

---

## **Analyse du métabolisme de l'acétate chez *Chlamydomonas reinhardtii***

**Auteur** : Giltay, Axel

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

**Faculté** : Faculté des Sciences

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

**Année académique** : 2016-2017

**URI/URL** : <http://hdl.handle.net/2268.2/2450>

---

### *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.*

---



Faculté des sciences, ULg

*Analyse du métabolisme de l'acétate  
chez Chlamydomonas reinhardtii*

Laboratoire de génétique des micro-algues

Promotrice : Professeur C. Remacle

Mémoire réalisé par **Giltay Axel**  
en vue de l'obtention du diplôme de master en  
biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Année académique 2016 - 2017

# Table des matières

<b>I. Introduction</b> .....	5
a. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	5
b. Métabolisme de l'acétate.....	6
c. Banque de mutants insertionnels.....	8
d. Analyse-omique du métabolisme de l'acétate : projet BAMBI .....	10
<b>II. But</b> .....	15
<b>III. Matériel et méthodes</b> .....	16
1. Matériel .....	16
a. Milieux .....	16
b. Amorces oligonucléotidiques .....	16
c. Multicultivateur .....	17
2. Méthodes .....	18
a. Extraction d'ADN/ARN chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	18
b. PCR.....	19
c. TAIL-PCR.....	20
d. Northern Blot.....	21
e. Western Blot.....	23
f. Dosage de la chlorophylle .....	25
g. Dosage de l'amidon .....	25
h. Dosage des protéines .....	26
i. Mesures de dégagement d'O <sub>2</sub> à l'oxygraphe .....	26
<b>IV. Résultats</b> .....	28
1. Caractérisation du mutant de la malate synthase .....	28
a. Croissance du mutant sur milieu paromomycine.....	28
b. PCR de confirmation du site d'insertion de la cassette.....	29
c. Analyse de la croissance sous différentes conditions lumineuses .....	31
d. Northern Blot .....	32
e. TAIL-PCR .....	33
2. Analyse du métabolisme de l'acétate .....	34
i. Analyse de la différence entre phase stationnaire et phase exponentielle.....	34

a. Rôle de l'autophagie.....	34
b. Mesures de dégagement d'oxygène des cultures.....	37
ii. Analyses métaboliques complémentaires.....	39
<b>V. Discussion/conclusion, perspectives .....</b>	<b>42</b>
1. Mutant de la malate synthase.....	42
2. Analyses métaboliques de l'acétate.....	43
<b>Bibliographie.....</b>	<b>47</b>

# Résumé

Lors de mon mémoire, je me suis intéressé au métabolisme de l'acétate chez *Chlamydomonas reinhartii*. En effet, cette algue verte pousse en condition phototrophe (lumière + CO<sub>2</sub>), mixotrophe (lumière + acétate) et hétérotrophe (à l'obscurité) en métabolisant l'acétate. Lors de la culture en présence d'acétate, la concentration usuelle est de 17mM, et nous possédons peu d'informations sur la réponse cellulaire à de plus hautes concentrations en acétate. Je me suis donc penché sur l'analyse du métabolisme de l'acétate en comparant les résultats métaboliques et physiologiques de la culture de *Chlamydomonas* en concentration faible (17mM) et élevée (57,5mM) en acétate, ainsi que sur l'étude d'un mutant d'une enzyme du cycle du glyoxylate.

La première partie consiste en l'étude d'un mutant d'une enzyme du cycle du glyoxylate, la malate synthase, obtenu hors de la banque de mutants insertionnels CLIP.

Dans la deuxième partie, je dispose d'une analyse transcriptomique de la réponse de *Chlamydomonas* à des concentrations en acétate plus élevées que la concentration habituellement utilisée (projet européen BAMBI). J'ai tenté de valider l'analyse transcriptomique par des techniques de biologie moléculaire et de biochimies. Pour ce faire je me suis intéressé à l'autophagie, en particulier à la différence du niveau d'expression de la protéine ATG8 (Western Blot) entre les algues cultivées en présence de 17 mM en acétate et les algues cultivées en présence de 57,5 mM en acétate. J'ai également analysé la photosynthèse (dégagement d'O<sub>2</sub>), dans ces deux conditions de culture.

J'ai également réalisé des analyses métaboliques complémentaires de ces algues cultivées dans les deux concentrations en acétate (17 et 57,5 mM). Dans cette optique, j'ai dosé la chlorophylle, les protéines totales, l'amidon ainsi que le poids sec, afin de voir s'il y a une différence de production de biomasse entre ces deux conditions de culture.

## **Remerciement**

Avant de débiter, je voudrais adresser mes remerciements à plusieurs personnes. Premièrement, et tout particulièrement, au Professeur Claire Remacle pour le temps qu'elle m'a consacré, pour les explications et les relectures de mon mémoire ainsi que pour son investissement et son engagement envers tous les projets de son laboratoire. Ensuite à Nadine Coosemans et Michel Radoux pour leurs précieux conseils et leurs aides lors des manipulations. Je remercie également les professeurs Cardol et Franck pour leurs précisions et éclaircissements sur les résultats de photosynthèse. Finalement je remercie tous les doctorants et post-doctorants du laboratoire pour leur accueil chaleureux et leur sympathie.

# I. Introduction

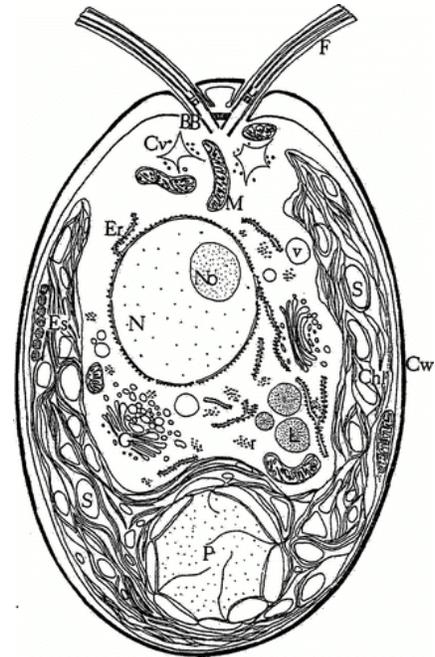
## a. *Chlamydomonas reinhardtii*

*Chlamydomonas reinhardtii* est une algue verte unicellulaire eucaryote d'une longueur de 6 à 10 µm. Elle possède deux flagelles, un chloroplaste unique, un noyau haploïde ainsi que de nombreuses mitochondries (Harris 2001). Elle se divise de manière asexuée la plupart du temps. En période de stress, comme par exemple en cas de carence azotée, elle peut se diviser de façon sexuée. A ce moment, des cellules de sexe opposé (mt+ et mt-) se différencient en gamètes et fusionnent pour former des zygotes (Harris 2001). Le zygote subira la méiose quand les conditions seront redevenues favorables et donnera 2 cellules mt+ et 2 cellules mt-.

Elle constitue un modèle en laboratoire pour plusieurs raisons :

- Elle est aisément cultivée à la lumière ou à l'obscurité.
- A la lumière, elle croît en présence de CO<sub>2</sub> atmosphérique (croissance phototrophe) ou en présence d'une source additionnelle de carbone comme l'acétate (croissance mixotrophe).
- A l'obscurité, elle croît uniquement grâce à la métabolisation de l'acétate (croissance hétérotrophe).
- Ses trois génomes ont été séquencés et peuvent être manipulés par transformation génétique (Harris 2001).
- Récemment une banque de 54000 mutants insertionnels taggés couvrant 80% du génome a été mise à la disposition des chercheurs (Li et al., 2016) (<https://www.chlamylibrary.org>) (cf. point c de l'introduction).

Harris 2001

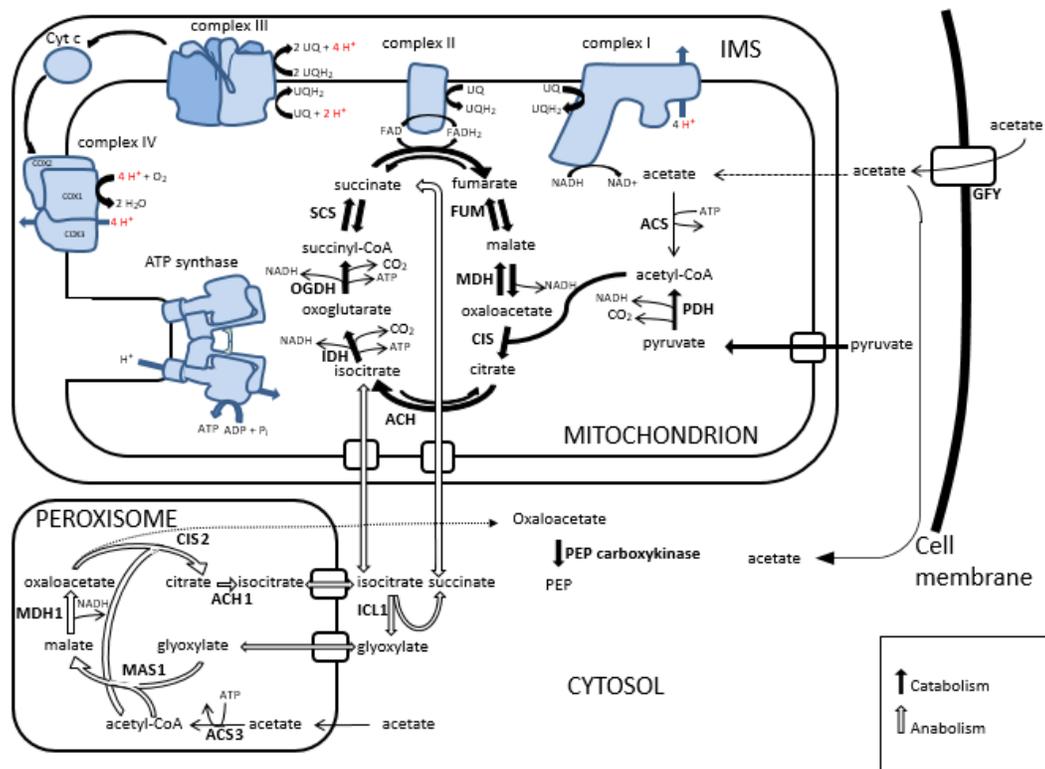


**Figure 1.** *Chlamydomonas reinhardtii*. BB, Corps basaux ; Chl, chloroplastes ; Cv, vacuole contractile ; Cw, parois cellulaire ; Er, réticulum endoplasmique ; F, flagelle ; G, appareil de Golgi ; L, corps lipidique ; M, mitochondrie ; N, noyau ; No, nucléole ; P, pyrénoides ; r, ribosomes ; S, grain d'amidon ; v, vacuole.

## b. Métabolisme de l'acétate

L'acétate est une source de carbone (C<sub>2</sub>) produit aussi bien chimiquement que biologiquement, par exemple par fermentation notamment chez *Chlamydomonas* (Yang et al., 2014), et est métabolisé par certaines micro-algues, en particulier les Chlorophycées.

En condition hétérotrophe, l'ATP est fourni par la phosphorylation oxydative et l'augmentation de la biomasse dépend du cycle du glyoxylate, où l'étape de production de CO<sub>2</sub> du cycle de Krebs est évitée, ce qui conduit à une assimilation nette de carbone (Johnson & Alric, 2012) (**figure 2**). En condition mixotrophe (lumière + acétate), l'assimilation du CO<sub>2</sub> via la photosynthèse conduit également à la production de biomasse, bien que l'activité photosynthétique semble réduite comparativement à la phototrophie dans les conditions décrites par (Heifetz et al., 2000).



**Figure 2.** Schéma représentant le métabolisme de l'acétate (adapté de Massoz et al. 2017). ACS : acétyl-CoA synthase ; MAS : malate synthase ; MDH : malate déshydrogénase ; CIS : citrate synthase ; ACH : aconitase hydratase ; ICL : isocitrate lyase ; PDH : pyruvate déshydrogénase ; IDH : isocitrate déshydrogénase ; OGDH : α-cétoglutarate déshydrogénase ; SCS : succinyl-coenzyme A synthétase ; FUM : fumarase

La prise de l'acétate extracellulaire se fait de manière ATP-dépendante. Cinq transporteurs putatifs de l'acétate ont été identifiés chez *Chlamydomonas* (Goodenough et al., 2014). Ces transporteurs appartiennent à la famille GRP1/FUN34/Yaa (GFY sur la **figure 2**) présente chez les bactéries et les champignons (Massoz et al., 2017). L'acétate est ensuite condensé, avec la coenzyme A, en acétyl-coenzyme A (acetyl-CoA), suivant deux voies possibles : une conversion directe par le biais de l'acétyl-CoA synthétase (ACS, sur la **figure 2**), ou par une réaction en deux temps, employant l'acétate kinase (ACK) et la phosphate acétyltransferase (PAT) (Johnson & Alric, 2012). Cette deuxième voie fonctionne principalement dans le sens de la fermentation, donc dans le sens de la production d'acétate à partir de l'acétyl-CoA (Yang et al., 2014), et n'est pas décrite dans la **figure 2**.

L'acétyl-CoA produit à partir de l'acétate entre dans le cycle du glyoxylate (Kornberg & Krebs, 1957). Ce cycle se déroule principalement dans le glyoxysome/peroxysome chez *Chlamydomonas* (Lauersen et al., 2016), puisque sur les six isoformes enzymatiques spécifiques de ce cycle (citrate synthase : CIS2, aconitase hydratase : ACH1, isocitrate lyase : ICL1, malate synthase : MAS1, malate déshydrogénase : MDH1, acétyl-CoA synthase : ACS3) cinq sont localisés dans le peroxysome. Seul l'isocitrate lyase (ICL1) est cytosolique (**figure 2**).

Contrairement au cycle de Krebs qui produit du CO<sub>2</sub>, le cycle du glyoxylate évite la production de celui-ci en court-circuitant les étapes oxydatives du cycle de Krebs (transformation de l'isocitrate en succinate, cf. **figure 2**). En effet, quand l'isocitrate prend le chemin du cycle du glyoxylate, il est clivé en succinate et glyoxylate sous l'action de l'isocitrate lyase (ICL1), puis condensé en malate en présence de l'acétyl-CoA sous l'action de la malate synthase (MAS1), ces deux enzymes étant spécifiques du cycle du glyoxylate. Le malate est ensuite converti en oxaloacétate par la malate déshydrogénase (MDH1). L'oxaloacétate peut être exporté dans le cytosol où il peut être transformé en phosphoénolpyruvate (PEP) par l'action de la PEP carboxykinase. Ceci est la première étape de la gluconéogenèse qui conduit à la synthèse de glucose (Johnson & Alric, 2012). Malate et oxaloacétate peuvent aussi servir à la synthèse d'acides aminés (Kornberg & Krebs, 1957).

Dans la mitochondrie, l'acétyl-CoA produit à partir du pyruvate par la pyruvate déshydrogénase (PDH) et à partir de l'acétate alimente le cycle de Krebs (ou cycle des acides tricarboxyliques - TCA) qui produit du NADH et libère les carbones de l'acétate sous forme de CO<sub>2</sub> comme indiqué dans la **figure 2**. Le NADH est utilisé pour la phosphorylation oxydative, donc pour la production d'ATP afin de répondre aux besoins énergétiques de la cellule (Johnson & Alric, 2012).

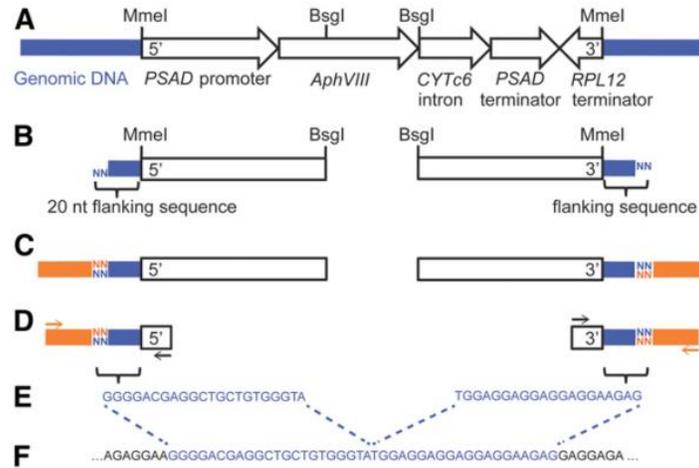
### c. Banque de mutants insertionnels

L'utilisation de *Chlamydomonas* comme organisme modèle d'un point de vue génétique est limitée par la difficulté à obtenir des mutants ciblés. En effet, la recombinaison homologue se produit à faible fréquence et on ne peut donc pas réaliser de mutagenèse dirigée chez *Chlamydomonas*. Les autres techniques visant à cibler des gènes d'intérêt, basées par exemple sur les nucléases à doigts de zinc (Sizova et al., 2013) ou le système CRISPR/Cas9 (Cong et al., 2013) ne sont pas encore utilisables en routine.

La création de banques de mutants insertionnels est donc un outil très important pour les études visant à élucider la fonction des gènes. Dans ce cas, une cassette de résistance à un antibiotique (paromomycine, hygromycine) est insérée de manière aléatoire dans le génome de l'algue. La localisation de la région d'insertion de la cassette se fait par des techniques moléculaires. Une des techniques couramment utilisée est la technique de TAIL-PCR (pour Thermal Asymmetric InterLaced PCR), efficace pour amplifier des fragments d'ADN adjacents au marqueur de sélection (Dent et al., 2005). Cette technique est basée sur 3 PCR successives où les températures d'hybridation des amorces sont de plus en plus hautes afin de favoriser l'amplification de produits spécifiques en fin d'expérience. Les amorces sont de deux types : amorces spécifiques localisées dans la cassette de résistance et amorces dégénérées qui s'hybrident de manière aléatoire. La 3<sup>e</sup> PCR permet en général l'amplification d'un seul produit comprenant une extrémité de la cassette et la séquence adjacente. Le produit de PCR est séquencé et comparé par BLAST au génome de *Chlamydomonas*, ce qui permet d'identifier la région d'insertion de la cassette et donc le gène inactivé.

Jusqu'il y a peu, les méthodes d'obtention des séquences flanquant l'insertion, telle que la méthode décrite ci-dessus et couramment utilisée au laboratoire (Emonds-Alt et al., 2016), avaient un débit trop lent pour cartographier les centaines de sites d'insertions nécessaires à l'obtention d'une banque cartographiée et indexée. Des stratégies visant à déterminer les coordonnées physiques des sites d'insertions dans une grande collection de mutants ont donc été développées. D'abord, une méthode d'identification aisée des sites d'insertions a été développée (Zhang et al., 2014). Un nouveau protocole, ChlaMmeSeq (pour *Chlamydomonas Mmel*-based insertion site Sequencing) qui repose sur l'identification de séquences adjacentes à la cassette d'insertion a été mis au point. Dans ce protocole, l'ADN génomique des transformants est digéré par *Mmel* (un site à chaque extrémité de la cassette de résistance) et *Bgsl* (présent dans la cassette), l'enzyme

*MmeI* générant des extrémités contenant 20 à 21 pb de la région d'insertion dont 2 nt simple brin à l'extrémité du fragment. Un adaptateur est alors ligé aux produits de digestion et le séquençage a lieu après amplification par PCR. Les séquences de 20 à 21 nt sont ensuite mappées sur le génome de *Chlamydomonas* (**figure 3**). On peut utiliser du séquençage haut débit sur des pools de mutants dans le cas d'analyses high-throughput (Li et al., 2016) sur des pools de mutants indexés.



**Figure 3.** (Zhang et al., 2014) Stratégie de mapping des sites d'insertions de la cassette de résistance. **(A)** La cassette utilisée pour la transformation de *Chlamydomonas* mesure 2660 pb et est composée d'un promoteur PSAD, d'un gène conférant la résistance à la paromomycine AphVIII, d'un intron CYTc6, et de deux terminateurs PSAD et RPL12 dans des orientations opposées. Les portions bleues représentent l'ADN génomique. **(B)** La double digestion de l'ADN génomique du mutant avec *MmeI* et *BsgI* produit des fragments de 1121 pb de chaque côté de la cassette, contenant 20 à 21 pb d'ADN génomique flanquant la cassette avec 2 nt libres. **(C)** Un adaptateur (orange) qui contient les sites de liaison pour les primers de PCR et de séquençage est lié aux produits de digestion. **(D)** La séquence résultante est amplifiée par PCR avec les primers se liant sur la cassette et sur l'adaptateur (flèche noir et orange). **(E)** Les produits de PCR sont séquencés par Sanger ou Illumina (pour respectivement séquençage individuel ou de mutants poolés). **(F)** Les 20 ou 21 pb flanquant la cassette sont mappés sur le génome de *Chlamydomonas reinhardtii* pour identifier le site de chaque insertion.

Ces chercheurs ont également développé une procédure robotique à haut débit pour le repiquage des colonies, la multiplication des mutants, la cryoconservation et le pooling des mutants pour la cartographie des sites d'insertions.

## d. Analyse-omique du métabolisme de l'acétate : projet BAMBI

BAMBI est l'acronyme de « Bottom-up Approches to Machines dedicated to Bayesian Interence ». Ce projet européen (FP7, FET-OPEN, Future and Emerging Technologies, GA 618024, 2014-2016) a notamment pour but d'analyser la réponse cellulaire de souches algales à différentes variations de l'environnement, du point de vue transcriptionnel et métabolique. Un des aspects étudiés concerne l'impact de la variation de la concentration en acétate sur la croissance algale.

La concentration usuelle de l'acétate utilisée pour la croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* est de 17mM (Harris, 1989). Cependant les informations concernant la réponse de *Chlamydomonas* aux concentrations élevées en acétate sont rares et il est souvent admis que de hautes concentrations en acétates sont létales ou, au moins, non favorables.

Dans l'optique de caractériser la réponse de *Chlamydomonas* aux concentrations élevées en acétate, des cellules de micro-algues ont été cultivées en culture liquide en utilisant différentes concentrations en acétate (17mM - 31mM - 44mM - 57,5mM) durant une exposition à la lumière constante de  $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Les échantillons ont été prélevés à 5 temps différents (18h-28h-50h-70h-145h) et des études métaboliques et transcriptomiques ont été réalisées. Pour les données transcriptomiques, 3 séquençages haut débit (RNA seq) ont été réalisés par temps et par concentration. Après vérification de la qualité des reads, le point 145h a dû être écarté. Pour la plupart des points de prélèvements, les 3 échantillons biologiques ont été gardés et les FPKM (fragments per kilobase of exon per million reads) ont été moyennés pour les analyses (rapport du projet européen, travail réalisé par K. Bogaert). Les correspondances entre les échantillons et les abréviations utilisées dans la **figure 4** (ainsi que tout au long du manuscrit) sont présentées ci-dessous :

ac1 = 17mM en acétate

ac2 = 31 mM en acétate

ac3 = 44 mM en acétate

ac4 = 57,5 mM en acétate

t1 = 12H, t2 = 28H, t3 = 50H et t4 = 70H

L'approche utilisée pour l'analyse des données transcriptomiques est appelée « Surprisal analysis » (Remacle et al., 2010) (Remacle & Levine, 2015). Cette approche procure une

connaissance et une caractérisation quantitative du niveau d'expression des gènes, en utilisant une approche globale.

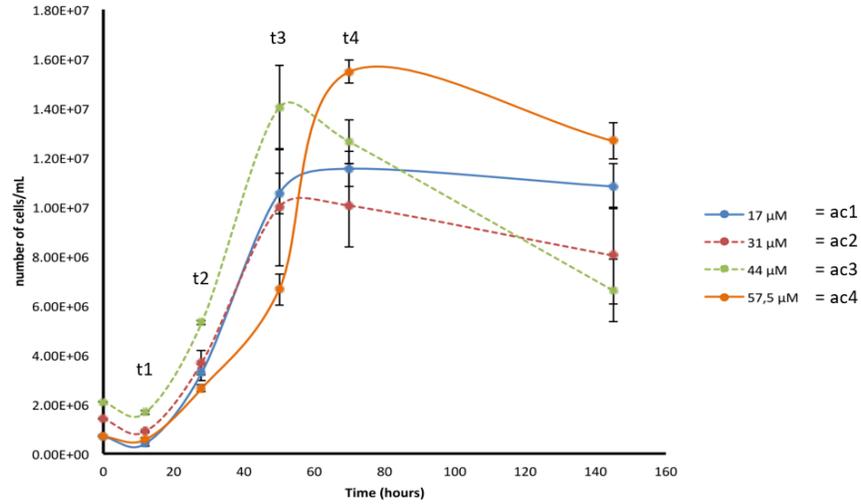
Cette méthode permet de définir un « balanced state » ( $\lambda_0$ ) (**figure 5.A**) où la valeur des transcrits est proche pour tous les échantillons. De plus, les analyses permettent d'identifier des contraintes additionnelles ( $\lambda_1$  et  $\lambda_2$ ) qui sont nécessaires pour quantifier la déviation due aux différentes conditions de croissance, le tout dans le respect du « balanced state ».

La première contrainte ( $\lambda_1$ ) caractérise la séparation des phénotypes sur base de la phase de croissance : stationnaire pour les  $\lambda_1$  négatifs (ac1t3, ac1t4, ac2t3, ac2t4, ac3t3, ac3t4, ac4t4) et exponentielle pour les  $\lambda_1$  positifs (ac1t1, ac1t2, ac2t1, ac2t2, ac3t1, ac3t2, ac4t1, ac4t2, ac4t3) (**figure 5.B**).

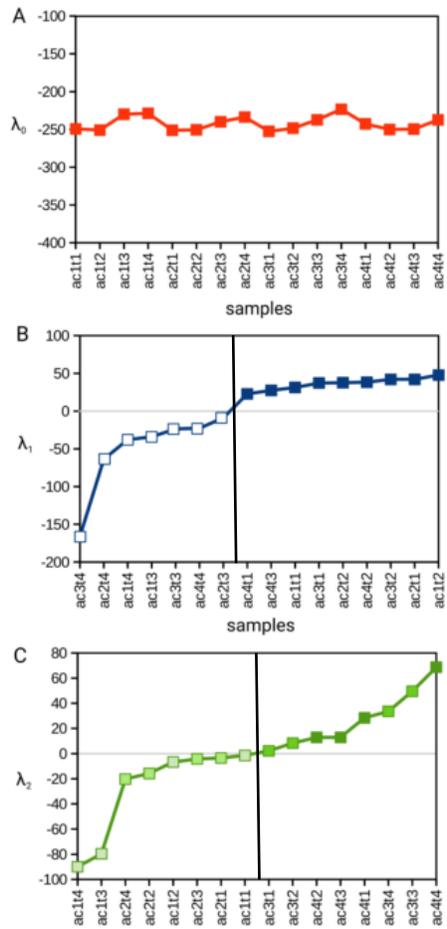
La seconde contrainte ( $\lambda_2$ ) caractérise la séparation des phénotypes sur base de la concentration en acétate : concentrations élevées (44 et 57,5 mM) pour les  $\lambda_2$  positifs (ac3t1, ac3t2, ac3t3, ac3t4, ac4t1, ac4t2, ac4t3, ac4t4) et basses (17 et 31 mM) pour les  $\lambda_2$  négatifs (ac1t1, ac1t2, ac1t3, ac1t4, ac2t1, ac2t2, ac2t3, ac2t4) (**figure 5.C**).

En effet, en regardant les courbes de croissance des différents échantillons (**figure 4**), nous remarquons que les échantillons ayant une valeur négative de  $\lambda_1$  (**figure 5**), se trouvent en phase stationnaire, alors que les échantillons ayant une valeur positive de  $\lambda_1$  (**figure 5**) sont dans une phase exponentielle.

De la même manière, les échantillons ayant une valeur négative pour  $\lambda_2$  (**figure 5**) ont une concentration en acétate faible (ac1 et ac2), et les échantillons ayant une valeur positive pour  $\lambda_2$  (**figure 5**) ont une concentration en acétate élevée (ac3 et ac4).



**Figure 4.** Courbes de croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* à 4 concentrations en acétate différentes (17 – 31 – 44 - 57,5 mM) sous des conditions de lumière continue ( $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et de température ( $25^\circ\text{C}$ ). (rapport d'activité de BAMBI).



**Figure 5.** Valeurs Lagrangiennes pour (A) le « balanced state ( $\lambda_0$ ) », (B) la première contrainte ( $\lambda_1$ ), (C) et la seconde contrainte ( $\lambda_2$ ). (rapport d'activité de BAMBI).  $t_1=12\text{H}$ ,  $t_2=28\text{H}$ ,  $t_3=50\text{H}$ ,  $t_4=70\text{H}$ ,  $ac_1=17\text{mM}$ ,  $ac_2=31\text{mM}$ ,  $ac_3=44 \text{ mM}$  et  $ac_4=57.5\text{mM}$  en acétate.

A partir des valeurs de  $\lambda$ , il est possible de retrouver les gènes et les voies biochimiques qui contribuent le plus aux différentes contraintes. Le tableau ci-dessous (**figure 6**), nous montre les voies biochimiques qui contribuent le plus au « balanced state » et à la contrainte  $\lambda_1$ .

Balanced state	$\lambda_1$	
	Phase stationnaire (ac1t3, ac1t4, ac2t3, ac2t4, ac3t3, ac3t4, ac4t4)	Phase exponentielle (ac1t1, ac1t2, ac2t1, ac2t2, ac3t1, ac3t2, ac4t1, ac4t2, ac4t3)
Phosphorylation oxydative	Régulation de l'autophagie	Métabolisme porphyrine et chlorophylle
Fixation du carbone chez les organismes photosynthétiques	Dégradation valine, leucine et isoleucine	Réplication ADN
Phagosome	Endocytose	Biosynthèse caroténoïde Biosynthèse N-Glycan
Cycle de Krebs	Transduction du signal hormonal chez les plantes	ARN polymérase
Métabolisme de l'acide 2-oxocarboxylique	Peroxisome	Biosynthèse ubiquinone et autres terpénoïde-quinone
Biosynthèse valine, leucine et isoleucine	Métabolisme du propanoate	Biosynthèse quinone
Métabolisme de l'acide alpha-linolénique	Métabolisme beta-alanine	Biosynthèse lysine
Biosynthèse lysine	Interaction SNARE dans les vésicules de transport	Métabolisme histidine
Métabolisme du pyruvate	Métabolisme des séléno-composants	Protéines entennes de la photosynthèse
Biosynthèse des acides gras	Interconversions du pentose et du glucuronate	Photosynthèse

**Figure 6.** Voies biochimiques contribuant le plus au « **balanced state** », et au  $\lambda_1$  « **phase stationnaire** », « **phase exponentielle** ».

### Balanced state

Les voies biochimiques qui contribuent le plus au « **balanced state** » sont celles liées aux fonctions relatives à l'activité mitochondriale (phosphorylation oxydative, cycle de Krebs), à la fixation du CO<sub>2</sub> atmosphérique (fixation du carbone chez les organismes photosynthétiques) et à la biosynthèse d'acides aminés (biosynthèse de la valine, leucine et isoleucine, biosynthèse de la lysine).

## $\lambda_1$

Les voies biochimiques retrouvées dans la phase stationnaire sont liées à la réponse au stress : autophagie, peroxyosome, endocytose,... ce qui correspond à l'état physiologique des cellules qui commencent à mourir.

Les voies biochimiques retrouvées dans la phase exponentielle témoignent de l'activité de ces cellules : photosynthèse, protéines antennes de la photosynthèse, métabolisme de la porphyrine et de la chlorophylle ainsi que des caroténoïdes, biosynthèse de l'ubiquinone,...

$\lambda_2$	
<b>Concentrations faibles en acétate</b> (ac1t1, ac1t2, ac1t3, ac1t4, ac2t1, ac2t2, ac2t3, ac2t4)	<b>Concentrations élevées en acétate</b> (ac3t1, ac3t2, ac3t3, ac3t4, ac4t1, ac4t2, ac4t3, ac4t4)
Métabolisme de l'acide alpha-Linolénique	Réparation des excisions de nucléotides
Photosynthèse – protéines antennes	Métabolisme des sphingolipides
Biosynthèse des acides gras	Protéolyse médié par l'ubiquitine
Biosynthèse des caroténoïdes	Biosynthèse du N-glycane
Photosynthèse	Réparation des excisions de bases
Ribosome	Métabolisme de la beta-alanine
Métabolisme du pyruvate	Recombinaison homologue
Biosynthèse de la Lysine	Réplication ADN
Métabolisme de la porphyrine et de la chlorophylle	Protéasome
Fixation du carbone chez les organismes photosynthétiques	Interaction SNARE dans le transport vésiculaire

**Figure 7.** Voies biochimiques les plus importantes en **concentrations faibles et élevées en acétate**.

## $\lambda_2$

Les voies biochimiques qui sont observées dans les concentrations faibles en acétate (ac1 et ac2) (**figure 7**) sont liées au métabolisme du carbone (fixation du carbone chez les organismes photosynthétiques, métabolisme du pyruvate) ainsi qu'à la photosynthèse (photosynthèse, protéines antennes, biosynthèse des caroténoïdes).

Par contre, les voies biochimiques observées dans les concentrations élevées en acétate (ac3 et ac4) sont complètement différentes. Certaines sont liées à la division de l'ADN (réplication, recombinaison homologue, réparation des excisions de bases et de nucléotides). Dans ces conditions, la source d'énergie semble venir des processus endogènes de stress (protéasome, protéolyse médiée par l'ubiquitine).

## II. But

Le but de mon mémoire est d'étudier le métabolisme de l'acétate chez *Chlamydomonas*. Je vais aborder cette étude sous deux angles : d'une part je vais voir si l'analyse des voies biochimiques obtenues à partir des données transcriptomiques de cellules cultivées à différentes concentrations en acétate peut être validée par des analyses biochimiques ou physiologiques (projet BAMBI), d'autre part je vais m'intéresser à une enzyme du cycle du glyoxylate, la malate synthase, en étudiant un mutant de la banque de mutants insertionnels décrite ci-dessus (point c, (Li et al., 2016)).

# III. Matériel et méthodes

## 1. Matériel

### a. Milieux

*Chlamydomonas reinhardtii* peut se cultiver sur milieu solide ou liquide. Pour les milieux solides, nous ajoutons de l'agar (15g/L).

Milieu TAP (Tris – Acétate (17mM) - Phosphate)

100 ml de Tris (0,2 M), 50 ml de solution A, 1 ml d'oligos, 1 ml de buffer II, 850 ml d'H<sub>2</sub>O, 1,39 g d'acétate. Ajuster le pH à 7 avec de l'acide chloridrique.

Milieu TAP (Tris – Acétate (57.5 mM) - Phosphate)

100 ml de Tris (0,2 M), 50 ml de solution A, 1 ml d'oligos, 1 ml de buffer II, 850 ml d'H<sub>2</sub>O, 4,717 g d'acétate. Ajuster le pH à 7 avec de l'acide chloridrique.

Solution A : 8 g de NH<sub>4</sub>Cl, 2 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O et 1 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O dans 1 l d'H<sub>2</sub>O

### b. Amorces oligonucléotidiques

Nom	Séquence	Concentration
MAS1-F	GTC-AGG-CTA-CAC-GAG-CAT-AAA	5 µM
MAS1-R	CTC-AAA-GTC-GGC-CAT-GTA-CT	5 µM
MAS2-F	GTT-TAA-AGC-TTG-TTC-AGG-GTG-TC	5 µM
MAS2-R	GAT-TGC-ACT-CGT-GGA-TCT-GT	5 µM
CIB FOR	GCA-CCA-ATC-ATG-TCA-AGC-CT	5 µM
CIB REV	GAC-GTT-ACA-GCA-CAC-CC-TTG	5 µM
1FOR-Par	GGG-CTC-TCA-GGG-CGT-CG	5 µM
2FOR-Par	CCC-ACT-CGC-AGC-CTG-GG	5 µM
3FOR-Par	CCA-GCA-CCG-GAA-GCG-CC	5 µM

### c. Multicultivateur

Les cultures de la souche analysée (souche contrôle, souche *icl::ICL* se comportant comme une souche sauvage en milieu TAP, (Willamme et al., 2015)) ont été réalisées en multicultivateur (**figure 8**). Quatre tubes avec le milieu TAP 17 mM acétate, et quatre tubes avec le milieu TAP 57.5 mM acétate. Les huit tubes sont éclairés avec une lumière constante de  $50 \mu\text{E}\cdot\text{M}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  et à une température de  $25^\circ\text{C}$ .

Les tubes sont ensemencés à  $6\cdot 10^5$  cellules au temps 0. Ils sont retirés du multicultivateur aux différents temps (12H, 28H, 50H, 70H) pour prélever les volumes nécessaires aux expériences, et ensuite replacés dans le multicultivateur. Chaque tube représente un réplica biologique.

Le bullage se fait avec de l'air.



**Figure 8.** Multicultivateur MC 1000-OD. <http://www.psi.cz/products/photobioreactors/multi-cultivator-mc-1000>

## 2. Méthodes

### a. Extraction d'ADN/ARN chez *Chlamydomonas reinhardtii*

#### i. Extraction ADN/ARN

La première méthode d'extraction d'ADN utilise la protéinase K : 2,2 ml de solution de protéinase K est préparée (1,4 ml d'H<sub>2</sub>O + 0,4 ml de protéinase K (20mg/ml en H<sub>2</sub>O) + 0,4 ml PCR reaction buffer). Nous plaçons 50 µl de la solution de protéinase K dans les 20 tubes de PCR avec 0,5 cm<sup>2</sup> de *Chlamydomonas* récupéré avec un cure-dent. Nous plaçons les 20 tubes contenant les 20 colonies dans la PCR en mode incubation (1h à 58°C et 1h à 96°C).

Centrifuger 5 s pour récupérer le surnageant contenant l'ADN. La préparation peut se conserver plusieurs mois à 4°C.

La deuxième méthode d'extraction d'ADN et d'ARN est plus lente mais obtient de meilleurs résultats : nous prélevons 3.10<sup>7</sup> à 1.10<sup>8</sup> cellules et nous les transférons dans un tube eppendorf contenant 0,5ml de TEN (10mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl). Nous vortexons et centrifugeons à 1500g pendant 2 minutes, puis nous éliminons le surnageant. Le culot est remis en suspension (vortex) dans 150µl d'eau glacée + 300µl de tampon SDS-EB (2% SDS, 400mM NaCl, 40mM EDTA, 100mM Tris HCl pH 8.0).

L'ADN ou l'ARN est extrait avec 350µl de phénol/CIA (1:1) en vortexant 30 secondes puis 5 minutes sur agitateur (vortex au maximum). Ensuite nous centrifugeons 5 minutes à 15000g et nous transférons la phase aqueuse (420µl) dans un nouveau tube eppendorf. Nous ajoutons 300µl de CIA (24:1) et nous centrifugeons 5 minutes à 15000g et nous transférons la phase aqueuse (370µl) dans un nouveau tube eppendorf.

Pour l'ADN : nous ajoutons 750µl d'alcool absolu glacé, et nous agitons jusqu'à la formation de fibres. Ensuite nous incubons sur glace pendant 30 minutes, ou à -20°C over-night. Après, nous centrifugeons 5 minutes à 15000g, nous éliminons le surnageant et nous lavons avec 300µl d'éthanol 70%.

Pour l'ARN : nous ajoutons 125µl de LiCl 8M et nous incubons over-night à 4°C. Ensuite nous centrifugeons 5 minutes à 15000g et nous lavons le culot d'ARN avec 300 µl d'éthanol 70%.

Ensuite, pour l'ADN et l'ARN, nous centrifugeons 5 minutes à 15000g, nous éliminons le surnageant et nous séchons 15 minutes à l'air libre. Nous ajoutons 50µl d'eau distillée stérile, nous laissons 5 minutes à température ambiante. Le culot bien dissout se conserve à -20°C pour l'ADN et -80°C pour l'ARN.

Nous pouvons également mesurer la concentration grâce au spectre UV, et vérifier l'intégrité de l'ADN et de l'ARN en faisant migrer sur gel d'agarose 1% : 1µl d'ADN ou ARN, 9 µl d'eau et 1 µl de USE (urée 4mM, EDTA 50mM, sucrose 50% (P/V), bleu de bromophénol 0.1% (P/V)).

## ii. Electrophorèse sur gel d'agarose

La migration des fragments d'ADN ou d'ARN se fait sur gel d'agarose (0,8 à 2% suivant le PM de l'échantillon pour l'ADN) et comme tampon de cuve, nous utilisons du TEA (Tris 40 mM, EDTA 2mM, ajuster le pH à 8 avec de l'acide acétique). Nous ajoutons du Midori Green dans le gel (4-6 µl) pour la visualisation de l'ADN ou de l'ARN. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas). La migration s'effectue à 100 Volts pendant 20 minutes.

## b. PCR

La PCR permet d'amplifier des fragments d'ADN spécifiques à partir d'ADN total.

La polymérase utilisée est la GoTaq G2 DNA Polymerase PROMEGA.

Voir « oligonucléotides » pour les amorces utilisées.

Le MIX pour PCR est réalisé comme suit :

Pour 500µl → 110µl de TP 5X + 11µl de dnTP (10mM) + 55 µl de primeur 1 (5µl) + 55 µl de primer 2 (5µl) + 27,5 µl de DMSO + 60 µl de polymérase + 181,5 µl d'H<sub>2</sub>O

15 µl de MIX dans chaque tube de PCR + 1,5µl d'ADN.

Il faut 3 étapes successives pour que la réaction ait lieu :

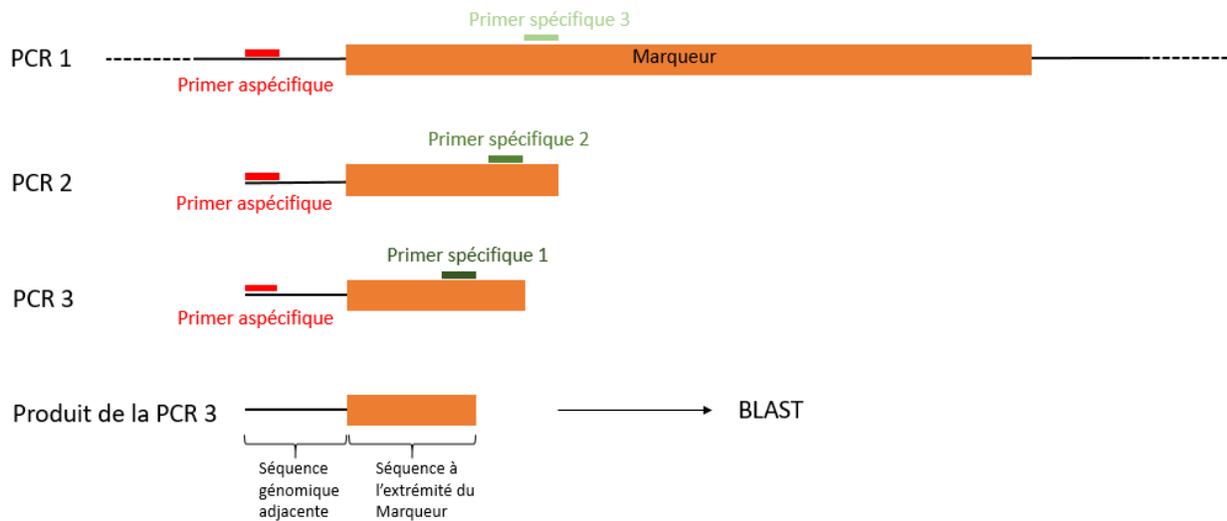
- Dénaturation : 95°C pendant 30 s
- Hybridation : 55°C pendant 30 s

- Elongation : 72°C pendant 30 s

On réalise 35 cycles puis la température descend à 4°C jusqu'à ce que l'on reprenne les tubes.

### c. TAIL-PCR

La TAIL-PCR (Thermal Asymmetric InterLaced PCR) permet de connaître la localisation d'un marqueur dans le génome de *Chlamydomonas* en amplifiant une séquence génomique adjacente au site d'insertion. Elle se compose de trois cycles de PCR, où le produit de la précédente est utilisé pour la nouvelle. Les trois PCR utilisent des primers spécifiques et aspécifiques (dégénérés). Les primers spécifiques sont au nombre de trois et s'hybrident de manière de plus en plus proche de l'extrémité de la séquence connue du marqueur (5' ou 3'), et les primers aspécifiques s'hybrident de manière aléatoire sur le génome (Thèse Barbara Emonds-Alt).



**Figure 9.** Principe des trois étapes de TAIL-PCR.

La polymérase utilisée est la GoTaq G2 DNA Polymerase PROMEGA.

Voir « oligonucléotides » pour les amorces utilisées.

Le MIX pour PCR est réalisé comme suit :

Pour 25 µl → 5µl de TP 5X + 0,5µl de dnTP (10mM) + 1 µl de primeur spécifique (5µM) + 6 µl de primer aspécifique (10µM) + 1,5 µl de DMSO + 0,3 µl de polymérase (5U/µl) + 9,7 µl d'H<sub>2</sub>O + 1 µl d'ADN.

Le tableau ci-dessous (Dent et al., 2005) indique les paramètres pour les trois PCR successives.

Reaction	Step	Thermal Settings	No. of Cycles
Primary	1	95°C, 2 min	1
	2	94°C, 1 min; 62°C, 1 min; 72°C, 2.5 min	5
	3	94°C, 1 min; 25°C, 3 min; ramping to 72°C over 3 min; 72°C, 2.5 min	1
	4	94°C, 30 s; 68°C, 1 min; 72°C, 2.5 min; 94°C, 30 s; 68°C, 1 min; 72°C, 2.5 min; 94°C, 30 s; 44°C, 1 min; 72°C, 2.5 min	15
	5	72°C, 5 min	1
Secondary	1	94°C, 30 s; 64°C, 1 min; 72°C, 2.5 min; 94°C, 30 s; 64°C, 1 min; 72°C, 2.5 min; 94°C, 30 s; 44°C, 1 min; 72°C, 2.5 min	12
	2	72°C, 5 min	1
Tertiary	1	94°C, 30 s; 44°C, 1 min; 72°C, 2.5 min	20
	2	72°C, 5 min	1

Après les trois PCR, on fait migrer les produits de la troisième PCR sur un gel d'agarose et si les bandes sont à la bonne taille et d'une qualité satisfaisante, on les envoie au séquençage.

Ensuite, la séquence génomique adjacente au site d'insertion du marqueur est « blastée » sur le génome de *Chlamydomonas* afin de connaître la localisation du marqueur.

#### d. Northern Blot

Le Northern Blot permet de détecter un ARN d'intérêt.

Cette technique commence par une extraction d'ARN (voir plus haut) puis une migration sur gel d'agarose (0.8%) :

Pour 100 ml de gel → 0.8 g d'agarose + 75 ml d'H<sub>2</sub>O + 10 ml de MOPS 10X + 15 ml de formaldéhyde 37%. Le gel doit être coulé la veille de la manipulation. Le tampon de run est du MOPS 1X.

Après la migration, on réalise un blotting :

Nous rinçons le gel dans une solution de SSC 10X, puis nous réalisons un blotting papier overnight pour récupérer les ARN sur une membrane Amersham Hybond - N<sup>+</sup>. Nous fixons ensuite les ARN sur la membrane en la plaçant au four pendant 2h à 80°C sous vide. La membrane peut se conserver sous film plastique à 4°C jusqu'à l'hybridation.

Ensuite nous réalisons une hybridation :

Nous réhumidifions la membrane avec du SSC 5X et nous préhybridons 1h à 50°C avec 15ml d'une solution de DIG Easy Hyb Granules ROCHE (réf : 11 796 895 001) dans un cylindre à hybrider.

Puis nous réalisons l'hybridation avec 10 ml d'une solution de DIG Easy + 25 ng de sonde digo (PCR Dig Probe Synthesis Kit 11 636 090 910 ROCHE) overnight à 50°C dans un cylindre à hybrider.

Ensuite nous lavons 2 x 5 min dans du 2X SSC – 0,1% SDS à température ambiante puis encore 2 x 15 min à 50 °C dans du 0,1 X SSC – 0,1 % SDS.

Puis à température ambiante :

Nous équilibrons la membrane 1 min en TP 1.

Ensuite nous saturons la membrane 30 min en TP2

Puis nous incubons 30 min dans l'anti-digoxigenin-AP Fab fragment (Roche : 11 093 274 910) 2µl/20 ml de TP2.

Nous rinçons 2 x 15 min dans TP1 + Tween 0,3% final

Puis nous équilibrons la membrane 3 min en TP3

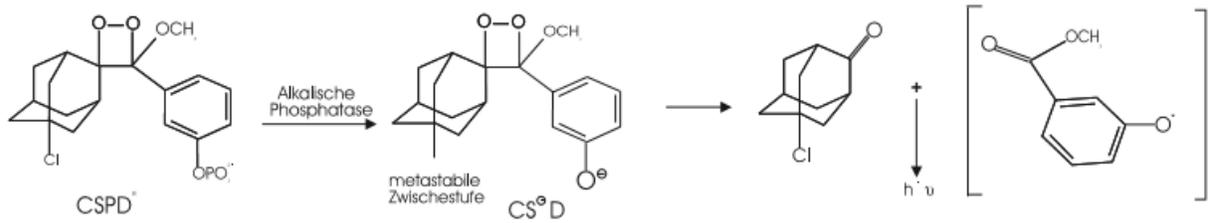
Ensuite nous incubons 5 min entre 2 feuilles plastiques avec 1 ml de CSPD (Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-yl)phenyl phosphate) (Roche : 11 755 633 001).

Nous enlevons l'excès de CSPD (**figure 10**) et nous scellons la membrane.

Puis nous incubons 15 min à 37°C, nous mettons en cassette et nous développons après un temps indéterminé.

Composition des solutions : MOPS 10X → pour 500 ml : 20,6 g MOPS + 400 ml d'H<sub>2</sub>O DMPC, ajuster à pH 7.0 avec NaOH + 8,4 ml NaAc 3M + 10 ml EDTA 500 mM pH 8.0 et amener à 500 ml.

SSC 10X → pour 1L : 86,5 g NaCl + 44,1 g Citrate de Na amené à pH 7.0 avec HCl.



**Figure 10.** Réaction de luminescence du CSPD. La déphosphorylation enzymatique du CSPD par une phosphatase produit un anion phénolate métastable qui se décompose et émet de la lumière à une longueur d'onde de 477 nm.

## e. Western Blot

### i. Extraits rapides

Nous mesurons la densité optique de chaque échantillon et nous centrifugeons 1,5ml, 2 minutes à 2000g. Ensuite nous reprenons le culot dans 242µl de SDS-page buffer (250µl SDS 20%, 500µl glycérol 50%, 250µl DTT 1M, 150µl Tris 1M pH 6.8, 1350µl eau distillée stérile) multiplié par la densité optique. Ensuite les échantillons sont lysés 5 minutes à 95°C. Ils se conservent à -80°C.

### ii. Gel SDS-PAGE et transfert sur membrane PVDF

Les échantillons sont chargés sur un gel SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) (acrylamide/bisacrylamide 37% ; Tris-HCl 0,5M pH 8,8 ; SDS 10 % ; TEMED ; APS 10%) de 12% pour Lhcb5 et 15% pour Cox2b et ATG8. Les gels sont immergés dans une cuve contenant le tampon de migration (Tris-HCl 20 mM; Glycine 200 mM ; SDS 10%) et la migration se fait pendant environ 1h30 à 180 mV.

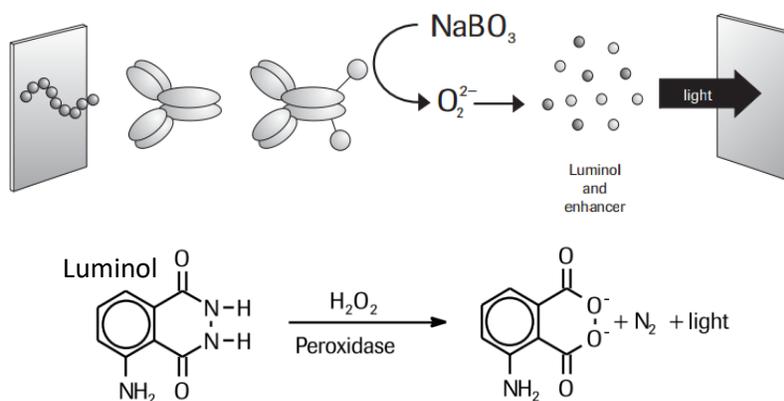
Ensuite, les protéines sont transférées du gel vers une membrane PVDF (polyvinyle difluoride). Cette membrane est activée 30 secondes dans du méthanol, rincée 2 min dans de l'eau, puis équilibrée 5 mins dans le tampon de blotting, et le transfert se fait dans une cuve contenant le tampon de blotting (Tris 25 mM ; Glycine 192 mM ; Méthanol 10%), over-night à 30 mA, à 4°C.

### iii. Anticorps primaire et secondaire

Après le transfert, la membrane est incubée 1H30 à température ambiante dans du blocking (Roche, ref : 11921 681 001) 1% sur agitateur. Ensuite la membrane est incubée avec l'anticorps primaire pendant 1H30 à température ambiante sur agitateur. Après, il s'en suit deux lavages de 10 minutes au TBST (1L de TBS (6,05 g Tris, 8,76 g NaCl, pH 7.5 avec HCl, amené à 1L avec H<sub>2</sub>O), 1ml de tween 20) et deux fois 10 minutes en blocking 0,5% sur agitateur.

La membrane est ensuite incubée 30 minutes avec l'anticorps secondaire (0,5µl/5ml blocking 0.5%)(Roche, ref : 11520 709 001) sur agitateur à température ambiante. Puis il s'en suit quatre lavages de 15 minutes en TBST.

La membrane est transférée dans un sac plastique soudé de 3 cotés et, en chambre noire, elle est incubée 1 minute avec 5ml de réactif de détection (50µl A + 5ml B)(Roche, ref : 11 500 694 001) (**figure 11**). L'excès de réactif de détection est éliminé et la membrane placée en cassette avec un film photo. Le développement se fait après un temps indéterminé : luminescence max après 2 mins, constante pendant 30 mins et le signal décroît de 70% après 1H.



**Figure 11.** Principe de détection du Western Blot. Fixation de la protéine sur une membrane, reconnaissance par l'anticorps primaire, reconnaissance de l'anticorps primaire par l'anticorps secondaire lié à une peroxydase qui, en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, catalyse l'oxydation du luminol et un produit de réaction intermédiaire est formé. Celui-ci se décompose en émettant de la lumière. Cette lumière est absorbée par un film photo.

## f. Dosage de la chlorophylle

1ml de culture est centrifugé à 15000g, puis 900µl de surnageant est retiré. Ensuite, nous ajoutons 900µl de méthanol, nous vortexons et nous centrifugeons 5 minutes à 15000g. Puis 1ml de surnageant est utilisé pour mesurer l'absorbance à 648, 664, 665 et 652 nm.

La quantité (µg/ml) de chlorophylle totale est calculée comme suit :  $(A_{648} \times 22.24) + (A_{664} \times 5.24)$ .

La quantité de chlorophylle a (µg/ml) est calculée comme suit :  $(A_{665} \times 16.72) - (A_{652} \times 9.16)$ .

## g. Dosage de l'amidon

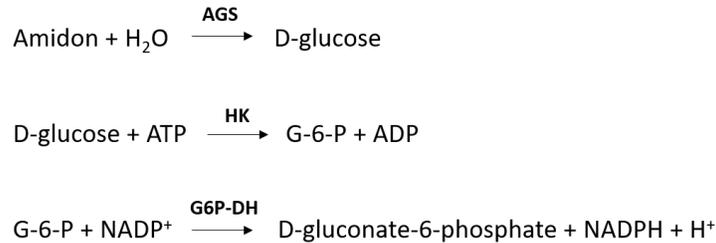
Nous récupérons le culot de cellules dans 1ml d'HEPES 50mM-KOH pH 7.5 (HEPES 1.2g/100ml). Nous ajoutons 600mg de billes de verre (0.5mm) dans chaque échantillon et nous agitons (vortex au maximum) pendant 40 minutes à 4°C. Ensuite nous prélevons 500µl d'extrait en eppendorf 2ml et nous centrifugeons 10 minutes à 16000 rpm à 4°C. Nous reprenons le culot dans 150µl d'eau distillée stérile et 1350µl de Percoll (GE Healthcare, ref : 17-0891-02), puis nous centrifugeons 1 heure à 10000 rpm à 4°C. Après nous éliminons le surnageant et nous lavons le culot d'amidon avec 500µl d'eau distillée stérile. Ensuite nous récupérons le culot dans 100µl d'eau.

Nous reprenons 10µl d'amidon dans 20µl d'eau et 20µl d'amidon dans 10µl d'eau dans un autre tube. Chaque « doublon » est incubé 10 minutes à 100°C et ensuite, nous ajoutons 60µl de solution 1 (kit « starch » Boehringer Mannheim/R-Biopharm). Puis nous incubons 15 minutes à 55°C et nous ajoutons ensuite 300µl d'eau et 300µl de solution 2 (kit « starch » Boehringer Mannheim/R-Biopharm). Nous transférons 230µl de chaque échantillon en microplaque transparente avec puits à fond plat. Nous prenons ensuite la densité optique initiale à 340nm (minimum 5 points). Nous ajoutons 6µl d'hexokinase/G6PDH et nous suivons la densité optique à 340nm jusqu'à atteindre le plateau.

Afin de calculer la concentration en amidon en g/l, nous utilisons cette formule :

$$C = \frac{(V \cdot MW)}{(6,3 \cdot d \cdot v \cdot 1000)} \cdot \Delta DO$$

V = volume final (0,690ml) ; MW = 162,1 ; ΔDO = DO finale au plateau – DO initiale ; d = trajet optique (0,715cm pour microplaque Sarstedt avec 230µl/puits) ; v = volume échantillon (0,01 ou 0,02ml).



**Figure 12.** Principe de détection du NADPH. L'amidon est hydrolysé en D-glucose à pH 4.6 par l'enzyme amyloglucosidase (AGS). Le D-glucose est phosphorylé en D-glucose-6-phosphate (G-6-P) par l'hexokinase (HK) en présence d'ATP. En présence de l'enzyme G6P-DH, le G-6-P est oxydé le NADP en D-gluconate-6-phosphate avec la formation de NADPH. La quantité de NADPH formée est stœchiométrique à la quantité de D-glucose formé par l'hydrolyse de l'amidon. Le NADPH est déterminé par son absorbance à 340 nm.

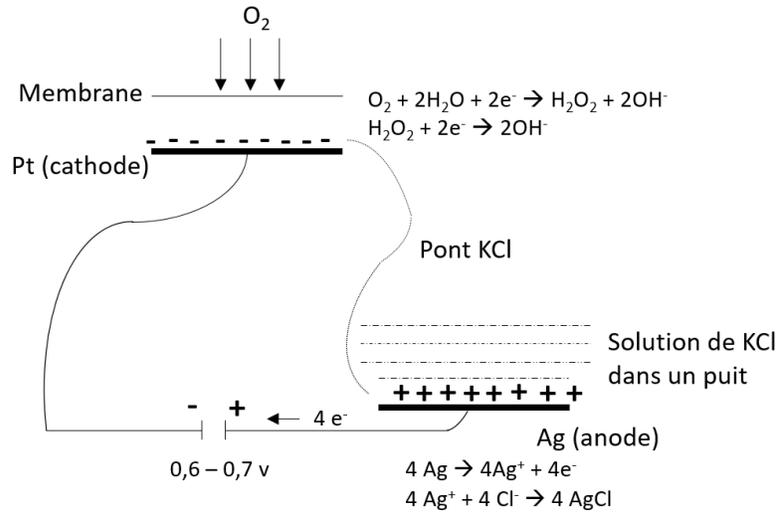
## h. Dosage des protéines

10 µl d'extrait lysé par les billes de verre (cf. point f) sont ajoutés à 200µl de bradford (BIO-RAD, ref : 500-0006) et l'absorbance est mesurée à 595 nm en plaque 96 puits (BRAND 781602). En parallèle, une courbe étalon est réalisée à l'aide de différentes concentrations en BSA (SIGMA, ref : 9048-46-8) : 0, 50, 100, 200, 300, 400 et 500µg/ml. Grâce à cette courbe étalon, nous pouvons calculer la concentration en protéines totales (µg/ml).

## i. Mesures de dégagement d'O<sub>2</sub> à l'oxygraphe

L'oxygraphe est un appareillage qui permet de mesurer la concentration en oxygène dans le milieu en temps réel. Il fonctionne à l'aide d'une électrode de Clark, découverte et expliquée par Clark et al., 1953 (**figure 13**) .

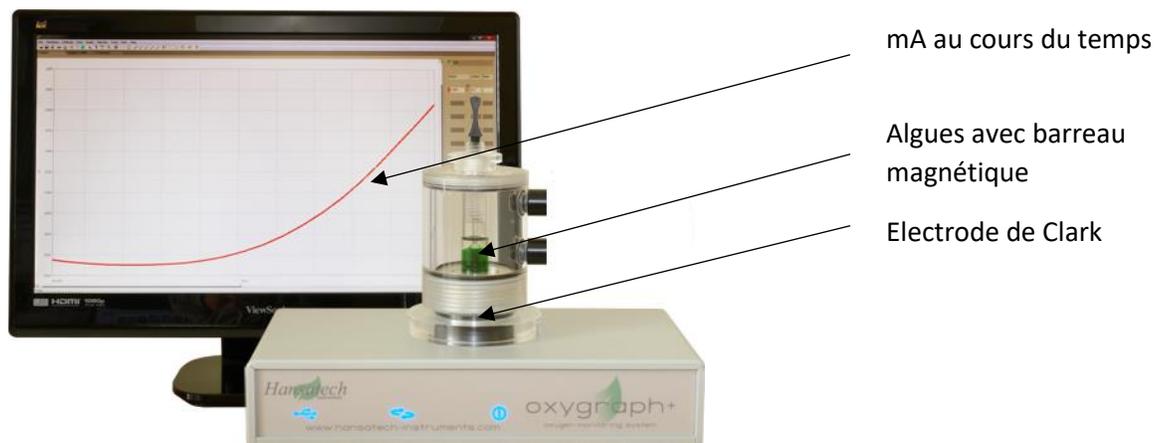
1,5ml de milieu de culture est placé dans l'oxygraphe et une agitation constante est appliquée à l'aide d'un barreau magnétique. La concentration en oxygène est estimée grâce à l'électrode de Clark (**figure 13 et 14**) qui mesure des milli ampères. Nous pouvons voir l'évolution de l'ampérage sur un écran en temps réel (**figure 14**).



**Figure 13.** Principe de l'électrode de Clark : un courant électrique est appliqué entre une cathode au platine et une anode à l'argent. Ce courant prend des électrons à l'argent et celui-ci réagit avec le chlore de la solution de KCl et précipite. Ces électrons vont réduire l'oxygène présent au contact de la cathode de platine. Donc plus il y a de l'oxygène qui traverse la membrane, plus les électrons pourront être utilisés, et donc plus il y aura d'électrons pris à l'argent. L'électrode de Clark mesure le passage du courant (l'ampérage), donc plus il y a d'oxygène, plus il y aura de courant électrique (d'ampères).

Un dispositif lumineux (absent sur la **figure 14**) permet de contrôler la luminosité appliquée aux algues. Celui-ci nous permet d'avoir 11 intensités croissantes et nous mesurons l'ampérage pour chaque intensité. Ensuite les pentes de la droite sont relevées pour chaque intensité. Grâce à une formule nous pouvons connaître les  $\mu\text{moles d'O}_2$  par minute et par cellules produit pour chaque intensité :

$$\text{Quantité d'O}_2 = \frac{\text{Pente}}{(O_2 \text{ max} - O_2 \text{ min}) \cdot (\text{constante de dissolution O}_2 \text{ à } 25^\circ\text{C} / \text{nombre de cellules})}$$



**Figure 14.** Oxygraphe. <http://www.hansatech-instruments.com>

# IV. Résultats

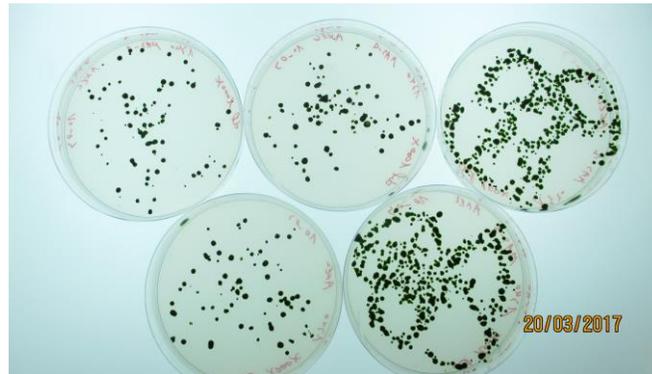
## 1. Caractérisation du mutant de la malate synthase

La malate synthase est une enzyme clé du cycle du glyoxylate permettant l'assimilation de l'acétate (cf. introduction). Le laboratoire a reçu ce mutant de la banque de mutants insertionnels récemment créée (Li et al., 2016). Dans un premier temps, nous devons vérifier si le mutant qui nous a été envoyé est bien muté dans la malate synthase.

### a. Croissance du mutant sur milieu paromomycine

La première étape est de vérifier si le mutant possède bien la cassette de résistance à la paromomycine. Celle-ci a été utilisée pour l'insertion dans le gène d'intérêt (cf. point c de l'introduction).

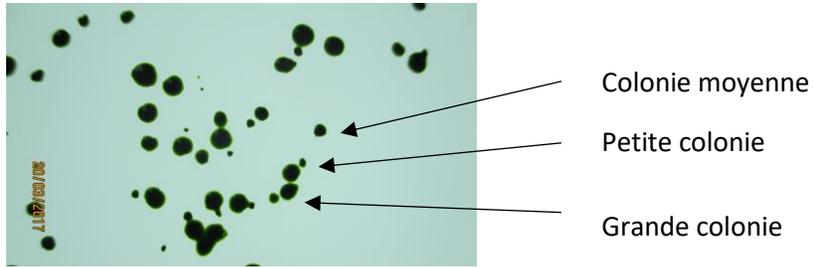
Pour ce faire, j'ai cultivé la souche algale MAS1 sur milieu TAP (Tris-Acétate-Phosphate) contenant l'antibiotique paromomycine. Donc, si la souche possède bien la cassette de résistance à cet antibiotique, elle poussera sur ce milieu.



**Image 15a.** Souche MAS1 sur milieu gélosé de TAP-paromomycine (10µg/ml).

### Observations

Des colonies possédant la cassette de résistance apparaissent et il semble y avoir différentes tailles de colonies (**figure 15b**).

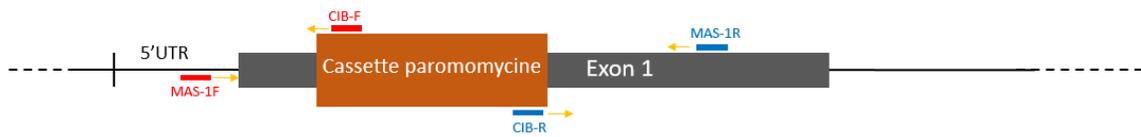


**Image 15b.** Zoom d'une boîte de l'image 14a.

## b. PCR de confirmation du site d'insertion de la cassette

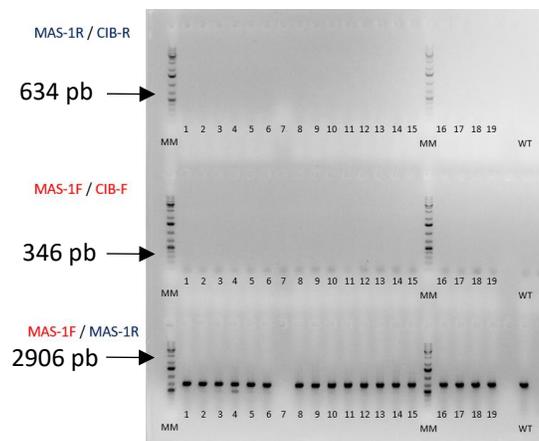
J'ai prélevé une vingtaine de grandes, moyennes et petites colonies et lysé les cellules en présence de protéinase K (cf. Matériel et Méthodes p18) permettant d'obtenir de l'ADN nécessaire pour réaliser des PCR.

J'ai réalisé des PCR sur tous ces ADN avec les couples de primers MAS-1R / CIB-R (produit de PCR attendu de 634 pb), MAS-1F / CIB-F (produit de PCR attendu de 346 pb), et MAS-1F / MAS-1R (produit de PCR attendu de 2906 pb) (cf. séquences dans « matériel et méthodes »).



**Figure 16.** Schéma des sites d'hybridation des primers sur le gène de la malate synthase.

## Analyse des colonies de grande taille



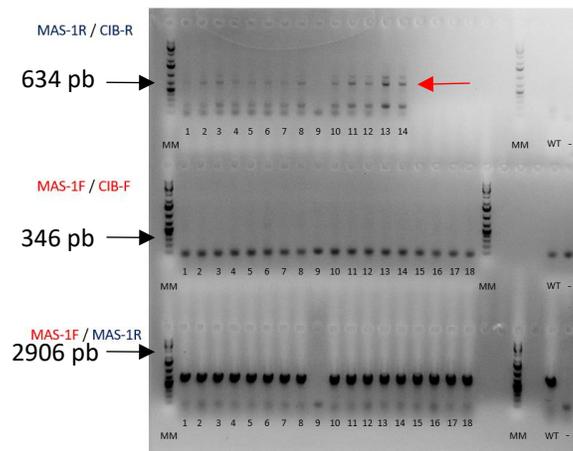
**Figure 17.** Migration des produits de PCR des colonies de grande taille (1-19) et souche contrôle WT sur gel d'agarose. Marqueur de poids moléculaire : O GeneRuler 1 kb plus DNA ladder.

## Observations

On remarque qu'aucune bande n'apparaît avec les primers qui impliquent la cassette de résistance (**MAS-1F / CIB-R** et **MAS-1F / CIB-F**). On voit aussi que toutes les colonies présentent un produit de PCR de même taille que celui de la souche témoin (WT, 724 kb) avec les primers supposés entourer la cassette (**MAS-1F / MAS1-R**).

## Analyse des colonies de taille moyenne

La **figure 18** montre le résultat obtenu lors de l'analyse des colonies de taille moyenne.

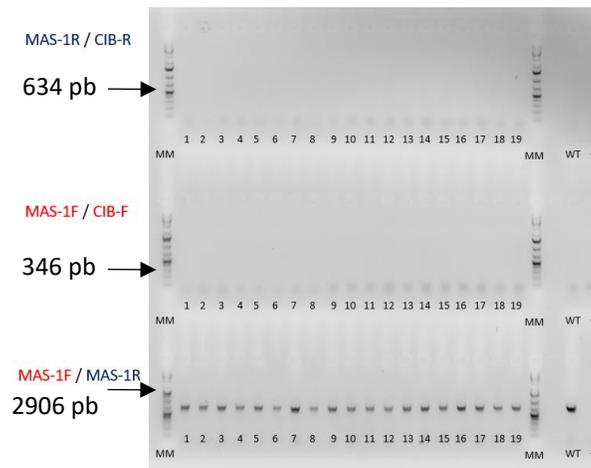


**Figure 18.** Migration des produits de PCR des colonies de taille moyenne (1-18) et du contrôle WT sur gel d'agarose. Marqueur de poids moléculaire : O GeneRuler 1 kb plus DNA ladder.

## Observations

Deux à trois produits de PCR apparaissent pour le couple de primers **MAS-1R / CIB-R**. Par contre, aucun produit n'est obtenu pour le couple **MAS-1F / CIB-F**. De plus, toutes les colonies de taille moyenne présentent un produit de PCR de même taille que celui de la souche témoin (WT) avec les primers supposés entourer la cassette (**MAS-1F / MAS1-R**). Ceci suggère que les produits de PCR obtenus avec le couple **MAS-1R / CIB-1R** sont probablement aspécifiques.

## Analyse des colonies de petite taille



**Figure 19.** Migration des produits de PCR des colonies de petite taille (1-19) et du contrôle WT sur gel d'agarose. Marqueur de poids moléculaire : O GeneRuler 1 kb plus DNA ladder.

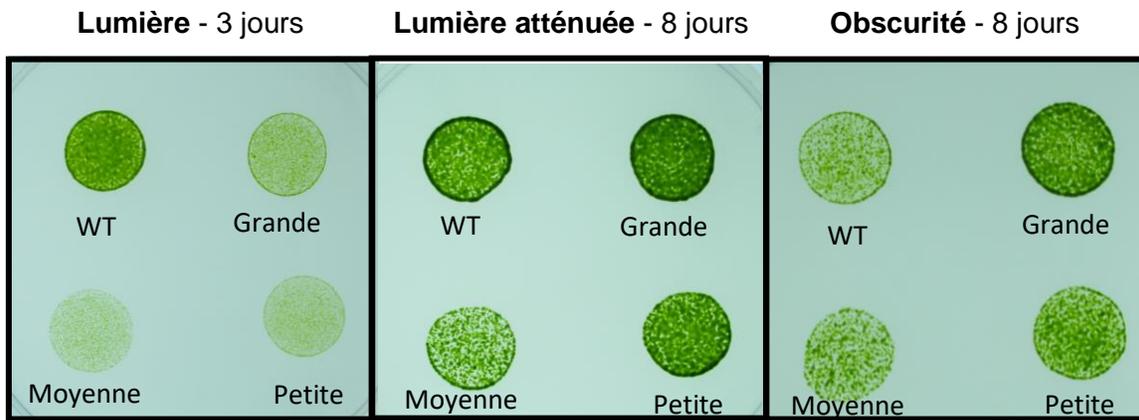
### Observations

Les mêmes conclusions sont tirées lors de l'analyse des colonies de petite taille : aucune cassette n'est détectée à l'endroit proposé (<https://www.chlamylibrary.org/>).

### c. Analyse de la croissance sous différentes conditions lumineuses

Malgré ces résultats négatifs concernant l'analyse moléculaire du mutant, il a quand même été décidé de réaliser une analyse phénotypique du mutant. En effet, le mutant pourrait être muté dans le gène de la malate synthase mais à un autre endroit que celui proposé par le site web de la CLIP library. Dans ce cas, l'algue est incapable de croître à l'obscurité puisqu'elle est incapable de métaboliser l'acétate via le cycle du glyoxylate.

J'ai donc cultivé des colonies de différentes tailles sur du milieu TAP (**figure 20**) sous différentes luminosités : lumière contrôle ( $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), lumière faible ( $5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et obscurité.



**Figure 20.** Croissance sur milieu gélosé TAP des souches WT, colonies de grande, de moyenne et de petite taille, cultivées sous différentes conditions de lumière.

### Observations

Toutes les souches poussent dans les 3 conditions (lumière, lumière atténuée, obscurité).

### d. Northern Blot

L'analyse suivante consiste à vérifier si le transcrite de la malate synthase est présent ou non dans les différentes souches. Pour ce faire, j'ai réalisé un Northern Blot.



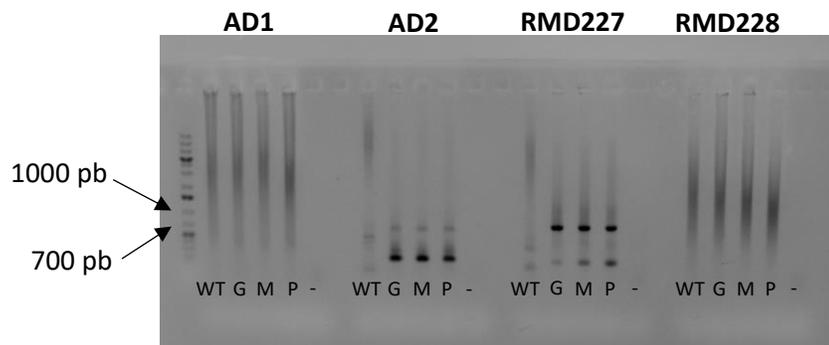
**Figure 21.** Northern Blot des colonies respectivement, WT, grandes, moyennes et petites.

### Observations

On remarque que le transcrite est détecté dans les différents types de colonies.

## e. TAIL-PCR

L'analyse finale consiste à essayer de connaître l'endroit où se trouve réellement la cassette, étant donné qu'elle n'est pas à la position indiquée. Pour ce faire, j'ai réalisé une TAIL-PCR avec 4 couples de primers : un aspécifique AD1 et les trois spécifiques (3FOR-Par, 2FOR-Par, 1FOR-Par), un aspécifique AD2 et les trois spécifiques, un aspécifique RMD227 (Dent et al., 2005) et les trois spécifiques, et un spécifique RMD228 (Dent et al., 2005) et les trois spécifiques. Les trois primers spécifiques se trouvent dans la cassette de résistance, en position 5'. Donc si la TAIL-PCR fonctionne, nous aurons le début de la cassette et un bout de génome de *Chlamydomonas* correspondant à la séquence adjacente au site d'insertion de la cassette. La distance entre le primer spécifique le plus proche de l'extrémité de la cassette et l'extrémité 5' de celle-ci étant de 700 pb, le fragment PCR doit avoir une taille supérieure à cette taille pour atteindre la région adjacente du génome de *Chlamydomonas*.



**Figure 22.** Migration des produits de la troisième PCR de la TAIL-PCR de la souche contrôle WT et des colonies grande (G), moyenne (M) et petite (P) taille sur gel d'agarose. Marqueur de poids moléculaire : O GeneRuler 1 kb plus DNA ladder.

Une bande apparaît à une taille qui pourrait être supérieure à 700 pb en utilisant le primer aspécifique RMD227.

La prochaine étape est de séquencer ces fragments et ensuite de réaliser un BLAST afin d'identifier la région d'insertion. Malheureusement je n'ai pas reçu les résultats du séquençage assez rapidement pour les montrer dans le manuscrit.

## Conclusions

Le mutant reçu n'est pas muté dans la malate synthase : nous n'avons pas détecté la cassette de résistance à l'endroit proposé, l'analyse phénotypique ne correspond pas à un mutant incapable d'utiliser l'acétate et enfin, le transcrit de la malate synthase est détecté.

## 2. Analyse du métabolisme de l'acétate

Comme indiqué dans l'introduction, nous disposons d'analyses transcriptomiques réalisées selon la méthode « surprisal » qui caractérisent la réponse cellulaire de *Chlamydomonas* à différentes concentrations en acétate (17 mM - 31 mM - 44 mM - 57,5 mM). Cette analyse a permis de dégager deux points :

- (i) les voies biochimiques importantes pour les cellules en phase exponentielle versus celles qui sont importantes en phase stationnaire
- (ii) les voies biochimiques importantes pour les cellules cultivées en concentrations élevées en acétate versus celles qui sont importantes pour les cellules cultivées en concentrations faibles en acétate (cf. point d de l'introduction)

Nous souhaitons maintenant voir si les données transcriptomiques peuvent être mises en relation avec des analyses biochimiques ou physiologiques. Au cours de mon travail, je me suis focalisé sur la caractérisation de voies biochimiques qui permettent de distinguer les cellules en phase exponentielle et les cellules en phase stationnaire (point i ci-dessous) car nous disposons d'outils biochimiques et physiologiques permettant d'analyser ce point.

### i. Analyse de la différence entre phase stationnaire et phase exponentielle

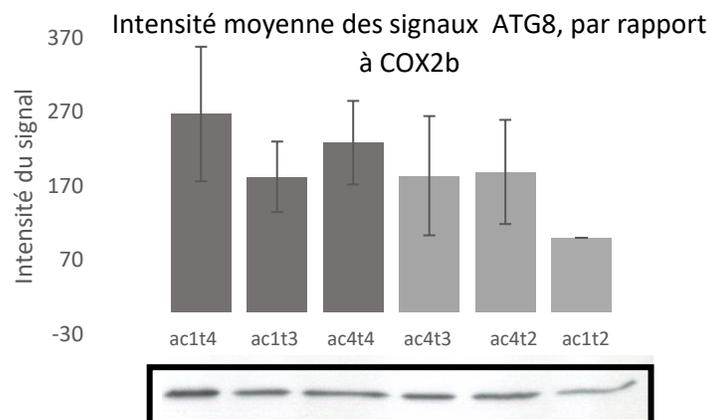
#### a. Rôle de l'autophagie

Une des voies biochimiques présentée dans la **figure 6** de l'introduction a retenu notre attention : l'autophagie qui caractérise les cellules en phase stationnaire. En effet, le renouvellement des protéines est essentiel pour l'adaptation des cellules à leur environnement. Comme les autres eucaryotes, les organismes photosynthétiques ont développé deux mécanismes distincts pour réguler la dégradation des protéines. Le premier consiste en l'ubiquitination des protéines et leur dégradation par le protéasome, et le deuxième en l'autophagie, un processus non sélectif membranaire, qui est contrôlé par un grand nombre de protéines. Nous disposons d'un anticorps contre ATG8 de *Chlamydomonas*. ATG8 est modifié avec la molécule lipidique phosphatidyléthanolamine (PE) par l'action consécutive des enzymes ATG7 et ATG3 en utilisant un procédé similaire à l'ubiquitination. Avant cette modification, ATG8 doit être clivé par la Cys

protéase ATG4 pour exposer un résidu Gly en C-terminale, qui se conjugue ensuite avec la PE (Pe et al., 2010).

J'ai d'abord analysé la quantité de la protéine ATG8 dans différents échantillons qui avaient déjà été utilisés pour les analyses transcriptomiques précédentes et conservés à -80°C (cf. **figure 5.B**). Les conditions regardées sont les concentrations extrêmes, c'est-à-dire 17 mM et 57.5 mM. Ceci est valable pour toutes les analyses qui suivent. Nous avons mesuré la quantité de la protéine ATG8 par rapport à celle de la protéine COX2b, une sous-unité du complexe IV de la chaîne respiratoire. Le choix de cette sous-unité comme contrôle est guidé par le fait que la voie biochimique « phosphorylation oxydative » est retrouvée dans le « balanced state » (cf. **figure 6** de l'introduction). Les voies biochimiques identifiées dans le « balanced state » contribuent de manière importante au transcriptome de tous les échantillons.

Les signaux correspondant à la protéine ATG8 ont été quantifiés par rapport à ceux de COX2b en utilisant le programme « Image Studio Lite version 5.2 ». La **figure 23** montre que les échantillons de la phase stationnaire (ac1t4, ac1t3, ac4t4) présentent une quantité de protéine ATG8 en moyenne plus importante, ce qui est en accord avec les résultats de transcriptomique.



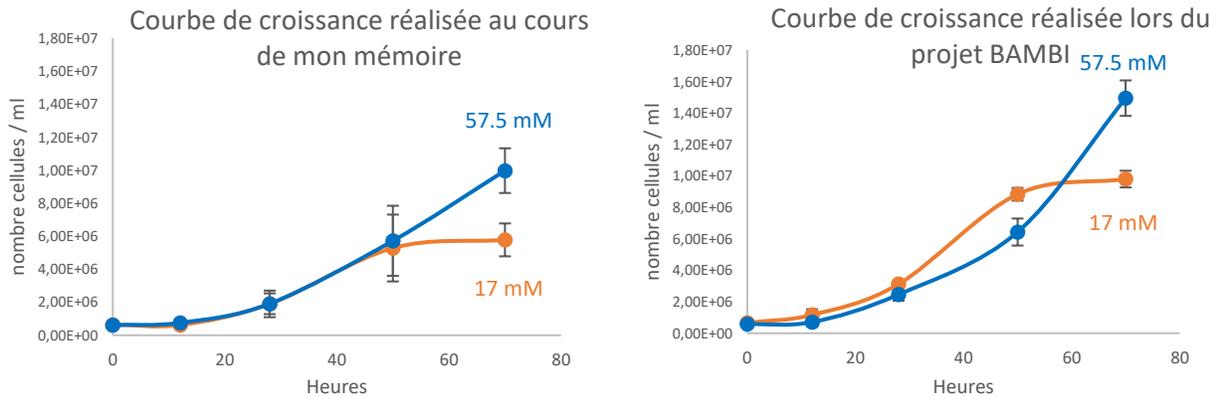
**Figure 23.** Intensités moyennes des signaux de la protéine ATG8 pour les échantillons ac1t4, ac1t3, ac4t4, ac4t3, ac4t2, ac1t2. L'écart-type est calculé à partir de 3 Western Blots

J'ai ensuite répété ces analyses à partir d'extraits obtenus lors de courbes de croissance que j'ai moi-même réalisées.

Pour ce faire, les algues sont cultivées en multicultivateur (cf. point c du « matériel et méthode »), trois tubes en concentration 17 mM et 3 tubes en concentration 57.5 mM. Ceci permet d'avoir 3

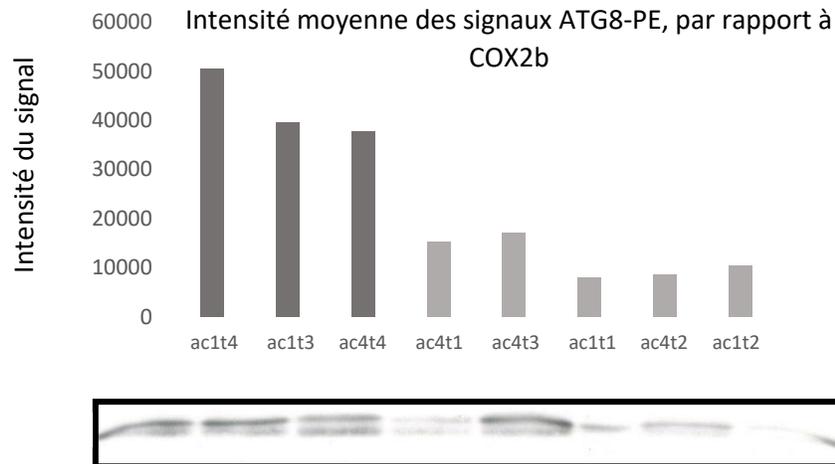
réplicats biologiques par temps pour les deux concentrations étudiées. A noter que chaque réplicat biologique est divisé en deux réplicats techniques.

La **figure 24** montre un exemple de courbe de croissance. Lors de chaque analyse, nous avons vérifié que le profil de la courbe était similaire à celui réalisé lors des analyses transcriptomiques précédentes : le point 50h de la courbe 57,5 mM en acétate est toujours en phase de croissance alors que ce point est en phase stationnaire pour les cellules de la courbe 17 mM acétate.



**Figure 24.** A gauche, courbe de croissance réalisée au cours de mon mémoire, et à droite, courbe de croissance réalisée lors du projet BAMBI.

Ici, j'obtiens deux bandes pour ATG8 (**figure 25**, celle du dessus correspond à la protéine ATG8 native, et celle du dessous, correspond à la protéine fonctionnelle, clivée et attachée à un groupement phosphatidyléthanolamine (PE) (cf. description du fonctionnement d'ATG8 p34). C'est cette dernière que j'ai considérée pour mesurer l'intensité des signaux, et les rapporter en graphique.



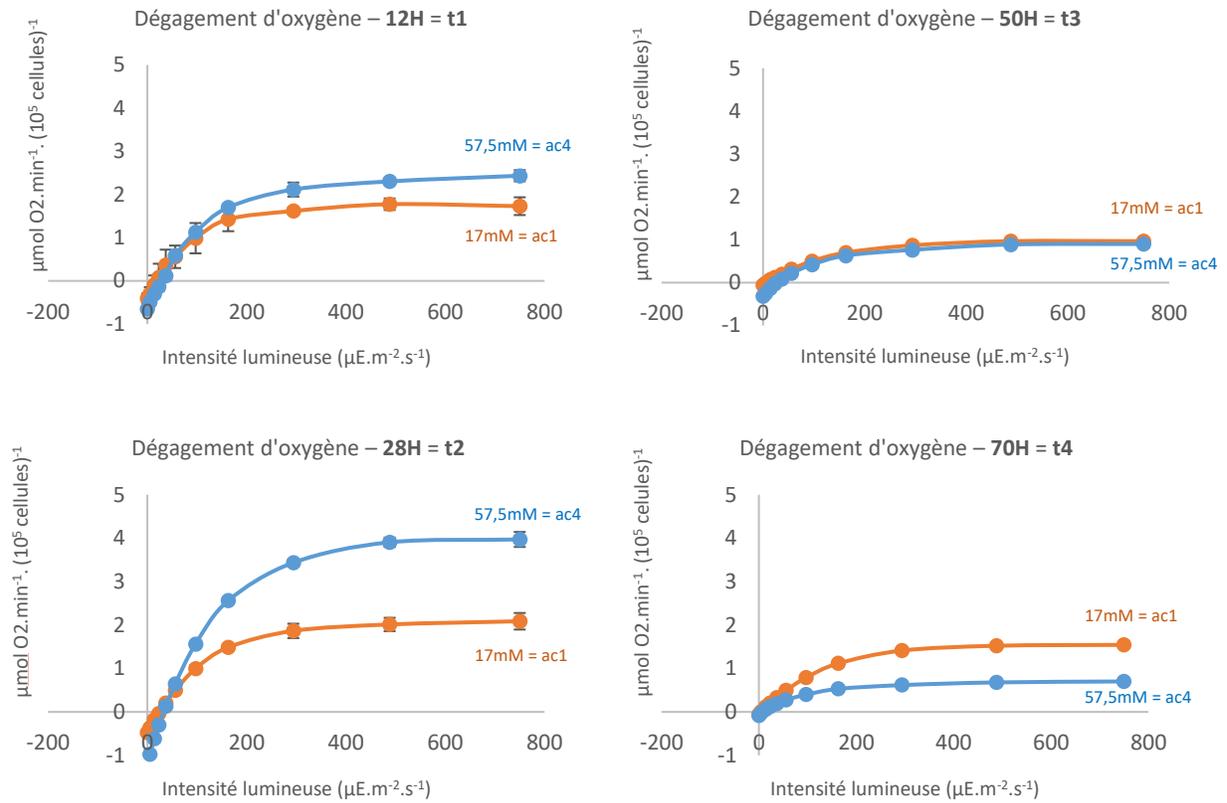
**Figure 25.** Intensités des signaux ATG8-PE : ac1t4, ac1t3, ac4t4, ac4t1, ac4t3, ac1t1, ac4t2, ac1t2. Les intensités des signaux sont quantifiées par rapport à COX2b.

Les conclusions sont les mêmes que précédemment : nous observons bien une quantité de protéine ATG8 plus importante dans les échantillons en phase stationnaire. ATG8 étant une protéine clé de l'autophagie (Pe et al., 2010), nous pouvons donc conclure que la voie biochimique de l'autophagie est bien plus importante dans les échantillons en phase stationnaire que ceux de la phase exponentielle, comme le suggère l'analyse « surprisal » réalisée sur les données transcriptomiques au cours du projet BAMBI. En effet, l'analyse « surprisal » place bien les points ac1t3, ac4t4, ac1t3, ac4 dans le même ensemble ( $\lambda_1$  négatif) et les points ac1t1, ac1t2, ac4t1, ac4t2, ac4t3 dans l'autre ensemble ( $\lambda_1$  positif) (cf. **figure 5**).

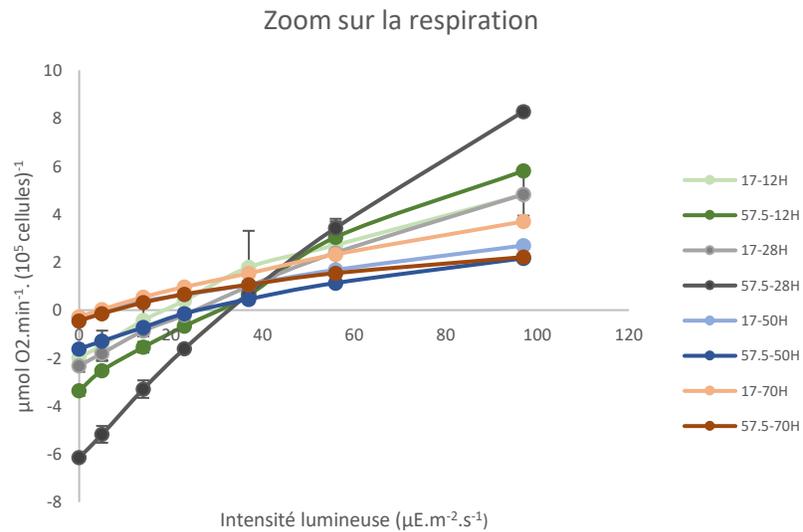
## b. Mesures de dégagement d'oxygène des cultures

J'ai ensuite tenté de vérifier que les échantillons en phase exponentielle photosynthétisent plus que les échantillons en phase stationnaire.

Pour ce faire, j'ai mesuré les courbes de dégagement d'oxygène à l'aide de l'électrode Clark de cellules cultivées aux concentrations extrêmes d'acétate, 17 et 57,5 mM, aux différents points de prélèvements ( $t_1=12h$ ,  $t_2=28h$ ,  $t_3=50h$  et  $t_4=70h$ ). Lors de ces analyses, 1,5 ml de cellules sont transférées à l'électrode de Clark et le dégagement d'O<sub>2</sub> est mesuré tel que décrit dans le matériel et méthodes.



**Figure 26a.** Courbes d'évolution de l'oxygène des 2 conditions de concentrations (ac1 et ac4) aux 4 temps (t1, t2, t3 et t4). Les mesures ont été réalisées au cours de 3 expériences indépendantes.



**Figure 26b.** Zoom sur la respiration des courbes d'évolution de l'oxygène.

## Observation

On constate que les cellules en phase exponentielle (point 12h=t1 et 28h=t2) dégagent plus d'oxygène que les cellules à 50h et 70h. Ce point est en accord avec l'analyse des données transcriptomiques selon la méthode « surprisal » qui place les points ac1t1, ac1t2, ac4t1 et ac4t2 dans le même ensemble ( $\lambda_1$  positif). Seul le point ac4t3 ne semble pas pouvoir être associé alors qu'il possède également une valeur de  $\lambda_1$  positive (cf. **figure 5**).

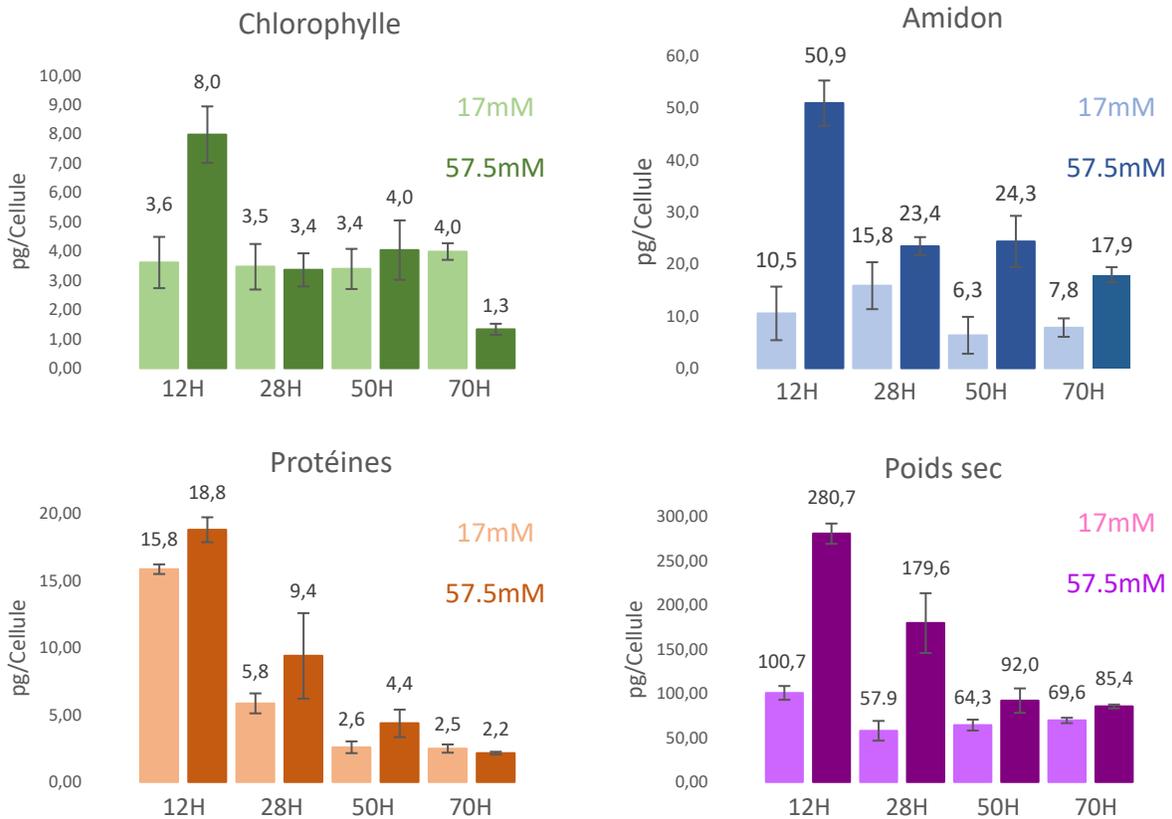
On constate également que le point de compensation (moment où la consommation d'O<sub>2</sub> est nulle) est atteint pour des intensités de lumière plus élevées à 57,5 mM qu'à 17 mM.

Finalement, on remarque que le dégagement d'oxygène est assez stable pour la condition 17 mM alors que le dégagement d'oxygène diminue au cours du temps pour la condition 57,5 mM

## ii. Analyses métaboliques complémentaires

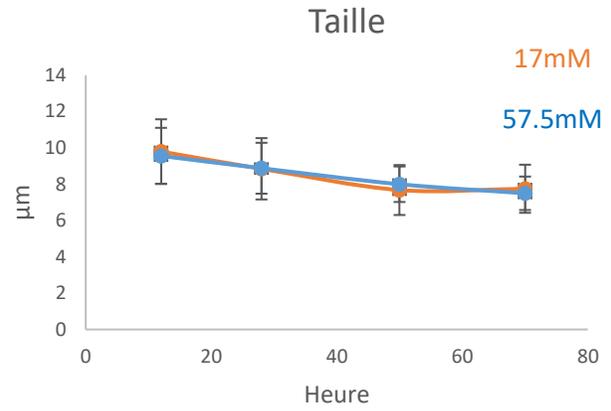
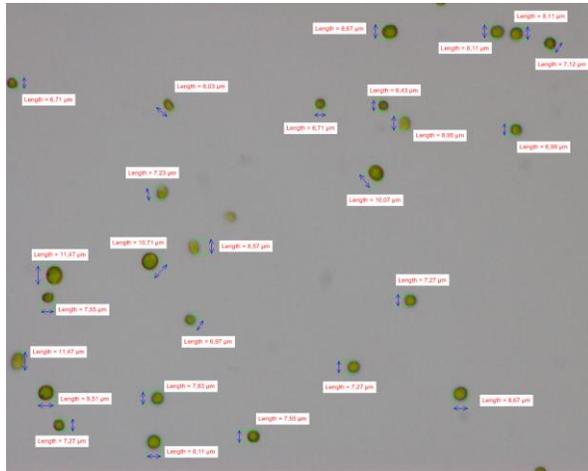
Comme le dégagement d'O<sub>2</sub> est plus important aux deux premiers points de croissance en 57,5 mM en acétate, je me suis ensuite demandé si la concentration en acétate a un impact sur le contenu en biomasse. Pour ce faire, j'ai réalisé de nouvelles courbes de croissance à 17 et 57,5 mM et prélevé des échantillons aux temps 12h, 28h, 50h et 70h.

Les valeurs obtenues pour les différents constituants (chlorophylle, amidon et protéines) et le poids sec sont du même ordre de grandeur que celles décrites précédemment au laboratoire (Roberty et al., 2014) (Willamme et al., 2015) en ce qui concerne la concentration 17 mM et la phase exponentielle. On constate que le contenu en chlorophylles, amidon, et protéines est en général plus élevé pour la concentration 57,5 mM, ce qui se traduit par un poids sec plus élevé (**figure 27**).



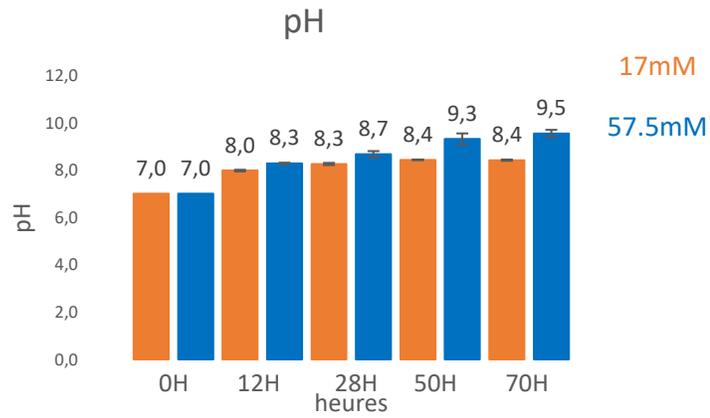
**Figure 27.** Quantité de chlorophylle, d'amidon, de protéines et poids sec (pg/cellule) : ac1t1, ac4t1, ac1t2, ac4t2, ac1t3, ac4t3, ac1t4, ac4t4.

Vu que le poids sec est plus élevé à la concentration 57,5 mM, je me suis demandé si cela pouvait avoir un impact sur la taille des cellules. Les cellules de *Chlamydomonas* étant ovoïdes, j'ai donc mesuré la longueur maximale des cellules au microscope (Imaging Software, NIS-Elements, version 4.0, NIKON). On constate qu'il n'y a pas de différences significatives au niveau de la taille des cellules (mesures réalisées sur 100 cellules) entre les deux concentrations d'acétate.



**Figure 28.** Exemple de mesure des cellules et évolution de la taille des cellules au cours du temps.

De plus, le pH du milieu de culture a également été mesuré. Il est plus élevé pour la concentration 57,5 mM.



**Figure 29.** pH des milieux de cultures.

# V. Discussion/conclusion, perspectives

## 1. Mutant de la malate synthase

Après un sous-clonage du mutant reçu de la banque sur milieu contenant de la paromomycine, des colonies de tailles différentes poussent. Toutes possèdent une cassette de résistance fonctionnelle à la paromomycine.

Pour vérifier la position de cette cassette de résistance, 3 paires de primers ont été dessinées. La première encadre la cassette, la deuxième sort de la cassette au niveau de l'extrémité 5' phosphate et la troisième sort de la cassette au niveau de l'extrémité 3' OH. Aucune PCR n'a donné de résultats concluants concernant la position supposée de la cassette d'insertion, quel que soit le type de colonie analysée (grande, moyenne ou petite).

Ensuite, j'ai cultivé les colonies de différentes tailles (grande, moyenne et petite) ainsi que la souche contrôle WT sous différentes conditions lumineuses (lumière contrôle, lumière atténuée et obscurité), en présence d'acétate. Toutes les souches sont capables de pousser à l'obscurité, ce qui ne correspond pas au phénotype d'un mutant malate synthase, qui devrait être incapable d'assimiler l'acétate.

Afin de confirmer ou d'infirmer la présence du transcrite de la malate synthase, j'ai réalisé un Northern Blot. Celui-ci révèle la présence des transcrits de la malate synthase.

Nous pouvons conclure que le mutant acheté dans la banque de mutants aux Etats-Unis n'est pas correct : il ne possède pas la cassette de résistance à la paromomycine au bon endroit. Le problème peut se situer à plusieurs niveaux : mapping de l'insertion, mélange des mutants lors des repiquages puisque la banque en contient un nombre très élevé (54000) ou maintenance du mutant MAS1 après son isolement. En effet, les mutants sont maintenus en présence d'acétate et à faible lumière (Li et al., 2016). L'activité photosynthétique étant peu élevée puisque les cultures sont maintenues en lumière faible, la croissance des transformants repose donc sur l'utilisation de l'acétate. Ce type de maintenance est donc davantage favorable aux mutants photosynthétiques qu'aux mutants incapables d'assimiler l'acétate, qui requièrent la lumière pour

croître. D'ailleurs, peu de mutants respiratoires inactivés dans la chaîne de transport d'électrons mitochondriales ont été repérés dans la banque par le laboratoire d'accueil.

## 2. Analyses métaboliques de l'acétate

Au cours de mon mémoire, j'ai également étudié l'adaptation de *Chlamydomonas* à des concentrations élevées en acétate. Pour ce faire, des courbes de croissance à différentes concentrations en acétate ont été réalisées et des échantillons prélevés à différents moments (18h-28h-50h et 70h). Le choix des concentrations (17, 31, 44, 57,5 mM) repose sur des analyses ultérieures à ma venue : 17 mM est la concentration contrôle, recommandée dans les articles (Harris 1989). Bien que la croissance ait été observée à des concentrations supérieures à la concentration maximale (57,5 mM) utilisée, celle-ci n'était plus du tout reproductible et les courbes de croissance obtenues variaient d'une expérience à l'autre. La concentration de 57,5 mM en acétate a donc été choisie comme limite supérieure et, comme j'ai pu le vérifier, elle permet d'obtenir des croissances reproductibles.

Dans un premier temps, je me suis demandé si l'analyse des données transcriptomiques par la méthode « surprisal » pouvait être corrélée à des données expérimentales. Pour rappel, cette analyse permet de distinguer les échantillons en phase stationnaire de ceux en phase exponentielle et d'associer les gènes et voies biochimiques liées à ces 2 phénotypes. Comme l'autophagie est proposée comme une voie biochimique importante pour expliquer la phase stationnaire, j'ai réalisé des Western Blots pour détecter la protéine ATG8, une protéine clé de l'autophagie. J'ai analysé deux types d'échantillons : des échantillons conservés à -80°C et provenant de l'analyse transcriptomique et de nouveaux échantillons, réalisés au cours de mon mémoire. Dans les 2 cas, la protéine ATG8 se retrouve en quantité plus importante dans les échantillons provenant de la phase stationnaire. Sur les Western blots réalisés sur les échantillons provenant de mes propres courbes, je détecte également la protéine ATG8 active, c'est-à-dire clivée et couplée à un groupement phosphatidyléthanolamine (PE). Cette forme est probablement plus fragile que la forme inactive, ce qui explique sa disparition des échantillons ayant séjourné plusieurs mois dans le congélateur -80°C. L'autophagie est un processus déclenché en cas de stress chez *Chlamydomonas* : privation de nutriments (azote, carbone, ou soufre), stress aux métaux, stress oxydant (ROS), dommages photo-oxidatifs générés par une déficience en caroténoïdes, stress dû à une forte intensité lumineuse, stress dû au froid, stress dû à

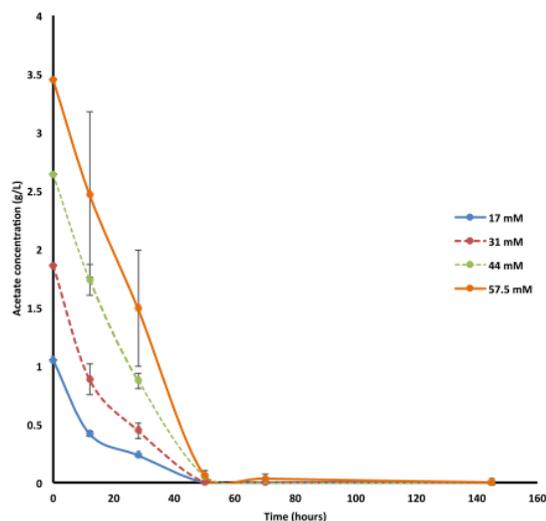
l'accumulation de protéines non repliées dans le réticulum endoplasmique et également stress dû à la phase stationnaire (Pérez-Martín et al., 2015).

J'ai également effectué des mesures du dégagement d'oxygène à l'aide de l'oxygraphe (**figure 26**). Ces mesures me permettent de montrer que les algues en phase de croissance exponentielle dégagent plus d'oxygène que les algues en phase stationnaire, quelle que soit la concentration en acétate, ce qui confirme les résultats obtenus par l'analyse « surprisal » des données transcriptomiques.

Si on regarde ce qui différencie les algues cultivées aux différentes concentrations en acétate, on remarque que les algues en conditions 57,5 mM en acétate respirent plus comparativement aux algues en condition 17 mM en acétate. Cependant l'écart se réduit au temps 50H et disparaît quasiment au temps 70H.

De plus, les algues en conditions 57,5 mM en acétate produisent plus d'oxygène que les algues en conditions 17 mM en acétate aux temps 12H et 28H. Ceci n'est plus vrai aux temps 50H et 70h, où les courbes se rapprochent.

Les différences observées (respiration et dégagement d'O<sub>2</sub>) pour la courbe à 57,5 mM en acétate pour les temps courts (12H et 28H) pourraient être expliquées en regardant la consommation d'acétate. En effet, le dosage de l'acétate au cours du temps a été réalisé au labo avant mon arrivée et on remarque qu'à 50H il n'y a plus d'acétate dans le milieu (**figure 30**), quelle que soit la concentration en acétate de départ.

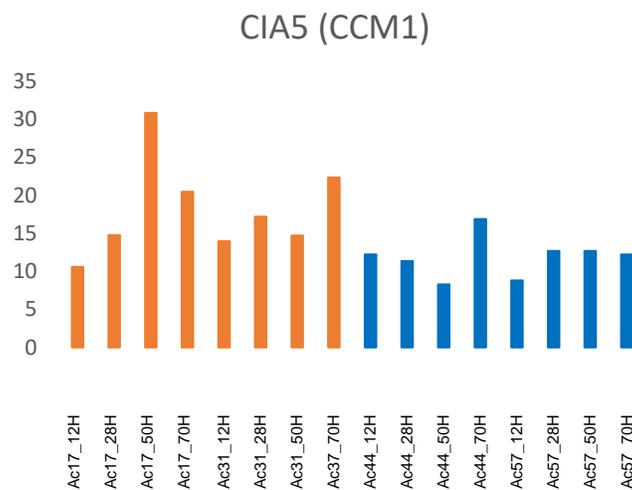


**Figure 30.** Evolution de la concentration en acétate dans le milieu au cours du temps pour les quatre conditions de départ (17, 31, 44 et 57,5 mM en acétate). L'écart-type est calculé à partir de 3 expériences indépendantes.

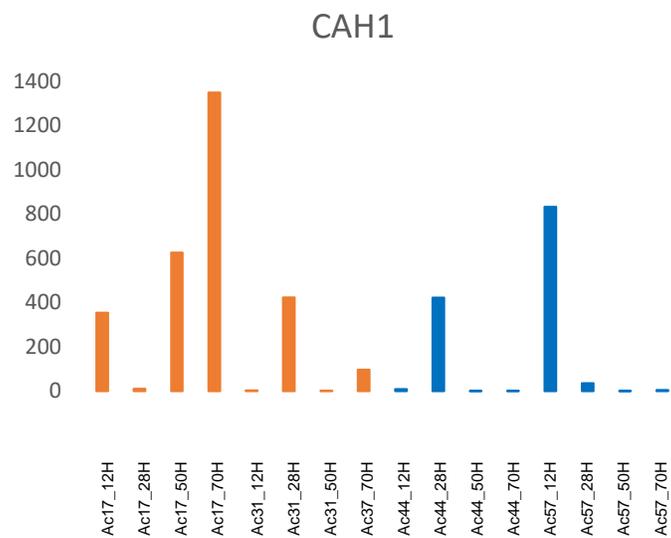
Donc, tant qu'il y a de l'acétate présent, on observe des différences suivant la concentration, par contre, lorsque celui-ci est épuisé, les différences s'amenuisent.

Le dégagement d'O<sub>2</sub> plus élevé pour les algues en conditions 57,5 mM en acétate aux temps 12H et 28H pourrait s'expliquer par la respiration plus importante pour ces algues à ces temps. En effet, dans ces conditions, le dégagement de CO<sub>2</sub> sera également plus important. Ce CO<sub>2</sub> peut être fixé dans le cycle de Calvin, ce qui stimule la photosynthèse. Une fois l'acétate consommé, la respiration est moins importante et les différences disparaissent.

L'hypothèse concernant la meilleure disponibilité en CO<sub>2</sub> chez les algues cultivées à la concentration 57,5 mM peut être étayée en regardant l'expression des gènes liés au Carbon Concentration Mechanism (CCM) (Fang et al., 2012) dans les analyses transcriptomiques. Les **figures 31 et 32** montrent en effet que plus la concentration en acétate est élevée, moins l'expression des gènes liés au CCM est importante. Le gène CIA5 code pour un régulateur du CCM tandis que le gène CAH1 code pour une anhydrase carbonique localisée dans le périplasma (Yoshioka et al., 2004).



**Figure 31.** Niveau d'expressions du gène CIA5 pour toutes les conditions.



**Figure 32.** Niveau d'expressions du gène CAH1 pour toutes les conditions.

L'augmentation du dégagement d'O<sub>2</sub> aux temps courts à la concentration 57,5 mM et la meilleure disponibilité en CO<sub>2</sub> entraînent une augmentation significative de la biomasse. Ceci pourrait être utilisé en cas d'application industrielle, si le but est d'obtenir le plus de biomasse possible.

# Bibliographie

- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Hsu, P. D., Marraffini, L. a. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/VCas Systems. *Science*, 339(6121), 819–823. doi:10.1126/science.1231143.
- Dent, R. M., Haglund, C. M., Chin, B. L., Kobayashi, M. C., & Niyogi, K. K. (2005). Functional genomics of eukaryotic photosynthesis using insertional mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 545–56. doi:10.1104/pp.104.055244
- Emonds-Alt, B., Coosemans, N., Gerards, T., Remacle, C., & Cardol, P. (2016). Isolation and characterization of mutants corresponding to the MENA, MENB, MENC, and MENE enzymatic steps of 5'-monohydroxyphyloquinone biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 4, 141–154. doi:10.1111/tpj.13352
- Fang, W., Si, Y., Douglass, S., Casero, D., Merchant, S. S., Pellegrini, M., Spalding, M. H. (2012). Transcriptome-Wide Changes in *Chlamydomonas reinhardtii* Gene Expression Regulated by Carbon Dioxide and the CO<sub>2</sub>-Concentrating Mechanism Regulator CIA5/CCM1. *The Plant Cell*, 1876–1893. doi:10.1105/tpc.112.097949
- Goodenough, U., Blaby, I., Casero, D., Gallaher, S. D., Goodson, C., Johnson, S., Wulan, T. (2014). The path to triacylglyceride obesity in the sta6 strain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 13, 591–613. doi:10.1128/EC.00013-14
- Heifetz, P. B. (2000). Effects of acetate on facultative autotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii* assessed by photosynthetic measurements and stable isotope analyses. *Plant Physiology*, 122(April), 1439–1445. doi:10.1104/pp.122.4.1439
- Johnson, X., & Alric, J. (2012). Interaction between Starch Breakdown , Acetate Assimilation , and Photosynthetic Cyclic Electron Flow in *Chlamydomonas*, 287(31), 26445–26452. doi:10.1074/jbc.M112.370205
- Kornberg, H., & Krebs, H. (1957). *Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle*. *Nature* (pp. 179(4568):988–91).
- Lauersen, K. J., Willamme, R., Coosemans, N., Joris, M., Kruse, O., & Remacle, C. (2016). Peroxisomal microbodies are at the crossroads of acetate assimilation in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *ALGAL*, 16, 266–274. doi:10.1016/j.algal.2016.03.026
- Li, X., Zhang, R., Patena, W., Gang, S. S., Blum, S. R., Ivanova, N., Jonikas, M. C. (2016). An Indexed, Mapped Mutant Library Enables Reverse Genetics Studies of Biological Processes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 367–387. doi:10.1105/tpc.15.00465

- Massoz, S. (2017). *Chlamydomonas Biology, Biotechnology and Biomedicine*. (M. Hippler, Ed.) (Microbiolo., p. part. 1, chapter 6).
- Pe, E., Florencio, F. J., & Crespo, L. (2010). Inhibition of Target of Rapamycin Signaling and Stress Activate Autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii* 1 [ W ], 152(April), 1874–1888. doi:10.1104/pp.109.152520
- Pérez-Martín, M., Blaby-Haas, C. E., Pérez-Pérez, M. E., Andrés-Garrido, A., Blaby, I. K., Merchant, S. S., & Crespo, J. L. (2015). Activation of autophagy by metals in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 14(9), 964–973. doi:10.1128/EC.00081-15
- Remacle, F., Kravchenko-Balasha, N., Levitzki, A., & Levine, R. D. (2010). Information-theoretic analysis of phenotype changes in early stages of carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(22), 10324–9. doi:10.1073/pnas.1005283107
- Remacle, F., & Levine, R. D. (2015). Statistical thermodynamics of transcription profiles in normal development and tumorigenesis in cohorts of patients. *European Biophysics Journal*, 44, 709–726. doi:10.1007/s00249-015-1069-y
- Roberty, S., Emonds-alt, B., Willamme, R., Duby, F., Dhali, D. O., Thonart, P., Remacle, C. (2014). Lack of isocitrate lyase in *Chlamydomonas* leads to changes in carbon metabolism and in the response to oxidative stress under mixotrophic growth, 404–417. doi:10.1111/tpj.12392
- Sizova. (2013). Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases. *Plant Journal*, 73, 873–882. doi:10.1111/tpj.12066
- Willamme, R., Alsafr, Z., Arumugam, R., Eppe, G., Remacle, F., Levine, R. D., & Remacle, C. (2015). Metabolomic analysis of the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated under day/night conditions. *Journal of Biotechnology*, 215, 20–26. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.04.013
- Yang, W., Catalanotti, C., D'Adamo, S., Wittkopp, T. M., Ingram-Smith, C. J., Mackinder, L., Posewitz, M. C. (2014). Alternative Acetate Production Pathways in *Chlamydomonas reinhardtii* during Dark Anoxia and the Dominant Role of Chloroplasts in Fermentative Acetate Production. *The Plant Cell Online*, 4499–4518. doi:10.1105/tpc.114.129965
- Yoshioka, S. (2004). The Novel Myb Transcription Factor LCR1 Regulates the CO<sub>2</sub>-Responsive Gene *Cah1*, Encoding a Periplasmic Carbonic Anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell Online*, 1466–1477. doi:10.1105/tpc.021162
- Zhang, R., Patena, W., Armbruster, U., Gang, S. S., Blum, S. R., & Jonikas, M. C. (2014). High-Throughput Genotyping of Green Algal Mutants Reveals Random Distribution of Mutagenic Insertion Sites and Endonucleolytic Cleavage of Transforming DNA. *The Plant Cell*, 1398–1409. doi:10.1105/tpc.114.124099

