins. *Curr Opin Microbiol*. 2014;22:38-48. doi:10.1016/j.mib.2014.09.008
4. Krajčovič J, Matej Vesteg, Schwartzbach SD. Euglenoid flagellates: A multifaceted biotechnology platform. *J Biotechnol*. 2015;202:135-145. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.11.035
5. Barsanti L, Gualtieri P. Anatomie d' *Euglena gracilis*. In: Konur O, ed. *Handbook of Algal Science, Technology and Medicine*. Academic Press; 2020:61-70. doi:10.1016/B978-0-12-818305-2.00004-8
6. Buetow DE. Acetate Repression of Chlorophyll Synthesis in *Euglena gracilis*. *Nature*. 1967;213(5081):1127-1128. doi:10.1038/2131127a0
7. Lonergan TA. Regulation of Cell Shape in *Euglena gracilis*. *Plant Physiol*. 1983;71(4):719-730.
8. Suzuki H, Ito Y, Yamazaki Y, Mineta K, Uji M, Abe K, Tani K, Fujiyoshi Y, Tsukita S. The four-transmembrane protein IP39 of *Euglena* forms strands by a trimeric unit repeat. *Nat Commun*. 2013;4:1766. doi: 10.1038/ncomms2731. PMID: 23612307; PMCID: PMC3644091.
9. Iseki M, Matsunaga S, Murakami A, et al. A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature*. 2002;415(6875):1047-1051. doi:10.1038/4151047a
10. Tsang ACH, Lam AT, Riedel-Kruse IH. Polygonal motion and adaptable phototaxis via flagellar beat switching in the microswimmer *Euglena gracilis*. *Nat Phys*. 2018;14(12):1216-1222. doi:10.1038/s41567-018-0277-7
11. Ascoli C, Barbi M, Frediani C, Murè A. Measurements of *Euglena* motion parameters by laser light scattering. *Biophys J*. 1978;24(3):585-599.
12. Yao R, Fu W, Du M, Chen ZX, Lei AP, Wang JX. Carotenoids Biosynthesis, Accumulation, and Applications of a Model Microalga *Euglenagracilis*. *Mar Drugs*. 2022;20(8):496. doi:10.3390/md20080496
13. Tschiersch H, Ohmann E, Doege M. Modification de la structure des thylakoïdes d' *Euglena gracilis* par traitement au norflurazon : conséquences sur l'extinction de la fluorescence. *Environ Exp Bot*. 2002;47(3):259-270. doi:10.1016/S0098-8472(01)00132-0
14. Doege M, Ohmann E, Tschiersch H. Chlorophyll fluorescence quenching in the alga *Euglena gracilis*. *Photosynth Res*. 2000;63(2):159-170. doi:10.1023/A:1006356421477
15. Renger T. Theory of excitation energy transfer: from structure to function. *Photosynth Res*. 2009;102(2):471-485. doi:10.1007/s11120-009-9472-9
16. Maeda H, Watanabe T, Kobayashi M, Ikegami I. Presence of two chlorophyll a' molecules at the core of photosystem I. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. 1992;1099(1):74-80. doi:10.1016/0005-2728(92)90189-9
17. Omata T, Murata N, Satoh K. Quinone and pheophytin in the photosynthetic reaction center II from spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. 1984;765(3):403-405. doi:10.1016/0005-2728(84)90182-8
18. Mirkovic T, Ostroumov EE, Anna JM, van Grondelle R, Govindjee, Scholes GD. Light Absorption and Energy Transfer in the Antenna Complexes of Photosynthetic Organisms. *Chem Rev*. 2017;117(2):249-293. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00002

19. Reinbothe S, Reinbothe C, Apel K, Lebedev N. Evolution of Chlorophyll Biosynthesis—The Challenge to Survive Photooxidation. *Cell*. 1996;86(5):703-705. doi:10.1016/S0092-8674(00)80144-0
20. Moss GP. Nomenclature of tetrapyrroles. *Eur J Biochem*. 1988;178(2):277-328. doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb14453.x
21. Proctor MS, Sutherland GA, Canniffe DP, Hitchcock A. The terminal enzymes of (bacterio)chlorophyll biosynthesis. *R Soc Open Sci*. 2022;9(5):211903. doi:10.1098/rsos.211903
22. Neilson J, Durnford D. Structural and functional diversification of the light-harvesting complexes in photosynthetic eukaryotes. *Photosynth Res*. 2010;106:57-71. doi:10.1007/s11120-010-9576-2
23. Pessarakli M. *Handbook of Photosynthesis, Second Edition*. CRC Press; 1996.
24. Tanaka R, Kobayashi K, Masuda T. Tetrapyrrole Metabolism in Arabidopsis thaliana. *Arab Book Am Soc Plant Biol*. 2011;9:e0145. doi:10.1199/tab.0145
25. Nagata N, Tanaka R, Tanaka A. The Major Route for Chlorophyll Synthesis Includes [3,8-divinyl]-chlorophyllide a Reduction in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*. 2007;48(12):1803-1808. doi:10.1093/pcp/pcm153
26. Beale SI. Chapter 20 - Biosynthesis of Chlorophylls and Hemes. In: Harris EH, Stern DB, Witman GB, eds. *The Chlamydomonas Sourcebook (Second Edition)*. Academic Press; 2009:731-798. doi:10.1016/B978-0-12-370873-1.00028-9
27. Tripathy BC, Pattanayak GK. Chlorophyll Biosynthesis in Higher Plants. In: Eaton-Rye JJ, Tripathy BC, Sharkey TD, eds. *Photosynthesis: Plastid Biology, Energy Conversion and Carbon Assimilation*. Springer Netherlands; 2012:63-94. doi:10.1007/978-94-007-1579-0_3
28. Minagawa J, Takahashi Y. Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins. *Photosynth Res*. 2004;82(3):241-263. doi:10.1007/s11120-004-2079-2
29. Enami I, Okumura A, Nagao R, Suzuki T, Iwai M, Shen JR. Structures and functions of the extrinsic proteins of photosystem II from different species. *Photosynth Res*. 2008;98(1):349-363. doi:10.1007/s11120-008-9343-9
30. Sobotka R, Esson HJ, Konik P, et al. Extensive gain and loss of photosystem I subunits in chromerid algae, photosynthetic relatives of apicomplexans. *Sci Rep*. 2017;7(1):13214. doi:10.1038/s41598-017-13575-x
31. Suzuki T, Tada O, Makimura M, et al. Isolation and Characterization of Oxygen-Evolving Photosystem II Complexes Retaining the PsbO, P and Q Proteins from Euglena gracilis. *Plant Cell Physiol*. 2004;45(9):1168-1175. doi:10.1093/pcp/pch131
32. Busch A, Hippler M. The structure and function of eukaryotic photosystem I. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. 2011;1807(8):864-877. doi:10.1016/j.bbabi.2010.09.009
33. Bag P. Light Harvesting in Fluctuating Environments: Evolution and Function of Antenna Proteins across Photosynthetic Lineage. *Plants*. 2021;10(6):1184. doi:10.3390/plants10061184
34. Koziol AG, Borza T, Ishida KI, Keeling P, Lee RW, Durnford DG. Tracing the Evolution of the Light-Harvesting Antennae in Chlorophyll a/b-Containing Organisms. *Plant Physiol*. 2007;143(4):1802-1816. doi:10.1104/pp.106.092536
35. Sheng X, Watanabe A, Li A, et al. Structural insight into light harvesting for photosystem II in green algae. *Nat Plants*. 2019;5(12):1320-1330. doi:10.1038/s41477-019-0543-4
36. Sheng X, Liu Z, Kim E, Minagawa J. Plant and Algal PSII-LHCII Supercomplexes: Structure, Evolution and Energy Transfer. *Plant Cell Physiol*. 2021;62(7):1108-1120. doi:10.1093/pcp/pcab072
37. Koziol AG, Durnford DG. Euglena Light-Harvesting Complexes Are Encoded by Multifarious Polyprotein mRNAs that Evolve in Concert. *Mol Biol Evol*. 2008;25(1):92-100. doi:10.1093/molbev/msm232

38. Kargul, J. and Barber, J. Photosynthetic acclimation: Structural reorganisation of light harvesting antenna – role of redox-dependent phosphorylation of major and minor chlorophyll a/b binding proteins. *The FEBS Journal*. 2008; 275: 1056-1068. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06262.x>.
39. Shen L, Huang Z, Chang S, et al. Structure of a C2S2M2N2-type PSII–LHCII supercomplex from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci*. 2019;116(42):21246-21255. doi:10.1073/pnas.1912462116
40. Damkjær JT, Kereiche S, Johnson MP, et al. The Photosystem II Light-Harvesting Protein Lhcb3 Affects the Macrostructure of Photosystem II and the Rate of State Transitions in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2009;21(10):3245-3256. doi:10.1105/tpc.108.064006
41. Kargul J, Turkina MV, Nield J, Benson S, Vener AV, Barber J. Light-harvesting complex II protein CP29 binds to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* under State 2 conditions. *FEBS J*. 2005;272(18):4797-4806. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04894.x
42. Gerle C, Misumi Y, Kawamoto A, et al. Three structures of PSI-LHCI from *Chlamydomonas reinhardtii* suggest a resting state re-activated by ferredoxin. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. 2023;1864(4):148986. doi:10.1016/j.bbabi.2023.148986
43. Su X, Ma J, Pan X, et al. Antenna arrangement and energy transfer pathways of a green algal photosystem-I–LHCI supercomplex. *Nat Plants*. 2019;5(3):273-281. doi:10.1038/s41477-019-0380-5
44. Ozawa S ichiro, Onishi T, Takahashi Y. Identification and Characterization of an Assembly Intermediate Subcomplex of Photosystem I in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii**. *J Biol Chem*. 2010;285(26):20072-20079. doi:10.1074/jbc.M109.098954
45. Kubota-Kawai H, Burton-Smith RN, Tokutsu R, et al. Ten antenna proteins are associated with the core in the supramolecular organization of the photosystem I supercomplex in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*. 2019;294(12):4304-4314. doi:10.1074/jbc.RA118.006536
46. Muller P, Li X, Niyogi KK. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiol*. 2001;125(4):1558-1566.
47. Gorman DS, Levine RP. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1965;54(6):1665-1669.
48. Gervasi A. Caractérisation et étude de la motilité et du phototactisme de *Chlamydomonas reinhardtii* et *Euglena gracilis* exposées à différentes intensités lumineuses. Mémoire de maîtrise. Université de Liège. 2021-2022. <http://hdl.handle.net/2268.2/16397>.
49. Farnebäck G. Two-Frame Motion Estimation Based on Polynomial Expansion. In: Bigun J, Gustavsson T, eds. *Image Analysis*. Springer; 2003:363-370. doi:10.1007/3-540-45103-X_50
50. Vivó-Truyols G, Schoenmakers PJ. Automatic Selection of Optimal Savitzky–Golay Smoothing. *Anal Chem*. 2006;78(13):4598-4608. doi:10.1021/ac0600196
51. Wittig I, Karas M, Schägger H. High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes. *Mol Cell Proteomics*. 2007;6(7):1215-1225. doi:10.1074/mcp.M700076-MCP200
52. Oquist G, Chow WS. On the relationship between the quantum yield of Photosystem II electron transport, as determined by chlorophyll fluorescence and the quantum yield of CO₂-dependent O₂ evolution. *Photosynth Res*. 1992;33(1):51-62. doi:10.1007/BF00032982
53. Forêt, H. Caractérisation spectroscopique des adaptations de la photosynthèse dans le rouge lointain chez *Euglena gracilis* et *Vitrella brassicaformis*. Université de Liège. 2023. <https://matheo.uliege.be/handle/2268.2/1850>.
54. Kolackova M, Janova A, Dobesova M, et al. Role of secondary metabolites in distressed microalgae. *Environ Res*. 2023;224:115392. doi:10.1016/j.envres.2023.115392

55. Komatsu H, Wada K, Kanjoh T, et al. Unique chlorophylls in picoplankton *Prochlorococcus* sp. "Physicochemical properties of divinyl chlorophylls, and the discovery of monovinyl chlorophyll b as well as divinyl chlorophyll b in the species *Prochlorococcus* NIES-2086." *Photosynth Res.* 2016;130(1):445-467. doi:10.1007/s11120-016-0283-5
56. Lamb JJ, Røkke G, Hohmann-Marriott MF. Chlorophyll fluorescence emission spectroscopy of oxygenic organisms at 77 K. *Photosynthetica.* 2018;56(1):105-124. doi:10.1007/s11099-018-0791-y
57. Krause GH, Weis E. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. *Photosynth Res.* 1984;5(2):139-157. doi:10.1007/BF00028527
58. Nagao R, Yokono M, Kato KH, Ueno Y, Shen JR, Akimoto S. High-light modification of excitation-energy-relaxation processes in the green flagellate *Euglena gracilis*. *Photosynth Res.* 2021;149(3):303-311. doi:10.1007/s11120-021-00849-9
59. de Marchin T, Ghysels B, Nicolay S, Franck F. Analysis of PSII antenna size heterogeneity of *Chlamydomonas reinhardtii* during state transitions. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* 2014;1837(1):121-130. doi:10.1016/j.bbabi.2013.07.009
60. Yakushevskaya A. E., Keegstra, W., Boekema, E. J., Dekker, J. P., Andersson, J., Jansson, S., ... Ruban, A. V. The structure of photosystem II in Arabidopsis: Localization of the CP26 and CP29 antenna complexes. *Biochemistry.* 2003; 42(3), 608-613. DOI: 10.1021/bi027109z
61. Tokutsu R, Iwai M, Minagawa J. CP29, a Monomeric Light-harvesting Complex II Protein, Is Essential for State Transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem.* 2009;284(12):7777-7782. doi:10.1074/jbc.M809360200
62. Wójtowicz J, Jagielski AK, Mostowska A, Gieczewska KB. Compensation Mechanism of the Photosynthetic Apparatus in Arabidopsis thaliana ch1 Mutants. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1):221. doi:10.3390/ijms22010221
63. Nagata N, Tanaka R, Satoh S, Tanaka A. Identification of a Vinyl Reductase Gene for Chlorophyll Synthesis in Arabidopsis thaliana and Implications for the Evolution of Prochlorococcus Species. *Plant Cell.* 2005;17(1):233-240. doi:10.1105/tpc.104.027276
64. Ito H, Tanaka A. Evolution of a divinyl chlorophyll-based photosystem in Prochlorococcus. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(44):18014-18019. doi:10.1073/pnas.1107590108
65. Havaux M, Dall'Osto L, Bassi R. Zeaxanthin Has Enhanced Antioxidant Capacity with Respect to All Other Xanthophylls in Arabidopsis Leaves and Functions Independent of Binding to PSII Antennae. *Plant Physiol.* 2007;145(4):1506-1520. doi:10.1104/pp.107.108480
66. Hartel H, Lokstein H, Grimm B, Rank B. Kinetic Studies on the Xanthophyll Cycle in Barley Leaves. *Plant Physiol.* 1996; 110: 471-482.
67. Bujaldon S, Kodama N, Rappaport F, et al. Functional Accumulation of Antenna Proteins in Chlorophyll b-Less Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Plant.* 2017;10(1):115-130. doi:10.1016/j.molp.2016.10.001
68. Morita R, Kusaba M, Yamaguchi H, et al. Characterization of Chlorophyllide a Oxygenase (CAO) in Rice. *Breed Sci.* 2005;55(3):361-364. doi:10.1270/jsbbs.55.361
69. Preiss S, Thornber JP. Stability of the Apoproteins of light-Harvesting Complex I and II during Biogenesis of Thylakoids in the Chlorophyll 6-less Barley Mutant Chlorina f2'. *Plant Physiol.* 1995; 107: 709-717.
70. Chen X, Zhang W, Xie Y, Lu W, Zhang R. Comparative proteomics of thylakoid membrane from a chlorophyll b-less rice mutant and its wild type. *Plant Sci.* 2007;173:397-407. doi:10.1016/j.plantsci.2007.06.012
71. Liu H, Ruan M, Mao P, Wang Z, Chen H, Weng Y. Unraveling the excited-state vibrational cooling dynamics of chlorophyll-a using femtosecond broadband fluorescence spectroscopy. *J Chem Phys.* 2024;160(20):205101. doi:10.1063/5.0203819
72. Brown JS, French CS. The Long Wave Length Forms of Chlorophyll a. *Biophys J.* 1961;1(7):539-550.

73. Doege M, Ohmann E, Tschiersch H. Chlorophyll fluorescence quenching in the alga *Euglena gracilis*. *Photosynth Res.* 2000;63(2):159-170. doi:10.1023/A:1006356421477